

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

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

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

Hsp70-Membranexpression auf Sarkomen – eine tumorspezifische Zielstruktur

Sophie Mirabell Lehnerer

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny
Prüfer der Dissertation:	1. Univ.-Prof. Dr. G. Multhoff
	2. Univ.-Prof. Dr. M. Molls

Die Dissertation wurde am 14.02.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 26.09.2012 angenommen.

In Liebe für meine Eltern

Ein Gelehrter in seinem Laboratorium ist nicht nur ein Techniker; er steht auch vor den Naturgesetzen wie ein Kind vor der Märchenwelt.

Marie Curie

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	6
1 Einleitung	8
1.1 Tumoren des Binde- und Stützgewebes	8
1.1.1 Klassifikation	8
1.1.2 Epidemiologie	10
1.1.3 Ätiologie	11
1.1.4 Klinisches Bild	12
1.1.5 Lokalisation	12
1.1.6 Diagnostik	14
1.1.6.1 Radiologie	14
1.1.6.2 Pathologie	16
1.1.7 Staging	20
1.1.8 Therapie	20
1.1.9 Prognose	21
1.2 Hitzeschockprotein 70	22
1.2.1 Struktur und Funktion von Hsp70	22
1.2.2 Rolle von Hsp70 in Onkologie und Immunologie	24
1.3 Intention und Zielsetzung	27
2 Material und Methoden	29
2.1 Material	29
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	29
2.1.2 Lösungen	29
2.1.3 Medien und Puffer	31
2.1.4 Antikörper	32
2.1.5 Zellkulturutensilien, Plastikmaterial	32
2.1.6 Zelllinien	33
2.1.7 Humanes Material	33
2.1.8 Sonstige Geräte	34
2.1.9 Sonstiges Material	35

2.2	Methoden	35
2.2.1	Materialgewinnung	35
2.2.2	Isolierung von Zellen aus Primärmaterial	35
2.2.3	Kultur von Zellen aus humanem Primärmaterial	38
2.2.4	Kultur von Zelllinien	39
2.2.5	Kryokonservierung von Zellen	40
2.2.6	Mikroskopische Methoden	40
	2.2.6.1 Durchlichtmikroskopie	40
	2.2.6.2 Immunfluoreszenzmikroskopie	41
2.2.7	Durchflusszytometrie (FACS)	42
	2.2.7.1 Funktionsprinzip des FACS	42
	2.2.7.2 Durchführung der FACS-Analyse mit primärem Material	43
	2.2.7.3 Durchführung der FACS-Analyse mit Zelllinien	44
	2.2.7.4 Auswertung der FACS-Analyse von primärem Material	45
	2.2.7.5 Auswertung der FACS-Analyse von Zelllinien	47
2.2.8	Sonstiges	50
	2.2.8.1 Fotos	50
	2.2.8.2 Bildbearbeitung	50
	2.2.8.3 Statistik	50
3	Ergebnisse	51
3.1	Kultur von Mausosteosarkomzelllinien	51
3.2	Durchflusszytometrie von Mausosteosarkomzelllinien	56
3.3	Immunfluoreszenz von Mausosteosarkomzelllinien	57
3.4	Patientenkollektiv	60
3.5	Kultur humaner Sarkomzellen aus Primärmaterial	63
3.6	Durchflusszytometrie von primären Sarkom- und Referenzzellen	70
3.7	Durchflusszytometrische Analysen in Patientensubgruppen	80
4	Diskussion	83
	Hsp70 – ein Tumormarker für Sarkome	

5	Anhang	96
5.1	Abkürzungsverzeichnis	96
5.2	Abbildungsverzeichnis	98
5.3	Tabellenverzeichnis	102
5.4	Danksagung	103
5.5	Literaturverzeichnis	104

Zusammenfassung

Sarkome, maligne Tumoren mesenchymalen Gewebes, sind seltene Tumorerkrankungen, gehen aber für die Betroffenen, vor allem Kinder und Jugendliche, häufig mit einer infausten Prognose einher. Um die Diagnose- und Therapiemöglichkeiten für Sarkome, insbesondere Knochensarkome, zu verbessern, ist es notwendig Merkmale zu identifizieren, die es erlauben, Tumorgewebe von Normalgewebe zuverlässig zu unterscheiden. In der vorliegenden Arbeit wird die Bedeutung von Hitze Schock Protein 70 (Hsp70) als tumorspezifischer Marker auf der Zelloberfläche von Sarkomen untersucht.

Hsp70 ist ein molekulares „Kindermädchen“ (Chaperon), das zytoplasmatisch in nahezu allen Zellen vorkommt. Stresseinwirkungen wie z.B. Hitze, Hypoxie, Bestrahlung, aber auch eine Reihe von Chemikalien verstärken die Expression von Hsp70 in der Zelle. Intrazelluläres Hsp70 schützt die Zelle vor den letalen Folgen einer Stresseinwirkung und unterstützt die Faltung nativer und denaturierter Proteine. Im Gegensatz zu Normalgewebe konnte bei einer Vielzahl von Karzinomen und Leukämien eine ungewöhnliche Translokation von zytosolischem Hsp70 an die Zelloberfläche beobachtet werden. Aufgrund dieses tumorspezifischen Expressionsmusters eröffnet die membrangebundene Form von Hsp70 die Möglichkeit für zielgerichtete therapeutische Interventionen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Osteosarkomzelllinien aus Mäusen sowie frische humane Gewebeproben verschiedener Weichteil- und Knochentumoren mit Schwerpunkt auf Osteo-, Chondro-, Ewing- und Liposarkom immunhistochemisch und durchflusszytometrisch hinsichtlich ihrer Hsp70-Membranexpression untersucht. Es wurde eine Methode entwickelt, die es erlaubt, ohne Einsatz proteolytischer Enzyme vitale Einzelzellen aus Sarkom- und korrespondierenden gesunden Referenzgeweben aus Patienten zu isolieren. Diese Zellen wurden direkt nach Isolation einer durchflusszytometrischen Untersuchung unterzogen. Parallel dazu wurde versucht Tumorzelllinien anzulegen. In 45% der Proben gelang es, Zellen nach Aussaat anwachsen zu lassen. Die vitalen Zellen wurden bereits nach wenigen Passagen kryokonserviert. Diese aus frischen Operationspräparaten gewonnenen

Zellen reflektieren den Patiententumor besser als langjährig passagierte Tumorzelllinien und sind somit von größerer klinischer Relevanz.

Ähnlich wie bei den Karzinomen ergaben die durchflusszytometrischen Untersuchungen der malignen mesenchymalen Tumoren, nicht aber der korrespondierenden Normalgewebe, eine verstärkte Hsp70-Membranexpression. Somit konnte auch für Sarkome wie z.B. Osteo-, Chondro-, Ewing- und Liposarkom ein tumorspezifisches Hsp70-Membranexpressionsmuster nachgewiesen werden.

Zukünftig könnte das membranständige Hsp70 als Zielstruktur für Therapie und Imagingverfahren klinische Anwendung finden. Hsp70-Antikörper-gekoppelte Radionuklide könnten genutzt werden, um nicht-invasiv eine Tumorlokalisierung zu bestimmen. Zusätzlich könnte membrangebundenes Hsp70 als tumorspezifische Zielstruktur für Antikörper-gekoppelte Chemo- oder Radiotherapien genutzt werden. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, das körpereigene Immunsystem gegen das membranständige Hsp70 spezifisch zu aktivieren. Im Rahmen einer klinischen Phase II Studie wird derzeit in meiner Arbeitsgruppe überprüft, inwieweit durch Hsp70 stimulierte, autologe NK-Zellen als adjuvante Immuntherapie den Krankheitsverlauf von Patienten mit nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) nach Radiochemotherapie verbessern können.

Der in dieser Arbeit erbrachte Nachweis, dass maligne Tumoren mesenchymalen Gewebes im Unterschied zum Normalgewebe Hsp70 auf der Zellmembran exprimieren, eröffnet neue Perspektiven in Diagnose, Therapie und Prognose der Knochentumoren.

1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit soll zunächst, nach Erläuterung grundlegender Kenntnisse über Knochen- und Weichteiltumoren und das Hitzeschockprotein 70, die Intention und Fragestellung der im Folgenden dargestellten Experimente beschrieben werden, um diese anschließend im Kontext internationaler Literatur zu diskutieren.

1.1 Tumoren des Binde- und Stützgewebes

1.1.1 Klassifikation

Die Tumoren des Binde- und Stützgewebes werden in Weichteil- und Knochentumoren untergliedert, deren maligne Formen als *Sarkome* bezeichnet werden. Im Folgenden wird der Schwerpunkt auf die Knochentumoren gelegt sein.

Die Knochentumoren werden nach der WHO-Klassifikation von Lyon (2002) eingeteilt (Tab.1). Die ersten beiden Gruppen richten sich nach der vom Tumor gebildeten Matrix wohingegen andere Gruppen nach dem vorherrschenden Zelltyp (z.B. Riesenzelltumor, Histiozytom) eingeteilt werden.

Tab.1 WHO-Klassifikation der Knochentumoren, Lyon 2002 (nach Freyschmidt et al., 2010). Das biologische Verhalten wird mit den Ziffern 0-3 angegeben: 0 bedeutet *benigne Tumoren*, 1 *unspezifische, borderline oder ungewisse Dignität*, (2 steht für *in situ carcinoma* und *Grad III intraepitheliale Neoplasie*) und 3 für *maligne Tumoren*.

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

Diese Arbeit konzentriert sich auf vier maligne Tumoren (Osteosarkom, Chondrosarkom, Ewing-Sarkom, Liposarkom) und auf zwei benigne Tumoren (Enchondrom, Riesenzelltumor), wobei der Riesenzelltumor aufgrund seines lokal aggressiven Wachstums mit *unsicherer Dignität* einzustufen ist. Das Liposarkom nimmt insofern eine Sonderstellung ein, da es sowohl in der Gruppe der Weichteilsarkome als auch seltener in der Gruppe der Knochensarkome vorkommt. Eine Definition der jeweiligen Entität gibt Tabelle 2:

Tab.2 Definitionen (WHO-Klassifikation) ausgewählter Entitäten

Entität	Definition nach der WHO-Klassifikation, Lyon 2002
Osteosarkom	Das konventionelle OS ist ein primärer hochgradig maligner, intramedullärer Tumor, dessen neoplastische Zellen Osteoid produzieren, wenn auch (manchmal) nur in kleinen Mengen.
Chondrosarkom	Das Chondrosarkom ist ein maligner Tumor mit reiner hyalinknorpeliger Differenzierung. Myxoide Veränderungen, Kalzifikationen oder Ossifikationen kommen vor.
Ewing-Sarkom	Das Ewing-Sarkom ist als Rundzellsarkom definiert, besitzt aber - im Gegensatz zum <i>primitiven neuroektodermalen Tumor</i> (ebenfalls ein Rundzellsarkom) weder in Licht-, noch in Elektronenmikroskopie noch in der Immunhistochemie eine neuroektodermale Differenzierung.
Liposarkom	Das Liposarkom des Knochens ist eine maligne Neoplasie, deren Phänotyp Fett „rekapituliert“.
Enchondrom	Das Enchondrom ist ein benigner hyaliner Knorpeltumor des Knochenmarkraumes. Die meisten Tumoren sind solitär, doch können sie – selten – mehr als einen Knochen oder mehrere Stellen in einem Knochen involvieren.
Riesenzelltumor	Der Riesenzelltumor ist eine benigne lokal aggressive Neoplasie, bestehend aus Verbänden von neoplastischen ovoiden mononukleären Zellen mit eingestreuten, gleichmäßig verteilten großen osteoklastenartigen Riesenzellen.

1.1.2 Epidemiologie

Drei Viertel der diagnostizierten primären Knochentumoren sind nach Angabe des *Schweizer Krebsregisters* benigne, wobei die tatsächliche Prävalenz der gutartigen Tumoren vermutlich höher liegt, da diese meistens asymptomatisch sind und häufig nur akzidentiell erkannt werden.

Primäre maligne Knochentumoren sind selten: Sie machen nur einen Anteil von 0,5% aller bösartigen Tumoren aus (Böcker et al., 2004). Die Inzidenz der Knochensarkome liegt bei etwa 0,8 Fällen pro 100.000 Einwohner/Jahr (Freyschmidt et al., 2010). Sekundäre Knochentumoren (Metastasen) treten etwa 2,5-mal häufiger als primäre maligne Knochentumoren auf (Böcker et al., 2004) und kommen vor allem im Erwachsenenalter vor. Zwei Drittel der primären Knochentumoren betreffen Jugendliche während der pubertären Wachstumsperiode (Niethard, Pfeil, 2005).

Einen Überblick über die ausgewählten Entitäten liefert Tabelle 3, welche auf den Angaben des *Baseler Knochtumor-Referenzzentrums* (Jundt, 1997) und den Daten von Dahlin und Schajowitz basiert.

Tab.3 Epidemiologische Daten ausgewählter Entitäten

Entität	Altersdurchschnitt in Jahren	Geschlechtsverteilung (M:F)	Häufigkeit	
			(% aller KT)	(% aller malignen KT)
Osteosarkom	19	1,1 : 1	20%	40%
Chondrosarkom	46	1,4 : 1	9%	20%
Ewing-Sarkom (+PNET)	17	1,5 : 1	4%	7,5%
Liposarkom - im Knochen	20.-40. LJ ¹	Geschlechtsprädisposition nicht bekannt ¹	<1%	<1%
- im Weichteilgewebe (WT)	40.-60. LJ ²	Keine Geschlechtsprädisposition ³	-	20% (aller Sarkome) ²
Enchondrom	38	0,9 : 1	3-10% ⁴	-
Riesenzelltumor	31	1 : 1	9%	-

¹Freyschmidt et al., 2010 ²Böcker et al., 2004 ³DGHO, 2006 ⁴Walden et al., 2008

1.1.3 Ätiologie

Über die Ätiologie der primären Knochtumoren weiß man bis heute nur wenig. Es gibt einige wenige Erkrankungen, welche die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Knochtumors erhöhen: Dazu zählen unter anderem das Familiäre Retinoblastomsyndrom, die polyostotische Paget-Erkrankung, strahleninduzierte Knochenveränderungen, Knocheninfarkte und chronische Osteomyelitiden. Einige Tumoren wie der Riesenzelltumor, das Osteoblastom und das Chondroblastom prädisponieren mit niedrigem Risiko zur Entstehung eines bösartigen Geschwulstes (Freyschmidt et al., 2010).

