

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

KLINIK UND POLIKLINIK
FÜR STRAHLENTHERAPIE UND RADIOLOGISCHE ONKOLOGIE
KLINIKUM RECHTS DER ISAR
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Molls)

**Evaluierung eines tumorspezifischen
Antikörpers zur Immuntherapie Hsp70-
membranpositiver Tumore im *in-vivo* Modell**

Kristin Kuhs

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. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. G. Multhoff

2. Univ.- Prof. Dr. M. Molls

Diese Dissertation wurde am 28.05.2013 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 04.06.2014
angenommen.

In Liebe für meine Eltern und meinen Bruder

Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen, dass Dinge so sind, wie sie sind.

- *Aristoteles* -

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Monoklonale Antikörper	5
1.1.1	Struktur eines Antikörpers.....	5
1.1.2	Wirkweise monoklonaler Antikörper.....	6
1.2	ADCC-kompetente Immuneffektorzellen	8
1.2.1	Natürliche Killerzellen	8
1.2.2	Makrophagen	10
1.2.3	Granulozyten.....	11
1.3	Tumorerfiltrierende Lymphozyten.....	13
1.4	Hitzeschockproteine.....	14
1.4.1	Hitzeschockprotein 70.....	14
1.4.2	Intrazelluläres Hitzeschockprotein 70	15
1.4.3	Extrazelluläres Hitzeschockprotein 70	16
1.4.4	Plasmamembran-gebundenes Hitzeschockprotein 70	17
2	Zielsetzung der Arbeit	19
3	Methoden	20
3.1	Herstellung von Lösungen	20
3.1.1	Pufferlösungen.....	20
3.1.2	Natrium-Azid-Lösung	20
3.1.3	BSA-Lösung 10%.....	20
3.1.4	BSA-Lösung 1%.....	21
3.1.5	DAB-Gebrauchslösung	21
3.1.6	Hämatoxylin	21
3.1.7	Herstellen einer Ethanolreihe.....	21
3.2	Gebrauchsansätze der Antikörper	22
3.2.1	Verdünnung der primären Antikörper.....	22
3.2.2	Verdünnung der sekundären Antikörper	23
3.3	Fixierung der Tumore in Formalin	23
3.4	Einbetten der Formalin-fixierten Tumore	23
3.5	Herstellung von Ultradünnschnitten	24
3.6	Immunhistochemie	24
3.6.1	Immunhistochemie ohne Kochen.....	24
3.6.2	Immunhistochemie mit Kochen.....	25
3.7	Mikroskopieren der Objektträger.....	26
4	Material	27
4.1	Chemikalien und Reagenzien	27
4.2	Lösungen	27

4.3	Puffer und Medien.....	28
4.4	Kits.....	29
4.5	Antikörper.....	29
4.5.1	Primärantikörper.....	29
4.5.2	Sekundärantikörper.....	29
4.6	Plastikmaterial.....	30
4.7	Sonstige Geräte.....	31
5	Ergebnisse.....	32
5.1	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit den Antikörpern Ly49b/CD56.....	33
5.2	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit dem Antikörper F4/80	38
5.3	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit dem Antikörper Ly6G/Ly6C.....	41
5.4	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit dem Antikörper CD3	43
6	Diskussion.....	47
6.1	Zusammenfassung und Interpretation der Versuchsergebnisse	47
6.2	Analyse der Eigenschaften des Antikörpers cmHsp70.1 im Vergleich mit bereits therapeutisch angewandten monoklonalen Antikörpern	50
6.3	Therapiespektrum des monoklonalen Antikörpers cmHsp70.1	52
6.4	Kritische Stellungnahme zur Therapie mit monoklonalen Antikörpern	55
7	Ausblick.....	57
8	Anhang.....	58
8.1	Abbildungsverzeichnis	58
8.2	Tabellenverzeichnis	61
8.3	Abkürzungsverzeichnis	63
8.4	Danksagung.....	66
9	Literaturverzeichnis.....	67
10	Zusammenfassung.....	81

1 Einleitung

Maligne Tumorerkrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen weltweit, dabei gehören Kolorektalkarzinome zu den zweithäufigsten Karzinomerkrankungen bei Männern und bei Frauen (Hofheinz et al. 2013). Die Inzidenz dieser Karzinomerkrankung beträgt zwischen 40-60/100.000/Jahr. Kolon- und Rektumkarzinome weisen histologisch und ätiologisch mehrere Gemeinsamkeiten auf. So besteht bei beiden Erkrankungen ein ähnliches Risikoprofil für die Erkrankung wie eine genetische Prädisposition, kolorektale Adenome in der Vorgeschichte, eine ballaststoffarme und fettreiche Ernährung, Adipositas und Bewegungsarmut oder chronisch entzündliche Darmerkrankungen. Bezüglich der operativen und adjuvanten Therapien ergeben sich im Hinblick auf beide Erkrankungen unterschiedlichen Ansätze (Hofheinz et al. 2013).

Im Folgenden soll ein Überblick über die Einteilung und Behandlungsmöglichkeiten von Kolonkarzinomen gegeben werden und im Weiteren soll auf die Therapiemöglichkeit mit monoklonalen Antikörpern und ihre Wirkweisen im Hinblick auf die durchgeführten Versuche näher eingegangen werden.

Die Einteilung von Kolorektalkarzinomen kann zum einen histologisch erfolgen in Adenokarzinome (mit 95% am häufigsten), neuroendokrine Tumore, Lymphome und andere, zum anderen kann eine Stadieneinteilung nach der UICC (Union internationale contre le cancer) oder nach der TNM-Klassifikation erfolgen.

Die Therapie bösartiger Tumorerkrankungen hat in den letzten Jahren ständig weitere Fortschritte verzeichnen können. In den meisten Fällen besteht die Tumorthherapie aus einem interdisziplinären Therapiekonzept, in das verschiedene medizinische Fachbereiche involviert sind. Dadurch ist es möglich, den Tumor bestmöglich zu behandeln. Wichtig für die erfolgreiche Behandlung ist die vorherige Einteilung in das richtige Stadium und den Differenzierungsgrad, das sog. Staging und Grading. Zum Staging gehören in der Regel ein Röntgenbild des Thorax, eine Oberbauchsonographie, eine Computertomographie des Thorax und des Abdomens sowie ggf. noch eine Knochenmarksbiopsie zur genaueren Aussage über die Ausbreitung der Erkrankung (Hofheinz et al. 2013).

Stadium	Primärtumor	Lymphknotenstatus	Fernmetastasen
0	Tis	N0	M0
I	T1/T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIc	T4b	N0	M0
IIIA	T1-2	N1 (1-3 betroffene LK)	M0
	T1	N2a (4-6 betroffene LK)	M0
IIIB	T3-4	N1 (1-3 betroffene LK)	M0
	T2-3	N2a (4-6 betroffene LK)	M0
	T1-2	N2b (>7 betroffene LK)	M0
IIIC	T4a	N2a (4-6 betroffene LK)	M0
	T3-T4a	N2b (>7 betroffene LK)	M0
	T4b	N1-2	M0
IVA	Jedes T	Jedes N	M1a (Fernmetastasen in 1 Organ)
IVB	Jedes T	Jedes N	M1b (Fernmetastasen in mehr als 1 Organ oder Peritoneum)

Tabelle 1: Einteilung der Kolonkarzinomerkrankung nach TNM- und UICC-Klassifikation (Wittekind et al. 2010)

Für das Grading ist eine histologische Probegewinnung erforderlich, mittels derer eine Aussage über den Differenzierungsgrad der Tumorzellen gemacht werden kann. Dabei unterscheidet man G1 bis G3. G1 steht für eine gute Differenzierung des Tumorgewebes mit einer hohen histologischen Übereinstimmung mit dem Ursprungsgewebe. G3 bedeutet eine schlechte Differenzierung und eine schlechte histologische Übereinstimmung mit dem Ursprungsgewebe. G2 liegt dazwischen und entspricht einem mäßig differenzierten Tumorgewebe.

Diagnostik	Untersuchungsverfahren
<u>Bei neu aufgetretenen Symptomen</u> , wie Änderungen der Stuhlgewohnheiten, Blut im Stuhl, Krämpfe oder Spasmen, Ileus, B-Symptomatik (Fieber, Gewichtsverlust, Nachtschweiß)	Digital rektale Untersuchung
	Komplette Koloskopie mit Biopsie
	Rekto-/ Sigmoidoskopie
	Virtuelle Koloskopie (Kapselendoskopie)
Ausbreitung und Therapieplanung	Röntgen-Thorax in 2 Ebenen
	Sonographie des Abdomens
	Computertomographie des Abdomens
	Computertomographie des Thorax
	Tumormarker Carcinoembryonales Antigen (CEA)

Tabelle 2: Diagnostik und Untersuchungsverfahren bei Verdacht auf ein Kolonkarzinom (Hofheinz et al. 2013)

Für die verschiedenen Stadien der Erkrankung gibt es unterschiedliche Therapiekonzepte. Im Allgemeinen besteht das Therapiekonzept aus der chirurgischen Resektion und der Strahlen- und Chemotherapie. Bei einer Erstdiagnose eines malignen Tumors werden die betroffenen Patienten i.d.R. in einer interdisziplinären Tumorkonferenz vorgestellt und gemeinschaftlich ein individuelles Therapiekonzept für jeden Patienten entwickelt. Ziel eines kurativen Ansatzes ist eine komplette Resektion des Primärtumors (Hofheinz et al. 2013). Bei Kolonkarzinomen gehört dazu eine En-Bloc-Resektion tumoradhärenter Organe, eine Resektion im Gesunden mit einem Sicherheitsabstand, der mikroskopisch 10cm tumorfreie Resektionsränder zeigt und zusätzlich die Entfernung lokoregionärer Lymphknotenpakete (>12 Lymphknotenpakete) (Hofheinz et al. 2013). Je nach dem Erkrankungsstadium kann die chirurgische Resektion durch eine

adjuvante oder neoadjuvante Therapie mittels einer Chemo- oder Strahlentherapie ergänzt werden. Im Stadium I-III ist eine alleinige Resektion in der Regel zielführend. Im Stadium IV mit Fernmetastasen wird zwischen potentiell resektablen Metastasen und nicht resektablen Metastasen unterschieden. Resektable Metastasen wie beispielsweise isolierte Lungen- oder Lebermetastasen können operativ entfernt werden und im Anschluss eine adjuvante medikamentöse Therapie initiiert werden. Eine weitere Therapieansatz kann auch zuerst ein sog. „Downstaging“ sein, damit ist eine medikamentöse Verkleinerung der Metastasen gemeint, um sie besser operativ resezierbar zu können (Hofheinz et al. 2013).

Neben den bereits beschriebenen chirurgischen, chemo- und strahlentherapeutischen Möglichkeiten wird zunehmend die Beeinflussung des Immunsystems als Therapieoption genutzt. In diesem Fall spielen vor allem zielgerichtete Antikörpertherapien eine wichtige Rolle. Die Behandlung von Tumorerkrankungen mittels einer zielgerichteten Antikörpertherapie wird bei einigen Tumorerkrankungen bereits in der Klinik eingesetzt. Dabei steht man in der klinischen Praxis oft vor der Schwierigkeit, dass durch die Therapie mit monoklonalen Antikörpern nicht nur die Tumorzellen angegriffen werden, sondern z.T. auch gesundes Gewebe. Deshalb ist das Bestreben, Tumorerkrankungen zielgerichteter therapieren zu können, von großem wissenschaftlichem Interesse. Gesucht wird nach einer Target-Struktur, die nur auf Tumorzellen vorhanden ist, nicht aber auf dem dazugehörigen Normalgewebe. Eine solche Zielstruktur scheint das Hsp70-Molekül zu verkörpern, da es auf bestimmten Tumorentitäten auf der Membranoberfläche exprimiert wird, nicht aber auf dem dazugehörigen Normalgewebe (Pfister, Radons et al. 2007). Der Arbeitsgruppe Multhoff ist es gelungen, einen Antikörper zu generieren, der zielgerichtet das Hsp70-Molekül auf bestimmten Tumorzellen ansteuert. *In-vitro* konnte bereits gezeigt werden, dass cmHsp70.1 zur Auslösung der Antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) fähig ist. Daher ist das Ziel dieser Arbeit nachzuweisen, dass cmHsp70.1 auch *in-vivo* die Fähigkeit besitzt, über die Auslösung der ADCC zu einem signifikanten Abtöten von Tumorzellen zu führen. Dies soll anhand eines immunhistochemischen Nachweises von ADCC-kompetenten Immuneffektorzellen innerhalb des Tumors, nach stattgehabter Therapie mit dem monoklonalen Antikörper cmHsp70.1 untersucht werden.

1.1 Monoklonale Antikörper

Im menschlichen Körper werden Antikörper von B-Lymphozyten produziert und sind gegen ein spezifisches Antigen gerichtet. Für die Therapie von Tumorerkrankungen werden v.a. gentechnisch hergestellte monoklonale Antikörper angewendet. Physiologisch entstehen monoklonale Antikörper im Rahmen eines multiplen Myeloms. So synthetisieren die malignen Plasmazellen nur einen einzigen Typ Antikörper. Im Gegensatz dazu sind Antikörper, die bei einer physiologischen Immunreaktion gebildet werden polyklonal, d.h. gegen verschiedene Epitope gerichtet. Monoklonale Antikörper können auch synthetisch hergestellt werden. Dazu bedient man sich der Hybridomtechnik. Um monoklonale Antikörper gegen ein spezifisches Antigen zu produzieren, wird eine Maus oder eine Ratte mit diesem Antigen immunisiert. Dadurch kommt es innerhalb des Tieres zu einer Antikörperproduktion durch B-Lymphozyten. Diese B-Lymphozyten können aus der Milz des Tieres isoliert werden und mit Zellen, die aus einer Myelomzelllinie gewonnen werden, fusioniert werden. Dadurch entstehen sog. Hybridomzellen, die die Eigenschaften beider Zelllinien vereinen. Es sind immortalisierte Zellen, die in der Lage sind einen spezifischen Antikörpertyp fortlaufend zu produzieren (Janeway et al. 2001). Für die Entwicklung der Hybridomtechnik und damit für die Entwicklung monoklonaler Antikörper schuf Niels K. Jerne durch seine wissenschaftlichen Arbeiten die Grundlage. Aus diesem Grund wurde ihm zusammen mit Georges Köhler und César Milstein 1984 der Nobelpreis für Medizin verliehen (Iannello, Ahmad 2005). Heutzutage gibt es eine Vielzahl monoklonaler Antikörper und ein enormes wissenschaftliches Interesse für diesen Forschungsbereich. Im folgenden Abschnitt soll ein Überblick über die Struktur eines Antikörpers und über die Wirkmöglichkeiten monoklonaler Antikörper gegeben werden.

1.1.1 Struktur eines Antikörpers

Ein Antikörper besteht aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Ketten. Diese werden durch kovalente Disulfidbrücken zusammengehalten. Bei den leichten Ketten unterscheidet man eine variable Domäne, die mit V_L bezeichnet wird, von einer konstanten Domäne, die mit C_L bezeichnet wird. Im Gegensatz dazu werden bei der schweren Kette eine variable Domäne und drei bzw. vier konstante Domänen unterschieden. Die sog. Antigenbindungsstelle, an der ein Antikörper an ein Antigen bindet, wird von den variablen Abschnitten einer schweren und einer leichten Kette

gebildet. Bei den Leichtketten kann je nach Subklasse ein Typ κ oder λ unterschieden werden. Beide Leichtketten bilden gemeinsam mit den schweren Ketten den Antigenbindenden F_{ab} - Teil eines Antikörpers (Janeway et al. 2001).

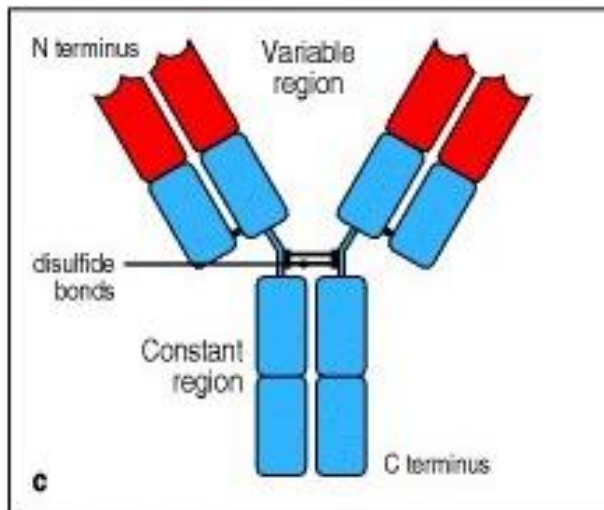


Abbildung 1: schematische Darstellung eines Antikörpermodells (Janeway et al. 2001)

1.1.2 Wirkweise monoklonaler Antikörper

1.1.2.1 Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC)

Die Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) ist ein Immuneffektormechanismus für das gezielte Abtöten von mit Antikörpern markierten Zielzellen. Für die erfolgreiche Durchführung der ADCC sind drei Voraussetzungen von Bedeutung. Erstens muss das Zielantigen auf der Zielzelle, beispielsweise einer Tumorzelle, exprimiert werden, zweitens ist das Vorhandensein des Antigen-spezifischen Antikörpers und drittens das Vorhandensein einer Fc-Rezeptor-tragenden Effektorzelle erforderlich (Iannello, Ahmad 2005).

Es kommt zu einer Antigen-Antikörper-Bindung auf der Zelloberfläche der markierten Zielzellen, indem das Fc-Fragment des Antikörpers an den Fc-Rezeptor der Effektorzelle bindet. Durch die Bindung kommt es zur Quervernetzung der Fc-Rezeptoren auf der Zielzelle und aktiviert diese zur Ausführung ihrer Funktion.

Es gibt eine Reihe von Effektorzellen, die in der Lage sind, die ADCC zu vermitteln. Dazu gehören NK-Zellen, die die Hauptgruppe der Effektorzellen ausmachen, Makrophagen und neutrophile Granulozyten (Iannello, Ahmad 2005). NK-Zellen vernichten ihre Zielzellen hauptsächlich durch Perforine oder Granzyme, die in ihren zytotoxischen Granula enthalten sind. Makrophagen können Stickstoffmonoxyd (NO) freisetzen oder andere Sauerstoffradikale. Zusätzlich sind sie in der Lage, Antikörpermarkierte Tumorzellen zu phagozytieren.

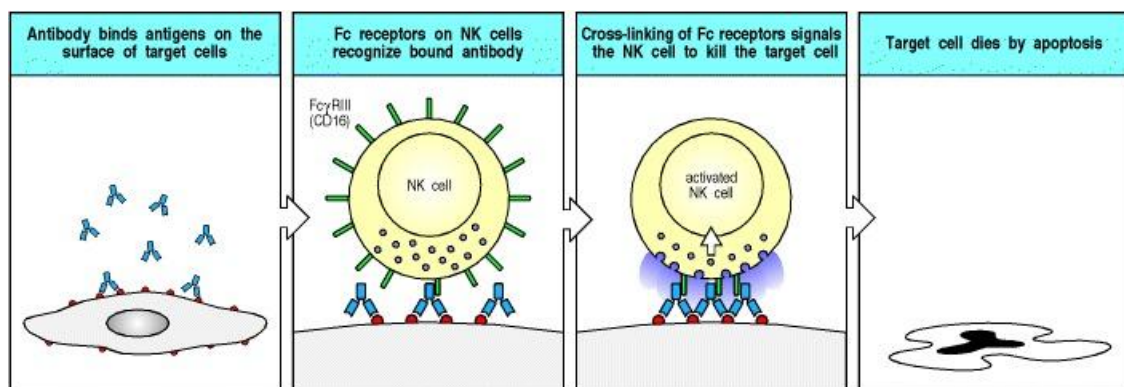


Abbildung 2: schematische Abbildung der ADCC vermittelt über NK-Zellen (Janeway et al. 2001)

1.1.2.2 CDC (Komplementabhängige Zytolyse)

Die CDC ist auch ein Mechanismus zur Abtötung von Zellen ähnlich der ADCC. Dabei bindet ein Antikörper an ein Antigen, das an der Zelloberfläche präsentiert wird. Es kommt zur Aktivierung des Komplementsystems über den Komplementfaktor C1q, an dessen Ende die Bildung des Membranangriffskomplexes steht. Durch den Membranangriffskomplex kommt es zur Porenbildung in der Zellmembran der Zielzelle und folglich zur Lyse (Adams, Weiner 2005). C1q scheint für diesen Mechanismus sehr wichtig zu sein, da gezeigt werden konnte, dass bei immunkompetenten Mäusen die Gabe des monoklonalen Antikörpers Rituximab zu 100% murine Mauslymphomzellen abtöten konnte. Dies konnte jedoch bei syngenen Knock-out Mäusen, die keinen Komplementfaktor C1q aufwiesen, nicht nachgewiesen werden (Di Gaetano, Cittera et al. 2003), (Dugdale, Pinchbeck et al. 2005).

1.1.2.3 Beeinflussung der Signaltransduktion

Wachstumsfaktorrezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei Prozessen innerhalb der Zelle. Über sie werden die Stimuli zur mitotischen Zellteilung gegeben. Wenn diese Rezeptoren überstimuliert sind, zum Beispiel im Falle eines malignen Tumors, wird durch diese die rasche Teilung und damit die Vervielfachung der Tumorzellen geebnet. Einige der monoklonalen Antikörper richten sich gegen Rezeptoren von Wachstumsfaktoren. Dazu gehören Antikörper, die gegen Mitglieder der EGFR-Familie gerichtet sind.

Neben den bereits genannten Wirkmöglichkeiten monoklonaler Antikörper gibt es noch den Mechanismus der Immunmodulation und die Möglichkeit, dass monoklonale Antikörper dazu benutzt werden, toxische Metaboliten, z.B. Radioisotope, an den Tumor heranzubringen. Es gibt Antikörper wie z.B. Ibritumomab-Tiuxetan (Zevalin®), die auf das CD20 Oberflächenmolekül auf B-Zellen zielen und in der Lage sind, ein β -Strahlen abgebendes Radioisotop an den Tumor heranzubringen. Der monoklonale Antikörper wirkt gezielt auf alle Zellen, die CD20 auf ihrer Oberfläche tragen und setzt sie für eine längere Zeit den radioaktiven Strahlen aus. Im Rahmen von Non-Hodgkin-Lymphomen sind mit dieser Therapie bereits Erfolge erzielt worden (Adams,Weiner 2005).

1.2 ADCC-kompetente Immuneffektorzellen

Im Knochenmark entstehen aus gemeinsamen Vorläuferzellen, den sog. hämatopoetischen Stammzellen, prinzipiell alle Zellen, die im peripheren Blut vorhanden sind. Aus der hämatopoetischen Stammzelle entstehen weitere Vorläuferzellen wie beispielsweise eine gemeinsame lymphatische Vorläuferzelle, aus der B- und T-Lymphozyten entstehen oder die gemeinsame myeloide Vorläuferzelle, aus der sich Granulozyten, Makrophagen oder dendritische Zellen entwickeln.

1.2.1 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen stammen aus dem Knochenmark aus einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle. Sie sind größer als T- und B-Lymphozyten und enthalten gut

erkennbare zytoplasmatische Granula. Sie sind in der Lage, ohne vorherige Aktivierung oder Immunisierung *in-vitro* bestimmte Zelllinien lymphatischer Tumore abzutöten (Janeway et al. 2001). NK-Zellen können - ähnlich wie zytotoxische T-Zellen - Zielzellen abtöten, indem sie an die Oberfläche der zuvor gebundenen Zielzelle den Inhalt ihrer zytotoxischen Granula freisetzen. Dadurch kann die Zellmembran überwunden werden und die Apoptose induziert werden (Janeway et al. 2001).

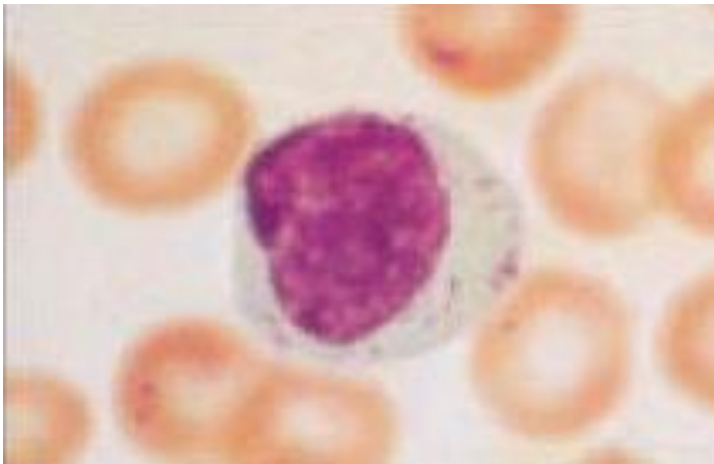


Abbildung 3: Natürliche Killerzelle (Janeway et al. 2001)

Natürliche Killerzellen enthalten lytische Granula mit zytotoxischen Effektorproteinen. Diese sind einerseits Perforine und andererseits Granzyme. Das Perforin ist ein Protein, das zu Poren polymerisiert (Janeway et al. 2001), die die Zellmembran der Zielzellen durchsetzen. Granzyme gehören zur Familie der Serinproteasen und können durch die Poren in der Zellmembran der Zielzellen, wenn sie sich im Zytoplasma befinden, den programmierten Zelltod auslösen (Janeway et al. 2001). Auf der Oberfläche von Natürlichen Killerzellen werden zwei Arten von Rezeptoren exprimiert, die für zytotoxische Aktivität verantwortlich sind. Die einen werden als aktivierende Rezeptoren bezeichnet und induzieren die Abtötung durch die Natürlichen Killerzellen. Die anderen Rezeptoren werden als inhibierende Rezeptoren bezeichnet und inhibieren die Aktivierung. Somit wird verhindert, dass normale Körperzellen durch Natürliche Killerzellen getötet werden. Diese inhibierenden Rezeptoren gelten als spezifisch für MHC-I-Klasse-Allele. Eine mögliche Differenzierung von infizierten und nicht-infizierten Zellen durch NK-Zellen könnte über ein verändertes Expressionsmuster der MHC-Klasse-I-

Moleküle funktionieren. Bei Mäusen beispielsweise werden inhibitorische Rezeptoren auf Natürlichen Killerzellen von Ly49, einer Multigenfamilie der C-Typ-Lektine kodiert (Janeway et al. 2001). Beim Menschen gehören MHC-I-Klasse-Moleküle zur Immunglobulin-Superfamilie und heißen p58 und p70 oder killerhemmende Rezeptoren (KIRs = killer inhibitory receptors). Außerdem werden die beiden C-Typ-Lektine CD94 und NKG2 von menschlichen Natürlichen Killerzellen exprimiert.

Durch die inhibierenden Rezeptoren wird das Tötungssignal der Natürlichen Killerzellen unterdrückt und Zellen, die ein ähnliches Expressionsmuster von MHC-I-Klasse-Molekülen wie Körperzellen besitzen, werden nicht durch Natürliche Killerzellen abgetötet.

1.2.2 Makrophagen

Makrophagen stellen die gewebeständige Form der im peripheren Blut zirkulierenden Monozyten (PBM = peripheral blood monocytes) dar. Monozyten entstehen aus der myeloiden Stammzelle im Knochenmark. Sie differenzieren zu Monozyten über verschiedene Progenitorzellen wie beispielsweise Monoblasten oder Promonozyten und werden dann als Monozyten in die Blutbahn abgegeben. Von dort migrieren sie in verschiedene Gewebe und differenzieren sich dort zu gewebeständigen Makrophagen aus (Mosser, Edwards 2008).

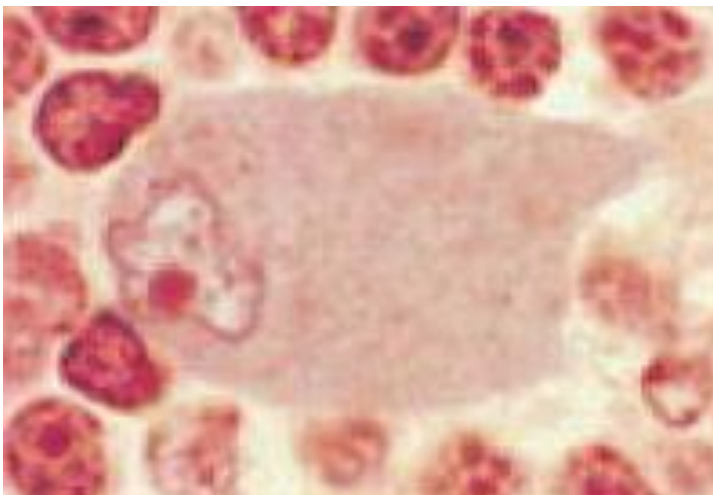


Abbildung 4: Makrophage (Janeway et al. 2001)

Ihre Hauptaufgabe besteht in der Phagozytose pathogener Zellen oder von Zelldetritus. Mithilfe der Phagozytose können pathogene Keime erkannt und intrazellulär aufgenommen werden. Intrazellulär werden diese in mehrere Fragmente zerteilt und so abgebaut. Zusätzlich gehören Makrophagen zu den Antigen-präsentierenden Zellen, weil sie MHC-Klasse-II Moleküle auf ihrer Oberfläche tragen. Dies befähigt sie $CD4^+$ -T-Lymphozyten Antigene auf ihrer Zelloberfläche zu präsentieren, damit diese von den $CD4^+$ -T-Lymphozyten abgetötet werden können.

1.2.3 Granulozyten

Granulozyten können anhand ihrer Färbung nach Pappenheim in drei Subgruppen unterteilt werden (Welsch 2006). Diese sind neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, die mit einer unterschiedlichen Häufigkeit im Blut vorkommen. Granulozyten machen mit 50-75% den größten Anteil der Lymphozyten aus. Neutrophile Granulozyten sind ca. 8-10 μ m große Zellen und weisen einen unregelmäßig geformten Zellkern auf. Aus diesem Grund werden sie synonym als polymorphkernige Lymphozyten bezeichnet. Sie machen mit >90% den größten Anteil der Granulozyten aus. Die Hauptmasse der neutrophilen Granulozyten verbleibt im Knochenmark, während nur ca. 10% im peripheren Blut zirkulieren (Welsch 2006). Zu den Aufgaben von neutrophilen Granulozyten gehört v.a. die Bekämpfung bakterieller Infektionen. Zusätzlich zählen sie zu den phagozytierenden Zellen und können auf diese Weise infizierte Zellen oder opsonierte Zellen phagozytieren und abtöten.

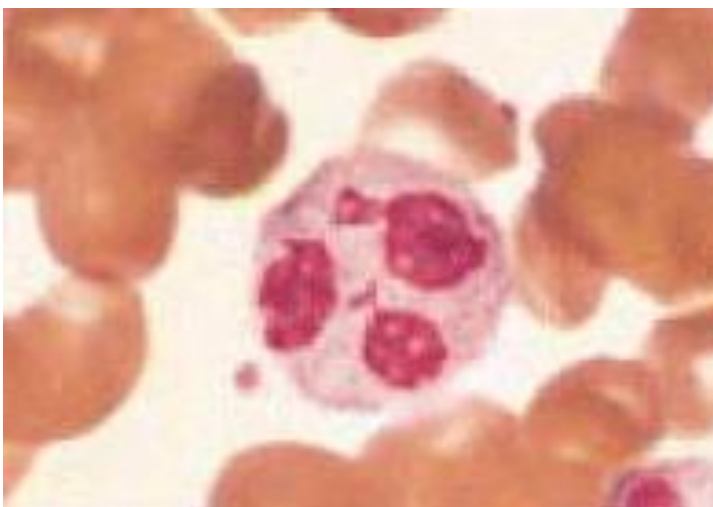


Abbildung 5: Neutrophiler Granulozyt (Janeway et al. 2001)

Über Chemotaxis gelangen neutrophile Granulozyten zum Ort bakterieller Infektionen und können mithilfe inhärenter Enzyme, v.a. über toxische Sauerstoffverbindungen pathologische Zellen oder Mikroorganismen abtöten (Welsch 2006). Neutrophile Granulozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche u.a. den Fc-Rezeptor. Kommt es zur Bindung des Fc-Rezeptors mit der Fc-Region eines Immunglobulins auf der Oberfläche einer bakteriellen Zelle, wird der neutrophile Granulozyt dadurch aktiviert (Ross et al. 2011).

Die zweite Gruppe machen die eosinophilen Granulozyten aus. Sie sind ca. 10-14µm groß und weisen einen zweigeklappten Kern auf (Welsch 2006). Charakteristisch sind große eosinophile zytoplasmatische Granula. Ähnlich wie neutrophile Granulozyten exprimieren sie den Fc-Rezeptor auf ihrer Oberfläche. Zum einen wird ihnen eine wichtige Aufgabe in der Abwehr gegenüber parasitären Infektionen zugesprochen. Zum anderen sind sie bei vielen allergischen Reaktionen wie Medikamentenallergien oder bei ekzematösen Hautveränderungen in großer Zahl vorhanden (Welsch 2006).

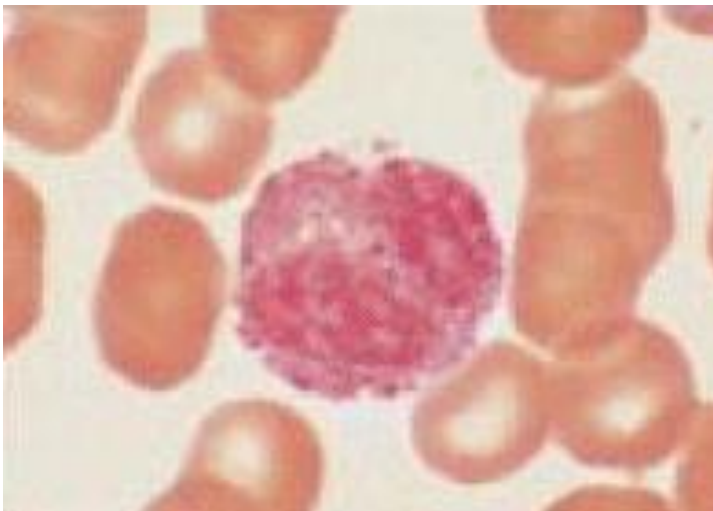


Abbildung 6: Eosinophiler Granulozyt (Janeway et al. 2001)

Basophile Granulozyten stellen die dritte Gruppe der Granulozyten dar mit einer Größe von 8-12µm. Sie weisen einen großen rundlichen, z.T. auch etwas eingekerbten Kern auf. Auch basophile Granulozyten weisen einen Fc-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche auf über den sie an IgE-Antikörper binden können. Funktionell wird angenommen, dass basophile Granulozyten ähnlich wie Mastzellen über die Bindung an IgE bei allergischen Reaktionen eine wichtige Rolle spielen (Ross et al. 2011).

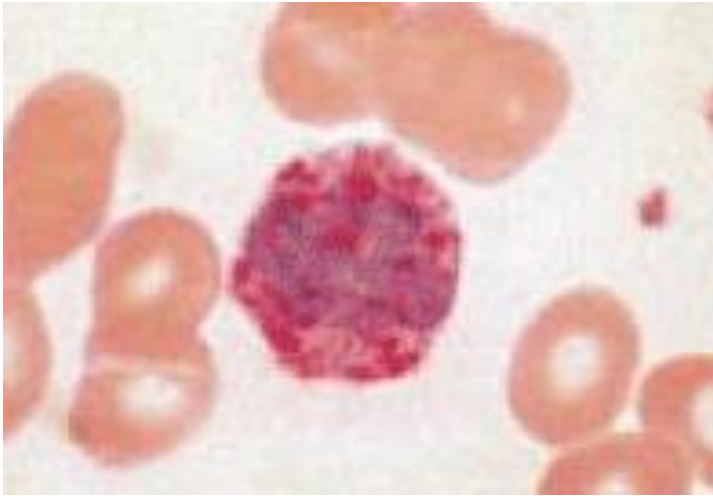


Abbildung 7: Basophiler Granulozyt (Janeway et al. 2001)

1.3 Tumorinfiltrierende Lymphozyten

Tumorinfiltrierende Lymphozyten setzen sich aus $CD8^+$ -T-Lymphozyten, $CD4^+$ -T-Lymphozyten und regulatorischen T-Lymphozyten (Tregs) zusammen (Hiraoka 2010).

$CD8^+$ -T-Lymphozyten spielen eine entscheidende Rolle im Kampf des Immunsystems gegen Tumorerkrankungen. Sie sind in der Lage, Tumorzellen oder auch virusbeladene Körperzellen direkt abzutöten. Dazu bedienen sie sich einiger Enzyme wie zum Beispiel Granzymen oder Perforinen, mit denen sie die Zellhülle der Zielzellen zerstören können (Hiraoka 2010). Naito et al. (Naito, Saito et al. 1998) beschreiben, dass eine hohe Zahl an $CD8^+$ -T-Lymphozyten im Tumorgewebe einen positiven prognostischen Marker für Kolorektalkarzinome darstellen.

$CD4^+$ -T-Lymphozyten werden auch als T-Helferzellen bezeichnet, da sie für die Aktivierung anderer Immunzellen wie zum Beispiel $CD8^+$ -T-Lymphozyten oder Makrophagen wichtig sind. Man unterscheidet zwischen T_H1 -, T_H2 - und T_H17 -Helferzellen. Die T_H1 -Zellen sind in die Immunreaktion auf Tumorzellen involviert, da sie eine Effektorfunktion als Antwort auf eine Stimulation durch IL-2 und $INF\gamma$ entwickeln können (Dunn, Old et al. 2004). Bei einem Übergewicht an T_H1 -Zellen kommt es zu einer verstärkten Produktion von $INF\gamma$. Durch eine optimierte Immunantwort durch zytotoxische T-Lymphozyten führt dies zu einer stärkeren Immunität des Organismus gegenüber dem Tumor. Im Gegensatz dazu scheinen T_H2 -Zellen bei der Entstehung von

Tumoren eher begünstigend zu wirken, weil sie eine Differenzierung in Richtung der T_H1 -Zellen hemmen. Durch die Hemmung der T_H1 -Zellen wird auch die Immunität gegenüber Tumorzellen gehemmt und der Tumor kann stärker proliferieren (Johansson 2008). Die Differenzierung der $CD4^+$ -Helferzellen in Richtung der T_H2 - Zellen wird durch IL-4, STAT-6 und den Transkriptionsfaktor Gata-2 gesteuert (Hiraoka 2010). Kemp et al. beschreiben auch eine direkte immunsuppressive Wirkung von IL-4 auf $CD8^+$ -T-Zellen (Kemp,Ronchese 2001).

T_H17 - Zellen sezernieren eine Reihe von Zytokinen wie beispielsweise IL-17A, IL-17F, IL-21 und IL-22, die eine Rolle bei entzündlichen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen spielen und in der Lage sind, extrazelluläre Pathogene zu bekämpfen (Hiraoka 2010). Über T_H17 - Zellen als tumorinfiltrierende Lymphozyten wurde bereits in einigen menschlichen Tumorentitäten berichtet, z.B. in Ovarial-, Prostata-, Leber- oder Mammakarzinomen (Miyahara, Odunsi et al. 2008), (Kryczek, Banerjee et al. 2009), (Zhang, Yan et al. 2009).

Regulatorische T-Zellen können auch zu den $CD4^+$ -T-Lymphozyten gezählt werden. Erstmals wurden sie von Gershon et al. 1970/71 beschrieben. Damals wurden sie als aus dem Thymus stammende T-Lymphozyten beschrieben, die als Antigen fungieren und Lymphozyten aus dem Knochenmark zu immunologischer Toleranz verhelfen (Gershon,Kondo 1971). Sie kommen in vielen bösartigen Tumoren vor. Eine der Hauptgruppen der regulatorischen T- Zellen stellen $CD4^+CD25^+$ -Tregs dar. Wilke et al. beschreiben, dass bei Patientinnen mit Ovarialkarzinomen regulatorische T-Zellen zu einer Supprimierung der tumorspezifischen Immunität führen und somit zu einer Unterstützung des Tumorwachstums *in-vivo* (Wilke, Wu et al. 2010). Deshalb weisen Tumore mit einer deutlichen Infiltration von regulatorischen T-Zellen ein schlechteres klinisches Outcome auf als solche Tumore mit einer geringeren Infiltrationsstärke (Wilke, Wu et al. 2010).

1.4 Hitzeschockproteine

1.4.1 Hitzeschockprotein 70

Hitzeschockproteine (Hsps) sind hoch konservierte Proteine, die in vielen subzellulären Kompartimenten vorkommen. Sie wurden in den 1960er Jahren erstmals von Ritossa beschrieben (Ritossa 1962). Man unterscheidet bei Säugetieren fünf verschiedene Gruppen von Hitzeschockproteinen. Dazu gehören das Hsp100, 90, 70, 60 und kleine

Hitzeschockproteine. Im Allgemeinen haben Hitzeschockproteine zytoprotektive Effekte und sie stabilisieren Proteine, um sie vor fehlerhaften Konformationen oder Aggregationen zu schützen. Jedes der einzelnen Mitglieder der Hitzeschockproteine besteht aus konstitutiven und induzierbaren Hitzeschockproteinen. Hsp 70 wird beispielsweise stark durch zellulären Stress wie Hitze, oxidativen Stress oder Therapeutika gegen Tumorerkrankungen induziert. Im Gegensatz dazu findet man im physiologischen Zustand nur sehr geringe Spiegel von Hsp70 in einer Zelle (Schmitt, Gehrman et al. 2007). Hitzeschockproteine spielen eine wichtige Rolle für den Transport von Proteinen, für die Faltung und auch für den Konformationszustand von anderen Proteinen innerhalb der Zelle (Schmitt, Gehrman et al. 2007). Im Nagetiermodell konnte gezeigt werden, dass u.a. Hsp70 das kanzerogene Potential von Tumorzellen verstärkt (Jaattela 1995; Garrido, Fromentin et al. 1998).

1.4.2 Intrazelluläres Hitzeschockprotein 70

Normalerweise fungiert das Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) als molekulares Chaperon, d.h. als Faltungshelfer für neu synthetisierte Proteine oder als Transporthelfer von Proteinen über die Zellmembran hinweg (Shi,Thomas 1992). In menschlichen Zellen finden sich verschiedene Formen des Hsp70, z.B. das stress-induzierte oder das konstitutiv exprimierte Hsp70 (Jaattela 1999). Es gibt einige Stimuli, u.a. die Therapie von Tumorerkrankungen, die die Synthese des stress-induzierbaren Hsp70 stimulieren, um der Zelle ein Überleben zu ermöglichen (Schmitt, Gehrman et al. 2007). Hsp70 besitzt die Fähigkeit, die Apoptose einer Zelle an verschiedenen Stellen zu blockieren. Es kann die Aktivierung von Caspasen, die zu den wichtigsten Enzymen der Apoptose gehören, reduzieren oder die Fragmentation des Kerns während der Apoptose verhindern (Schmitt, Gehrman et al. 2007), (Buzzard, Giaccia et al. 1998). Innerhalb des mitochondrialen Apoptose-Weges greift das Hsp70 an drei Stellen an. Prämitochondrial ist eine Hemmung stress-induzierter Kinasen möglich (Schmitt, Gehrman et al. 2007), indem es als Inhibitor der Kinase JNK1 (c-Jun N-terminale Kinase) wirkt (Park, Lee et al. 2001). Auf mitochondrialer Ebene hemmt Hsp70 die Translokation von Bax, einem Protein, das durch den Tumorsuppressor p53 induziert wird und für die Apoptose wichtig ist. Auf diesem Weg wird die Steigerung der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran verhindert und folglich auch die Abgabe von Cytochrom C über die Mitochondrienmembran, das im physiologischen Zustand die Apoptose auslösen würde (Stankiewicz, Lachapelle et al. 2005), (Schmitt, Gehrman et al. 2007). Postmitochondrial interagiert Hsp70 mit Apaf-1 (Apoptotic

protease activating factor-1), wodurch die Bildung des Apoptosoms und die Aktivierung der Caspasen gehemmt werden (Schmitt, Gehrman et al. 2007).