1.1.4 Klinisches Bild

Knochentumoren präsentieren sich nicht mit typischen Leitsymptomen, auch die Laborwerte sind in der Regel ohne auffälligen Befund (Niethard, Pfeil, 2005). Langsam wachsende Tumoren, welche meistens benigne sind, sind oft lange Zeit asymptomatisch und fallen mit unspezifischen Symptomen wie palpabler Schwellung und Schmerz auf. Auch maligne Tumoren können dieses Symptombild zeigen, wobei zu beachten ist, dass Knochentumoren einen fernab von der Tumorlokalisierung projizierten Gelenkschmerz aufweisen können (Freyschmidt et al., 2010). Eine Erstmanifestation kann auch eine pathologische Fraktur sein: Die osteolytisch geschädigte Knochenstruktur bricht ohne adäquates Trauma (Papagelopoulos et al., 2008). Beim Osteo-, Chondro- und Ewing-Sarkom korreliert das Auftreten einer Fraktur sogar negativ mit der Überlebenswahrscheinlichkeit (Bramer et al., 2007, Godley et al., 2011). Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust oder andere Allgemeinsymptome finden sich im Zusammenhang mit Knochentumoren nur bei einer geringen Zahl von Patienten und sind dann in der Regel mit einem weit fortgeschrittenen Tumorstadium assoziiert.

1.1.5 Lokalisation

Hinsichtlich der Lokalisation wird einerseits zwischen der Verteilung im Skelett und andererseits der Lokalisation im Knochen selbst unterschieden.

Generell treten Knochentumoren bevorzugt gelenknah auf. An der Epiphysenfuge, in der während der Pubertät das intensivste Längenwachstum stattfindet, sind einige Tumoren, darunter das Osteosarkom, lokalisiert, da die Tumorentstehung in engem Zusammenhang mit der Gewebedifferenzierung steht (Niethard, Pfeil, 2005).

Die einzelnen Entitäten weisen verschiedene Charakteristika bezüglich der Lokalisation im Skelett und Knochen auf, welche der Diagnosefindung dienlich sein können.

Einen Überblick über die ausgewählten Entitäten liefert Tabelle 4, welche sich auf die Daten des *Baseler Knochentumor-Referenzzentrums* und den Daten von Freyschmidt stützt.

Tab.4 Verteilung verschiedener Sarkomentitäten im Skelett mit Lokalisation im Knochen

Entität	Lokalisation im Skelett	Lokalisation im Knochen
Osteosarkom	Femur (45%), Tibia (20%), Humerus (10%)	Metaphyse, Diaphyse
Chondrosarkom	Femur (23%), Os ilium (19%), Humerus, Rippen (je 10%)	Metaphyse, Diaphyse
Ewing-Sarkom	Femur (25%), Humerus, Tibia, Os ilium (je 11%)	Diaphyse
Liposarkom	Weichteile; Knochen: Femur (50%)	Metaphyse, selten Diaphyse
Enchondrom	Handskelett (60%), Femur (10%)	Diaphyse
Riesenzelltumor	Femur (25%), Tibia (25%), Radius (10%)	Epiphyse, Metaphyse

1.1.6 Diagnostik

Eine Verdachtsdiagnose ergibt sich häufig aus einem suspekten bildgebenden Befund; nur bei manchen bestimmten Entitäten (z.B. dem Osteochondrom) ermöglicht ein charakteristisches Röntgenbild die Blickdiagnose. Der Goldstandard der endgültigen Diagnosefindung ist die histopathologische Beurteilung. Zur exakten Biopsie- und Operationsplanung und zum therapielevanten Staging ist die Einbindung unterschiedlicher radiologischer Verfahren unverzichtbar.

1.1.6.1 Radiologie

Knochentumoren werden mittels Röntgen (Abb.1, 2 und 4) und CT diagnostisch eingegrenzt. Ein MRT kann Auskunft über die Weichteilbeteiligung geben (Abb.3), eine Angiographie kann bei bestimmten Fragestellungen (z.B. selektive Embolisation) indiziert sein. Mittels Szintigraphie lässt sich feststellen, ob der Tumor solitär oder multipel vorliegt; die Anreicherungsintensität korreliert mit der Aktivität von Umbauprozessen, welche verstärkt in schnell wachsenden, malignen Tumoren vorkommen.

Weitere Malignitätskriterien sind unscharfe Begrenzungen des Tumorgewebes, Periostabhebungen, sog. „Zwiebelschalen“, ausgedehnte Osteolysen, Spiculae, Codman-Dreiecke und solide Periostreaktionen. Auf ein langsames und damit häufig benignes Wachstum deuten radiologische Merkmale wie Periostschalen, Osteolysen mit Randsklerose, lobuläre Periostschalen, singuläre Periostlamellen und solide Periostreaktionen hin (Lasserre, Blohm, 2003).

In den Abbildungen 1 - 4 sind einige typische radiologische Erkennungsmuster beispielhaft dargestellt.



Abb.1 Chondrosarkom



Abb.2 Osteosarkom

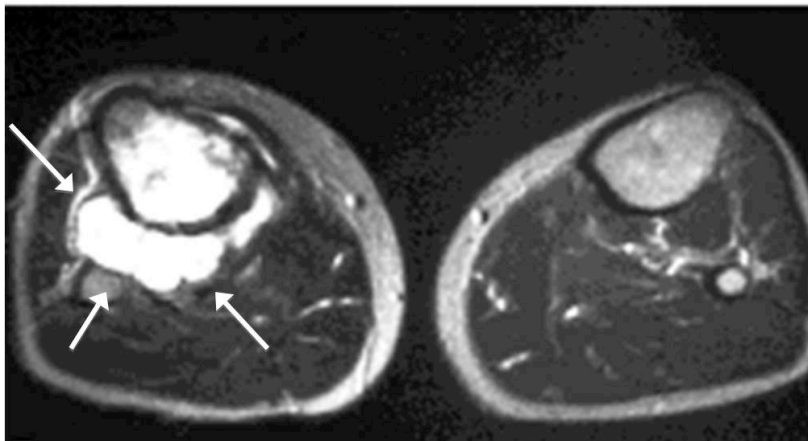


Abb.3 Chondrosarkom (MRT)

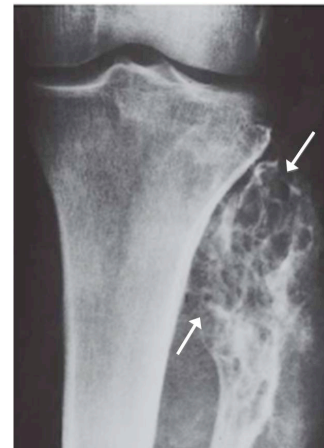


Abb.4 Riesenzelltumor

Abb.1 **Chondrosarkom** der distalen Tibia mit typischen knorpeligen Kalzifikationen (Pfeile), lytischen Komponenten (Stern), kortikaler Destruktion und Periostreaktion (Klammer).

Abb.2 Periosterker am distalen Femur bei einem **Osteosarkom**. Das Osteosarkom hat die Kompakta komplett destruiert. Als einzige Periostreaktion ist eine dreieckförmige solide Ossifikation am oberen Tumorrund sichtbar (Pfeil).

Abb.3 Das MRT zeigt eine Ausweitung des in der proximalen Tibia gelegenen **Chondrosarkoms** ins Weichteilgewebe (Pfeile), die im Röntgenbild (nicht abgebildet) nicht gezeigt werden kann.

Abb.4 Intratumorale Septierungen: Der **Riesenzelltumor** weist multiple grobe intratumorale Trabekel auf (Pfeile), die ihm ein seifenblasenartiges Muster verleihen.

Durch charakteristische radiologische Merkmale lassen sich einzelne Tumorentitäten diagnostisch eingrenzen. Eine Übersicht über ausgewählte Entitäten gibt Tabelle 5.

Tab.5 Radiologische Diagnosekriterien ausgewählter Entitäten

Entität	Radiologische Diagnosekriterien
Osteosarkom	Periostabhebung, Zwiebelschalen, Codman-Sporn, Spiculae
Chondrosarkom	Mottenfraß-Osteolysen, Durchbrechung der Kortikalis, Codman-Dreieck, Spiculae, zentrale Tumornekrosen mit Kalkspritzern
Ewing-Sarkom	Osteomyelitis-ähnliche Veränderungen, Destruktion der Kortikalis mit mottenfraßähnlicher Strukturauflösung
Liposarkom	Mottenfraß-Osteolysen, dystrophische Kalzifikationen, aufgetriebene, arrodierete Kompakta, paraossaler Tumorausbruch
Enchondrom	Scharf begrenzte, runde oder spindelige Strukturauslöschung, verschiedene Kalzifikationsmuster der Knorpelmatrix
Riesenzelltumor	Zentrale Osteolyse ohne auffällige Randsklerose, von innen usurierte Kortikalis, blasige Auftreibungen

1.1.6.2 Pathologie

Die verschiedenen Entitäten der Knochentumoren werden sowohl auf generelle Malignitätskriterien (Kernatypien, Hyperchromasie, Hyperzellularität, Pleomorphie, Anaplasie) als auch auf spezifische Merkmale wie Kalzifizierungen, Matrixprodukte und immunhistochemische Marker hin untersucht.

Folgende Tabelle basiert auf den Daten des *Baseler Knochentumor-Referenz-zentrums*.

Tab.6 Makroskopische und histopathologische Diagnosekriterien ausgewählter Entitäten

Entität	Makroskopische Diagnosekriterien	Histopathologische Diagnosekriterien
Osteosarkom	Grauweißer Tumor	Atypische osteoidbildende Zellen
Chondrosarkom	Grauweiß, glasig, Verkalkungen	Zelldichtes Gewebe mit je nach Malignitätsgrad zunehmenden Atypien bei abnehmender Differenzierung der Knorpelmatrix
Ewing-Sarkom	Weich, bräunlich-blutig	Zytoplasmaarme Rundzellen mit kleinen Nukleolen und Glykogenablagerungen
Liposarkom	Reifem Fettgewebe ähnlich, blutig imbibierte	Atypische Lipoblasten, plexiformes Gefäßmuster
Enchondrom	Glasig	Reifes Knorpelgewebe
Riesenzelltumor	Braunes, weiches, blutig imbibierte Gewebe	Riesenzellen, mononukleäre Histiozyten, Siderin

Das in Abbildung 5 dargestellte Osteosarkom weist das typische makroskopische Bild eines grauweißen Tumors auf, der sich im Markraum der Metaphyse befindet (Stern) und die Kortikalis durchbricht (Pfeile).

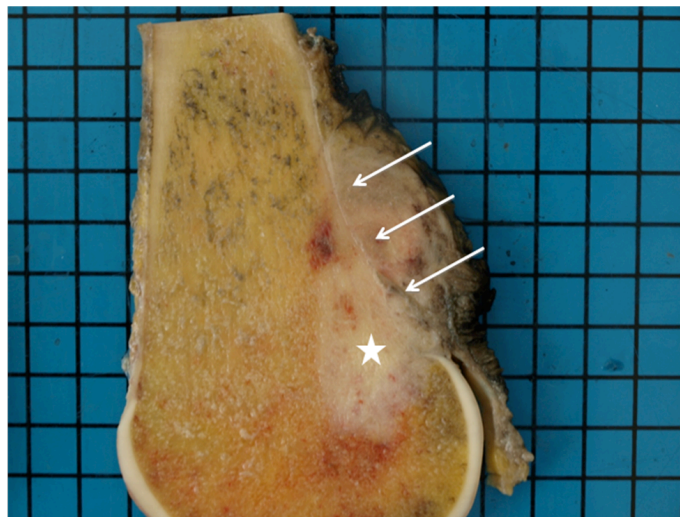


Abb.5 Makroskopisches Bild eines klassischen medullären Osteosarkoms, dessen grauweiße Tumormasse intramedullär (Stern) und die Kortikalis durchbrechend (Pfeile) extramedullär wächst.

Die im Folgenden dargestellten histologischen Schnitte der ausgewählten Entitäten weisen charakteristische Merkmale auf.