In Tumoren spielt Hsp70 auch eine wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass seine Expression die Kanzerogenität von Tumorzellen im Nagetiermodell steigert (Jaattela 1995), (Schmitt, Gehrman et al. 2007). Im Gegenteil dazu zeigt sich, dass es durch die Reduzierung der Menge an intrazellulärem Hsp70 in Tumorzellen, zu einer höheren Sensibilität für die Apoptose und zum Absterben der Tumorzellen kommt. Durch ein Absenken des Hsp70-Spiegels könnte eine geringere Kanzerogenität der Tumorzellen folgen (Gurbuxani, Bruey et al. 2001), (Nylandsted, Rohde et al. 2000), (Schmitt, Gehrman et al. 2007). In hochmalignen Tumoren wie dem Endometriumkarzinom, Osteosarkomen oder dem Nierenzellkarzinom finden sich eine erhöhte Expression von Hsp70 (Santarosa, Favaro et al. 1997), (Nanbu, Konishi et al. 1998). Eine erhöhte Expression von Hsp70 in Mammakarzinomen, Endometriumkarzinomen oder im Magenkarzinom geht mit einer erhöhten Rate an Metastasen, einer schlechteren Prognose und einer Resistenz gegenüber Chemo- oder Strahlentherapie einher (Garrido, Ottavi et al. 1997), (Vargas-Roig, Gago et al. 1998), (Brondani Da Rocha, Regner et al. 2004).

1.4.3 Extrazelluläres Hitzeschockprotein 70

Das Hsp70 spielt eine wichtige Rolle bei der Stimulation des Immunsystems (Schmitt, Gehrman et al. 2007). Im menschlichen Serum ist es assoziiert mit Zellstress, beispielsweise im Zusammenhang mit Entzündungen, bakteriellen oder viralen Infekten. *In-vitro* ist es auch im Medium von antigenpräsentierenden Zellen (APC) zu finden (Schmitt, Gehrman et al. 2007). Die aktive Ausschüttung von Hsp70 durch lebende Tumorzellen kann stimuliert werden durch exogenen Stress (Schmitt, Gehrman et al. 2007), (Barreto, Gonzalez et al. 2003).

Der Mechanismus über den Hsp 70 an die Plasmamembran bzw. an die Zelloberfläche gelangt, ist noch nicht gänzlich verstanden. Ein möglicher Weg könnte in einem Shuttle-Mechanismus zusammen mit Proteinen liegen, die über eine transmembranäre Domäne verfügen, und somit Hsp70 mit an die Zelloberfläche transportiert könnten. Alternativ ist eine direkte Interaktion des Hitzeschockproteins mit Lipidkomponenten der Zellmembran denkbar. DeMaio et al. haben gezeigt, dass eine Assoziation von Mitgliedern der Hsp70-Familie mit Phosphatidylserinen in PC12-Tumorzellen besteht (Arispe, Doh et al. 2004). Multhoff et al. konnten zeigen, dass es eine aktive Freiset-

zung von Hsp70 zusammen mit Bag4 aus lebenden humanen Kolon- und Pankreas-karzinomzellen in Lipidvesikeln existiert. Zudem stammen diese ursprünglich aus frühen Endosomen und waren später an der Plasmamembran bzw. extrazellulär (Gastpar, Gehrman et al. 2005).

Eine weitere Eigenschaft von extrazellulär lokalisiertem Hsp70 besteht in seiner Funktion als Träger für ursprünglich aus Tumorzellen stammende Proteinen. Zusammen mit Hsp70 werden sie beispielsweise von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen und nach Prozessierung über MHC-Klasse-I-Moleküle an CD8⁺-T-Lymphozyten präsentiert. Es wird berichtet, dass es nach der Präsentation an CD8⁺-Lymphozyten zu einer Antigen-spezifischen CD⁺-Immunantwort sowohl *in-vitro* als auch im Mausmodell kommt (Schmitt, Gehrman et al. 2007), (Binder, Blachere et al. 2001), (Schild, Arnold-Schild et al. 1999; Doody, Kovalchin et al. 2004). Außerdem ist Hsp70 ein Triggerfaktor für Natürliche Killerzellen, die eine hohe Dichte an CD94 auf ihrer Zelloberfläche besitzen (Gross, Schmidt-Wolf et al. 2003), (Gross, Hansch et al. 2003). Die Effektorfunktionen von Natürlichen Killerzellen werden durch verschiedene killerzellinhibierende und -aktivierende Rezeptoren reguliert. Dazu gehören KIR-Rezeptoren (killer cell immunoglobulin-like receptors), ICT (immunglobulin-like transkript) oder C-Type lecture Rezeptoren oder NCR (natural cytotoxicity receptor) (Moretta, Bottino et al. 2001). Nach der „Missing self“ Theorie (Ljunggren, Karre 1990) sind Tumorzellen mit einem fehlerhaften MHC-Expressionsmuster ideale Ziele für die zytolytische Attacke durch Natürliche Killerzellen. Hsp70 ist auf der Plasmamembran von Kolonkarzinomen, Bronchial-, Pankreas-, Mamma-, Kopf-Hals-Tumoren und davon abstammenden Metastasen (Lewis, Devin et al. 2000) lokalisiert, obwohl die dazugehörigen Normalgewebe Hsp70-negativ auf der Membran sind.

1.4.4 Plasmamembran-gebundenes Hitzeschockprotein 70

Hitzeschockproteine sind hoch konservierte Proteine, die in fast jedem subzellulären Kompartiment zu finden sind (Radons, Multhoff 2005), (Multhoff, Botzler et al. 1995). Sie haben eine wichtige Aufgabe in der Tumorimmunität, die durch antigenpräsentierende Zellen, T-Zellen und Natürliche Killerzellen vermittelt wird (Wells, Malkovsky 2000). Mittels Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass sich an die Plasmamembran-gebundenes Hsp70 auf der Zelloberfläche von Tumorzellen nachweisen lässt, nicht jedoch auf korrespondierendem Normalgewebe (Tamura, Peng et al. 1997). Die Funktion von Hsp70 auf der Plasmamembran besteht in dem Schutz vor durch

Bestrahlung entstandenen Zellzyklusschäden (Radons, Multhoff 2005) und in der Funktion als Erkennungsstruktur für einen zytolytischen Angriff durch Natürliche Killerzellen.

2 Zielsetzung der Arbeit

Die membrangebundene Form des Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) wird auf einer Vielzahl von menschlichen Tumorzellen exprimiert, nicht aber auf dem dazugehörigen normalen Gewebe (Stangl, Gehrman et al. 2011). Bei Patienten mit tiefen Rektum- und Lungenkarzinomen ist bekannt, dass ein Hsp70-positiver Membranstatus mit einem schlechteren Überleben einhergeht (Pfister, Radons et al. 2007). Diesbezüglich könnte ein Hsp70-membranpositiver Status einen negativen prognostischen Marker für dieses Patientengut darstellen (Pfister, Radons et al. 2007). Außerdem bestehen Hinweise für eine Assoziation von Hsp70 mit einer stärkeren Resistenz der exprimierenden Tumorzellen gegenüber einer Strahlentherapie und für eine Assoziation von Hsp70 mit unterschiedliche Metastasierungswegen (Gehrman, Marienhagen et al. 2005). Eine Therapie mittels eines zielgerichteten Antikörpers auf das Hsp70-Molekül könnte eine effektivere Therapiemöglichkeit von Patienten mit Hsp70-positiven Tumorerkrankungen darstellen. Obwohl Hsp70 ein negativer prognostischer Marker zu sein scheint, könnte er genutzt werden um Hsp70-positive Tumorerkrankung erfolgreicher therapieren zu können und gegebenenfalls auch die Strahlensensibilität zu erhöhen. Deshalb hat die Arbeitsgruppe Multhoff et al. versucht, einen Antikörper zu generieren, der sich speziell gegen diese membrangebundene Form von Hsp70 auf der Oberfläche von Tumorzellen richtet. Mit der Entwicklung des monoklonalen Antikörpers cmHsp70.1 ist dies gelungen. Der monoklonale Antikörper cmHsp70.1 bindet an verschiedene humane Tumorzelllinien wie z.B. Kolon- (CX2), Mamma- (MDA436) und Lungenkarzinomzelllinien (A549). Bei murinen Zelllinien bindet er beispielsweise an die Kolonkarzinomzelllinie CT26.

Stangl et al. konnten für den Antikörper cmHsp70.1 zeigen, dass es durch ihn *in-vitro* sowohl bei unstimulierten murinen Milzzellen als auch bei mit TKD/ IL-2 stimulierten murinen Milzzellen zu einem signifikanten Abtöten der CT26-Tumorzellen mittels ADCC kam (Stangl, Gehrman et al. 2011). Im Rahmen dieser Dissertation soll untersucht werden, ob cmHsp70.1 auch *in-vivo* zu einer antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) und somit zu einem Abtöten der Tumorzellen führt. Diese Fragestellung soll im Tiermodell an der Kolonkarzinomzelllinie CT26 näher untersucht werden. Dabei soll anhand immunhistochemischer Färbungen von ADCC-kompetenten Immuneffektorzellen nachgewiesen werden, dass es durch die Behandlung der Tumore mit cmHsp70.1 zur Auslösung der ADCC in den Maustumoren kommt und dass damit der Nachweis erbracht werden kann, dass mit cmHsp70.1 zielgerichtet ein Hsp70-positiver Tumor im Mausmodell behandelt werden kann.

3 Methoden

3.1 Herstellung von Lösungen

3.1.1 Pufferlösungen

3.1.1.1 Trispuffer 10x (500ml)

30,285g Tris (hydromethyl)-aminomethan werden in 450ml H₂O millipore (Millipore™) gelöst und anschließend mit HCl 37% (Merk, Darmstadt, Deutschland) auf pH 7,5 eingestellt. Danach wird auf 500ml mit H₂O millipore (Millipore™) aufgefüllt. Zum Gebrauch wird die Lösung 1:10 mit H₂O millipore (Millipore™) auf 1x verdünnt.

3.1.1.2 Autopuffer 10x (500ml)

30,285g Tris (hydromethyl)-aminomethan werden in 450ml H₂O millipore (Millipore™) gelöst und anschließend mit HCl 37% (Merk, Darmstadt, Deutschland) auf pH 7,5 eingestellt. Nach Zugabe von 12,5ml Brij 35® (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wird H₂O millipore (Millipore™) bis zu einem Endvolumen von 500ml zugegeben. Zum Gebrauch wird die Lösung 1:10 mit H₂O millipore (Millipore™) auf 1x verdünnt.

3.1.2 Natrium-Azid-Lösung

In 200ml Auto-Puffer (1x verdünnt) wird 0,2g Natriumazid (Merk, Darmstadt, Deutschland) gelöst. Kurz vor Gebrauch werden 500µl von 30% Wasserstoffperoxid (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) hinzugefügt. Auf jeden Schnitt werden ca. 150µl pipettiert.

3.1.3 BSA-Lösung 10%

Es werden 0,75g BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in 7,5ml DPBS (Gibco) gelöst.

3.1.4 BSA-Lösung 1%

Die 10%ige BSA-Lösung wird 1:10 mit H₂O millipore (Millipore™) verdünnt.

3.1.5 DAB-Gebrauchslösung

Für das Herstellen von 3ml DAB-Gebrauchslösung (DAB + Substrate Chromogen System, Dako, Hamburg, Deutschland) wurden 3ml DAB Substrate Buffer mit 3 Tropfen des Chromogens vermischt. Insgesamt wurden 200µl auf jeden Schnitt pipettiert.

3.1.6 Hämatoxylin

Das verwendete Hämatoxylin (Hämatoxylin nach Mayer, Apotheke Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland) wurde vor dem Gebrauch durch einen Filter filtriert.

3.1.7 Herstellen einer Ethanolreihe

3.1.7.1 Ethanol 96% (500ml)

Es werden 480ml Ethanol absolut (Apotheke Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland) mit 20ml H₂O millipore (Millipore™) vermischt.

3.1.7.2 Ethanol 70% (500ml)

Es werden 350ml Ethanol absolut (Apotheke Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland) mit 150ml H₂O millipore (Millipore™) vermischt.

3.1.7.3 Ethanol 50% (500ml)

Es werden 250ml Ethanol absolut (Apotheke Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland) mit 250ml H₂O millipore (Millipore™) vermischt.

3.1.7.4 Ethanol 30% (500ml)

Es werden 150ml Ethanol absolut (Apotheke Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland) mit 350ml H₂O millipore (Millipore™) vermischt.

3.2 Gebrauchsansätze der Antikörper

3.2.1 Verdünnung der primären Antikörper

Antikörper	Verdünnung
clone DX5, rat-anti-mouse, CD49b, IgM, Biozol	1:25
clone 12F11, rat-anti-mouse, CD56, IgG, BD Biosciences	1:100
clone BM8, rat-anti-mouse, F4/80, IgG2a, ACRIS Antibodies GmbH	1:50
clone RB6-8C5, rat-anti-mouse, Gr-1 Ly6C/ Ly6G, IgG2bk, Biolegend	1:50
clone SP7, rabbit-anti-goat, CD3, IgG, Abcam	1:100

Tabelle 3: Verdünnung der primären Antikörper

Für eine Verdünnung von 1:100 wurden 2µl des primären Antikörpers mit 198µl von 1% BSA in PBS verdünnt. Insgesamt wurden 200µl auf jeden Schnitt pipettiert.

Für eine Verdünnung von 1:50 wurden 4µl des primären Antikörpers mit 196µl von 1% BSA in PBS verdünnt.

Für eine Verdünnung von 1:25 wurden 6µl des primären Antikörpers mit 194µl von 1% BSA in PBS verdünnt.

3.2.2 Verdünnung der sekundären Antikörper

Antikörper	Verdünnung
Rabbit-anti-hamster, 43C-CB0706, IgG, HRP, Fitzgerald	1:100
Rabbit-anti-rat, P0162, IgG, HRP, Dako	1:100

Tabelle 4: Verdünnung der sekundären Antikörper

Für eine Menge von 1500µl sekundärem Antikörper mit einer Verdünnung von 1:100 wurden jeweils 15µl des sekundären Antikörpers mit 1485µl von 1% BSA in PBS verdünnt. Jeweils 150µl wurden auf die jeweiligen Schnitte pipettiert.

3.3 Fixierung der Tumore in Formalin

Die Tumore wurden in 4 mm dicke Stücke geschnitten und in Bouin's Lösung fixiert. Diese enthält 71,5% (vol/vol) Picrinsäure, 23,8% (wt/vol) Formaldehyd und 4,7% (vol/vol) Essigsäure.

3.4 Einbetten der Formalin-fixierten Tumore

Nach vollständiger Fixierung der Tumore wurden sie aus der Formalinlösung entnommen und mittels eines Einmalskalpells (bei den größeren Gewebestücken mittig) ein 2-3mm großes Stück herausgeschnitten und in die Einbettförmchen gelegt. Die kleineren Tumore wurden z.T. vollständig oder halbiert in die Einbettförmchen gelegt. Die so vorbereiteten Gewebeproben wurden in den Einbettförmchen eingeschlossen und in 70% Ethanol verbracht. Im Institut für Pathologie des Klinikums rechts der Isar wurden sie in das Gewebeverarbeitungssystem Shandon Excelsior ES eingesetzt und über Nacht in einer aufsteigenden Ethanolreihe mit darauffolgender Xylolbehandlung dehydriert und abschließend in flüssiges Paraffin überführt.

Im Anschluss wurden die Tumorgewebe an einer Einbettstation (Medite®, Burgdorf, Deutschland) in den Einbettförmchen mit 70°C heißem Paraffin übergossen und auf

einer Kühlplatte (Medite®, Burgdorf, Deutschland) bei -10°C ausgehärtet.

3.5 Herstellung von Ultradünnschnitten

Die Paraffinblöcke wurden initial auf einer Kühlplatte (Medite®, Burgdorf, Deutschland) bei -15°C gekühlt. Anschließend wurden sie in das Microtom (Microm HM355S, Thermo Fisher Scientific) eingespannt. Es erfolgte die Anfertigung von jeweils 10 x 2,5µm dünnen Folgeschnitte, die anschließend zum Strecken in ein 46°C warmes Wasserbad (Medite®, Burgdorf, Deutschland) verbracht wurden. Abschließend wurden die Paraffinschnitte auf Objektträger (Menzel + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) aufgezogen und zum Trocknen für 60-80 Minuten bei 60°C in einem Trockenschrank (Memmert + Co. KG, Schwabach, Deutschland) aufbewahrt.

3.6 Immunhistochemie

3.6.1 Immunhistochemie ohne Kochen

Die Objektträger sind in einem Glasbehälter für dreißig Minuten in Xylol AI gestellt worden und für weitere dreißig Minuten in Xylol AII. Danach wurden sie in die Ethanolreihe verbracht. Dabei waren sie für zehn Minuten in Ethanol absolut I, zehn Minuten in Ethanol absolut II, fünf Minuten in Ethanol 96% I, fünf Minuten in Ethanol 96%II, fünf Minuten in Ethanol 70%, fünf Minuten in Ethanol 50% und fünf Minuten in H₂O destilliert. Anschließend wurden die einzelnen Gewebe auf dem Objektträger mit einem Fettstift (Filzstift S2002, Dako, Hamburg) umrandet und für jeweils dreißig Minuten 200µl Natrium-Azid-Lösung (Merk, Darmstadt) auf die Schnitte pipettiert und in einer Feuchten-Kammer bei Raumtemperatur gelagert. In die Natrium-Azid-Lösung wurden vorher 150µl Wasserstoffperoxid (Carl Roth, Karlsruhe) pipettiert. Daraufhin sind die Objektträger für zehn Minuten in Tris-Puffer, anschließend für fünf Minuten im Auto-Puffer gebadet worden. Mit jeweils 200µl BSA 10% in PBS sind die Schnitte bei 4°C in einer Feuchten-Kammer über Nacht gelagert worden, um die Hintergrundfärbung zu blockieren. Am folgenden Tag sind die Objektträger direkt mit dem primären Antikörper (200µl pro Schnitt) bei Raumtemperatur für zwei Stunden in einer Feuchten-Kammer

inkubiert worden. Darauffolgend sind sie für zwanzig Minuten im Auto-Puffer gewaschen worden und anschließend mit dem sekundären Antikörper (150µl pro Schnitt) für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer Feuchten-Kammer gelagert worden. Die Schnitte sind erneut für zwanzig Minuten im Auto-Puffer gewaschen worden und danach mit jeweils 200µl der DAB-Gebrauchslösung (Dako, Hamburg) in einer Feuchten-Kammer für zwanzig Minuten belassen worden. Anschließend sind die Objektträger für fünf Minuten mit kaltem Leitungswasser überspült worden und für fünf Minuten in destilliertes Wasser gestellt worden. Danach erfolgte für dreißig Sekunden ein Eintauchen in Hämatoxylin. Anschließend erfolgte erneut ein Überspülen für zehn Minuten mit warmem Leitungswasser. Danach ist die Ethanol Reihe von wässriger Konzentration bis zum Xylol abgelaufen. Dabei sind die Schnitte zuerst für fünf Minuten in Ethanol 30%, fünf Minuten in Ethanol 50%, fünf Minuten Ethanol 70%, fünf Minuten Ethanol 96% I und dann Ethanol 96% II. Darauffolgend jeweils fünf Minuten in Ethanol absolut II und I gebadet worden. Abschließend waren die Schnitte für jeweils zehn Minuten in Xylol BI und BII. Nach der Färbung sind die Gewebeschnitte mit Eukitt Eindeckelmedium (O. Kindler, Freiburg, Deutschland) und einem Deckglas (Menzel + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckelt worden.

3.6.2 Immunhistochemie mit Kochen

Die Objektträger wurden wie im Abschnitt „Immunhistochemie ohne Kochen“ behandelt bis nach der Durchführung der absteigenden Alkoholreihe. Danach wurden sie in 98°C heißem Puffer gekocht, indem ein großes Becherglas zweifingerbreit mit destilliertem Wasser gefüllt wurde und dort hinein ein weiteres Becherglas mit 1:10 verdünntem Puffer gestellt wurde. Beide Behälter sind mit Alufolie abgedichtet worden, um das Entweichen von Wasserdampf zu verhindern. Das Wasserbad ist dreißig Minuten auf mindestens 98°C gehalten worden, wobei eventuell entwichenes Volumen mit destilliertem Wasser aufgefüllt wurde. Nach dreißig Minuten ist der Puffer von der Heizplatte genommen worden und nicht länger als drei Minuten abgekühlt worden. Anschließend wurden die Objektträger in destilliertem Wasser für fünf Minuten gebadet und dann die Gewebe mit einem Fettstift markiert. Danach entsprechen die weiteren Schritte dem Protokoll für „Immunhistochemie ohne Kochen“ ab dem Schritt, wo die Objektträger in destilliertes H₂O für zwei Minuten gestellt wurden, im Anschluss Natriumazid auf die Schnitte pipettiert wurde und sie für 30 Minuten in eine feuchte Kammer gestellt wurden.