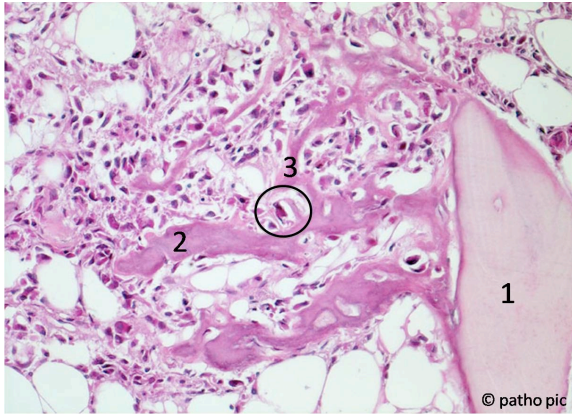


Abb.6 **Osteosarkom**

Die hyperchromatischen Osteosarkomzellen bauen an ein erhaltenes Spongiosabälkchen aus Lamellenknochen (1) osteoide Matrix an (2). Angelagert finden sich einige reaktive osteoklastäre Riesenzellen (3). HE-Färbung, 200x

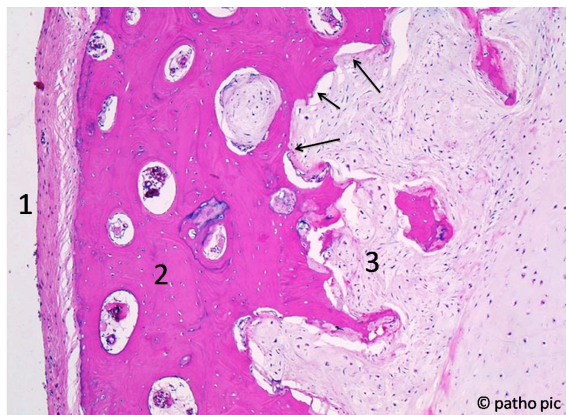


Abb.7 **Chondrosarkom**

Die vom Periost (1) bedeckte gesunde Kortikalis (2) wird vom Chondrosarkom (3) destruiert. Die aggressive Invasionsfront (Pfeile) ist hyperzellulär und resorbiert die Kortikalis. Die Chondrozyten liegen nicht wie in gesundem Gewebe gruppiert in der chondroiden Matrix. HE-Färbung, 50x

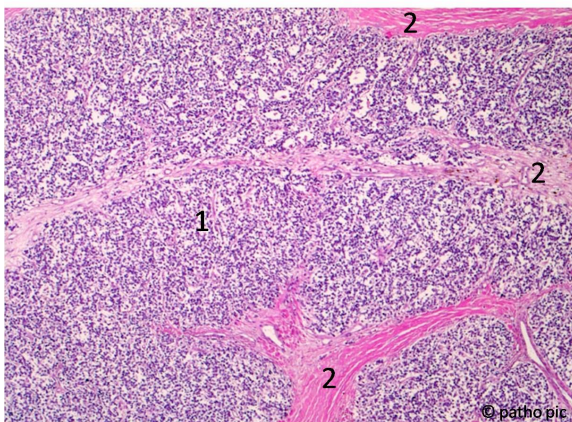


Abb.8 **Ewing-Sarkom**

Das Ewing-Sarkom imponiert mit einem monotonen Tumorzellrasen kleiner, uniformer Zellen (1). Die bindegewebigen Septen (2) verleihen dem Tumor eine lobuläre Struktur. HE-Färbung, 50x

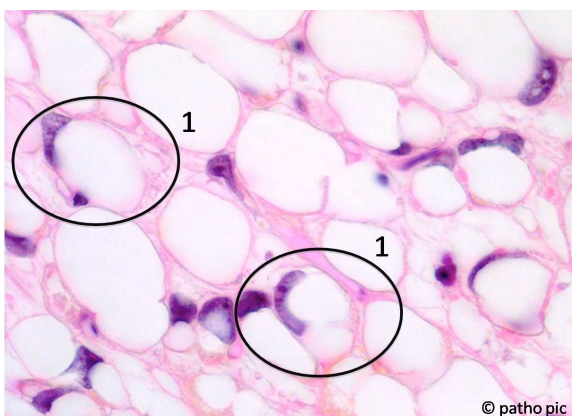


Abb.9 **Liposarkom**

Das Liposarkom besteht aus vielen univakuolären Lipoblasten (1), welche einen vergrößerten, hyperchromatischen, exzentrischen Kern aufweisen, der von der Vakuole an den Rand verdrängt wird. Der Tumor wird zum Teil durch feine fibrovaskuläre Septen durchzogen. HE-Färbung, 630x



Abb.10 **Enchondrom**

Das Enchondrom (1) wächst in läppchenartigen Strukturen und wird knöchern eingerahmt (2) und von Markgewebe umgeben (3). Der Tumor weist eine niedrige Zellularität auf und die Chondrozyten sind gleichmäßig in der Matrix verteilt; nur selten sind die Chondrozyten gepaart angeordnet. HE-Färbung, k.A. zur Vergrößerung

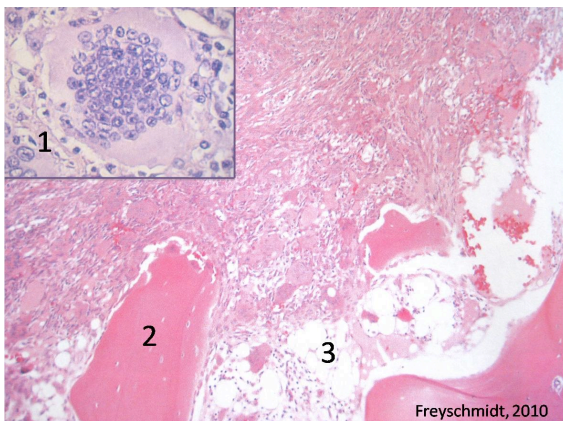


Abb.11 **Riesenzelltumor**

Der RZT imponiert mit großen, mehrkernigen, polygonalen Zellen, die reichlich Zytoplasma aufweisen (1). Diese Riesenzellen vom osteoklastären Typ liegen in einem Verband proliferierender mononukleärer Zellen. Der aggressiv wachsende Tumor löst das normale Knochengewebe (2) auf und infiltriert den Markraum (3). HE-Färbung, k.A. zur Vergrößerung

1.1.7 Staging

Zur Prognoseabschätzung und Therapiewahl spielt neben den entitätenspezifischen Kriterien das Staging eine herausragende Rolle. Für benigne und maligne Knochentumoren gibt es je drei Stadien, die aus einer Kombination von Grading, lokaler Ausbreitung und Metastasierungsverhalten ermittelt werden.

Im Allgemeinen gibt es drei Gradingstufen - G0 (benigne), G1 (niedrigmaligne), G2 (hochmaligne) – welche durch histologische, radiologische und klinisch-biologische Merkmale bestimmt werden. Die lokale Ausbreitung umfasst drei Stufen: T0 (intrakapsulär), T1 (extrakapsulär, intrakompartimental), T2 (extrakompartimental). Das Metastasierungsverhalten wird in M0 (keine Metastasen) und M1 (Vorliegen von Metastasen) eingeteilt.

Die Tabelle 7 zeigt das Staging der Knochentumoren nach Enneking 1985.

Tab.7 Staging der Knochentumoren

Stadium	Grading	Lokalisation	Metastase
Benigne			
1	G0	T0	M0
2	G0	T0	M0
3	G0	T1-2	M0-1
Maligne			
1A	G1	T1	M0
1B	G1	T2	M0
2A	G2	T1	M0
2B	G2	T2	M0
3A	G1-2	T1	M1
3B	G1-2	T2	M1

1.1.8 Therapie

Die Wahl der Therapie richtet sich nach der Entität und nach dem Staging des Tumors. Ab Stadium 2A werden Tumoren gleich welcher Entität radikal reseziert, was häufig mit einer Amputation einhergeht (Freyschmidt et al., 2010). Bei nachgewiesener Manifestation von Metastasen wird palliativ behandelt.

Einige wenige Tumoren, wie das Ewing-Sarkom, sprechen auf eine Radiotherapie an (Merchant et al., 1999). Auch einige Chemotherapeutika (Alkylantien wie Cyclophosphamid) werden neoadjuvant und adjuvant mit unterschiedlichem bzw. zum Teil unsicheren Erfolg eingesetzt (Jung, Kasper, 2010, Mulder et al., 2010).

Tab.8 Therapiemöglichkeiten ausgewählter Entitäten

Entität	Therapie
Osteosarkom	Prä- und postoperative Chemotherapie
Chondrosarkom	Resektion
Ewing-Sarkom	Prä- und postoperative Chemotherapie, evtl. Radiotherapie
Liposarkom	Resektion, evtl. Chemo- und Radiotherapie
Enchondrom	Bei Beschwerden Kürettage oder besser en-bloc-Resektion, sonst nur Kontrolle
Riesenzelltumor	Kürettage und Knochenzementplombe

1.1.9 Prognose

Generell lässt sich sagen, dass die Prognose entscheidend vom Staging abhängt. Je kleiner der Tumor und je besser die histologische Differenzierung ist, je radikaler der Tumor operiert wird (R0: mit tumorfreien Resektionsrändern), desto besser ist die Überlebenschancen (Sheth et al., 1996).

Beim Auftreten von Tochtergeschwülsten, welche überwiegend hämatogen metastasieren und sich häufig in der Lunge ansiedeln, ist die Prognose schlecht und die Therapie nicht mehr kurativ sondern palliativ.

Die 5-Jahres-Überlebensraten reichen beim Osteosarkom von 70% (nach neoadjuvanter Chemotherapie und R0-Resektion) bis 37% beim Vorliegen von Metastasen (Bielack et al., 2009). Beim Chondrosarkom liegt die 5-Jahres-Überlebensrate im Durchschnitt bei 77%. Ein Lokalrezidiv tritt bei 20% der Patienten auf, Metastasen bei knapp 14% (Björnsson et al., 1998)

1.2 Hitzeschockprotein 70

Das Hitzeschockprotein 70 (Hsp70, auch als *Heat shock protein 70* bezeichnet) gehört zur Familie der Hitzeschockproteine. Diese werden durch endogene und exogene Stimulation, wie Temperaturerhöhung, Anoxie oder Einwirkung von Chemikalien, als Reaktion auf solche Stressfaktoren vermehrt gebildet und werden auch unter physiologischen Bedingungen konstitutiv exprimiert (Lindquist, 1986, Lindquist, Craig, 1988, Todryk et al., 2003). Dabei wirken die Hitzeschockproteine als molekulare Chaperone und helfen bei Faltung und Transport von Proteinen (Csermely, 2001). Sie kommen in Prokaryoten und Eukaryoten (Lindquist, Craig, 1988) in den verschiedensten Zellkompartimenten vor (Todryk et al., 2003). Entsprechend ihrem Molekulargewicht werden sie in verschiedene Familien eingeteilt (Small HSPs, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, HSP110), die sich in Struktur und Expression unterscheiden (Jolly, Morimoto, 2002).

Zur HSP70-Familie zählen das konstitutiv exprimierte Hsc70 (MW 73kDa) und das durch Stress induzierbare Hsp70 (MW 72kDa). Im Gegensatz zum Hsc70, dessen zytosolische Konzentration durch äußere Stimuli nur schwach erhöht wird, ist das Hsp70 nur gering konstitutiv exprimiert, kann aber bei Stresseinwirkung bis zu 20-fach erhöht werden. In der neueren Literatur wird die Bezeichnung HSPA1A synonym für Hsp70 verwendet (Kampinga et al., 2009).

Im Folgenden wird näher auf das stressinduzierbare Hsp70 eingegangen, wobei dessen Vorkommen, molekulare Struktur und Funktion beschrieben und seine Rolle in der Immunologie und Onkologie hervorgehoben wird.

1.2.1 Struktur und Funktion von Hsp70

Das Hitzeschockprotein 70 konnte intrazellulär (ER, Zytosol, Mitochondrien, Nukleus) (Haas, 1994, Jolly, Morimoto, 2002), auf der Zellmembran (Multhoff et al., 1995, Multhoff, Hightower, 2011) und sogar im extrazellulären Raum (Feige, Polla, 1994, Asea et al., 2000, Vega et al., 2008, Pockley, Multhoff, 2008) nachgewiesen werden.

Die sogenannten Hitzeschockfaktoren (HSF) regulieren als Transkriptionsfaktoren die Expression von Hsp70. Zu diesen zählen unter anderem der HSF1, welcher schnell auf Stimuli wie Chemikalien oder Hitze reagiert, und der langsamer wirkende HSF2 (Mathew et al., 2001, Morimoto, 1998).

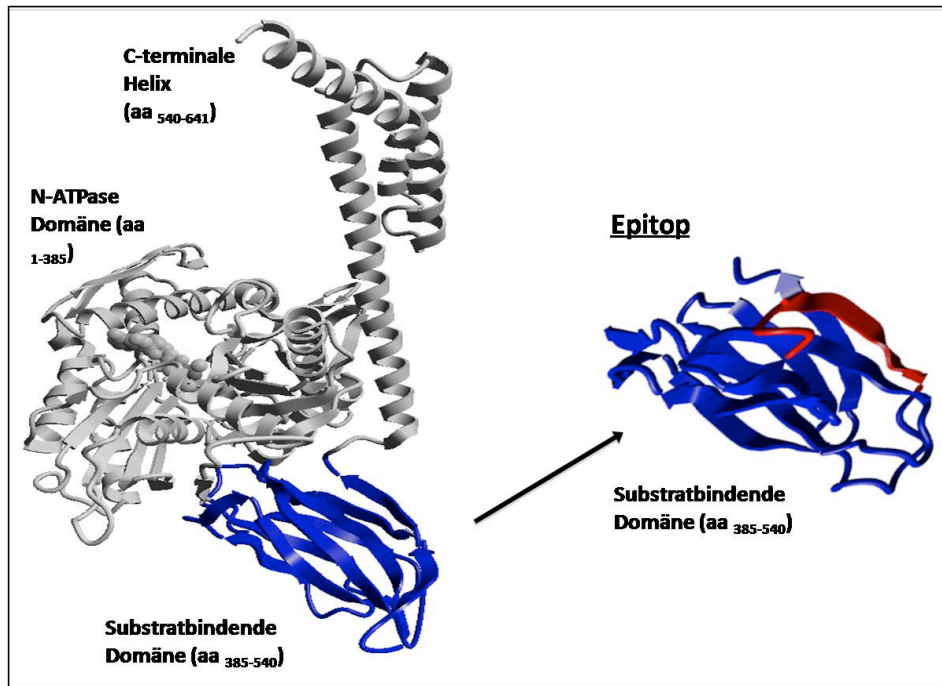


Abb.12 **Strukturmodell Hsp70** (641 Aminosäuren): Es sind die ATPase-Domäne am N-Terminus, die substratbindende Domäne und die C-terminale Helix dargestellt. Die separat dargestellte substratbindende Domäne zeigt rot markiert das Epitop, welches als Erkennungsstruktur (Antigen) für Antikörper dient.

In Abbildung 12 ist die molekulare Struktur des aus 641 Aminosäuren aufgebauten Hsp70 dargestellt. Am N-Terminus befindet sich zwischen zwei stark konservierten lobulären Subdomänen die Nukleotidbindungsstelle (ATPase Domäne, 44kDa) (Haas, 1994, Feige, Polla, 1994, Harrison et al., 1997, Bukau, Horwich, 1998). An diese schließt sich die weniger stark konservierte substratbindende Domäne (18kDa) an, welche in die C-terminale α -Helix (10kDa) übergeht. Gebundene Peptide werden durch eine ATP-induzierte Konformationsänderung freigesetzt (Bukau, Horwich, 1998, Hartl, Hayer-Hartl, 2002).

Hsp70 ist an vielfältigen intrazellulären Prozessen beteiligt. So hilft es bei der korrekten Faltung neusynthetisierter und denaturierter Proteine sowie auch bei der Protein-Degradation (Mathew et al., 1998, Hartl, Hayer-Hartl, 2002). Stuart beschreibt die Rolle von Hsp70 als Partnermolekül, das Proteine beim Transport in Mitochondrien begleitet (Stuart et al., 1994, Gupta et al., 2008). Eine ähnliche Funktion ist auch für den Transport ins ER (Haas, 1994, Nishikawa et al., 2005) und in Lysosomen (Terlecky, 1994, Mambula, Calderwood, 2006) nachgewiesen worden. Des Weiteren hat Hsp70 eine die DNA-Replikation beeinflussende Funktion (Helmbrecht et al., 2000) und reguliert das Zellwachstum, indem es mit Kontrollmolekülen des Zellzyklus wie cyclinabhängigen Kinasen oder dem Tumorsupressorprotein p53 (Zylicz et al., 2001) reagiert.