3.7 Mikroskopieren der Objektträger

Die Objektträger wurden in einem Zeiss Axiovert 2 plus- Mikroskop (Carl Zeiss, United States) bei 20-facher Vergrößerung analysiert.

4 Material

4.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	Konzentration	Hersteller
Ethanol absolut, unvergällt	99,8%	Apotheke Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland
Eukitt Eindeckelmedium	-	Kindler, Freiburg, Deutschland
Hämatoxylin n. Mayer	-	Apotheke Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland
Formaldehydlösung	37%	Merk, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure	37%	Merk, Darmstadt, Deutschland
Xylol	-	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien

4.2 Lösungen

Bezeichnung	Konzentration	Hersteller
BSA (Bovine Serum Albumin)	96%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Brij 35®	30%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DPBS (Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline)	-	Gibco
Natrium-Azid	-	Merk, Darmstadt, Deutschland
Target retrieval solution 10x (S1699)	-	Dako, Hamburg, Deutschland
Wasser, millipore	-	Millipore™, Millipore Corp., USA
Wasserstoffperoxid	30%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 6: Bezeichnung und Konzentration der Lösungen

4.3 Puffer und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Volumen	Verwendung
Autopuffer	Tris(hydromethyl)-aminomethan H ₂ O millipore reine HCL 37% Brij35 (30%)	30,285g 450ml 17ml (auf pH 7,5) 12,5ml	IHC
Ethanol 96%	Ethanol absolut H ₂ O millipore	480ml 20ml	IHC
Ethanol 70%	Ethanol absolut H ₂ O millipore	350ml 150ml	IHC
Ethanol 50%	Ethanol absolute H ₂ O millipore	250ml 250ml	IHC
Ethanol 30%	Ethanol absolut H ₂ O millipore	150ml 350ml	IHC
Trispuffer	Tris(hydromethyl)-aminomethan H ₂ O millipore reine HCL37%	30,285g 450ml 17ml (auf pH 7,5)	IHC
BSA10%	BSA (Fraktion V, nicht Alc.- präzipitiert) PBS	5g 50ml	IHC

Tabelle 7: Puffer und Medien

4.4 Kits

Kit	Code-Nr.	Hersteller
Liquid DAB (Diaminobenzidin) + Substrate Chromogen System	K3468	Dako, Hamburg, Deutschland

Tabelle 8: Kits

4.5 Antikörper

4.5.1 Primärantikörper

Bezeichnung (Klon)	Ursprung	Isotyp	Konjugat	Firma	Verwendung
Clone DX5	Rat	IgM	-	BD Pharmigen™	FC
Clone 12 F11	Rat	IgG2a	-	BD Pharmigen™	WB, IHC
Clone BM8, F4/80	Rat	IgG2a	-	Acris Antibodies GmbH	IHC
Clone RB6-8C5, Ly6G/ Ly6C Gr-1	Rat	IgG2bk	-	BD Pharmigen™	IHC, FC
Clone SP7	Rabbit	IgG	-	Abcam	IHC, WB

Tabelle 9: Primärantikörper

4.5.2 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Ursprung	Isotyp	Konjugat	Firma	Verwendung
Rabbit-anti-hamster 43C-CB0706	Rabbit	IgG	HRP	Fitzgerald	IHC
Rabbit-anti-rat, P0162	Rabbit	IgG	HRP	Dako	IHC, ELISA

Tabelle 10: Sekundärantikörper

4.6 Plastikmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Cryotubes	TPP Techno Plastic Products AG, Schweiz
Filzstift (S2002)	Dako, Hamburg, Deutschland
Deckgläser (24x60mm)	Menzel GmbH, Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland
Einbettkassetten Rotilabo®	Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Einbettformen aus Metall	Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Einmalskalpelle (Model 21 oder 22)	Seidel Medipool, Deutschland
Eppendorf-Tubes (1,5ml)	Eppendorf, Hamburg
Einwegpipetten (1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Falcon-Tubes (15ml)	TPP Techno Plastic Products AG, Schweiz
Pipettenspitzen gelb 10µl-200µl	Sarstedt AG & CO., Nürnberg, Deutschland
Pipettenspitzen blau 100-1000µl	Sarstedt AG & CO., Nürnberg, Deutschland
Thermo Scientific Superfrost Ultra Plus®	Menzel GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 11: Bezeichnung der Plastikmaterialien

4.7 Sonstige Geräte

Gerät	Hersteller
Axioskop 2 plus	Carl Zeiss, United States
Ausgußstation (Paraffin Embedding System)	Medite® GmbH Burgdorf, Deutschland
Kühlplatte (Tissue Cool Plate) COP 20	Medite® GmbH Burgdorf, Deutschland
Kühlplatte (Tissue Cool Plate) COP 30	Medite® GmbH Burgdorf, Deutschland
Microm HM 355 S	Microm; jetzt: Thermo Fisher Scientific
Präzisionswaage	Kern& Sohn GmbH, Balingen
pH-Meter S20 Seven Easy	Mettler-Toledo GmbH Gießen, Deutschland
Paraffin Streckbad TFB 35	Medite® GmbH Burgdorf, Deutschland
Trockenschrank	Memmert GmbH + Co KG Schwabach, Deutschland

Tabelle 12: sonstige Geräte

5 Ergebnisse

Bösartigen Tumoren können pathologisch anatomisch verschiedene Differenzierungsmerkmale zugeordnet werden. Ihre Wachstumsform ist infiltrierend oder invasiv. Sie verdrängen ihr Nachbargewebe nicht, sondern destruieren es durch ihr expansives Wachstum. In der Regel besitzen bösartige Tumore kein oder nur zum Teil ein Kapselgewebe. Bösartige Tumore zeigen häufig eine Nekrose in histologischen Schnitten und einen uneinheitlich ausgereiften Gewebetyp. Im Vergleich dazu haben gutartige Tumore häufig ein einheitlichen Gewebetyp und sehr selten eine Nekrosezone. Die Zellgröße bzw. Zellform ist bei bösartigen Tumoren uneinheitlich. Sie weisen eine polymorphe Kernform und -größe auf und auch häufig Mitosen. Die Kern-Plasma-Relation beschreibt das Volumenverhältnis von Zelle zu Zellkern. Sie ist bei Tumorzellen zugunsten des Zellkerns verschoben, bei gesunden Zellen nimmt der Zellkern in der Regel zwischen 5-10% des Volumens der Zelle ein (Riede et al. 2004).

In den Versuchen dieser Dissertation wurden $2,5 \times 10^4$ CT26-Tumorzellen Balb/c Mäusen intraperitoneal injiziert an Tag 0. An Tag 3,5, und 7 wurden ihnen $20\mu\text{g}$ des Antikörpers cmHsp70.1 intravenös gespritzt. An Tag 21 wurden die Mäuse getötet und mindestens sechs aufeinanderfolgende Tumorschnitte mit einer Dicke von jeweils $2,5\mu\text{m}$ wurden immunhistologisch untersucht. Die histologischen Schnitte, die auf den folgenden Seiten gezeigt werden, sind nach einem fixen Schema ausgewertet worden. Die Zahl der infiltrierenden Zellen wurde anhand eines ausgewählten Ausschnittes von 1cm^2 evaluiert. Die Bewertung mit – ist definiert als keine Infiltration (<10), mit einem + ist definiert als schwache Infiltration (10-50), mit ++ ist definiert als intermediäre Infiltration (50-200) und mit +++ bei einer starken Infiltration (>200). Die histologischen Schnitte wurden mit einer Vergrößerung von 20fach fotografiert und die Maßstabsbalken entsprechen einer Größe von $50\mu\text{m}$.

5.1 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit den Antikörpern Ly49b/CD56

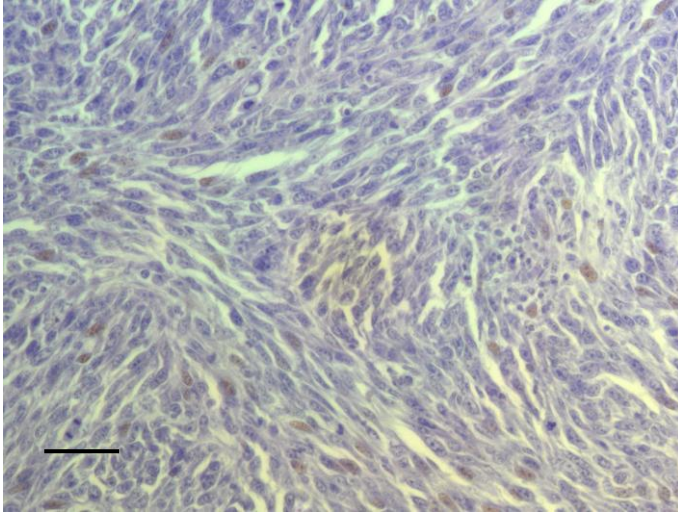


Abbildung 8: Isotypen-Kontrolle IgM

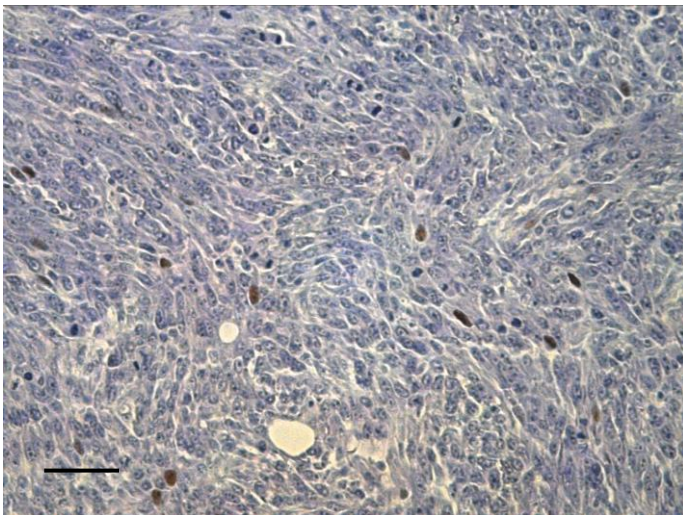


Abbildung 9: NK-Zellen, Ly49b, Ctrl

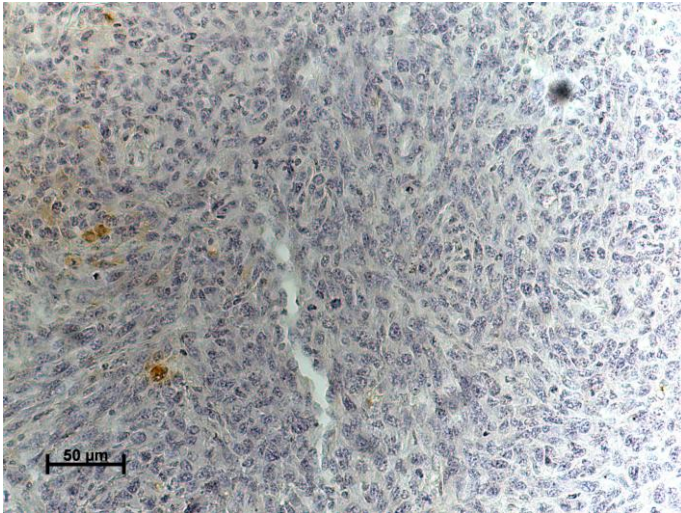


Abbildung 10: NK-Zellen, CD56, Ctrl

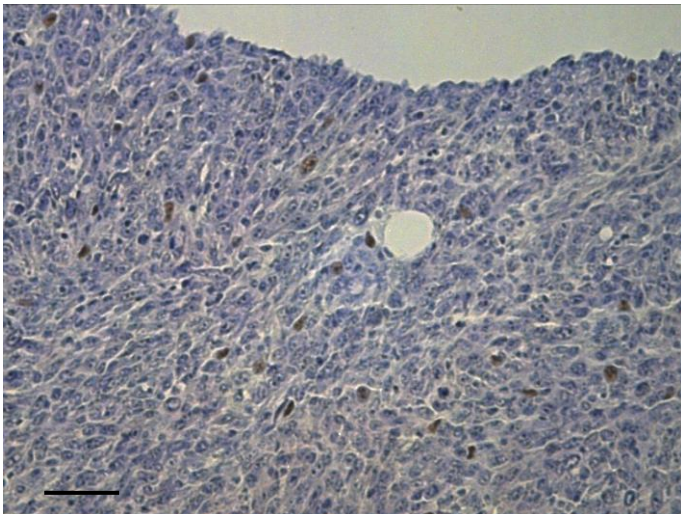


Abbildung 11: NK-Zellen, Ly49b, 1x AB

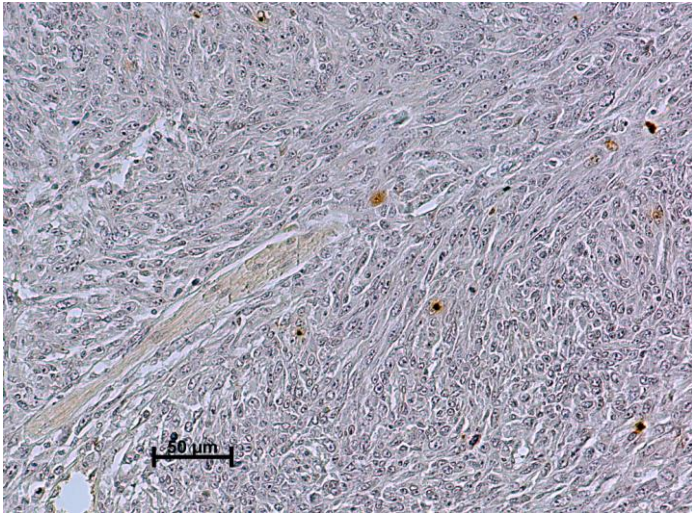


Abbildung 12: NK-Zellen, CD56, 1x AB

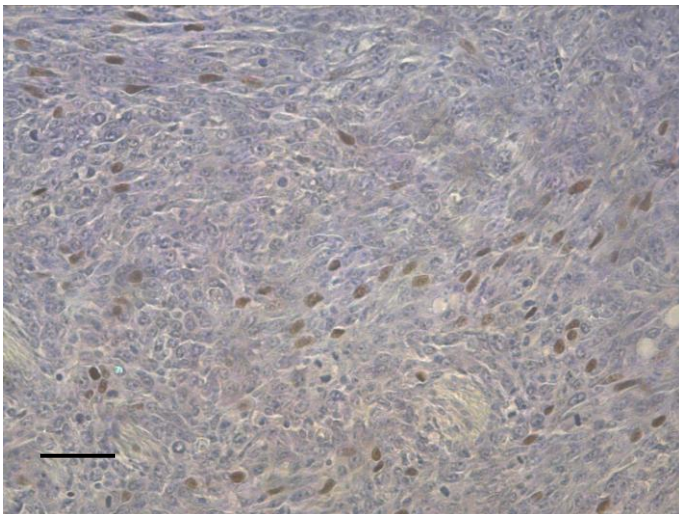


Abbildung 13: NK-Zellen, Ly49b, 2x AB

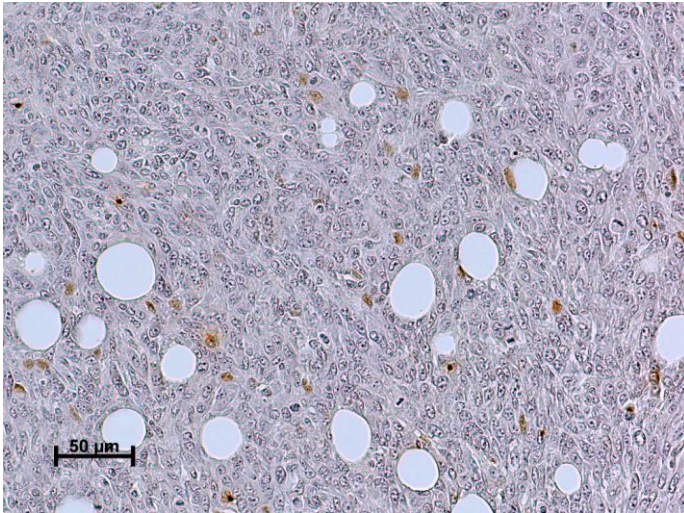


Abbildung 14: NK-Zellen, CD56, 2x AB

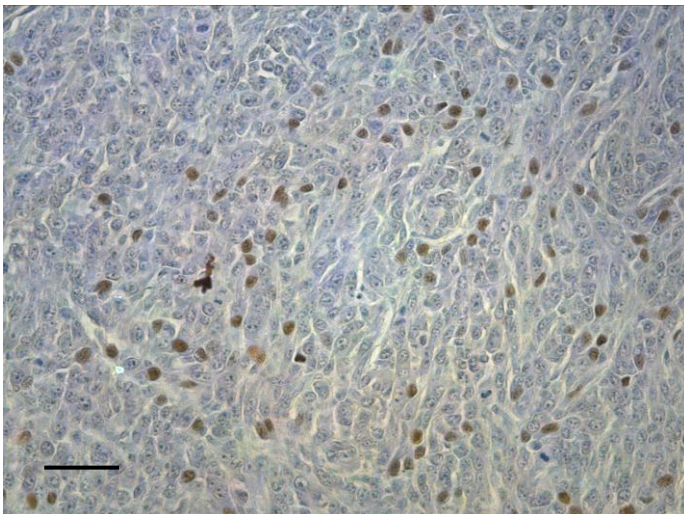


Abbildung 15: NK-Zellen, Ly49b, 3x AB

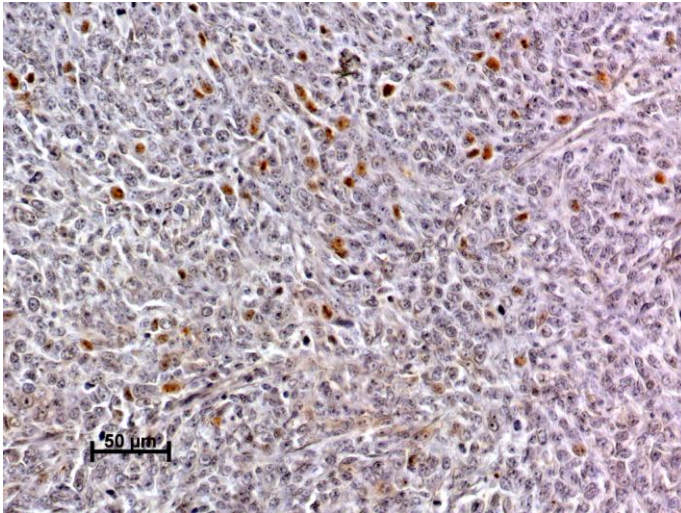


Abbildung 16: NK-Zellen, CD56, 3x AB

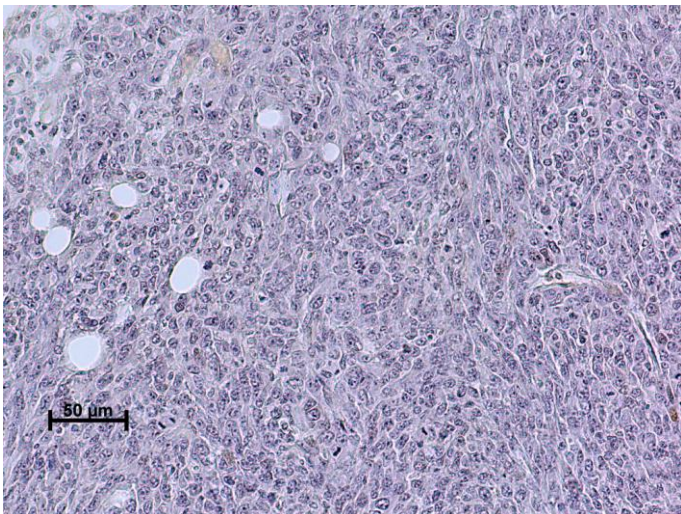


Abbildung 17: Isotypen-Kontrolle, IgG

Auf den Abbildungen 9 bis 16 sind die immunhistochemischen Färbungen mit dem Antikörper Ly49b (Clone DX5, BD Pharmingen™) und CD56 (Clone 12F11, BD Pharmingen™) dargestellt. Beide stellen Cluster of Differentiation dar, die auf der Oberfläche von Natürlichen Killerzellen vorkommen.

Die Abbildungen 9 und 10 zeigen die Ergebnisse der Kontrollgruppe innerhalb der mit dem NK-Zell-Marker gefärbten histologischen Schnitte. Auf ihnen wird eine schwache Infiltration mit Natürlichen Killerzellen deutlich. Die Abbildungen 11 und 12 repräsentie-

ren die Gruppe, die einmal mit dem Antikörper cmHsp70.1 therapiert worden ist. Sie zeigen ein schwaches Infiltrationsverhalten der Natürlichen Killerzellen. Die Abbildungen 13 und 14 zeigen die Ergebnisse der zweimal therapierten Mausgruppe. Auf ihnen ist zu erkennen, dass die Infiltrationsstärke der Natürlichen Killerzellen zugenommen hat und sie ein intermediäres Infiltrationsverhalten zeigen. Die dreimal mit dem Antikörper cmHsp70.1 behandelte Gruppe ist auf den Abbildungen 15 und 16 dargestellt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur ein Mal therapierten Mausgruppe stellt sich eine deutliche Steigerung der Infiltration durch die Natürlichen Killerzellen dar. Sie kann mit einer starken Infiltration bewertet werden.