Verschiedene Proteine, wie **Hsp70 interacting protein (Hip)**, **Hsp70 organizing protein (Hop)** oder CHIP binden an Hsp70 und bestimmen die ausgeführte Funktion. CHIP zum Beispiel ist gebunden, wenn Proteine abgebaut werden (Hartl, Hayer-Hartl 2002, Höhfeld, Jentsch, 1997, Höhfeld et al., 2001, Meacham et al., 2001). Hsp70 ist auf diese Zusammenarbeit angewiesen und unterliegt somit einer Kontrolle und kann in seiner Funktion modifiziert werden.

1.2.2 Rolle von Hsp70 in Onkologie und Immunologie

Unter den erwähnten physiologischen Bedingungen normaler Zellen erfüllt Hsp70 seine Funktion, indem es die Zelle schützt und stabilisiert und Reparaturvorgänge nach schädigenden Einwirkungen unterstützt.

Auch entartete Zellen machen sich diese protektive Eigenschaft zu Nutze, indem sie durch verstärkte Hsp70-Expression eine anti-apoptotische Wirkung induzieren (Wei et al., 1995, Gabai et al., 1998, Jäättelä, 1999). Zum Schutz der Tumorzellen wirkt Hsp70 auf AIF (apoptosis inducing factor) –abhängige und –unabhängige Prozesse an verschiedenen Stellen des apoptotischen Signalweges ein (Ravagnan et al., 2001, Jäättelä et al., 1998, Jäättelä, 1999).

Neben diesen intrazellulären Funktionen übernimmt Hsp70 sowohl in membrangebundener Form als auch extrazellulär vorkommend vielfältige Aufgaben bei Immunprozessen (Shu, Huang, 2008, De Maio, 2011).

So konnte Asea stimulatorische Effekte von Hsp70 auf das angeborene Immunsystem nachweisen: Durch eine Bindung an die Toll-Like-Rezeptoren TLR 2 und TLR 4 von Monozyten bewirkt Hsp70 in diesen eine verstärkte Expression und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (Asea et al., 2000, Asea et al., 2002). Auf diese Weise fördert Hsp70 als Gefahrenbote indirekt eine Antwort des adaptiven Immunsystems, wie zum Beispiel zytotoxischer T-Zellen.

Ein weiterer immunstimulierender Mechanismus von Hsp70 ergibt sich aus dessen Rolle als Carriermolekül für antigene Peptide (Srivastava, 1994). Diese stammen aus Tumor- oder virusinfizierten Zellen und können bei Zellnekrose als Hsp70-Antigen-Komplex in den Extrazellularraum freigesetzt werden (Udono, Srivastava, 1993, Srivastava, 1994). Antigenpräsentierende Zellen, wie Makrophagen oder dendritische Zellen, nehmen die Hsp70-Antigen-Komplexe rezeptorvermittelt auf und präsentieren sie nach intrazellulärer Prozessierung auf membranständigen MHC-I-Molekülen, wodurch eine antigenspezifische Immunantwort CD8-positiver T-Zellen hervorgerufen werden kann (Arnold-Schild et al., 1999, Singh-Jasuja, 2000, Basu, Srivastava, 2000, Schild et al., 1999). In innovativen Versuchen werden Hsp70-Peptid-Komplexe aus Tumorzellen gewonnen, um sie dann nach Stimulation von T-Zellen als Vaccine gegen Tumorzellen einzusetzen (Janetzki et al., 2000, Ménoret et al., 2000).

Neben diesen Effekten auf antigenpräsentierende Zellen und T-Zellen wirkt Hsp70 auch auf Natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Multhoff gelang es 1995, die Präsenz von Hsp70 auf der Membran von humanen Tumorzellen, nicht aber auf gesunden Zellen nachzuweisen (Multhoff et al., 1995, Hantschel et al., 2000). Diese Expression lässt sich durch Hitzeschock oder membraninteraktive Substanzen wie ET-18-OCH3 steigern (Botzler et al., 1999). Die Quantität membrangebundenen Hsp70 korreliert positiv mit der Sensibilität für eine NK-Zell-vermittelte Lyse der Tumorzellen (Multhoff et al., 1995, Botzler et al., 1996, Multhoff et al., 1997, Multhoff et al., 2000). Dabei treten die NK-Zellen über ein Epitop am C-Terminus des Hsp70 mit der Tumorzelle in Kontakt (Botzler et al., 1998) und entfalten durch Exozytose zytotoxischer Granula ihre zelllytische Wirkung. Inkubiert man die NK-Zellen mit dem TKD-Peptid (14

Aminosäuren lange Sequenz der Substratbinde-Domäne des Hsp70) und Interleukin 2 zeigen sie eine gesteigerte Proliferation mit erhöhter lytischer Aktivität gegen Hsp70-positive Zielzellen (Botzler et al., 1998, Multhoff et al., 2001). In verschiedenen Studien wird die klinische Anwendbarkeit dieses Verfahrens erfolgversprechend geprüft.

Auch eine negative Korrelation zwischen der Hsp70-Positivität und dem Überleben von Tumorpatienten mit Plattenepithelkarzinom konnte von Pfister gezeigt werden (Pfister et al., 2007).

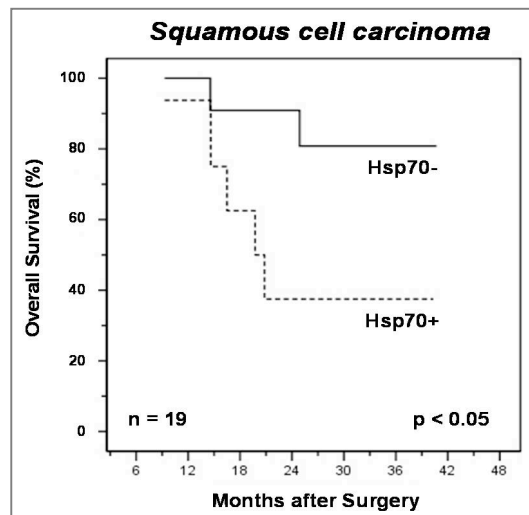


Abb.13 **Überlebenswahrscheinlichkeiten von Lungenkarzinompatienten mit negativem und positivem Hsp70-Status.** Plattenepithelkarzinom der Lunge (n=19) eingeteilt nach dem Hsp70-Membranstatus (Hsp70-membranpositiv vs. Hsp70-membrannegativ). Die Überlebenskurven beziehen sich auf Monate nach chirurgischer Behandlung (Pfister et al., 2007).

Von meiner Arbeitsgruppe wurden bereits Tumoren aus dem Kopf-Hals-Bereich, Leukämien, Lungenkarzinome und kolorektale Karzinome auf eine Hsp70-Membranpositivität hin untersucht. Im klinischen Kontext wurde auf die therapierelevante Bedeutung dieser Ergebnisse hingewiesen.

1.3 Intention und Zielsetzung

Knochtumoren können in jedem Lebensalter auftreten. Bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen sind sie nach den Leukämien und Lymphomen die dritthäufigsten Tumoren. Sie präsentieren sich zum Teil erst spät mit unspezifischen Symptomen. Dieses Fehlen von Leitsymptomen und der Mangel an spezifischen diagnostischen Markern führen häufig zu einer späten Diagnosestellung. So kann die Therapie erst in fortgeschrittenen Tumorstadien begonnen werden. In den meisten Fällen ist eine radikale Chirurgie die einzige Möglichkeit, welche nicht selten mit einer Amputation einhergeht. Mit Chemotherapie und Bestrahlung kombinierte Therapien verbesserten in den letzten Jahren die Überlebenswahrscheinlichkeit; beim Osteosarkom zum Beispiel liegt die 5-Jahres-Überlebensrate mit neuen Chemotherapieprotokollen bei 60-78% (Messerschmitt et al., 2009). Trotz dieser Erfolge ist es von großer Bedeutung weitere Therapiekonzepte für die (neo)-adjuvante Behandlung zu entwickeln.

Im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen kommt den *Immuntherapien* in letzter Zeit immer mehr Bedeutung zu. Ein besonderes Augenmerk liegt dabei auf der Familie der Hitzeschockproteine, die unter physiologischen Bedingungen bei Proteinfaltung, -transport und -degradierung helfen und die Zelle unter Stresseinwirkungen wie Hitze, Anoxie und Chemikalien auf vielfältige Weise schützen. Hsp70, ein stressinduzierbares 72kDa Protein der Hitzeschockfamilie, konnte auf der Plasmamembran von Tumorzellen verschiedener Entitäten im Unterschied zu normalen Zellen nachgewiesen werden (Multhoff et al., 1995, Hantschel et al., 2000). Die Membranexpression von Hsp70 auf den Tumorzellen korreliert dabei positiv mit der Sensitivität einer durch Natürliche Killerzellen vermittelten Zellyse (Multhoff et al., 1995, Botzler et al., 1996, Multhoff et al., 1997, Multhoff et al., 2000). Hieraus ergeben sich interessante Perspektiven für die Immuntherapie.

Um auch Sarkompatienten, im speziellen Knochtumorpatienten, den Möglichkeiten der Immuntherapie einen Zugang zu verschaffen, muss zunächst geklärt werden, ob Sarkome eine Expression von Hsp70 auf der Zellmembran aufweisen. Dies könnte nicht nur vom therapeutischen Standpunkt aus gesehen sehr interessant sein, sondern auch für die Diagnostik und das individuelle Therapiemonitoring zur frühen Erkennung von Metastasen und Rezidiven von enormer Bedeutung sein.

Ziel dieser Arbeit war es, Hsp70 mit verschiedenen Methoden (Durchflusszytometrie, Immunfluoreszenz) sowohl auf der Membran von Osteosarkomzelllinien aus der Maus als auch auf Tumorzellen humanen Biopsiematerials verschiedener Entitäten nachzuweisen und mit klinisch-pathologischen Parametern in Zusammenhang zu bringen. Eine zweite Aufgabenstellung bestand darin, eine Methode zu entwickeln, Zellen aus Knochentumorbiopsien zu extrahieren, und der Versuch, diese in Kultur anwachsen zu lassen, sollte dokumentiert werden. Die angewachsenen Zellen könnten für weitere Versuche im Sinne der translationalen Forschung interessant sein, weil sie den primären Zellen im Gegensatz zu Kulturzelllinien sehr ähnlich sind.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Konzentration	Hersteller
DMSO (Dimethylsulfoxid), Hybri-Max [®]	-	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ethanol	70%	Apotheke des Klinikums rechts der Isar
Isopropanol	-	Apotheke des Klinikums rechts der Isar
Propidiumiodid	-	Calbiochem
Vectashield [®] -DAPI	1,5µg/ml	Vector Laboratories

Das kristalline Propidiumiodid wurde so in DPBS gelöst, dass es in einer Konzentration von 100µg/ml vorlag.

2.1.2 Lösungen

Bezeichnung	Konzentration	Hersteller
Annexin-V-Fluos		Roche GmbH
Amphotericin B	250µg/ml	PAA Laboratories GmbH
BME-Vitamine (100x)	-	PAN [™] Biotech GmbH
BSA (Bovine serum albumine)	-	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
CaCl ₂	1M	Sigma
DMEM (Dulbecco`s modified Eagle`s medium)	-	Gibco

DPBS (Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline)	-	Gibco
Foetales Kälberserum (FCS)	-	PAA Laboratories GmbH
Hepes (pH 5,0 - 5,5)	1M	Gibco
L-Glutamin	200mM	PAN™ Biotech GmbH
Penicillin/Streptomycin (PenStrep-Lösung)	10.000U/ml Penicillin 10.000µg/ml Streptomycin	Gibco
NaCl	1M	Carl Roth GmbH
NaOH	1M	Merck KGaA
Natriumpyruvat	100mM	PAN™ Biotech GmbH
Nicht essentielle Aminosäuren (100x)	-	PAA Laboratories GmbH
RPMI 1640	-	Gibco
Trypsin/EDTA	0,05% Trypsin 0,02% EDTA in DPBS	PAN™ Biotech GmbH
Trypanblaulösung	0,4%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Annexin-V-Fluos wurde in Aliquots à 10µl bei -20°C gelagert und vor dem Versuch im Kühlschrank aufgetaut.

Das kristalline BSA wurde in einer 1%-Verdünnung in DPBS gelöst.

FCS wurde in 500ml-Portionen bei -20°C gelagert und dann bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurde es für 45min bei 56°C hitzeinaktiviert. Nach einer sterilen Filtration wurde es in Aliquots zu je 50ml bei -20°C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

Trypanblau (0,4%) wurde mit DPBS bis zu einer Endkonzentration von 0,1% verdünnt.

Zum Herstellen der Lösungen wurde entionisiertes Wasser aus einer Millipore™ - Anlage verwendet.