5.2 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit dem Antikörper F4/80

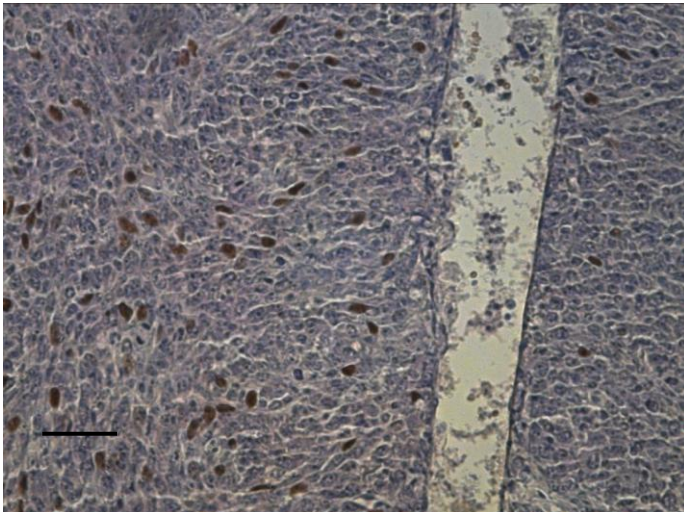


Abbildung 18: Makrophagen, Ctrl

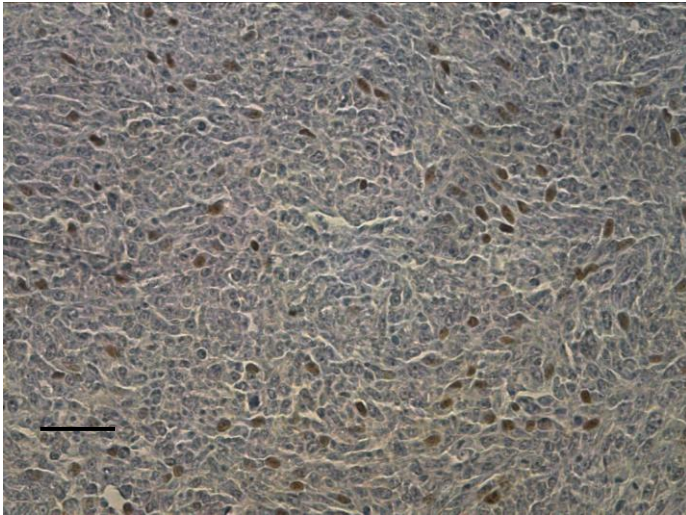


Abbildung 19: Makrophagen, 1x AB

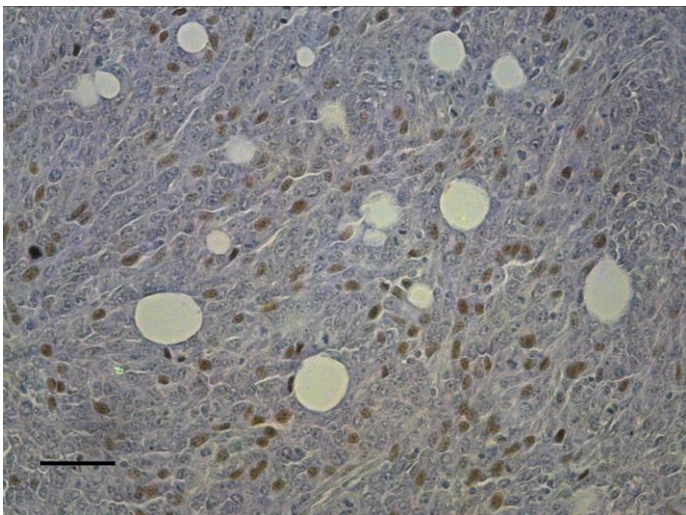


Abbildung 20: Makrophagen, 2x AB

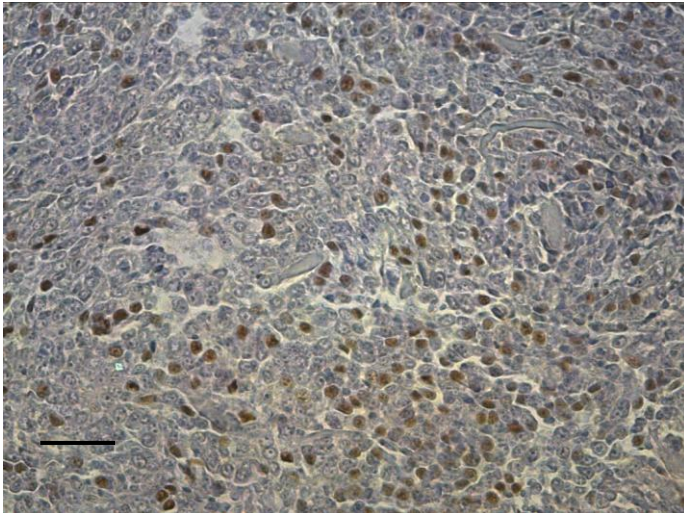


Abbildung 21: Makrophagen, 3x AB

Auf den Abbildungen 18 bis 21 ist die immunhistochemische Färbung mit dem F4/80 Antikörper (Clone BM8, F4/80, Acris Antibodies) dargestellt. Makrophagen sind in einer normalen Hämatoxylin-Eosin Färbung an ihrem nierenförmigen bzw. eingekerbten Kern zu erkennen.

Die Abbildung 18 zeigt ein repräsentatives Bild der Kontrollgruppe, die mit dem Antikörper F4/80 immunhistochemisch angefärbt worden ist. Dieses Infiltrationsverhalten der Makrophagen kann als ein intermediäres Infiltrationsverhalten interpretiert werden. Die Abbildungen 19 und 20 stellen repräsentative histologische Bilder der einmal mit dem Antikörper und zweimal mit dem Antikörper cmHsp70.1 behandelten Mausgruppen dar. Sie zeigen ebenso wie die Kontrollgruppe eine intermediäre Infiltration der Makrophagen. Im Vergleich dazu ist auf der Abbildung 21 die dreimal behandelte Mausgruppe dargestellt. Es zeigt sich eine starke Zunahme der Infiltration der Makrophagen in das Tumorgewebe.

5.3 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit dem Antikörper Ly6G/Ly6C

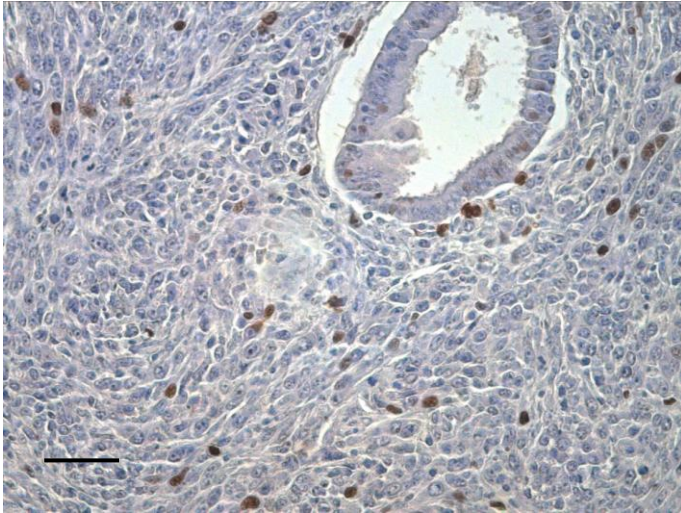


Abbildung 22: Granulozyten, Ly6G/Ly6C, Ctrl

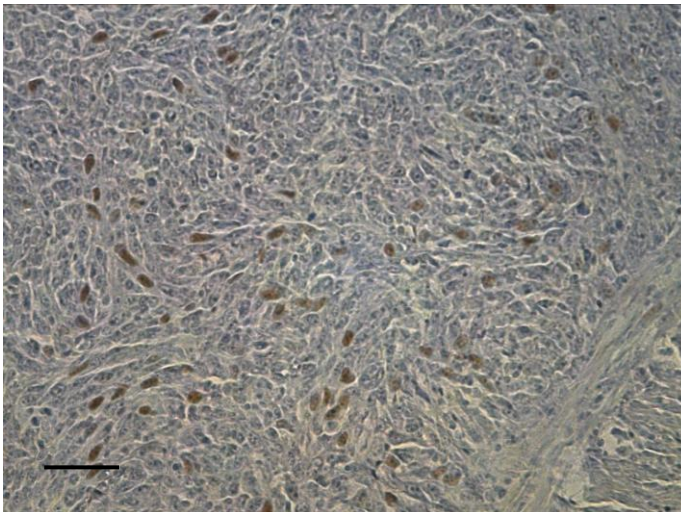


Abbildung 23: Granulozyten, Ly6G/Ly6C, 1x AB

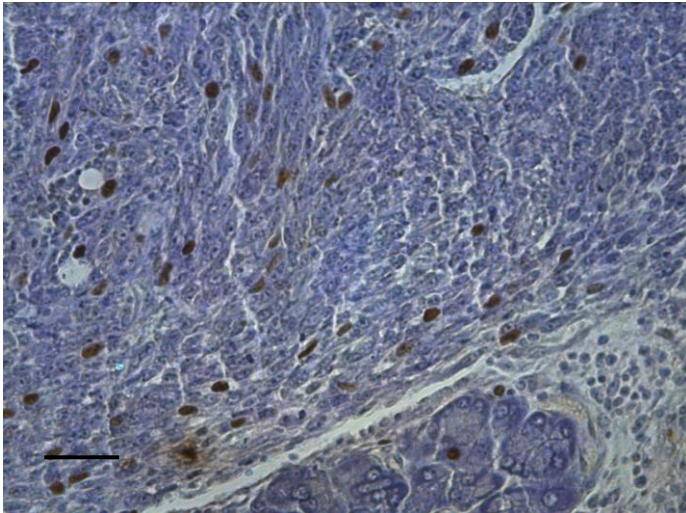


Abbildung 24: Granulozyten, Ly6G/Ly6C, 2x AB

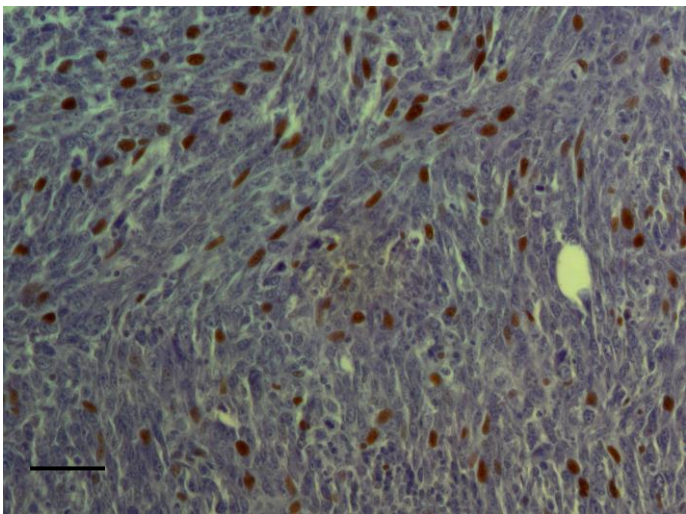


Abbildung 25: Granulozyten, Ly6G/Ly6C, 3x AB

Auf den Abbildungen 22 bis 25 ist die immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper Ly6G/Ly6C (Clone RB6-8C5, Gr-1, BD Pharmigen™) dargestellt. Im Allgemeinen besitzen Granulozyten im Zytoplasma zahlreiche Granula, die sich mit sauren Farbstoffen wie Eosin oder mit basischen Farbstoffen wie Methyleneblau und Azur anfärben lassen (Welsch 2006). Die Granula der neutrophilen Granulozyten lassen sich mit sauren und mit basischen Farbstoffen rosa oder violett anfärben. Die eosinophilen

Granulozyten färben sich eosinrot und die basophilen Granulozyten werden durch die basischen Farbstoffe tiefblau-schwarz (Welsch 2006).

Auf der Abbildung 22 ist die Kontrollgruppe der immunhistochemischen Färbung mit dem Antikörper Ly6C/Ly6G dargestellt. Es zeigt sich ein schwaches Infiltrationsverhalten der Granulozyten. Die einmal mit dem Antikörper cmHsp70.1 behandelte Mausgruppe ist auf der Abbildung 23 abgebildet und die Abbildung 24 repräsentiert die zweimal therapierte Mausgruppe. Auf beiden Abbildungen ist eine intermediäre Infiltration mit Granulozyten zu sehen. Die dreimal therapierte Mausgruppe zeigt im Vergleich zur Kontrollgruppe eine starke Infiltration, wie auf Abbildung 25 zu sehen ist.

5.4 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit dem Antikörper CD3

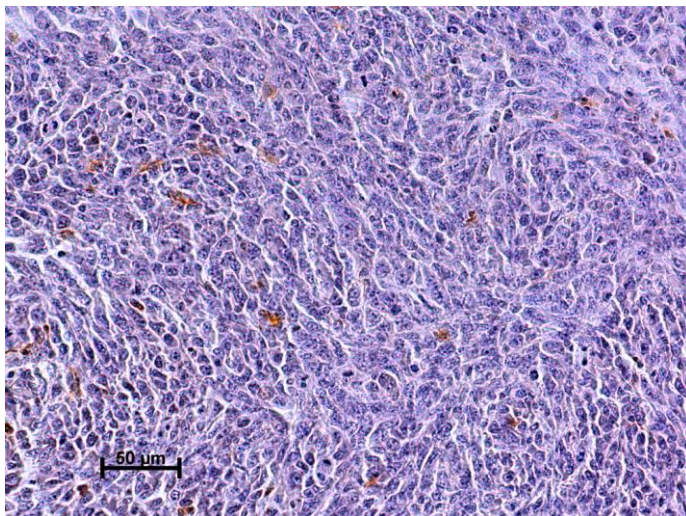


Abbildung 26: T-Zellen, CD3, Ctrl

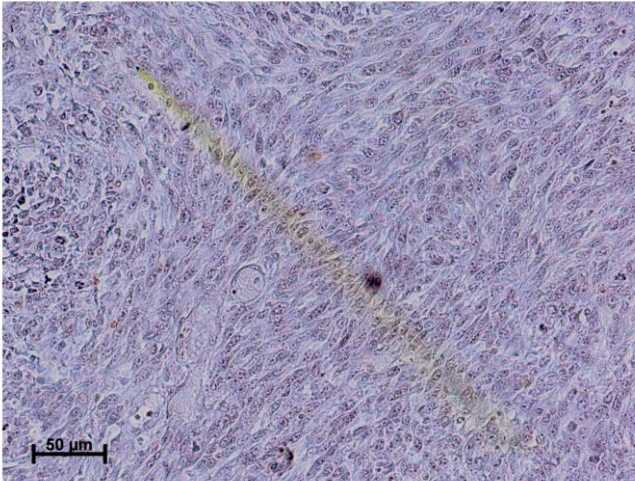


Abbildung 27: T-Zellen, CD3, 1x AB

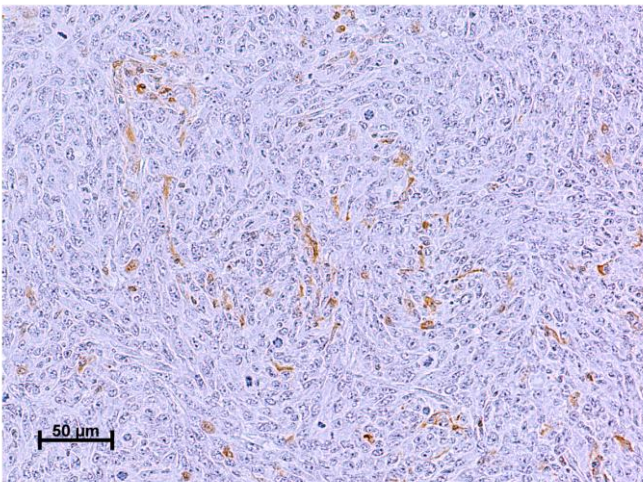


Abbildung 28: T-Zellen, CD3, 2x AB

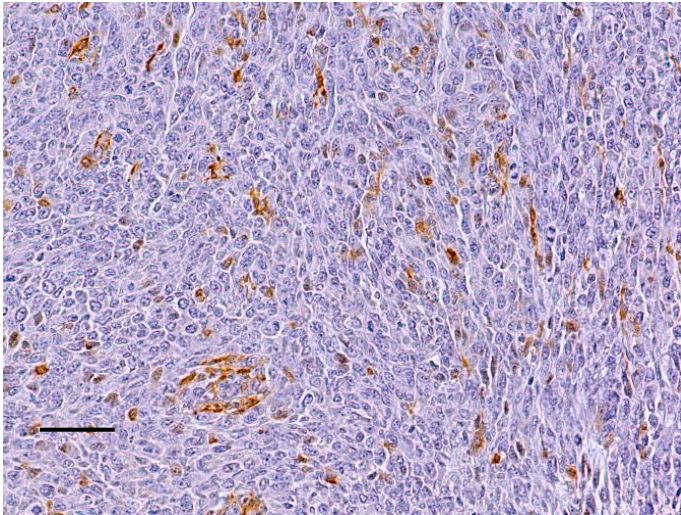


Abbildung 29: T-Zellen, CD3, 3x AB

Die Abbildungen 26 bis 29 zeigen die Ergebnisse der Mäuse, die mit dem Antikörper gegen CD3 immunhistochemisch gefärbt worden sind. Auf der Abbildung 26 ist ein repräsentatives Bild der Kontrollgruppe der T-Zellen dargestellt. Das Färbeverhalten, das sich auf Abbildung 26 zeigt, wird als eine sehr schwache Infiltration mit T-Zellen innerhalb des Tumorgewebes gewertet. Abbildung 27 und 28 zeigen repräsentative Schnitte der einmal und zweimal mit dem Antikörper cmHsp70.1 therapierten Mausgruppen. Sie zeigen eine sehr schwache Infiltration der T-Zellen. Die Abbildung 29 zeigt die dreimal behandelte Gruppe. Diese Abbildung wird mit einer intermediären Infiltration bewertet. Die T-Zellen, die durch die Färbung mit dem Antikörper CD3 eine bräunliche Farbe zeigen, sind auf den histologischen Schnitten anhand ihrer rundlichen Zellform zu erkennen. Es fallen jedoch weiter auch braungefärbte Zellen auf, die eine längliche Zellform aufweisen. Diese könnten T-Zellen darstellen, die sich fortbewegen und in dieser Fortbewegung im histologischen Schnitt angeschnitten wurden. Abbildung 30 zeigt eine Vergrößerung (Vergrößerung 40x) einer länglichen T-Zelle.

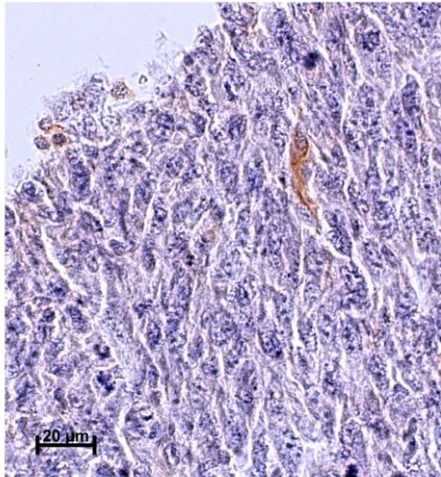


Abbildung 30: T-Zelle 40x fach

Abbildung 30 zeigt zusätzlich die typischen histologischen Merkmale einer Tumorzelle: unterschiedlich große, polymorphe Zellkerne mit plumpen oder prominenten Nukleolen (Riede et al. 2004).

Antikörper	Ctrl	1x AB	2x AB	3x AB
NK-Zellen, Ly49b (Clone DX5, BD Pharmigen™)	+	+	++	+++
NK-Zellen, CD56 (Clone 12F11, BD Pharmigen™)	+	+	++	+++
NK-Zellen, gesamt (CD49b/ CD56)	+	+	++	+++
Makrophagen, F4/80 (Clone BM8, Acris Antibodies)	++	++	++	+++
Granulozyten, Ly6G/ Ly6C (Clone RB6-8C5, GR-1, BD Pharmigen™)	+	++	++	+++
T-Zellen, CD3 (Clone SP7, Abcam)	-	-	-	+

Tabelle 13: Semiquantitative Analyse der lymphatischen und granulozytären Infiltration in die CT26-Tumore nach einer bis drei Injektionen des monoklonalen Antikörpers cmHsp70.1

6 Diskussion

6.1 Zusammenfassung und Interpretation der Versuchsergebnisse

Bösartige Tumorerkrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Dabei zählen Kolorektalkarzinomerkrankungen mit einer Inzidenz von 40-60/100.000/Jahr zu den häufigsten Tumoren des Menschen. Heutzutage wird in der Klinik ein multimodales Therapiekonzept eingesetzt. Dabei werden alle dazugehörigen Fachdisziplinen mit in die Therapieplanung einbezogen, um die bestmögliche Therapie für den betroffenen Patienten zu ermöglichen. Neben der chirurgischen Resektion und der Radiochemotherapie werden einige der Tumorerkrankungen heute auch mittels monoklonaler Antikörper therapiert. Dazu gehören u.a. das Mammakarzinom und auch B-Zelllymphome, die mit Antikörpern wie Herceptin® oder Rituximab erfolgreich behandelt werden können.

Hsp70 erfüllt im menschlichen Organismus viele Funktionen wie zum Beispiel den Schutz der Zelle bei Stress durch exogene Noxen. Es wurde jedoch auch beschrieben, dass Hsp70 auf bestimmten Tumorentitäten wie Kolonkarzinomzellen der Zelllinie CT26 membrangebunden vorkommt.

Um Tumorpatienten besser behandeln zu können, ergab sich die Frage, ob mittels einer zielgerichteten Antikörpertherapie gegen das Hsp70-Molekül auf Tumorzellen eine effektive Tumorthherapie erzielt werden kann.

Dazu wurde von der Arbeitsgruppe Multhoff der monoklonale Antikörper cmHsp70.1 generiert, der spezifisch an die membrangebundene Form des Hsp70-Moleküls auf Tumorzellen bindet. In Vorversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass cmHsp70.1 in der Lage ist, *in-vitro* den immunologischen Mechanismus der ADCC durch unstimulierte murine Milzeffektorzellen (Stangl, Gehrmann et al. 2011) auszulösen.

Das Ziel dieser Arbeit ist es nachzuweisen, dass cmHsp70.1 nicht nur *in-vitro*, sondern auch *in-vivo* über die Auslösung der ADCC zu einem Abtöten von Tumorzellen und zu einer Regression des Tumorgewichts der behandelten Tumore führt. Aus diesem Grund wurden Balb/c Mäusen Kolonkarzinomzellen der Zelllinie CT 26 intraperitoneal injiziert und konsekutiv mit dem Hsp70-spezifischen Antikörper cmHsp70.1 behandelt. Nach 21 Tagen wurden die Mäuse mittels zervikaler Dissektion getötet und die Tumore entnommen und histologisch untersucht.

Es erfolgte die immunhistochemische Anfärbung von Immuneffektorzellen, von denen beschrieben ist, dass sie in der Lage sind die ADCC auszulösen. In den Versuchsergebnissen zeigt sich, dass das Tumorgewebe der dreimal vorbehandelten Mäuse im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine viel stärkere Infiltration mit NK-Zellen, Makrophagen und Granulozyten aufweist als die dazugehörige nicht vorbehandelte Kontrollgruppe. Die Vorbehandlung mit dem Hsp70-spezifischen Antikörper cmHsp70.1 hat folglich zu der Infiltration der Immuneffektorzellen in das Tumorgewebe geführt.

Die Tumorgewichtsdaten, die von der Arbeitsgruppe Multhoff (Stangl, Gehrman et al. 2011) erhoben wurden, zeigen eine signifikante Reduktion des Tumorgewichts je intensiver die Therapie mit cmHsp70.1 erfolgt ist (Stangl, Gehrman et al. 2011). Dies ist außerdem mit einem signifikanten Anstieg des Serumlevels an Hsp70 (Tag 14: 154 ± 41.7 pg/mL vs. $1,434.5 \pm 786$ pg/mL, $n = 4$, $P < 0.01$, gemessen mittels ELISA) assoziiert (Stangl, Gehrman et al. 2011). Im Vergleich dazu scheint bei den CD3⁺-T-Zellen ein anderes Infiltrationsverhalten zu Grunde zu liegen. Im Ergebnisteil zeigt sich, dass die immunhistochemischen Bilder der Kontrollgruppe und der einmal und zweimal vorbehandelten Mausgruppe eine sehr schwache Infiltration mit T-Zellen aufweisen. Erst die dreimal vorbehandelte Gruppe zeigt eine etwas stärkere Infiltration der T-Lymphozyten. Dieses Infiltrationsverhalten der T-Zellen in unserem Modell scheint dem physiologischen Ablauf der sekundären Immunantwort zu folgen. Die Antigene müssen den T-Zellen erst präsentiert werden, damit sie den Stimulus zur Infiltration und zum Abtöten der - in diesem Fall CT26-positiven - Tumorzellen erhalten. Aufgrund unseres Versuchsaufbaus ist es nicht möglich, eine Aussage über den exakten Zeitpunkt der Infiltration zu treffen. Die im Ergebnisteil dargestellten Immunhistochemien zeigen, dass durch mehrfache Vorbehandlung der Mäuse eine stärkere Infiltration mit Immuneffektorzellen gelingt. Um eine Aussage über den Zeitpunkt der Infiltration zu machen, wäre ein weiterer Versuch nötig, in dem jeweils eine Maus zu verschiedenen Zeitpunkten aus dem Experiment ausgeschlossen würde. Die Tumore dieser Maus müssten jeweils auf die Immuneffektorzellen hin untersucht werden und zusätzlich am Ende der Versuchsreihe - wie bei uns - an Tag 21. Aus diesem Versuchsansatz ließe sich eine genauere Aussage treffen, zu welchem Zeitpunkt welche Immuneffektorzelle in das Tumorgewebe infiltriert. In der Literatur werden NK-Zellen häufig in Bezug auf ihre Fähigkeit, immunologische Vorgänge zu beeinflussen, diskutiert. So beschreiben Lee et al., dass durch monoklonale Antikörpertherapien NK-Zellen dazu stimuliert werden, Tumorzellen durch die ADCC zu töten (Lee, Srivastava et al. 2011). Stangl et al. konnten in Experimenten *in-vitro* zeigen, dass durch die Stimulation von murinen Milzzellen mit TKD/IL-2 der Anteil an NK-Zellen zunimmt und dass es zu einer gesteigerten Lyse von Tumorzellen der Zelllinie CT26 kommt (Stangl, Gehrman et al. 2011). Die

stärkere Zytolyse könnte sich dadurch erklären lassen, dass es durch TKD/ IL-2-aktivierte NK-Zellen zu einem direkten Abtöten der Hsp70-membranpositiven Tumorzellen gekommen ist (Stangl, Gehrman et al. 2011), (Multhoff, Pfister et al. 2001).

In der Literatur werden NK-Zellen als wichtigste Effektorzellen der ADCC beschrieben und für die Wirkung vieler monoklonaler Antikörper verantwortlich gemacht (Abes,Teillaud 2011). So wird der klinische Erfolg beispielsweise von Rituximab, Herceptin® und Cetuximab (ein Antikörper gegen den epidermalen Wachstumsfaktor EGFR) zumindest in großen Teilen der NK-Zellaktivität zugeschrieben (Alderson,Sondel 2011). Makrophagen und Granulozyten sind sowohl in der Lage, die ADCC auszulösen als auch andere Zellen zu phagozytieren. Abès et al. beschreiben, dass Makrophagen und Granulozyten zu einem intrazellulären Abbau von Antikörperbedeckten Zielzellen und letztendlich zu ihrer vollständigen Beseitigung *in-vivo* beitragen. Zudem wird ihnen eine wichtige Rolle bei der Effektivität monoklonale Antikörper zugesprochen wird (Abes,Teillaud 2011). Deschoolmeester et al. haben eine Studie an Patienten mit Kolorektalkarzinomen durchgeführt, in der sie immunhistochemische Schnitte der Tumore auf CD3⁺- und CD8⁺-T-Zellen hin untersucht haben. Sie konnten eine starke Korrelation zwischen der Infiltration von Lymphozyten und einer verbesserten Überlebensrate der Patienten feststellen. Sie haben das verbesserte Überleben darauf zurückgeführt, dass durch die verstärkte Infiltration mit Lymphozyten weniger Mikrometastasen gesetzt wurden (Deschoolmeester, Baay et al. 2010). Dieses Ergebnis bestätigt die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten, dass CD3⁺-T-Lymphozyten eine wichtige Rolle in der Therapie von Tumorpatienten spielen. Nach Vorbehandlung mit dem Hsp70-spezifischen Antikörper cmHsp70.1 wandern sie verstärkt in das Tumorgewebe ein.

Zusammenfassend zeigt sich, dass nach Vorbehandlung mit cmHsp70.1 Immuneffektorzellen wie NK-Zellen, Makrophagen, Granulozyten und CD3⁺-T-Zellen verstärkt das Tumorgewebe infiltrieren und mittels der ADCC zu einer Regression des Tumorwachstums führen. Aus diesem Grund könnte die Behandlung von Tumorpatienten mit dem Hsp70-spezifischen Antikörper ein besseres Therapiekonzept und ein verbessertes Überleben von Patienten mit Hsp70-membranpositiven Tumoren ermöglichen.

6.2 Analyse der Eigenschaften des Antikörpers cmHsp70.1 im Vergleich mit bereits therapeutisch angewandten monoklonalen Antikörpern

Die Therapie von Tumorerkrankungen mittels monoklonaler Antikörper ist ein vielversprechendes Forschungsfeld, das in den letzten Jahren in der Tumorforschung an großer Bedeutung gewonnen hat. Die ersten monoklonalen Antikörper, die entwickelt wurden, richteten sich gegen das GD3-Gangliosid in malignen Melanomen (Houghton,Scheinberg 2000), (Iannello,Ahmad 2005).

In Zukunft wird es eine wichtige Frage sein, wie die Therapie mit monoklonalen Antikörpern noch vielfältiger einsetzbar sein kann und wie monoklonale Antikörper in Kombination mit bereits etablierten Therapiemöglichkeiten wie Chemo- oder Strahlentherapie einen Tumor effektiver angreifen können.

Der Arbeitsgruppe Multhoff ist es gelungen, einen monoklonalen Antikörper gegen die membrangebundene Form des Hsp70 zu generieren. Dieser Antikörper cmHsp70.1 konnte über die Immunisierung von Mäusen mit dem 14-mer-Peptid „TKD“ hergestellt werden. Die murine und die humane TKD-Sequenz unterscheiden sich nur in einer Aminosäure (Zhang, Liu et al. 2007),(Multhoff,Hightower 2011), daher bindet der monoklonale Antikörper cmHsp70.1 sowohl an die murine als auch die humane TKD-Sequenz. Deshalb war es möglich, die Experimente, zu denen auch diese in der hier vorliegenden Dissertation gehören, an der murinen Kolonkarzinom-Zelllinie CT26 durchzuführen. Diese Zelllinie gehört zu der Gruppe von Tumorzellen, die Hsp70 auf ihrer Zellmembran tragen. Multhoff et al. konnten zeigen, dass es viele humane Tumorentitäten gibt, die einen Hsp70-positiven Membranstatus aufweisen. Im Vergleich dazu sind die entsprechenden Normalgewebe Hsp70-negativ auf der Membran (Multhoff, Botzler et al. 1995; Multhoff 2007). Zudem ist bekannt, dass ein Hsp70-positiver Membranstatus negativ mit der Mortalität korreliert. Das Vorhandensein von Hsp70 auf der Zellmembran scheint ein negativer prognostischer Marker zu sein (Pfister, Radons et al. 2007). Jedoch zeigen sowohl die *in-vitro*-Ergebnisse der Arbeitsgruppe Multhoff (Stangl, Gehrman et al. 2011) als auch die im Ergebnisteil dargestellten immunhistochemischen Schnitte, dass dieses Expressionsmuster genutzt werden könnte für eine zielgerichtete Antikörpertherapie. CmHsp70.1 könnte als klinisch einsetzbarer Antikörper verwendet werden und somit eine weitere zielgerichtete Therapiemöglichkeit für Hsp70-membranpositive Tumore darstellen. In klinischer Anwendung finden sich bereits erfolgreich eingesetzte Beispiele.

Ein wichtiger in der Therapie von Mammakarzinomen eingesetzter monoklonaler Antikörper ist Trastuzumab (Herceptin®). Er ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der sich von dem murinen Antikörper 4D5 ableitet (Dugdale, Pinchbeck et al. 2005). Trastuzumab erkennt ein Epitop an der extrazellulären Domäne des epidermalen Wachstumsfaktors HER-2/ Erb-2/ Neu. HER-2 ist ein transmembranärer Tyrosinkinase-Rezeptor und heterodimerisiert mit HER-1, HER-3 und HER-4. Er ist an der Übermittlung von Signalen, die Zellwachstum, -überleben und -proliferation betreffen, beteiligt (Iannello,Ahmad 2005). HER-2 wird auf ca. 25-30% der Mammakarzinome und auf anderen Karzinomentitäten wie Ovarialkarzinomen oder Magenkarzinomen exprimiert (Iannello,Ahmad 2005), (Kono, Takahashi et al. 2002) und ist in der Lage, an Calmodulin, ein intrazelluläres Rezeptorprotein, zu binden (Li, Sanchez-Torres et al. 2004). Trastuzumab blockiert durch seine Bindung an HER-2 den Signalweg bei einer HER2-aktivierten Zelle. Dadurch kommt es zu einer Abnahme der Zellproliferation und die Zelle gewinnt ihre Fähigkeit zur Apoptose über den PI3K/ Akt- Pathway wieder zurück (Dent, Verma et al. 2009), (Yakes, Chinratanalab et al. 2002), (Nahta,Esteva 2006). Außerdem werden die Tumorzellen sensibler gegenüber einer Chemo- oder Strahlentherapie (Pegram, Konecny et al. 2004; Dent, Verma et al. 2009). Eine Überexpression von HER-2 auf Tumorzellen eines Mamma- oder Ovarialkarzinoms spricht für eine schlechtere Prognose der Patientinnen (Iannello,Ahmad 2005).

Es existieren verschiedene Hypothesen bezüglich des Wirkmechanismus von Trastuzumab, u.a. gehört vor allem die Auslösung der ADCC dazu. Carson et al. zeigten, dass Trastuzumab *in-vitro* HER-2-positive, nicht aber HER-2-negative Mammakarzinomzellen über Auslösung der ADCC abtöten kann (Carson, Parihar et al. 2001). CD16⁺-NK-Zellen scheinen bei der Wirksamkeit von Trastuzumab zu den wichtigsten Effektorzellen zu gehören (Sliwkowski, Lofgren et al. 1999). Es wird beschrieben, dass Trastuzumab die HER-2-stimulierte Angiogenese inhibieren kann (Nahta,Esteva 2006), (Izumi, Xu et al. 2002) (Klos, Zhou et al. 2003). Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten, nämlich, dass Immuneffektorzellen wie NK-Zellen nach Vorbehandlung mit dem Hsp70-spezifischen Antikörper vermehrt im Tumorgewebe vorhanden sind, zeigen, dass dieser Antikörper seine Wirkung auch *in-vivo* über die ADCC vermittelt. Dies könnte für Tumorpatienten mit Hsp70-membranpositiven Tumoren eine neue Behandlung ermöglichen.

Cobleigh et al. konnten in einer Studie zeigen, dass ungefähr 15% der Frauen, die zuvor aufgrund eines metastasierten Mammakarzinoms behandelt worden sind und deren Tumor eine Überexpression des Wachstumsrezeptors HER-2 aufwies, auf die Therapie mit Trastuzumab ansprachen (Cobleigh, Vogel et al. 1999). In einer großen Stu-

die konnte dargestellt werden, dass aus der Kombination von Trastuzumab mit einer Chemotherapie eine 25% höhere Überlebensrate nach 29 Monaten resultierte (Slamon, Leyland-Jones et al. 2001), (Baselga 2001). Trastuzumab ist somit nicht nur als Monotherapie bei Mammakarzinomen einsetzbar, sondern auch in Kombination mit Chemotherapie oder einem Aromatasehemmer.

Ein zweiter, häufig eingesetzter monoklonaler Antikörper ist Rituximab. Er ist ein humanisierter Antikörper, der sich gegen das Oberflächenmolekül CD20 auf B-Zellen richtet. Eine Therapie mit Rituximab ist bei Patienten mit folliculären Lymphomen in einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium und ohne Vorbehandlung indiziert. In diesem Fall wird er mit Chemotherapeutika kombiniert. Es wird auch bei Patienten mit diffus großzelligem B-Zell-Lymphom zusammen mit dem Chemotherapieprotokoll CHOP (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon) eingesetzt. Coiffier beschreibt eine 76%-ige komplette Ansprechrate bei Patienten mit einem diffus großzelligem B-Zell-Lymphom, die mit der Kombination von Rituximab und dem CHOP-Schema behandelt worden waren. Im Vergleich dazu lag die Ansprechrate bei Patienten mit einer reinen Chemotherapie mit dem CHOP-Schema bei 60% (Coiffier 2002), (Adams, Weiner 2005). Shan et al. beschreiben, dass Rituximab in verschiedenen Studien *in-vitro* durch unterschiedliche Mechanismen zum Zelltod geführt hat. Dazu gehören unter anderem die Auslösung von ADCC, CDC und die Induzierung der Apoptose (Shan, Ledbetter et al. 2000). Im Rahmen der Therapie mit Rituximab kann eine schwere „first-dose“-Toxizität auftreten. Sie steht im Zusammenhang mit der Anhäufung von Zelldetritus durch die rasche Zerstörung der malignen Lymphomzellen sowie der normalen Zellen, die das Oberflächenmolekül CD20 auf ihrer Zelloberfläche tragen (Byrd, Waselenko et al. 1999).

6.3 Therapiespektrum des monoklonalen Antikörpers cmHsp70.1

Monoklonale Antikörper werden in der klinischen Therapie entweder als Monotherapie oder als Kombinationstherapie zusammen mit Chemotherapeutika oder Strahlentherapie eingesetzt. Wie oben bereits beschrieben, wird beispielsweise Trastuzumab zusammen mit Chemotherapeutika wie Doxorubicin oder anderen in der Therapie von Mammakarzinomen eingesetzt. Auch Rituximab findet seinen klinischen Einsatz sowohl als Monotherapeutikum als auch in Kombination mit dem Chemotherapiechema CHOP.

Gehrmann et al. konnten an γ -bestrahlten Kolonkarzinomzelllinien, welche membrangebundenes Hsp70 initial niedrig exprimierten, einen Anstieg der Hsp70-membranpositiven Zellen im Tumor sowie eine höhere Hsp70-Moleküldichte auf den Membranen der einzelnen Zellen nachweisen. Im Vergleich dazu blieb die Dichte bei Zelllinien, die vor der Bestrahlung schon hohe Level an Hsp70 exprimiert hatten, gleich (Gehrmann, Marienhagen et al. 2005). Das gleiche Phänomen lässt sich auch für die Tumorzellen Colo+/ Colo- von Pankreaskarzinomen nachweisen. Die stärkere Expression von Hsp70 auf der Plasmamembran ist durch Translokation von zytosolischem Hsp70 auf die Plasmamembran möglich (Gehrmann, Marienhagen et al. 2005). Diese Beobachtung legt die Schlussfolgerung nahe, dass der monoklonale Antikörper cmHsp70.1, der sich gegen das membrangebundene Hsp70-Molekül auf Tumorzellen richtet, möglicherweise einen klinischen Benefit im Zusammenspiel mit einer Strahlentherapie bieten könnte. Denn obwohl ein Hsp70-membranpositiver Status als negativer prognostischer Marker eingeschätzt wird (Stangl, Gehrmann et al. 2011) und mit einem schlechteren klinischen Outcome in manchen Tumorentitäten einhergeht, könnte durch den Einsatz des monoklonalen Antikörpers cmHsp70.1 die therapeutische Option bestehen, zielgerichtet gegen die Tumorzelle zu behandeln. CmHsp70.1 scheint nur auf Hsp70-tragenden Tumorzellen seine zytotoxische Wirkung auszuüben, da Normalgewebe Hsp70-negativ auf der Plasmamembran ist und somit nicht als Zielstruktur fungiert. Eine weitere Therapiemöglichkeit könnte die Kombination von cmHsp70.1 mit selektiven COX-1/2-Hemmern bieten. Gehrmann et al. beschreiben, dass bei Versuchen mit den Tumorzelllinien CX- und CX-2 eine signifikante Hochregulation von zytoplasmatischem Hsp70 bei Gabe von nichttödlichen Dosen von COX-1/2-Hemmern auftritt. Die Tumorzelllinie CX- exprimiert Hsp70 nur in niedriger Konzentration auf der Plasmamembran, wohingegen CX-2 einen hohen Level an Hsp70 auf der Plasmamembran aufweist. Beide Zelllinien wurden zusammen mit nichttödlichen Dosen von COX-1/2-Hemmern inkubiert und es zeigte sich eine Erhöhung der Hsp70-Dichte auf der CX--Zelllinie. Die Hsp70-Dichte auf den vorher schon verstärkt Hsp70 exprimierenden CX-2-Tumorzellen blieb dagegen gleich (Gehrmann, Brunner et al. 2004).

Ein Hsp70-membranpositiver Status bei malignen Melanomen und bei AML mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zur Metastasierung und mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Gehrmann, Schmetzer et al. 2003). Bei Patienten mit tiefem Rektumkarzinom und Plattenepithelkarzinom der Lunge und Hsp70-positiver Plasmamembran wird auch über ein schlechteres klinisches Outcome berichtet (Pfister, Radons et al. 2007). Jedoch haben Patienten mit Hsp70-positiven Kolon- und Magenkarzinomen ein signifikant besseres Überleben. Man nimmt an, dass der Grund für diese Polarität in den verschiedenen Metastasierungswegen der beschriebenen Tu-

morentitäten liegt. Kolon- und Magenkarzinome metastasieren vor allem über die Vena mesenterica (Koch, Weitz et al. 2001), über das Splanchnikusgebiet, in die Leber, wohingegen tiefe Rektumkarzinome unter Umgehung der Leber in die Lunge metastasieren (Dormann A 2001). Tumore der Lunge metastasieren häufig in das Gehirn und in lokale Lymphabflussgebiete (Pfister, Radons et al. 2007). Als wahrscheinliche Ursache für die bessere Überlebenswahrscheinlichkeit bei Tumoren mit hepatischer Metastasierung wird vermutet, dass die hepatischen NK-Zellen eine wichtige Filterfunktion von Tumorzellen übernehmen. Man weiß, dass nach Transplantation von NK-Zellen in Mäuse eine Zellyse von Hsp70-membranpositiven Tumorzellen *in-vivo* möglich ist (Multhoff, Pfister et al. 2000). Außerdem wird hepatischen NK-Zellen eine stärkere zytolytische Fähigkeit attestiert als NK-Zellen aus der Blutbahn oder aus der Milz. Zudem wird CD94 von hepatische NK-Zellen stark exprimiert (Vermijlen, Seynaeve et al. 2004). CD94 ist an der Interaktion zwischen Hsp70-membranpositiven Tumorzellen und NK-Zellen beteiligt (Gross, Hansch et al. 2003). Dies ist ein weiterer Grund dafür, dass die Stimulation über inflammatorische Zytokine für NK-Zellen wichtig ist zur Ausübung ihrer Funktion als Effektorzellen. IL-15 ist beispielsweise für die verschiedenen Funktionen von NK-Zellen wie ihrer Aktivierung, dem Rekrutment, der Proliferation oder der Differenzierung essentiell (Ferlazzo, Pack et al. 2004; Pfister, Radons et al. 2007), (Kogure, Mantani et al. 2002). In der Leber enthalten Kupfer`sche Sternzellen - Makrophagen des hepatischen Gewebes - viel IL-15. Dies könnte für die verstärkte Zytolyse von Tumorzellen in der Leber eine Rolle spielen. Aus diesen Gründen könnte sich für die Therapie mit cmHsp70.1 ableiten lassen, dass er bei Tumorentitäten, die hepatisch metastasieren, zusammen mit der Filterfunktion der hepatischen NK-Zellen einen effektiven Therapieansatz darstellen könnte, da durch die Antikörpertherapie zielgerichtet Hsp70-membranpositive Tumorzellen angegriffen und durch die hepatischen NK-Zellen eine Metastasierungstendenz reduziert und möglicherweise sogar verhindert werden könnte.