2.1.3 Medien und Puffer

Bezeichnung	Zusätze	Volumen
Annexin-Bindepuffer	Hepes/NaOH 10mM pH7,4 CaCl ₂ 2,5mM NaCl 140mM Dest. Wasser	1ml 250µl 7,1ml 1,65ml
Annexin-Färbepuffer	Annexin-V-Fluos Annexin-Bindepuffer	5µl 500µl
Einfriermedium	RPMI1640 DMSO	80ml 20ml
FACS-Puffer	DPBS FCS	100ml 10ml
Glio4500	DMEM FCS L-Glutamin PenStrep Natriumpyruvat BME Vitamine (100x) Nicht essentielle Aminosäuren Amphotericin B	500ml 50ml 5ml 5ml 5ml 5ml 5ml 5ml
Maus-Osteosarkom-Medium	DMEM (Medium) FCS PenStrep	500ml 50ml 5ml
Transport-Medium	DMEM (Medium) FCS PenStrep	500ml 50ml 10ml

2.1.4 Antikörper

Bezeichnung (Klon)	Ursprung	Isotyp	Konjugat	Firma	Verwendung
CD45	Maus	IgG1	APC	Caltag	FACS
CD77	Maus	IgG1	FITC	BD Pharmingen™	FACS
Hsp70 (cmHsp70.1)	Maus	IgG1	FITC	Multimmune GmbH München	FACS, IF
Isotypenkontrolle	Maus	IgG1	FITC	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	FACS, IF
Isotypenkontrolle	Maus	IgG1	APC	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	FACS
MHC-1	Maus	IgG1	FITC	Sigma, Steinheim	FACS

2.1.5 Zellkulturutensilien, Plastikmaterial

Material	Hersteller
Cryoboxen (Cryo 1°C Freezing container)	Nalge Nunc International, Rochester, USA
Cryotubes 2,0ml	TPP Techno Plastic Products AG, Schweiz
Deckgläser 18x18mm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Einwegpipetten (1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml)	Starstedt AG, Nürnberg
Einwegpinzetten	J. Söllner GmbH, Deggendorf
Einwegskalpelle	Feather Safety Co., Osaka, Japan
Eppendorf-Tubes (1,5ml)	Starstedt AG, Nürnberg
FACS Röhrchen, unsteril	Becton Dickinson Biosciences, Bedford, USA
Falcon-Tubes (15ml)	TPP Techno Plastic Products AG, Schweiz
Falcon-Tubes (50ml)	Starstedt AG, Nürnberg

Nalgene® Cryogenic Vial 1,2ml	Nalge Nunc International, Rochester, USA
Petrischalen (Ø100x20mm)	TPP Techno Plastic Products AG, Schweiz
Pipettenspitzen	Starstedt AG, Nürnbrecht
Zellsieb 70µm	Becton Dickinson Biosciences, Bedford, USA
Zellkulturflaschen, belüftet (2µm vent cap) (25cm ² (T25), 75cm ² (T75) Grundfläche)	Corning incorporated, Corning, USA
2-well chamber slides Lab-Tek®	Nalge Nunc International, Rochester, USA

2.1.6 Zelllinien

Die Maus-Osteosarkom-Zelllinien wurden uns freundlicherweise von Herr Rosemann (HMGU KKG Sarkom) zu weiteren Untersuchungen überlassen.

Die Osteosarkome wurden Hybrid-Mäusen aus den Stämmen BALB/c und CBA/Ca entnommen. Generiert wurden die Tumoren, indem man den Mäusen den sich im Knochen anreichernden α -Emitter ²²⁷Th (als Thorium-Citrat) injizierte (Rosemann et al., 2006). Die Diagnosen der Tumoren wurden histologisch gesichert und sind auf der *Pathbase* (http://eulep.pdn.cam.ac.uk/Search_Pathbase/index.php) unter den *Accession Numbers* 3410 bis 3414 einzusehen.

Es wurden 15 Linien (MOS 62, 162, 184, 306, 548, 679, 733, 734, 1188, 1189, 1324, 1400, 1403, 1929, 2022) aus Maus-Osteosarkomen in den folgenden Versuchen verwendet.

2.1.7 Humanes Material

Biopsie- und Resektionsmaterial kamen aus der Klinik für Orthopädie und der Klinik für Plastische Chirurgie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München. Es wurden alle konsekutiven Patienten mit Verdacht auf benigne und maligne mesenchymale Tumoren im Zeitraum vom 16. Februar 2009 bis 20. August 2010 in das Projekt eingeschlossen. Die histopathologische Diagnose stellte das

Pathologische Institut des Klinikums rechts der Isar nach Erhalt des resezierten Gewebes.

Die lokale Ethikkommission genehmigte die Materialentnahme. Die Patienten wurden über die Probenentnahme aufgeklärt und erklärten schriftlich ihr Einverständnis.

Den Patienten wurden im Rahmen einer präoperativen, zu diagnostischen Zwecken durchgeführten Biopsie Tumor- und gesundes Referenzgewebe entnommen. Diagnoseabhängig dienten zusätzlich oder alternativ der während der OP resezierte Tumor sowie ein im OP-Fenster gelegenes Stück tumornahen Referenzgewebes als Untersuchungsmaterial. Des Weiteren wurden den Patienten Serum (7,5ml) und EDTA-Blut (18ml) abgenommen.

Alle Daten wurden in einer Datenbank (Microsoft Excel 2007) festgehalten. Die Verarbeitung primären Materials erfolgte jeweils zeitnah nach der Entnahme.

2.1.8 Sonstige Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Axioskop 2 plus [®]	Carl Zeiss AG, Deutschland
Axiovert 135 [®]	Carl Zeiss AG, Deutschland
Axiovision [®] -Software	Carl Zeiss AG, Deutschland
CellQuest [®] -Software	Becton Dickinson, San Jose, USA
Costar Stipettor [®] Pipettierhilfe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Digitalkamera Fine pix S1 Pro [®]	Fujifilm Corporation
FACS Calibur [®]	Becton Dickinson, San Jose, USA
Neubauer [®] Zählkammer 0,0025mm ²	Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
Millipore [™] Direct Q 3 [®] with pump	Millipore Corporation, Billerica, USA

Die Sterilbänke (Clean Air, Hilden), die Brutschränke und verschiedene Tischzentrifugen (beides von Heraeus, Hanau) wurden regelmäßig sterilisiert und gewartet.

2.1.9 Sonstiges Material

Alle sonstigen Materialien und verwendeten Geräte wurden über Firmen wie Carl Roth GmbH (Karlsruhe) oder Laborcenter bezogen und waren für wissenschaftliche Zwecke bzw. als für die Zellkultur geeignet ausgewiesen. Weitere Chemikalien kamen von Sigma-Aldrich (München), Roche (Mannheim) oder VWR (Darmstadt).

2.2 Methoden

2.2.1 Materialgewinnung

In der Klinik für Orthopädie und in der Klinik für Plastische Chirurgie des Klinikums rechts der Isar wurde im Rahmen von Tumorresektionen und offenen Biopsien Patientenmaterial entnommen.

Dabei wurde Probenmaterial jeweils aus dem Tumor und dem gesunden Gewebe mesenchymalen Ursprungs, welches im Operationsgebiet so weit wie möglich vom Tumor entfernt lag, herausgeschnitten. Beide Gewebestücke wurden in separate, mit Transport-Medium gefüllte 50ml-Tubes gegeben und umgehend zur weiteren Verarbeitung in das Labor gebracht.

Das Biopsat aus gesundem Gewebe diente in weiteren Versuchen als Vergleichsmaterial und wurde als Referenzgewebe bezeichnet.

2.2.2 Isolierung von Zellen aus Primärmaterial

Um Zellen aus Primärmaterial für weitere Untersuchungen zu gewinnen, wurde das Biopsie- und Resektionsmaterial aufgearbeitet. Ein Teil der Zellen wurde mit dem Versuch, primäre Zellen zu züchten, in Kultur genommen.

Zunächst wurde ein kleines Stück des Biopsiematerials mit einem Skalpell steril abgeschnitten, auf ein Stück Alufolie gelegt und diese mit einer Pinzette über Stickstoffdampf gehalten, um das Gewebestück schonend durchzufrieren. Anschließend wurde es in einem Cryotube bei -80°C für spätere kryo-histologische Untersuchungen gelagert.

Ein weiteres sehr kleines Stück (Durchmesser ca. 3mm) wurde steril vom Biopsiematerial abgetrennt und in ein 1,2ml Nalgene Cryogenic Vial überführt, um es ebenfalls bei -80°C für die Gewinnung von Zelllysaten aufzubewahren.

Das restliche Gewebestück wurde in eine Petrischale überführt und das überschüssige Medium wurde abgesaugt. Nach sorgfältigem Spülen des Biopsats in 10-25ml DPBS wurden 2ml DPBS oder Glio4500-Medium in die Petrischale gegeben, damit die herausgelösten Zellen in der Suspension wegschwimmen konnten. Das Gewebestück wurde, solange es noch fest war, mit einem Skalpell und einer Pinzette und, sobald es weich war, mit zwei Skalpellen in gegenläufigen Bewegungen mechanisch zerkleinert (Abb.14a). Während der Zerkleinerung wurde immer wieder etwas kaltes Medium zugegeben, in der Petrischale mit den Gewebestückchen resuspendiert und dann über ein $70\mu\text{m}$ -Zellsieb in ein 50ml-Tube filtriert (Abb.14b). Zum Schutz der schon herausgelösten Zellen wurde das 50ml-Tube mit der Einzelzellsuspension in einem Eisbehälter gekühlt aufbewahrt.

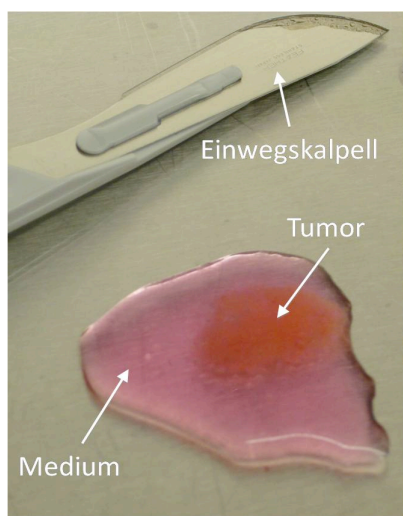


Abb.14a Tumorstück mit Skalpell



Abb.14b Zellsuspension mit Sieb

Nach vollständiger Zerkleinerung des Gewebestückes wurden die verbleibenden Stückchen aus dem Zellsieb und der Petrischale in eine Zellkulturflasche (T25) überführt und in Glio4500-Medium überschichtet und kultiviert.

Die Einzelzellsuspension wurde bei 1500rpm und 4°C für 5min zentrifugiert. Nach Abschütten des Überstandes wurde das Pellet in 3ml frischem Medium resuspendiert.

Zur Zellzahlbestimmung wurden der Zellsuspension 20µl entnommen und mit 20µl 0,1% Trypanblaulösung gemischt. Ein Aliquot der Suspension wurde dann in eine Neubauer-Zählkammer gebracht und anschließend wurden die Zellen unter Phasenkontrast gezählt. Bei toten und nekrotischen Zellen war die Integrität der äußeren Zellmembran nicht mehr gewährleistet und Trypanblau diffundierte in das Zellinnere. Vitale Zellen mit intakter äußerer Zellmembran nahmen Trypanblau nicht auf und erschienen im Lichtmikroskop weiß. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach der Formel:

$$\text{Zellen/1ml} = n \times 10.000 \times v / q$$

wobei **n** die Anzahl der gezählten Zellen in **q** Quadranten ist. Der Faktor **v** steht für den Verdünnungsfaktor, der aufgrund der 1:1 Mischung mit Trypanblau 2 war.

Dabei musste darauf geachtet werden, dass sich in der Suspension nicht nur Tumorzellen, sondern auch Leukozyten (Abb.15 „1“) und Erythrozyten befanden. Die Vitalität der Leukozyten lag nach Zerkleinerung und Transport im Gegensatz zu den Tumorzellen zumeist bei ca. 100%. Tumorzellen lassen sich von Leukozyten aufgrund ihrer Größe unterscheiden. Leukozyten sind zumeist nur halb so groß als Tumorzellen (Abb.15 „2“). Letale Tumorzellen sind blau angefärbt und in Abbildung 15 mit „3“ markiert.

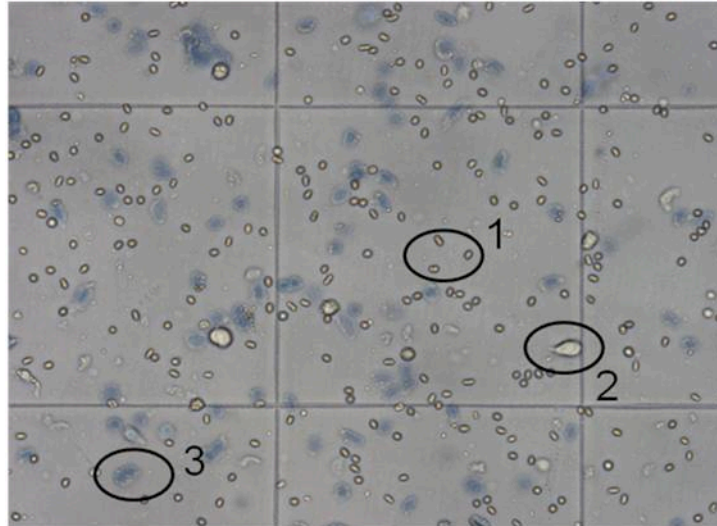


Abb.15 Ausschnitt aus Neubauer-Zählkammer mit Leukozyten (1), vitalen Tumorzellen (2) und letalen Tumorzellen (3)

Für die in Kapitel 2.2.7.2 beschriebene FACS-Analyse wurden für vier Ansätze je 200.000 Zellen des Tumor- und Referenzgewebes eingesetzt. Bis zum Start des Versuchs wurde die Zellsuspension auf Eis gestellt. Bei geringer Ausbeute an vitalen Zellen wurde die Hälfte der gewonnenen Suspension für die FACS-Analyse abgenommen.

Die restliche Einzelzellsuspension wurde mit 8ml Glio4500-Medium in eine T25-Zellkulturflasche überführt und in den Inkubator gestellt.

2.2.3 Kultur von Zellen aus humanem Primärmaterial

Die Zellen wurden unter Standardbedingungen (37°C, 95% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂) kultiviert. Die Zellen wuchsen in DMEM-Medium (4,5g/L Glucose, L-Glutamin, Pyruvat) unter Zusatz von 10% FCS, 1% L-Glutamin, 1% PenStrep-Lösung, 1% Natrium-Pyruvat, 1% BME Vitamine, 1% essentielle Aminosäuren und 1% Amphotericin B. Dieses Medium wurde als Glio4500-Medium bezeichnet. Die Zellen wurden je nach Konfluenz alle 1-3 Wochen passagiert.

Zum Passagieren wurden die adhärenenten Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und anschließend mit Trypsin (1,5ml für T75-Zellkulturflasche, 0,5ml für T25-ZKF) im Inkubator 8-10min lang vom Plattenboden gelöst. Durch sanftes Klopfen der Flasche

lösten sich die letzten adhärennten Zellen. Nach Mediumzugabe (6,5ml für T75-ZKF, 4,5ml für T25-ZKF) wurden die Zellen durch Resuspendieren komplett voneinander gelöst und anschließend gezählt.