Hsp70-membranpositive Tumorzellen scheinen signifikant widerstandsfähiger gegenüber chemisch- und physikalisch-induziertem Stress zu sein als Hsp70-negative Tumorzellen. Außerdem wirkt Hsp70 membranstabilisierend und ermöglicht vermutlich auf diesem Wege eine verstärkte Resistenz der Tumorzelle gegenüber einer Chemo- oder Strahlentherapie (Pfister, Radons et al. 2007). Betrachtet man die Tatsache, dass eine γ -Bestrahlung die Dichte von Hsp70 auf der Plasmamembran von Tumorzellen erhöht und dass Hsp70 für einige Tumorentitäten ein schlechteres klinisches Outcome bedeutet, erscheint es auf den ersten Blick widersprüchlich, dass dies einen Vorteil für die Therapie von Hsp70-membranpositiven Tumorerkrankungen bedeuten könnte. Berücksichtigt man jedoch, dass Hsp70 viele Funktionen innerhalb der Zelle übernimmt

und dass in der Abwesenheit von Hsp70 oder von Zytokin-stimulierten NK-Zellen, vermutlich die immunstimulatorischen Fähigkeiten von Hsp70 zugunsten seiner anderen Funktionen vermindert sind (Pfister, Radons et al. 2007), ist es möglich, dass auch in diesem Zusammenhang eine Therapie mit cmHsp70.1 erfolgreich wäre. Durch den gezielten Angriff könnten die Hsp70-membranpositiven Tumorzellen lysiert und so die Resistenz gegen eine Bestrahlung reduziert werden.

6.4 Kritische Stellungnahme zur Therapie mit monoklonalen Antikörpern

Die Therapie mit monoklonalen Antikörpern wurde durch die von Kohler und Milstein 1975 erstmals beschriebene Hybridomtechnik ermöglicht (Kohler, Milstein 1975). Obwohl in die Therapie mit monoklonalen Antikörpern große Erwartungen gesetzt wurden, waren die ersten Erfolge eher mäßig. Ein Hauptgrund für die zunächst schlechte Wirksamkeit und die beschränkte Anwendung der murinen monoklonalen Antikörper im menschlichen Körper waren ihre kurze Halbwertszeit und ihre geringe Effektorzellfunktion (Iannello, Ahmad 2005). Nach einem Austausch der murinen Fc-Region mittels der humanen Fc-Region konnte dies verbessert werden.

Jedoch gibt es auch heute noch Gründe dafür, dass die Therapie mit monoklonalen Antikörpern nicht oder nur zu einem unzureichenden klinischen Erfolg führt. Dies liegt unter anderem daran, dass Tumorzellen einige Möglichkeiten entwickelt haben, das Immunsystem zu umgehen und somit auch der Wirksamkeit von monoklonalen Antikörpern zu entkommen.

Tumorzellen sind in der Lage die Expression von MHC-Antigenen zu modulieren. Dies ist beispielsweise für leukämische Tumorzellen beschrieben worden. Sie regulieren ihre MHC-Klasse-I-Antigene herunter, um die NK-Zell- und zytotoxische T-Zell-vermittelte Immunantwort zu umgehen. Demanet et al. beschreiben, dass HLA-Bw6 und HLA-A herunterreguliert werden, nicht aber HLA-Bw4 (Demanet, Mulder et al. 2004). Dieses ist einer der Liganden für inhibitorische KIR (killer cell immunoglobulin-like receptors) auf NK-Zellen. KIR-vermittelte inhibitorische Signale sind stärker als CD16- und CD32-vermittelte NK-Zell-Aktivierung. Deshalb wird vermutet, dass eine Interaktion von HLA-Bw4 und KIR das Abtöten von Tumorzellen während der ADCC verhindert (Demanet, Mulder et al. 2004). Dies wäre eine Erklärung dafür, dass bei

manchen Patienten die Therapie von Tumorerkrankungen mit monoklonalen Antikörpern nicht zu einer klinisch ausreichenden Effektivität führt.

Auch eine Veränderung der nicht-klassischen HLA-Moleküle in Tumorzellen ist denkbar. Für Tumorzellen von Mammakarzinomen ist beschrieben, dass 38% HLA-G exprimieren (Lefebvre, Antoine et al. 2002). Im Vergleich dazu ist das für normales Mammagewebe nicht beschrieben. HLA-G gehört zu den nicht-klassischen HLA-Klasse-I-Antigenen und wird normalerweise von Trophoblastenzellen während der Schwangerschaft exprimiert (Iannello, Ahmad 2005). Es wird angenommen, dass es an der Hemmung des mütterlichen Immunsystems gegenüber dem Fetus beteiligt ist.

HLA-G interagiert mit verschiedenen anderen Rezeptoren wie beispielsweise ILT-2, KIR2DL4 oder dem Ko-Rezeptor von zytotoxischen T-Lymphozyten. Diese Rezeptoren werden von Monozyten, Makrophagen, NK-Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten exprimiert (Papamichail, Perez et al. 2004), (Biassoni, Cantoni et al. 2001). Eine Interaktion von HLA-G mit den genannten Rezeptoren auf den Effektorzellen führt zu einer verminderten oder fehlenden Effektivität der gehemmteten Zellen. Dies könnte für die Therapie mit monoklonalen Antikörpern bedeuten, dass gerade Zellen, die durch Ausführung der ADCC versuchen, die Tumorzellen gezielt abzutöten, in ihrer Effektivität gehemmt werden und dadurch der Therapieerfolg der monoklonalen Antikörper ausbleibt oder vermindert ist.

Der Polymorphismus von Fc γ -Rezeptoren ist ein weiterer Grund für eine verminderte Effektivität von monoklonalen Antikörpern, da Fc-Rezeptor-tragende Effektorzellen an der ADCC und an der Immunantwort gegen Tumorzellen beteiligt sind. Wenig und Levy beschreiben, dass der Polymorphismus von Fc γ -Rezeptoren das Therapieansprechen von Patienten mit folliculären Lymphomen beeinflusst und dass Fc γ RIIIa 158v/v und Fc γ RIIa 131 his/his Genotypen unabhängig voneinander mit einem Therapieansprechen und Progressionsfreiheit in ihrem Patientenkollektiv verbunden waren. Das V-Allel (Valin) von Fc γ RIIIa besitzt eine höhere Affinität für IgG1 und IgG3 als das F-Allel (Phenylalanin). Aus diesem Grund vermittelt der erstgenannte Fc γ -Rezeptor die ADCC effektiver (Iannello, Ahmad 2005). Wenn bekannt wäre, welchen Typ des Fc γ -Rezeptor-Polymorphismus der jeweilige Patient tragen würde, wäre eine gezieltere Therapie mittels monoklonaler Antikörper möglich. Damit ließen sich die Effektivität und der Erfolg dieser Therapie optimieren.

7 Ausblick

Eine Erweiterung des Versuchsaufbaus durch einen gezielten Ausschluss von Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten des Experimentes könnte eine noch detailliertere Aussage über den genauen Zeitpunkt der Infiltration von Immuneffektorzellen in das Tumorgewebe geben. Somit ließe sich nicht nur eine quantitative Aussage darüber treffen, dass der monoklonale Antikörper cmHsp70.1 zu einer Infiltration des Tumorgewebes mit Immuneffektorzellen führt, sondern auch über den Zeitpunkt der Infiltration. Eine klinische Anwendbarkeit von cmHsp70.1 könnte für Patienten mit Hsp70-membranpositiven Tumoren in der Zukunft eine vielversprechende, effektive und nebenwirkungsarme Therapie ermöglichen.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Bezeichnung	Quelle
Abb. 1	Schematische Darstellung eines Antikörpermodells	Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. "Immunobiology: The Immune System in Health and Disease." 5th edition. New York: Garland Science; 2001.
Abb. 2	Schematische Abbildung der ADCC vermittelt über NK-Zellen	Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. "Immunobiology: The Immune System in Health and Disease." 5th edition. New York: Garland Science; 2001.
Abb. 3	Natürliche Killerzelle	Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. "Immunobiology: The Immune System in Health and Disease." 5th edition. New York: Garland Science; 2001. Lichtmikroskopie
Abb. 4	Makrophage	Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. "Immunobiology: The Immune System in Health and Disease." 5th edition. New York: Garland Science; 2001. Lichtmikroskopie
Abb. 5	Neutrophiler Granulozyt	Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. "Immunobiology: The Immune System in Health and Disease." 5th edition. New York: Garland Science; 2001. Lichtmikroskopie
Abb. 6	Eosinophiler Granulozyt	Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. "Immunobiology: The Immune System in Health and Disease." 5th edition. New York: Garland Science; 2001. Lichtmikroskopie

Abb. 7	Basophiler Granulozyt	Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. "Immunobiology: The Immune System in Health and Disease." 5th edition. New York: Garland Science; 2001. Lichtmikroskopie
Abb. 8	Isotypen-Kontrolle, IgM	eigene Aufnahme, Immunhistochemie, Vergrößerung 20x
Abb. 9	NK-Zellen, Ly49b, Ctrl	eigene Aufnahme, Immunhistochemie, Vergrößerung 20x
Abb. 10	NK-Zellen, CD56, Ctrl	eigene Aufnahme, Immunhistochemie, Vergrößerung 20x
Abb. 11	NK-Zellen, Ly49b, 1x AB	eigene Aufnahme, Immunhistochemie, Vergrößerung 20x
Abb. 12	NK-Zellen, CD56, 1x AB	eigene Aufnahme, Immunhistochemie, Vergrößerung 20x
Abb. 13	NK-Zellen, Ly49b, 2x AB	eigene Aufnahme, Immunhistochemie, Vergrößerung 20x
Abb. 14	NK-Zellen, CD56, 2x AB	eigene Aufnahme, Immunhistochemie, Vergrößerung 20x
Abb. 15	NK-Zellen, Ly49b, 3x AB	eigene Aufnahme, Immunhistochemie, Vergrößerung 20x
Abb. 16	NK-Zellen, CD56, 3x AB	eigene Aufnahme, Immunhistochemie, Vergrößerung 20x
Abb. 17	Isotypen-Kontrolle, IgG	eigene Aufnahme, Immunhistochemie, Vergrößerung 20x
Abb. 18	Makrophagen, Ctrl	eigene Aufnahme, Immunhistochemie, Vergrößerung 20x
Abb. 19	Makrophagen, 1x AB	eigene Aufnahme, Immunhistochemie, Vergrößerung 20x
Abb. 20	Makrophagen, 2x AB	eigene Aufnahme, Immunhistochemie, Vergrößerung 20x

Abb. 21	Makrophagen, 3x AB	eigene Aufnahme, Vergrößerung 20x	Immunhistochemie,
Abb. 22	Granulozyten Ly6G/ Ly6C, Ctrl	eigene Aufnahme, Vergrößerung 20x	Immunhistochemie,
Abb. 23	Granulozyten, Ly6G/ Ly6C, 1x AB	eigene Aufnahme, Vergrößerung, 20x	Immunhistochemie,
Abb. 24	Granulozyten, Ly6G/ Ly6C, 2x AB	eigene Aufnahme, Vergrößerung 20x	Immunhistochemie,
Abb. 25	Granulozyten, Ly6G/ Ly6C, 3x AB	eigene Aufnahme, Vergrößerung 20x	Immunhistochemie,
Abb. 26	T-Zellen, CD3, Ctrl	eigene Aufnahme, Vergrößerung 20x	Immunhistochemie,
Abb. 27	T-Zellen, CD3, 1x AB	eigene Aufnahme, Vergrößerung 20x	Immunhistochemie,
Abb. 28	T-Zellen, CD3, 2x AB	eigene Aufnahme, Vergrößerung 20x	Immunhistochemie,
Abb. 29	T-Zellen, CD3, 3x AB	eigene Aufnahme, Vergrößerung 20x	Immunhistochemie,
Abb. 30	T-Zellen, CD3	Eigene Aufnahme, Vergrößerung 40x	Immunhistochemie,

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle	Bezeichnung	Quelle
Tab.1	Einteilung der Kolonkarzinom- krankung nach der TNM- und UICC- Klassifikation	Wittekind, C. 2010 aus den Daten der Gesellschaft für Onkologie
Tab. 2	Diagnostik und Therapie bei dem Verdacht auf ein Kolonkarzinom	Deutsche Gesellschaft für Onkologie http://www.dgho- onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/ kolonkarzinom Stand: 01.01.2013
Tab. 3	Verdünnung der primären Antikörper	eigene Herstellung
Tab. 4	Verdünnung der sekundären Antikörper	eigene Herstellung
Tab. 5	Chemikalien und Reagenzien	eigene Herstellung
Tab. 6	Bezeichnung und Konzentration der Lösungen	eigene Herstellung
Tab. 7	Puffer und Medien	eigene Herstellung
Tab. 8	Kits	eigene Herstellung
Tab. 9	Primärantikörper	eigene Herstellung
Tab. 10	Sekundärantikörper	eigene Herstellung
Tab. 11	Bezeichnung der Plastikmaterialien	eigene Herstellung
Tab. 12	Sonstige Geräte	eigene Herstellung

Tab.13	Semiquantitative Analyse der lymphatischen und granulozytären Infiltration in die CT26-Tumore nach einer bis drei Injektionen des monoklonalen Antikörpers cmHsp70.1	eigene Herstellung
--------	--	--------------------

8.3 Abkürzungsverzeichnis

AB	Antikörper
ADCC	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
AML	Akute myeloische Leukämie
Apaf-1	Apopototic protease activating factor-1
APC	antigenpräsentierende Zellen
BSA	bovine serum albumine
C1q	Komplementfaktor des Komplementsystems
CDC	Komplementabhängige Zytolyse
CD3 ⁺	T-Lymphozyten
CD4 ⁺	T-Helferzellen
CD4 ⁺ CD25 ⁺	Subpopulation der regulatorischen T-Lymphozyten
CD8 ⁺	zytotoxische T-Lymphozyten
CD16	Oberflächenmolekül auf Natürlichen Killerzellen
CD20	Cluster of differentiation 20, Oberflächenmolekül auf B-Lymphozyten
CD94	Oberflächenmolekül von Natürlichen Killerzellen
COX	Cyclooxygenase
CT26	Tumorzelllinie
Ctrl	Kontrolle
C _L	konstante Domäne der leichten Ketten eines Antikörpers
CX	Zelllinie
CX-2	Zelllinie
DAB	Diaminobenzidin
dest.	destilliert
DPBS	Dullbecco's phosphate buffered saline
EGFR	endothelial growth factor receptor
F _{ab}	Antikörper-bindende Stelle eines Antikörpers
F _c -Fragment	kristallisierbares Fragment eines Antikörpers, Bindungsstelle
G1	Grading, Tumorzellen gut differenziert
G2	mäßig differenziert

G3	schlecht differenziert
Gata-2	humanes Gen, das für ein Transkriptionsfaktor kodiert
HER-2	human epidermal growth factor
HCL	Salzsäure
HLA-A	Human Leukocyte Antigen A
HLA-Bw6	Human Leukocyte Antigen Bw6
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ O	Wasser
Hsp70	Hitzeschockprotein 70
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
ILT-2	Immunoglobulin-like transcript 2
Il-2	Interleukin-2
Il-4	Interleukin-4
Il-17	Interleukin-17
Il- 21	Interleukin-21
Il-22	Interleukin-22
INF γ	Interferon- γ
JNK1	c-Jun N-terminale Kinase
MHC	main histocompatibility complex
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxyd
KIR	killer cell immunoglobulin-like receptors
KIR2DL4	killer cell immunoglobulin-like receptors 2DL4
Ly49b	Oberflächenmolekül auf murinen Natürlichen Killerzellen
PBM	peripheral blood monocytes
p53	Tumorsuppressor
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TKD	Peptid TKDNNLLGRFELSG
UICC	Union contre le cancer
T _H 1	Subtyp der Helferzellpopulation

T _H 2	Subtyp der Helferzellpopulation
T _H 17	Subtyp der Helferzellpopulation
TNM	Klassifikation nach Tumor, Nodus, Metastasen
V _L	variable Domäne der leichten Ketten eines Antikörpers

8.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Gabriele Multhoff, Leiterin der Experimentellen Radioonkologie des Klinikums rechts der Isar in München, für Ihre hervorragende Betreuung während der Durchführung der Versuche für meine Doktorarbeit. Während dieser Zeit habe ich Einblicke in die medizinische Grundlagenforschung gewonnen und die Möglichkeit erhalten, wissenschaftliches Arbeiten zu erlernen. Nach meinem erfolgreichen Studium der Medizin hat diese Arbeit mein Verständnis für wissenschaftliche Forschung vertieft.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Stefan Stangl bedanken für die Einarbeitung in die praktischen Arbeiten und dafür, dass er jederzeit ansprechbar war für meine Fragen und Probleme.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Multhoff gilt mein großer Dank für eine herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die vielen konstruktiven Gespräche und Hilfestellungen.

Insbesondere möchte ich mich bei Kathrin Hube und Sophie Lehnerer für die gemeinsame Studienzeit und die vielen aufbauenden Gespräche bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder Nikolas. Sie haben mich auf meinem Lebensweg liebevoll unterstützt und mir in Gesprächen und mit positiver Kritik Mut bei meinem Studium und der Doktorarbeit gemacht.

9 Literaturverzeichnis

Abes, R. and Teillaud, J. L. (2011). "Modulation of tumor immunity by therapeutic monoclonal antibodies." Cancer Metastasis Rev **30**(1): 111-124.

Adams, G. P. and Weiner, L. M. (2005). "Monoclonal antibody therapy of cancer." Nat Biotechnol **23**(9): 1147-1157.

Alderson, K. L. and Sondel, P. M. (2011). "Clinical cancer therapy by NK cells via antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity." J Biomed Biotechnol **2011**: 379123.

Arispe, N., Doh, M., Simakova, O., Kurganov, B. and De Maio, A. (2004). "Hsc70 and Hsp70 interact with phosphatidylserine on the surface of PC12 cells resulting in a decrease of viability." FASEB J **18**(14): 1636-1645.

Barreto, A., Gonzalez, J. M., Kabingu, E., Asea, A. and Fiorentino, S. (2003). "Stress-induced release of HSC70 from human tumors." Cell Immunol **222**(2): 97-104.

Baselga, J. (2001). "Clinical trials of Herceptin(trastuzumab)." Eur J Cancer **37 Suppl 1**: S18-24.

Biassoni, R., Cantoni, C., Pende, D., Sivori, S., Parolini, S., Vitale, M., Bottino, C. and Moretta, A. (2001). "Human natural killer cell receptors and co-receptors." Immunol Rev **181**: 203-214.

Binder, R. J., Blachere, N. E. and Srivastava, P. K. (2001). "Heat shock protein-chaperoned peptides but not free peptides introduced into the cytosol are presented efficiently by major histocompatibility complex I molecules." J Biol Chem **276**(20): 17163-17171.

Brondani Da Rocha, A., Regner, A., Grivicich, I., Pretto Schunemann, D., Diel, C., Kovaleski, G., Brunetto De Farias, C., Mondadori, E., Almeida, L., Braga Filho, A. and Schwartzmann, G. (2004). "Radioresistance is associated to increased Hsp70 content in human glioblastoma cell lines." Int J Oncol **25**(3): 777-785.

Buzzard, K. A., Giaccia, A. J., Killender, M. and Anderson, R. L. (1998). "Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis." J Biol Chem **273**(27): 17147-17153.

Byrd, J. C., Waselenko, J. K., Maneatis, T. J., Murphy, T., Ward, F. T., Monahan, B. P., Sipe, M. A., Donegan, S. and White, C. A. (1999). "Rituximab therapy in hematologic malignancy patients with circulating blood tumor cells: association with increased infusion-related side effects and rapid blood tumor clearance." J Clin Oncol **17**(3): 791-795.

Carson, W. E., Parihar, R., Lindemann, M. J., Personeni, N., Dierksheide, J., Meropol, N. J., Baselga, J. and Caligiuri, M. A. (2001). "Interleukin-2 enhances the natural killer cell response to Herceptin-coated Her2/neu-positive breast cancer cells." Eur J Immunol **31**(10): 3016-3025.