Dazu wurden 20µl Zellsuspension entnommen und mit 20µl 0,1% Trypanblaulösung gemischt. Ein Aliquot der Suspension wurde dann in einer Neubauer- Zählkammer gebracht und die Zellen wurden unter Phasenkontrast wie unter 2.2.2 beschrieben gezählt.

Die komplette Zellsuspension aus einer T25-ZKF wurde zur Expansion in ein T75-ZKF überführt und mit frischem Medium auf 20ml aufgefüllt.

Die Zellsuspension aus einer T75-ZKF wurde in zwei T75-ZKF gesplittet, deren Zellen im Verlauf zum einen Teil weiterkultiviert, zum anderem Teil eingefroren wurden, um für zukünftige Versuche zur Verfügung zu stehen.

2.2.4 Kultur von Zelllinien

Die Zelllinien wurden unter Standardbedingungen (37°C, 95% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂) kultiviert. Die Zellen wuchsen in Maus-Osteosarkom-Medium und wurden ein- bis zweimal die Woche passagiert.

Zur Passage wurden die adhärennten Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und anschließend mit Trypsin (1,5 ml für T75-ZKF) im Inkubator 8-10min lang inkubiert. Durch Klopfen der Flasche lösten sich die noch adhärennten Zellen. Nach Mediumzugabe (6,5ml für T75-ZKF) wurden die Zellen durch Resuspendieren komplett voneinander gelöst und anschließend wie unter 2.2.2 beschrieben gezählt.

Es wurden pro T75-ZKF 500.000 Zellen ausgesät. Dafür wurde das errechnete Volumen der Zellsuspension in eine frische Flasche gegeben und mit Medium auf das Endvolumen von 20ml aufgefüllt.

Die unter diesen Bedingungen kultivierten Zellen befanden sich zum Zeitpunkt der Experimente in der exponentiellen Wachstumsphase. Die Zellkulturen wurden regelmäßig passagiert, auf Mykoplasmenkontamination und Vitalität geprüft. Bei etablierten Zelllinien lag der Anteil vitaler Zellen bei regelmäßigem Passagieren über 95%.

2.2.5 Kryokonservierung von Zellen

Die aus der Kultur gewonnen humanen Zellen wie auch die Mauszelllinien, die für weitere Versuche gelagert werden sollten, wurden eingefroren.

Pro 2ml-Cryotube wurden 500.000 Zellen in 1,8ml Einfriermedium-FCS-Gemisch eingefroren; bei humanen Zellen, bei denen die Zellzahl zum Teil niedriger war, wurden die gesamten Zellen einer T75-ZKF eingefroren. Das Restvolumen von 0,2ml stellte eine Pufferzone dar, damit eventuell eingedrungener Stickstoff die Tubes beim Auftauen nicht platzen ließ.

Die gezählte und errechnete Menge an Zellen wurde in 5ml kaltem DPBS aufgenommen und bei 1500rpm und 4°C 5min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 900µl kaltem FCS resuspendiert. Unter Zugabe von 900µl Einfriermedium wurden die Zellen in ein Cryotube gegeben. Die Endkonzentration des DMSO betrug 10%.

Das gesamte Procedere fand in rasch durchgeführten Arbeitsschritten mit vorgekühlten Lösungen, Medien, Zentrifugen und Cryotubes auf Eis statt. DMSO ist über 4°C toxisch und könnte somit die Zellen schädigen.

Die Cryotubes wurden bis zur raschen Überführung in einen -80°C Gefrierschrank in einer auf 4°C vorgekühlten Cryobox gehalten. Die mit Isopropanol gefüllten Cryoboxen gewährleisteten ein Abkühlen der Zellen von ca. 1°C/ml pro Minute. Das Isopropanol wurde nach jeder fünften Benutzung durch Frisches ersetzt. Aufgrund dieses Vorgehens gelang es, Zellen mit einer hohen Überlebenswahrscheinlichkeit einzufrieren. Nach 2-3 Tagen wurden die Cryotubes in Gefriertruhen mit flüssigem Stickstoff eingelagert.

2.2.6 Mikroskopische Methoden

2.2.6.1 Durchlichtmikroskopie

Um das Anwachsen von Zellen aus Primärmaterial von Sarkom-Patienten im Verlauf zu beobachten und zu dokumentieren, wurden die Zellen in einem Axiovert 135 Mikroskop® von Zeiss bei 5-facher, 10-facher, 40-facher, 100-facher und 200-facher

Vergrößerung fotografiert. Zellen die parallel mit Immunfluoreszenzverfahren untersucht wurden, wurden mit einem Axioskop 2 plus[®] Mikroskop von Zeiss betrachtet und fotografiert.

2.2.6.2 Immunfluoreszenzmikroskopie

Mit der Immunfluoreszenzmikroskopie können in der Zelle und auf der Zellmembran liegende Antigene sichtbar gemacht werden, indem an diese Antikörper binden, die mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt sind. DAPI ist ein nach Anregung blaues Licht imitierender Farbstoff, welcher sich in der DNA einlagert und somit die Lokalisation von Zellkernen deutlich macht (Florijn et al., 1995).

Das membranständige Hsp70 kann mit FITC-gekoppeltem cmHsp70.1-Antikörper sichtbar gemacht werden. Zur Isotypkontrolle verwendet man einen Antikörper der Immunglobulinklasse G1.

Bei der Versuchsdurchführung verhinderte eine Inkubation auf Eis und das Arbeiten mit kalten Medien und Lösungen die Internalisierung des an membranständiges Hsp70 gebundenen cmHsp70.1-Antikörpers.

Zur Durchführung wurden von jeder Zelllinie jeweils 100.000 Zellen pro Well auf einen 2-Well-Chamber-Slide ausgesät. Am zweiten Tag nach Aussaat wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit 1ml kaltem DPBS gewaschen. Anschließend wurden 500µl DPBS mit 1% BSA zum Blocken dazugegeben und 60min auf Eis inkubiert.

Nach Abnahme der Blocklösung wurde das eine Well mit 1ml FITC-gekoppeltem Hsp70-Antikörper (im Verhältnis 1:1 mit DPBS verdünnt) und das andere Well mit 1ml FITC-gekoppeltem Isotyp (IgG, 1:150 mit DPBS verdünnt) 60min im Dunkeln auf Eis inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen 3-mal mit kaltem DPBS gewaschen. Nach Entfernen der Well-Umrandung und nach Zugabe von einem Tropfen Vectashield[®]-DAPI wurde das aufgelegte Deckglas mit Nagellack fixiert.

Die Objektträger wurden dann in einem Axioskop 2 plus Mikroskop[®] von Zeiss mit einem planaren 10x- oder 20x-Objektiv bei Verwendung von Standardfiltern

analysiert. Spezifisch gefärbte Zellen wurden fotografiert und mit der Software Axiovision® von Zeiss analysiert.

2.2.7 Durchflusszytometrie (FACS)

2.2.7.1 Funktionsprinzip des FACS

Das Akronym FACS steht für *fluorescence activated cell sorting*. Die Zellen werden anhand verschiedener fluoreszenzassoziierter und physikalischer Parameter gemessen und können nach unterschiedlichen Kriterien sortiert werden.

Für die Durchführung einer FACS-Analyse ist eine Suspension von Einzelzellen nötig (Böcker et al., 2004).

Die gewonnenen Zellen passieren einzeln eine Kapillare, in der ein Laserstrahl auf sie trifft. Sein Licht wird zum Teil von den Zellen gestreut, mittels Fotomultipliern verstärkt und dann detektiert. Die Intensität des Vorwärtsstreulichtes gibt das Volumen der Zelle wieder, die des Seitwärtsstreulichtes korreliert mit der Granularität der Zelloberfläche (Carter, Ormerod, 2000). Neben dem gestreuten Licht können auch emittierte Fluoreszenzsignale erfasst werden. Die Detektion antikörpergebundener Fluoreszenzfarbstoffe ermöglicht die Quantifizierung der Antikörper, welche mit der Anzahl der jeweiligen in der Zelle befindlichen oder an der Zellmembran gebundenen Zielstrukturen korreliert (Frelinger et al., 2010).

Mit dieser Analysemethode konnten die Zellen des Primärmaterials und der Zelllinien speziell auf die möglicherweise vorhandene Expression von Hsp70 auf der Zellmembran untersucht werden und diese quantifiziert und unter Einbezug weiterer Parameter näher charakterisiert werden.

2.2.7.2 Durchführung der FACS-Analyse mit primärem Material

Alle Arbeitsschritte fanden auf Eis und mit vorgekühlten Zentrifugen und Lösungen statt, damit die Zellen vital blieben.

Die auf Eis kühl gehaltene Zellsuspension humaner Zellen (s. Kap. 2.2.2) wurde für die FACS Analyse in ein 15ml-Tube überführt und mit FACS-Puffer (DPBS + 10% FCS) aufgefüllt. Nach Zentrifugation (1500rpm, 4°C, 5min) wurde der Überstand abgeschüttet und das Pellet mit 4ml FACS-Puffer resuspendiert und somit ein weiteres Mal gewaschen.

Davon wurde für jeden Ansatz je 1ml in ein 1,5ml-Eppendorf-Tube überführt und nochmals zentrifugiert (1500rpm, 4°C, 5min). Die weitere Durchführung des Versuchs in 1,5ml Eppendorf Tubes hatte den Vorteil, dass die Pellets nach der Zentrifugation gut sichtbar auf der Seite der Tubes lagen und somit der Waschüberstand anschließend sehr sorgfältig abgesaugt werden konnte. Der Hsp70-Antikörper wurde dadurch nicht unnötig verdünnt, was wiederum zu genaueren Ergebnissen und vor allem zu geringeren Abweichungen bei der Hsp70-Färbung führte.

Die Zellen wurden mit der Antikörperlösung resuspendiert und 30min lang auf Eis und im Dunkeln inkubiert.

Es wurde folgendes Pipettierschema für die vier Ansätze verwendet:

Ansatz	Antikörper	Menge
Ansatz 1	IgG1-FITC IgG1-APC	5µl 1µl
Ansatz 2	Hsp70-FITC CD45-APC	5µl 1µl
Ansatz 3	MHC1-FITC CD45- APC	5µl 1µl
Ansatz 4	CD77-FITC CD45-APC	4µl 1µl

Nach Inkubation wurden die Zellen mit 1ml FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert (1500rpm, 4°C, 5min). Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 500µl FACS-Puffer resuspendiert und in ein FACS-Tube überführt. Die Messung erfolgte so schnell wie möglich, da die frisch aus Primärmaterial gewonnenen Zellen mit zunehmender Zeit nicht mehr vital waren.

Propidiumiodid zur Letalitätsbestimmung wurde in einer Verdünnung von 1:100 dazugegeben. Tote Zellen nahmen das Propidiumiodid aufgrund des Verlustes ihrer Membranintegrität schnell auf und konnten so detektiert werden. Damit vitale Zellen, welche das PI nach längerer Zeit mittels Diffusion aufnahmen, nicht fälschlicherweise als tot detektiert wurden, wurde das PI erst unmittelbar vor der Messung hinzugefügt. Die Messung erfolgte durch FACS Calibur[®] und die Verarbeitung der Daten mittels des Programmes CellQuest[®].

2.2.7.3 Durchführung der FACS-Analyse mit Zelllinien

Zur Vorbereitung für die FACS-Analyse von murinen Osteosarkomzelllinien wurden pro Linie 700.000 Zellen durch Trypsinieren aus der Kultur genommen. Je 100.000 Zellen wurden für die Hsp70- und Isotyp-Färbung verwendet, die übrigen 500.000 Zellen für die Annexin-Färbung.

Hsp70-Färbung

Die in Medium suspendierten Zellen wurden für 5min bei 4°C und 1500rpm zentrifugiert und anschließend nach Absaugen des Überstandes mit 1ml kühlem DBPS resuspendiert, um die Zellen zu waschen. Je 500µl davon wurden in ein 1,5ml-Eppendorf-Tube gegeben und nochmals für 5min bei 4°C und 1500rpm zentrifugiert. Nach sorgfältigem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet mit 5µl der Antikörperlösung resuspendiert. Es wurde nach folgendem Schema pipettiert, wobei der Antikörper mit der gleichen Menge DPBS verdünnt wurde:

Ansatz	Antikörper	Menge
Ansatz 1	IgG1-FITC	2,5µl
	DPBS	2,5µl
Ansatz 2	Hsp70-FITC	2,5µl
	DPBS	2,5µl

Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis im Dunkeln wurden die Zellen mit 1ml kühlem DPBS gewaschen und zentrifugiert (4°C, 1500rpm, 5min). Anschließend wurde das Pellet in 500µl FACS-Puffer aufgenommen und in ein FACS-Tube überführt.

Propidiumiodid zur Letalitätsbestimmung wurde erst unmittelbar vor der Messung in einer Verdünnung von 1:100 dazugegeben.

Wie auch beim Arbeiten mit primären Zellen wurde darauf geachtet, dass alle Arbeitsschritte auf Eis und mit vorgekühlten Zentrifugen und Lösungen stattfanden, damit die Zellen vital blieben.

Annexin-Färbung

Die in Medium resuspendierten Zellen wurden für 5min bei 4°C und 1500rpm zentrifugiert und nach Absaugen des Überstandes mit 1ml DPBS gewaschen und nochmals zentrifugiert (5min, 4°C, 1500rpm). Das Pellet wurde mit 200µl Annexin-Bindepuffer resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde das Pellet mit 100µl Annexin-Färbepuffer vermengt und 15min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Diese 100µl wurden anschließend in 400µl Annexinpuffer aufgenommen und in ein FACS-Tube überführt. Erst direkt vor der Messung wurden 5µl Propidiumiodid hinzugegeben.

2.2.7.4 Auswertung der FACS-Analyse von primärem Material

Die Sensitivität des Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsscatters (SSC) wurde so eingestellt, dass alle durchflusszytometrisch erkennbaren Populationen abgebildet werden konnten.

Vitale Zellen wurden durch eine Dotplotdarstellung der Propidiumiodid-Fluoreszenz (PI) und des FSC charakterisiert.