Cobleigh, M. A., Vogel, C. L., Tripathy, D., Robert, N. J., Scholl, S., Fehrenbacher, L., Wolter, J. M., Paton, V., Shak, S., Lieberman, G. and Slamon, D. J. (1999). "Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease." J Clin Oncol **17**(9): 2639-2648.

Coiffier, B. (2002). "Rituximab in the treatment of diffuse large B-cell lymphomas." Semin Oncol **29**(1 Suppl 2): 30-35.

Demanet, C., Mulder, A., Deneys, V., Worsham, M. J., Maes, P., Claas, F. H. and Ferrone, S. (2004). "Down-regulation of HLA-A and HLA-Bw6, but not HLA-Bw4, allospecificities in leukemic cells: an escape mechanism from CTL and NK attack?" Blood **103**(8): 3122-3130.

Dent, S., Verma, S., Latreille, J., Rayson, D., Clemons, M., Mackey, J., Verma, S., Lemieux, J., Provencher, L., Chia, S., Wang, B. and Pritchard, K. (2009). "The role of HER2-targeted therapies in women with HER2-overexpressing metastatic breast cancer." Curr Oncol **16**(4): 25-35.

Deschoolmeester, V., Baay, M., Van Marck, E., Weyler, J., Vermeulen, P., Lardon, F. and Vermorken, J. B. (2010). "Tumor infiltrating lymphocytes: an intriguing player in the survival of colorectal cancer patients." BMC Immunol **11**: 19.

Di Gaetano, N., Cittera, E., Nota, R., Vecchi, A., Grieco, V., Scanziani, E., Botto, M., Introna, M. and Golay, J. (2003). "Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo." J Immunol **171**(3): 1581-1587.

Doody, A. D., Kovalchin, J. T., Mihalyo, M. A., Hagymasi, A. T., Drake, C. G. and Adler, A. J. (2004). "Glycoprotein 96 can chaperone both MHC class I- and class II-restricted epitopes for in vivo presentation, but selectively primes CD8+ T cell effector function." J Immunol **172**(10): 6087-6092.

Dormann A, L. H., Hoffmann H. (2001). "Klinikleitfaden Innere Medizin." 256-312.

Dugdale, A. H., Pinchbeck, G. L., Jones, R. S. and Adams, W. A. (2005). "Comparison of two thiopental infusion rates for the induction of anaesthesia in dogs." Vet Anaesth Analg **32**(6): 360-366.

Dunn, G. P., Old, L. J. and Schreiber, R. D. (2004). "The three Es of cancer immunoediting." Annu Rev Immunol **22**: 329-360.

Ferlazzo, G., Pack, M., Thomas, D., Paludan, C., Schmid, D., Strowig, T., Bougras, G., Muller, W. A., Moretta, L. and Munz, C. (2004). "Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(47): 16606-16611.

Garrido, C., Fromentin, A., Bonnotte, B., Favre, N., Moutet, M., Arrigo, A. P., Mehlen, P. and Solary, E. (1998). "Heat shock protein 27 enhances the tumorigenicity of immunogenic rat colon carcinoma cell clones." Cancer Res **58**(23): 5495-5499.

Garrido, C., Ottavi, P., Fromentin, A., Hammann, A., Arrigo, A. P., Chauffert, B. and Mehlen, P. (1997). "HSP27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs." Cancer Res **57**(13): 2661-2667.

Gastpar, R., Gehrman, M., Bausero, M. A., Asea, A., Gross, C., Schroeder, J. A. and Multhoff, G. (2005). "Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells." Cancer Res **65**(12): 5238-5247.

Gehrman, M., Brunner, M., Pfister, K., Reichle, A., Kremmer, E. and Multhoff, G. (2004). "Differential up-regulation of cytosolic and membrane-bound heat shock protein 70 in tumor cells by anti-inflammatory drugs." Clin Cancer Res **10**(10): 3354-3364.

Gehrmann, M., Marienhagen, J., Eichholtz-Wirth, H., Fritz, E., Ellwart, J., Jaattela, M., Zilch, T. and Multhoff, G. (2005). "Dual function of membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70), Bag-4, and Hsp40: protection against radiation-induced effects and target structure for natural killer cells." Cell Death Differ **12**(1): 38-51.

Gehrmann, M., Schmetzer, H., Eissner, G., Haferlach, T., Hiddemann, W. and Multhoff, G. (2003). "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**(4): 474-476.

Gershon, R. K. and Kondo, K. (1971). "Infectious immunological tolerance." Immunology **21**(6): 903-914.

Gross, C., Hansch, D., Gastpar, R. and Multhoff, G. (2003). "Interaction of heat shock protein 70 peptide with NK cells involves the NK receptor CD94." Biol Chem **384**(2): 267-279.

Gross, C., Schmidt-Wolf, I. G., Nagaraj, S., Gastpar, R., Ellwart, J., Kunz-Schughart, L. A. and Multhoff, G. (2003). "Heat shock protein 70-reactivity is associated with increased cell surface density of CD94/CD56 on primary natural killer cells." Cell Stress Chaperones **8**(4): 348-360.

Gurbuxani, S., Bruey, J. M., Fromentin, A., Larmonier, N., Parcellier, A., Jaattela, M., Martin, F., Solary, E. and Garrido, C. (2001). "Selective depletion of inducible HSP70 enhances immunogenicity of rat colon cancer cells." Oncogene **20**(51): 7478-7485.

Hiraoka, N. (2010). "Tumor-infiltrating lymphocytes and hepatocellular carcinoma: molecular biology." Int J Clin Oncol **15**(6): 544-551.

Hofheinz, R.-D., Arnold, D., Borner, M., Folprecht, G., Graeven, U., Hebart, H., Hegewisch-Becker, S., Meybier, T., Scheithauer, W., Schmoll, H.-J., Thaler, J., Weitz, J., Wörmann, B. (2012), „Leitlinien Kolonkarzinom“

<http://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/kolonkarzinom>

Stand 01.03.2013

Houghton, A. N. and Scheinberg, D. A. (2000). "Monoclonal antibody therapies-a 'constant' threat to cancer." Nat Med **6**(4): 373-374.

Iannello, A. and Ahmad, A. (2005). "Role of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the efficacy of therapeutic anti-cancer monoclonal antibodies." Cancer Metastasis Rev **24**(4): 487-499.

Izumi, Y., Xu, L., di Tomaso, E., Fukumura, D. and Jain, R. K. (2002). "Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail." Nature **416**(6878): 279-280.

Jaattela, M. (1995). "Over-expression of hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells." Int J Cancer **60**(5): 689-693.

Jaattela, M. (1999). "Heat shock proteins as cellular lifeguards." Ann Med **31**(4): 261-271.

Janeway, CA Jr., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. J., "Immunobiology: The Immune System in Health and Disease" 5th edition. New York: Garland Science; 2001.

Kemp, R. A. and Ronchese, F. (2001). "Tumor-specific Tc1, but not Tc2, cells deliver protective antitumor immunity." J Immunol **167**(11): 6497-6502.

Klos, K. S., Zhou, X., Lee, S., Zhang, L., Yang, W., Nagata, Y. and Yu, D. (2003). "Combined trastuzumab and paclitaxel treatment better inhibits ErbB-2-mediated angiogenesis in breast carcinoma through a more effective inhibition of Akt than either treatment alone." Cancer **98**(7): 1377-1385.

Koch, M., Weitz, J., Kienle, P., Benner, A., Willeke, F., Lehnert, T., Herfarth, C. and von Knebel Doeberitz, M. (2001). "Comparative analysis of tumor cell dissemination in mesenteric, central, and peripheral venous blood in patients with colorectal cancer." Arch Surg **136**(1): 85-89.

Kogure, T., Mantani, N., Goto, H., Shimada, Y., Tamura, J. and Terasawa, K. (2002). "The effect of interleukin-15 on the expression of killer-cell immunoglobulin-like receptors on peripheral natural killer cells in human." Mediators Inflamm **11**(4): 219-224.

Kohler, G. and Milstein, C. (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." Nature **256**(5517): 495-497.

Kono, K., Takahashi, A., Ichihara, F., Sugai, H., Fujii, H. and Matsumoto, Y. (2002). "Impaired antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by herceptin in patients with gastric cancer." Cancer Res **62**(20): 5813-5817.

Kryczek, I., Banerjee, M., Cheng, P., Vatan, L., Szeliga, W., Wei, S., Huang, E., Finlayson, E., Simeone, D., Welling, T. H., Chang, A., Coukos, G., Liu, R. and Zou, W. (2009). "Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments." Blood **114**(6): 1141-1149.

Lee, S. C., Srivastava, R. M., Lopez-Albaitero, A., Ferrone, S. and Ferris, R. L. (2011). "Natural killer (NK): dendritic cell (DC) cross talk induced by therapeutic monoclonal antibody triggers tumor antigen-specific T cell immunity." Immunol Res **50**(2-3): 248-254.

Lefebvre, S., Antoine, M., Uzan, S., McMaster, M., Dausset, J., Carosella, E. D. and Paul, P. (2002). "Specific activation of the non-classical class I histocompatibility HLA-G antigen and expression of the ILT2 inhibitory receptor in human breast cancer." J Pathol **196**(3): 266-274.

Lewis, J., Devin, A., Miller, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Neckers, L. and Liu, Z. G. (2000). "Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor-kappaB activation." J Biol Chem **275**(14): 10519-10526.

Li, H., Sanchez-Torres, J., Del Carpio, A., Salas, V. and Villalobo, A. (2004). "The ErbB2/Neu/HER2 receptor is a new calmodulin-binding protein." Biochem J **381**(Pt 1): 257-266.

Ljunggren, H. G. and Karre, K. (1990). "In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition." Immunol Today **11**(7): 237-244.

Miyahara, Y., Odunsi, K., Chen, W., Peng, G., Matsuzaki, J. and Wang, R. F. (2008). "Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(40): 15505-15510.

Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M. C., Biassoni, R. and Moretta, L. (2001). "Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity." Annu Rev Immunol **19**: 197-223.

Mosser, D. M. and Edwards, J. P. (2008). "Exploring the full spectrum of macrophage activation." Nat Rev Immunol **8**(12): 958-969.

Multhoff, G. (2007). "Heat shock protein 70 (Hsp70): membrane location, export and immunological relevance." Methods **43**(3): 229-237.

Multhoff, G., Botzler, C., Wiesnet, M., Eissner, G. and Issels, R. (1995). "CD3- large granular lymphocytes recognize a heat-inducible immunogenic determinant associated with the 72-kD heat shock protein on human sarcoma cells." Blood **86**(4): 1374-1382.

Multhoff, G., Botzler, C., Wiesnet, M., Muller, E., Meier, T., Wilmanns, W. and Issels, R. D. (1995). "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**(2): 272-279.

Multhoff, G. and Hightower, L. E. (2011). "Distinguishing integral and receptor-bound heat shock protein 70 (Hsp70) on the cell surface by Hsp70-specific antibodies." Cell Stress Chaperones **16**(3): 251-255.

Multhoff, G., Pfister, K., Botzler, C., Jordan, A., Scholz, R., Schmetzer, H., Burgstahler, R. and Hiddemann, W. (2000). "Adoptive transfer of human natural killer cells in mice with severe combined immunodeficiency inhibits growth of Hsp70-expressing tumors." Int J Cancer **88**(5): 791-797.

Multhoff, G., Pfister, K., Gehrman, M., Hantschel, M., Gross, C., Hafner, M. and Hiddemann, W. (2001). "A 14-mer Hsp70 peptide stimulates natural killer (NK) cell activity." Cell Stress Chaperones **6**(4): 337-344.

Nahta, R. and Esteva, F. J. (2006). "Herceptin: mechanisms of action and resistance." Cancer Lett **232**(2): 123-138.

Naito, Y., Saito, K., Shiiba, K., Ohuchi, A., Saigenji, K., Nagura, H. and Ohtani, H. (1998). "CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer." Cancer Res **58**(16): 3491-3494.

Nanbu, K., Konishi, I., Mandai, M., Kuroda, H., Hamid, A. A., Komatsu, T. and Mori, T. (1998). "Prognostic significance of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in endometrial carcinomas." Cancer Detect Prev **22**(6): 549-555.

Nylandsted, J., Rohde, M., Brand, K., Bastholm, L., Elling, F. and Jaattela, M. (2000). "Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(14): 7871-7876.

Papamichail, M., Perez, S. A., Gritzapis, A. D. and Baxevanis, C. N. (2004). "Natural killer lymphocytes: biology, development, and function." Cancer Immunol Immunother **53**(3): 176-186.

Park, H. S., Lee, J. S., Huh, S. H., Seo, J. S. and Choi, E. J. (2001). "Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase." EMBO J **20**(3): 446-456.

Pegram, M. D., Konecny, G. E., O'Callaghan, C., Beryt, M., Pietras, R. and Slamon, D. J. (2004). "Rational combinations of trastuzumab with chemotherapeutic drugs used in the treatment of breast cancer." J Natl Cancer Inst **96**(10): 739-749.

Pfister, K., Radons, J., Busch, R., Tidball, J. G., Pfeifer, M., Freitag, L., Feldmann, H. J., Milani, V., Issels, R. and Multhoff, G. (2007). "Patient survival by Hsp70 membrane phenotype: association with different routes of metastasis." Cancer **110**(4): 926-935.

Radons, J. and Multhoff, G. (2005). "Immunostimulatory functions of membrane-bound and exported heat shock protein 70." Exerc Immunol Rev **11**: 17-33.

Riede, U.-N., Walch, A., Wiestler, O.D., Störungen des Zellwachstums, In „Allgemeine und spezielle Pathologie“, Riede, U.-N., Werner, M., Schaefer, H.-E., (Hrsg.), Thieme-Verlag, Stuttgart 2004

Ritossa, P. (1962). "[Problems of prophylactic vaccinations of infants]." Riv Ist Sieroter Ital **37**: 79-108.

Ross, M. H., Pawlina, W., (2011). "Histology: a text and atlas. with correlated cell and molecular biology", Lippincott Williams & Wilkins, a Wolter Kluwers business, Baltimore-Philadelphia.

Santarosa, M., Favaro, D., Quaia, M. and Galligioni, E. (1997). "Expression of heat shock protein 72 in renal cell carcinoma: possible role and prognostic implications in cancer patients." Eur J Cancer **33**(6): 873-877.

Schild, H., Arnold-Schild, D., Lammert, E. and Rammensee, H. G. (1999). "Stress proteins and immunity mediated by cytotoxic T lymphocytes." Curr Opin Immunol **11**(1): 109-113.

Schmitt, E., Gehrmann, M., Brunet, M., Multhoff, G. and Garrido, C. (2007). "Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy." J Leukoc Biol **81**(1): 15-27.

Shan, D., Ledbetter, J. A. and Press, O. W. (2000). "Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells." Cancer Immunol Immunother **48**(12): 673-683.

Shi, Y. and Thomas, J. O. (1992). "The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate." Mol Cell Biol **12**(5): 2186-2192.

Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J. and Norton, L. (2001). "Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2." N Engl J Med **344**(11): 783-792.

Sliwkowski, M. X., Lofgren, J. A., Lewis, G. D., Hotaling, T. E., Fendly, B. M. and Fox, J. A. (1999). "Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin)." Semin Oncol **26**(4 Suppl 12): 60-70.

Stangl, S., Gehrmann, M., Riegger, J., Kuhs, K., Riederer, I., Sievert, W., Hube, K., Mocikat, R., Dressel, R., Kremmer, E., Pockley, A. G., Friedrich, L., Vigh, L., Skerra, A. and Multhoff, G. (2011). "Targeting membrane heat-shock protein 70 (Hsp70) on tumors by cmHsp70.1 antibody." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(2): 733-738.

Stankiewicz, A. R., Lachapelle, G., Foo, C. P., Radicioni, S. M. and Mosser, D. D. (2005). "Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation." J Biol Chem **280**(46): 38729-38739.

Tamura, Y., Peng, P., Liu, K., Daou, M. and Srivastava, P. K. (1997). "Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations." Science **278**(5335): 117-120.

Vargas-Roig, L. M., Gago, F. E., Tello, O., Aznar, J. C. and Ciocca, D. R. (1998). "Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy." Int J Cancer **79**(5): 468-475.

Vermijlen, D., Seynaeve, C., Luo, D., Kruhoffer, M., Eizirik, D. L., Orntoft, T. F. and Wisse, E. (2004). "High-density oligonucleotide array analysis reveals extensive differences between freshly isolated blood and hepatic natural killer cells." Eur J Immunol **34**(9): 2529-2540.

Wells, A. D. and Malkovsky, M. (2000). "Heat shock proteins, tumor immunogenicity and antigen presentation: an integrated view." Immunol Today **21**(3): 129-132.

Welsch, U. (2006). "Welsch Lehrbuch Histologie", Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München, 2. Auflage.

Wilke, C. M., Wu, K., Zhao, E., Wang, G. and Zou, W. (2010). "Prognostic significance of regulatory T cells in tumor." Int J Cancer **127**(4): 748-758.

Yakes, F. M., Chinratanalab, W., Ritter, C. A., King, W., Seelig, S. and Arteaga, C. L. (2002). "Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action." Cancer Res **62**(14): 4132-4141.

Zhang, H., Liu, R. and Huang, W. (2007). "A 14-mer peptide from HSP70 protein is the critical epitope which enhances NK activity against tumor cells in vivo." Immunol Invest **36**(3): 233-246.

Zhang, J. P., Yan, J., Xu, J., Pang, X. H., Chen, M. S., Li, L., Wu, C., Li, S. P. and Zheng, L. (2009). "Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients." J Hepatol **50**(5): 980-989.

10 Zusammenfassung

Maligne Tumorerkrankungen stellen eine der häufigsten Todesursachen weltweit dar. Daher kommt einer effektiven und insbesondere einer kurativen Therapie für die Betroffenen eine enorme Wichtigkeit zu. Die aktuelle Tumorthherapie unterscheidet sich in Bezug auf die vielfältigen Tumorerkrankungen, jedoch besitzen die Therapieansätze aller Tumorentitäten gemeinsame Grundsätze. So besteht ein Tumortherapiekonzept aus einem interdisziplinären, multimodalen Ansatz, in dem die chirurgische Resektion, die Radio- und Chemotherapie ihren festen Platz besitzen. In den letzten Jahrzehnten ist an der Optimierung der bestehenden Therapieansätze intensiv geforscht worden und v.a. das Konzept der Immunmodulation mittels einer Antikörpertherapie hat stark an Stellenwert dazu gewonnen. In der Klinik findet bereits eine Vielzahl monoklonaler Antikörper, u.a. in der Tumorthherapie, ihre therapeutische Anwendung. Jedoch besteht in einigen Fällen eine Therapielimitation durch bestehende Nebenwirkungen der Antikörpertherapie. So ist eine Therapielimitation beispielsweise dadurch gegeben, dass die Zielstruktur, auf die die Antikörper gerichtet sind, oft auch auf dem Normalgewebe zu finden ist. So gilt für den monoklonalen Antikörper Rituximab, dass nicht nur maligne B-Lymphomzellen abgetötet werden, sondern auch gesunde B-Zellen, die für die Immunantwort eine wichtige Rolle spielen. Daher ist mit dem Antikörper Rituximab eine erhöhte Infektionsrate mit Virusinfekten assoziiert.

Um die Tumorthherapie und insbesondere die Antikörpertherapie optimieren zu können, besteht eine intensive Suche nach Zielstrukturen, die nur auf Tumorzellen, nicht aber auf dem dazugehörigen Normalgewebe exprimiert werden. Eine solche Zielstruktur scheint das Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) zu verkörpern. Hsp70 gehört zur Familie der Hitzeschockproteine und sorgt physiologischerweise intrazellulär für eine Homöostase innerhalb der Zelle. So besitzt es zytoprotektive Effekte und schützt Proteine vor fehlerhaften Konformationen. Zellulärer Stress wie beispielsweise Hitze, Bestrahlung oder Chemikalien führen zu einer verstärkten Expression von intrazellulärem Hsp70. Bei einigen Tumorentitäten konnte membrangebundenes Hsp70 auf der Zelloberfläche beschrieben werden. Im Gegensatz dazu weist das dazugehörige Normalgewebe kein membrangebundenes Hsp70 auf. Daher eröffnet eine zielgerichtete Therapie dieses membrangebundenen Hsp70 neue Therapiemöglichkeiten für eine Therapie mit monoklonalen Antikörpern.

In Rahmen dieser Arbeit wurden Kolonkarzinomzellen der Zelllinie CT26 Balb/c-Mäusen intraperitoneal injiziert und die wachsenden Tumore je nach Therapiegruppe ein- bis dreimal mit dem monoklonalen Antikörper cmHsp70.1 behandelt. Nach 21 Tagen wurde der Tumor immunhistochemisch untersucht. CmHsp70.1 ist *in-vitro* in der Lage über die Auslösung der Antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) Tumorzellen abzutöten. Daher war es Ziel dieser Arbeit nachzuweisen, dass cmHsp70.1 auch *in-vivo* über die ADCC seine Wirkung ausübt. Dieser Nachweis erfolgte durch die immunhistochemische Färbung von Immuneffektorzellen wie Natürliche Killerzellen, Makrophagen, Granulozyten und T-Lymphozyten, die in der Lage sind, die ADCC zu vermitteln. Die Versuchsergebnisse zeigen, dass cmHsp70.1 auch *in-vivo* über die ADCC zu einem signifikant niedrigeren Tumorgewicht und zu einer starken Infiltration von NK-Zellen, Makrophagen und Granulozyten in den Tumor führt. Diese Ergebnisse eröffnen für die zukünftige Behandlung von Tumoren die Möglichkeit, membranständiges Hsp70 als Zielstruktur für eine zielgerichtete, effektive und nebenwirkungsarme Therapie mit monoklonalen Antikörpern zu benutzen.