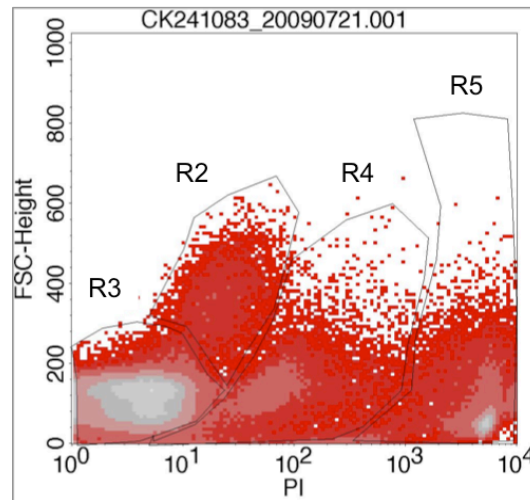


Abb.16 Dotplot (PI-FSC)

Weit rechts im Dotplot der Abbildung 16 liegende Zellen sind sehr signalintensiv, da sie viel PI aufgrund einer nicht mehr intakten Zellmembran aufgenommen haben. Dies spricht dafür, dass die Zellen nicht mehr vital sind.

Für die Analyse wurden die Zellpopulationen in Regionen (R2, R3, R4, R5) im FSC-PI-Dotplot eingrenzt und separat analysiert.

R4 und R5 enthielten kaum vitale Zellen. R3 enthielt vitale Zellen, die von der Größe her Lymphozyten entsprachen. R2 enthielt die zu untersuchenden Tumor- bzw. Referenzzellen. R1 (nicht in Abb.16 dargestellt) gibt die CD45-positiven Zellen wieder. CD45 ist ein leukozytenspezifischer Marker.

Des Weiteren wurden Gates gebildet, welche die Zellen weiter charakterisierten. Das im Folgenden interessante Gate 6 schloss alle Zellen mit ein, die sich in Region 2 befanden und nicht zugleich CD45-positiv waren (G6 = R2 and not R1).

Um keine unspezifischen Bindungen zu werten, wurden jeweils Isotyp-Kontrollen durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden mit einem MHC1-spezifischen Antikörper markierte Zellen mit untersucht. Da MHC1 auf allen kernhaltigen Zellen vorkommt, diente es als Nachweis, dass die FACS-Analyse technisch funktionierte.

Die in Kapitel 3 dargestellten Ergebnisse konzentrieren sich nach Abzug des Isotypwertes auf den Prozentanteil Hsp70-positiver Zellen aus dem Gate 6 im Markerbereich 1 (M1). M1 wurde der Gaußschen Kurve entsprechend so angesetzt,

dass die unspezifische Bindung des Isotypes nicht im markierten Bereich lag (Abb.17 und Abb.18).

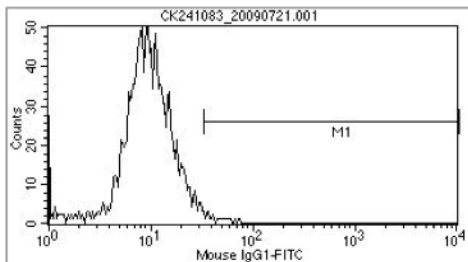


Abb.17 Markersezung am Isotyp

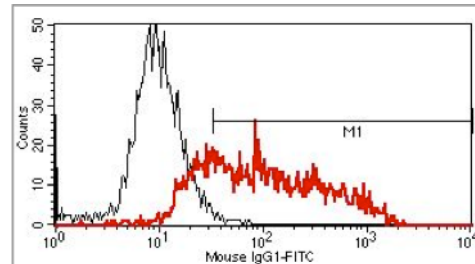


Abb.18 Hsp70-Färbung (rot) und Isotyp

Neben dem Prozentsatz positiv gefärbter Zellen wird in den Diagrammen teilweise auch die durchschnittliche Fluoreszenzintensität angegeben (sog. *Mean-fluorescence-intensity*, mfi). Der mfi-Wert ist direkt proportional zur Anzahl gebundener Antikörpermoleküle und somit ein Maß für die Menge an Antigenen auf der Zellmembran. Er schließt nach Abzug des Isotyps alle Zellen des Gate 6 ein.

2.2.7.5 Auswertung der FACS-Analyse von Zelllinien

Hsp70

Wie bei der Analyse primärer Zellen wurde die Sensitivität des Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsscatters (SSC) so eingestellt, dass die Population abgebildet werden konnte (Abb.19).

Vitale Zellen wurden durch eine Dotplot-Darstellung der PI-Fluoreszenz und des FSC charakterisiert (Abb.20).

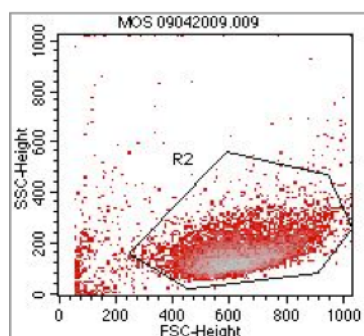


Abb.19 Region 2

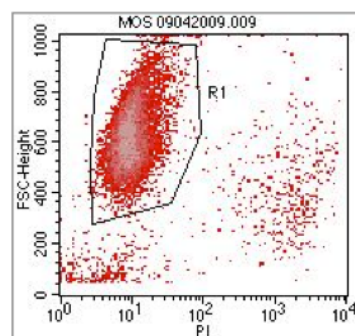


Abb.20 Region 1

Anders als im FACS primärer Zellen fand sich bei den Zelllinien nur eine deutlich zu erkennende Population, die mit R1 (Abb.20) gekennzeichnet wurde. PI-positive und folglich tote Zellen wie auch sehr kleine Zelltrümmer, welche durch ein niedriges FSC auffielen, wurden durch Setzen der Region 1 nicht mit in die Auswertung eingeschlossen.

In R2 (Abb.19) wurden die Zellen entsprechend ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) eingegrenzt, so dass R2 die Osteosarkomzellen darstellt.

Zellen, die sowohl in R1 als auch R2 eingeschlossen sind, sind im Gate 1 dargestellt. Die in Kapitel 3 dargestellten Ergebnisse konzentrieren sich nach Abzug des Isotypwertes auf den Prozentanteil Hsp70-positiver Zellen aus dem Gate 1 im Markerbereich 1 (M1). M1 wurde entsprechend einer idealen Gauß-Kurve so angesetzt, dass der Anteil der mit dem unspezifischen Isotypantikörper gefärbten Zellen bei unter 5% lag (Abb.21 und Abb.22).

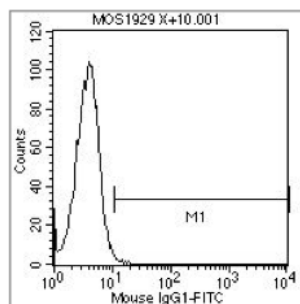


Abb.21 Markersetzung am Isotyp

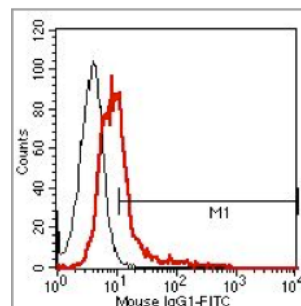


Abb.22 Hsp70-Färbung (rot) und Isotyp

Annexin

Die Annexin-Färbung dient zur Bestimmung des Anteils früh-apoptotischer Zellen. Bei Letalitätstests, die auf nekrotische Zellen abzielen, werden die toten Zellen über das Eindringen eines Farbstoffes in die Zelle sichtbar gemacht. Bei apoptotischen Zellen hingegen wird die äußere Zellmembran erst sehr spät permeabel. Allerdings wird im Anfangsstadium von apoptotischen Vorgängen die Dipolarität der Zellmembran nicht mehr aufrecht erhalten und dadurch kommt es zu einer Translokation von Phosphatidylserin vom inneren Membranleaflet in das äußere Membranleaflet. Annexin V bindet calciumabhängig an Phosphatidylserin. Färbt

man die Zellen zusätzlich dazu noch mit Propidiumiodid (Farbstoff, der über Membranlöcher in die Zelle eindringt, Marker für Zellnekrose) (PI), so kann man den Anteil nekrotischer und apoptotischer Zellen unterscheiden.

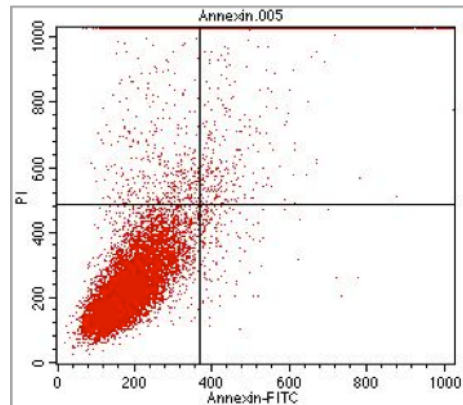


Abb.23 Annexin- und PI-Färbung zur Vitalitätsbestimmung

Der Dotplot (Abb.23) wird in 4 Quadranten unterteilt:

Q1	Linker oberer Quadrant	Apoptotische, nicht letale Zellen
Q2	Rechter oberer Quadrant	Apoptotische, letale Zellen
Q3	Linker unterer Quadrant	Nicht apoptotische, nicht letale Zellen
Q4	Rechter unterer Quadrant	Nicht apoptotische, letale Zellen

Die in Q3 befindlichen Zellen zeigen weder apoptotische Veränderungen noch sind sie nekrotisch. Ein hoher Prozentsatz in diesem Quadranten gibt Auskunft darüber, dass sich in der Zellkultur überwiegend vitale Zellen befanden und dass die Zellen während der Aufbereitung für die FACS-Analyse nicht beschädigt wurden.

2.2.8 Sonstiges

2.2.8.1 Fotos

Durchlichtmikroskopische Fotos wurden mit einer Fuji Digitalkamera an einem Zellkulturmikroskop von Zeiss (Jena, Deutschland) aufgenommen.

2.2.8.2 Bildbearbeitung

Digitale Bilder wurden auf einen PC übertragen und mit Adobe[®] Photoshop bearbeitet.

2.2.8.3 Statistik

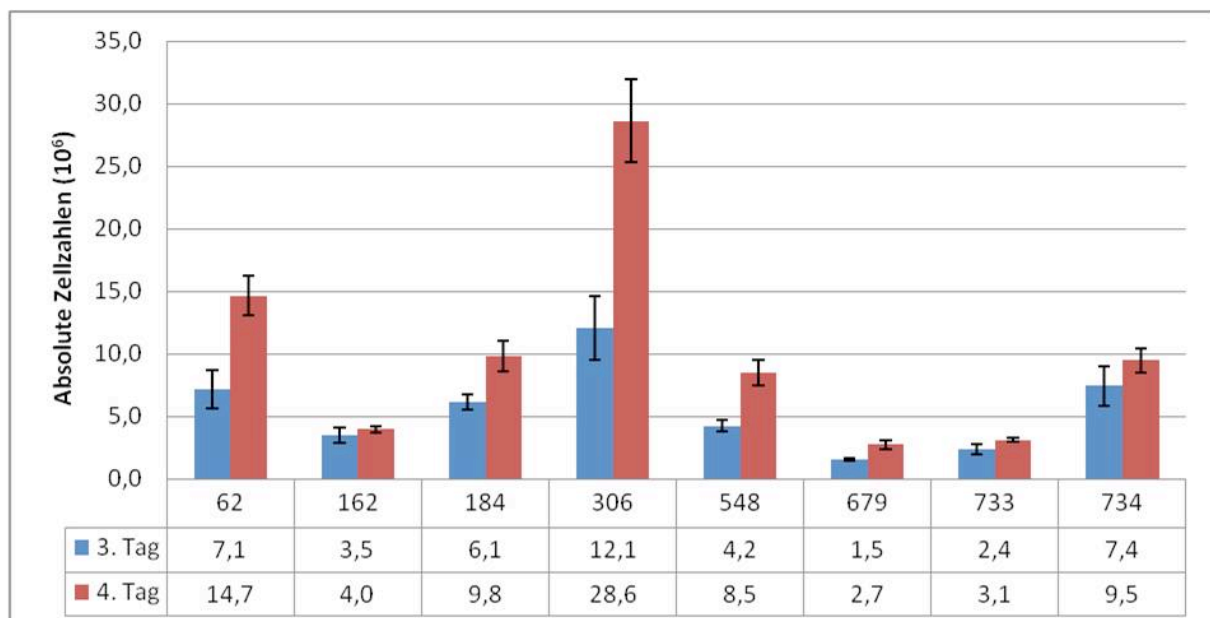
Bei allen Ergebnissen wurde mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ untersucht. Der p-Wert wurde mittels Excel[®] durch den studentischen T-Test ermittelt. Fehlerbalken resultieren aus der Standardabweichung oder dem Standardfehler aus der Quantifizierung von mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen.

3 Ergebnisse

3.1 Kultur von Mausosteosarkomzelllinien

Die unter Standardbedingungen (37°C, 95% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂) kultivierten Mausosteosarkomzelllinien konnten 1-2-mal pro Woche passagiert werden. Probleme mit Verunreinigungen (Pilze, Bakterien) traten nicht auf. Nach Trypsinieren und Waschen in Medium wurden 0,5x10⁶ Zellen pro T75-Zellkulturflasche ausgesät. Am 3. bzw. 4. Tag nach Aussaat wurden die Zellen gezählt und neu ausgesät. Der Anteil vitaler Zellen lag bei jeder Zellpassage über 95%.

Das Wachstumsverhalten der Zelllinien 62, 162, 184, 306, 548, 679, 733 und 734 wurde über 12 Passagen beobachtet und dokumentiert (Diag.1). Einige Zelllinien, wie zum Beispiel die Linie 306, zeigten ein schnelles Wachstum mit einer Verdopplungszeit von ca. 16h; die Zellen vermehrten sich in 4 Tagen von 0,5x10⁶ auf 28,6x10⁶ Zellen. Andere Zelllinien wuchsen langsamer, wie Zelllinie 679, mit einer Verdopplungszeit von 39h. Die Zellzahl stieg in 4 Tagen nur auf 2,7x10⁶.

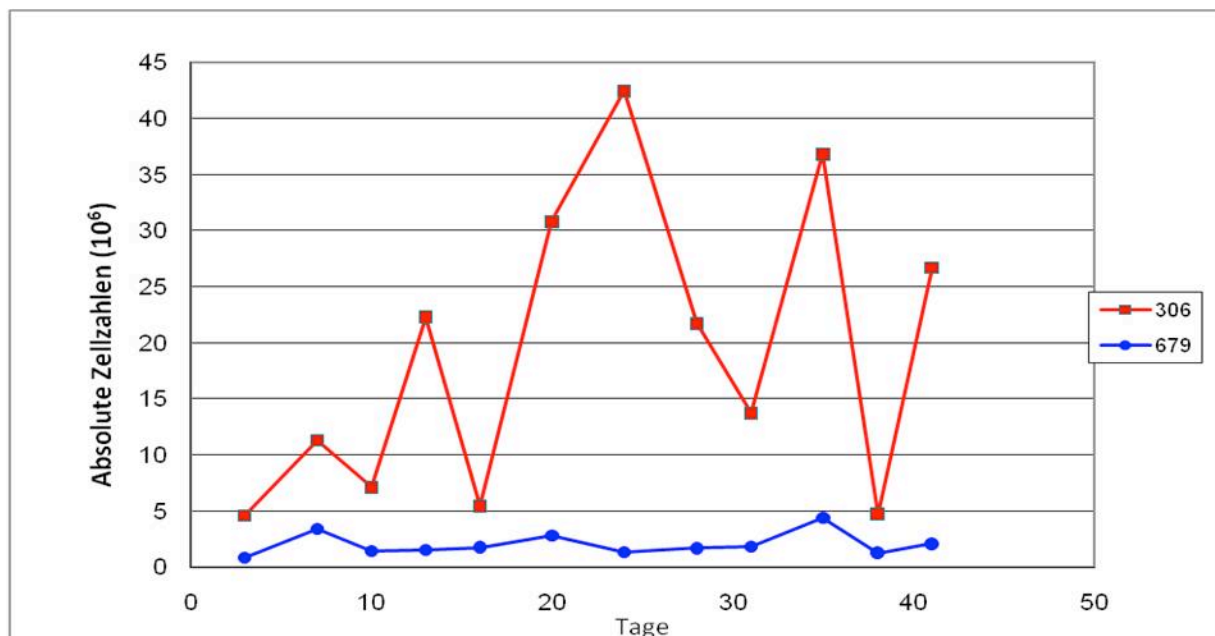


Diag.1 Absolute Zellzahlen einer T75-Zellkulturflasche am 3. Tag (blau, n=7) und am 4. Tag (rot, n=5) nach Aussaat (0,5x10⁶ Zellen). Es sind die Zelllinien 62, 162, 184, 306, 548, 679, 733 und 734 mit Standardfehler dargestellt.

Auch hinsichtlich der Kontinuität des Wachstumsverhaltens gab es Unterschiede zwischen den Zelllinien. Die Linien 162, 548, 679 und 733 zeigten im Gegensatz zu den Linien 62, 184, 306 und 734 ein kontinuierliches Wachstum: Die gezählten Zellzahlen unterlagen einer geringeren Schwankung, was sich auch in einem geringeren Standardfehler in Diagramm 1 bemerkbar macht.

Aus den Beobachtungen lässt sich ableiten, dass ein schnelles Wachstum mit größeren Schwankungen der gezählten Zellzahlen verschiedener Passagen einhergeht, während langsam wachsende Zellen über die 12 Passagen hinweg ein kontinuierliches Wachstum zeigten.

In den Wachstumskurven sind exemplarisch für kontinuierlich und diskontinuierlich wachsende Zellen zwei Zelllinien dargestellt (Diag.2).



Diag.2 Zelllinie 306 zeigt im Verlauf von 12 Passagen (42 Tage) schwankende Zellzahlen, Zelllinie 679 zeigt gleichmäßige Zellzahlen; nach jedem Zählen (Kreis bzw. Viereck) wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen ausgesät und zum nächsten Zeitpunkt (Kreis bzw. Viereck) gezählt.

Im Folgenden sind die Morphologie der Osteosarkomzelllinien anhand einiger repräsentativer Aufnahmen beschrieben:

Abb.24a-c Linie 62

Alle drei Fotos aus der Zellkultur der Linie 62 sind in 100-facher Vergrößerung aufgenommen. Am Tag 2 ist ein lockerer Zellrasen zu sehen, der am Tag 4 sehr dicht ist. Die Zellen in Abbildung 24c scheinen durch das dichte Wachstum kleiner als in Abbildung 24a.

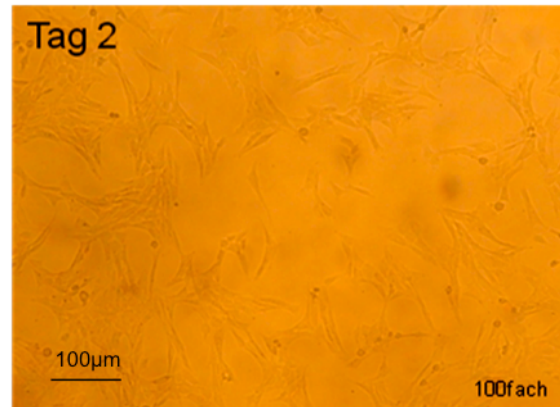


Abb.24a

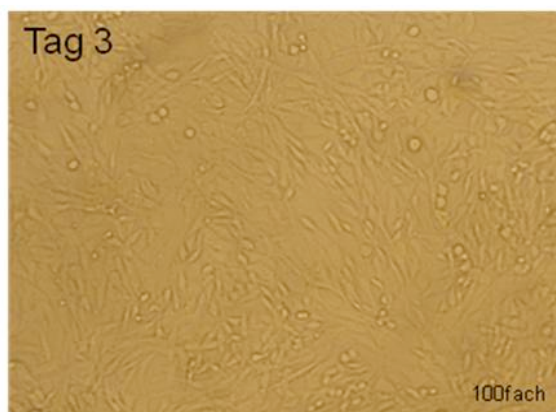


Abb.24b



Abb.24c

Abb.25 Linie 162

Die kontrastarmen Zellen der Linie 162 bilden am Tag 4 (Abb.25, 100fache Vergrößerung) einen dichten Zellrasen. Die Zellen wachsen im Vergleich zu den Zellen der Linie 62 (Abb.24c) flächiger und erscheinen größer. Diese Beobachtung lässt sich auch mit den Zellzahlen vereinbaren (Diag.1): Von der Linie 62 wachsen am Tag 4 mehr als dreimal so viele Zellen als bei Linie 162 an.

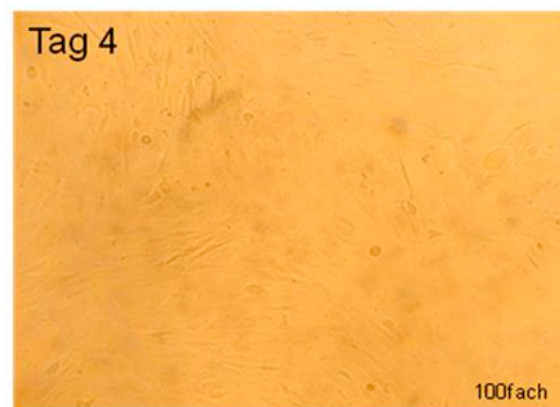


Abb.25

Abb.26a,b Linie 306

Die Zellen der Linie 306 sind am Tag 4 nach Aussaat in 100-facher (Abb.26a) und 200-facher (Abb.26b) Vergrößerung aufgenommen. Die sich schnell vermehrende Linie (Diag.1) wächst sehr dicht; der Zellrasen erscheint leicht unregelmäßig, fleckig, da die Zellen an einigen Stellen dichter wachsen als an Anderen. Die Zellen stellen sich kugelig mit ein bis zwei spindelförmig Ausläufern dar.



Abb.26a

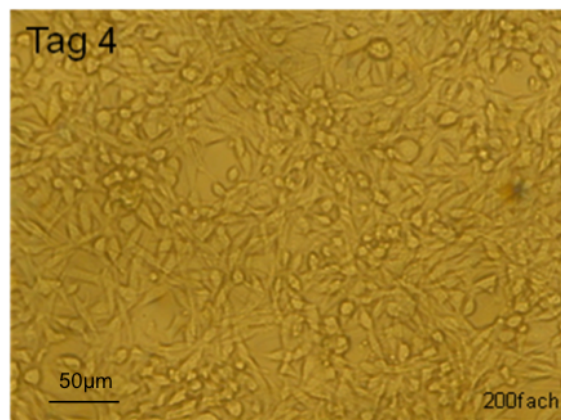


Abb.26b

Abb.27 Linie 679

Die Zellen der Linie 679 präsentieren sich am Tag 4 (Abb.27, 100-fache Vergrößerung) mit sehr großen, rhomboiden Zellen. Der Zellrasen ist kontinuierlich, die Zellen wachsen aber im Vergleich zu den Zelllinien 62 (Abb.24c) und 306 (Abb.26a) weniger dicht, was sich auch in den niedrigeren Zellzahlen (Diag.1) widerspiegelt.

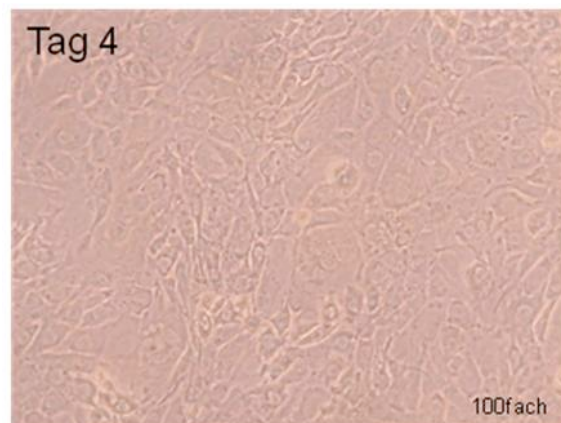


Abb.27

In einer zweiten Versuchsreihe wurden weitere Osteosarkomzelllinien aus der Maus ausgesät (Linie 1188, 1189, 1324, 1400, 1403, 1929 und 2022) und das Wachstum mit Fotos dokumentiert. Die Aufnahmen entstanden mit einem Phasenkontrastmikroskop, das die dreidimensionale Struktur der Zellen besser hervorhebt.

Abb.28 Linie 1189

Die Zellen der Linie 1189 zeigen am 3. Tag nach Aussaat einen kontinuierlichen, lockeren Zellrasen (Abb.28, 100-fache Vergrößerung). Die Zellkerne treten kugelig hervor, die teilweise sehr dünnen dendritenartige Zellausläufer liegen dem Flaschenboden flach an (Pfeil).

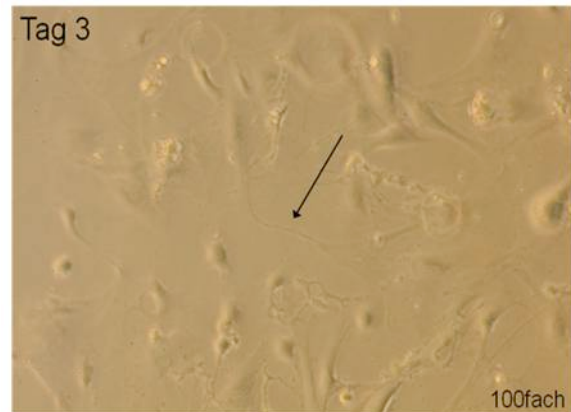


Abb.28

Abb.29 Linie 1929

Die Zellen der Linie 1929 präsentieren sich am 3. Tag nach Aussaat mit einem kontinuierlichen, dichten Zellrasen (Abb.29, 100-fache Vergrößerung). Die Zelle liegen so dicht, dass nur die Kerne kugelig hervortreten und die Zellausläufer nicht zu sehen sind.

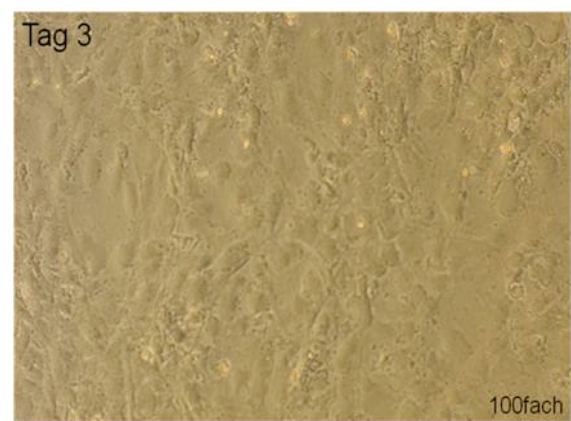


Abb.29

Obwohl alle Kulturlinien aus Osteosarkomen von Mäusen stammten, unterschieden sie sich sowohl in der Anwachsgeschwindigkeit als auch in der Morphologie. Einige Linien wie MOS 62, 306 und 1929 wiesen kleine, dicht aneinander liegende Zellen auf (Abb.24c, 26a, 29) und ergaben bei der Zellzählung am 4.Tag bis zu 28 Mio. Zellen (Diag.1). Andere Zelllinien dagegen wie MOS 162, 679 und 1189 präsentierten sich mit großen, flächig wachsenden Zellen, die viel Platz pro Zelle beanspruchten (Abb.25, 27, 28). So konnten in einer T75-Zellkulturflasche nur wenige Zellen anwachsen: Von Linie 679 wurden am Tag 4 nach Aussaat von $0,5 \times 10^6$ Zellen $2,7 \times 10^6$ Zellen gezählt (Diag.1). Bei diesen weniger dicht wachsenden Zellen waren die Zellausläufer gut zu erkennen, die sich dendritenartig auf dem Plattenboden auszogen (Abb.28 Pfeil).

3.2 Durchflusszytometrie von Mausosteosarkomzelllinien

Es ist nachgewiesen, dass Proteine der HSP70-Familie auf der Zellmembran verschiedener Tumoren lokalisiert sind (Ferrarini et al., 1992; Multhoff et al., 1995; Shin et al., 2003). Bei Sarkomen war der Hsp70-Status noch nicht bekannt. Zunächst wurde der Hsp70-Status auf 15 Sarkomzelllinien aus Mäusen getestet. Einige Linien wie MOS 306 und 1324 zeigten nur eine schwache Hsp70-Membranexpression (18,1% bzw. 1,9% Hsp70-positive Zellen), wohingegen Linien wie MOS 1403 und 162 stark Hsp70-membranpositiv waren (77,1% bzw. 64,9% Hsp70-membranpositive Zellen). Einzelne FACS-Analysen sind exemplarisch in Abbildung 30 dargestellt.

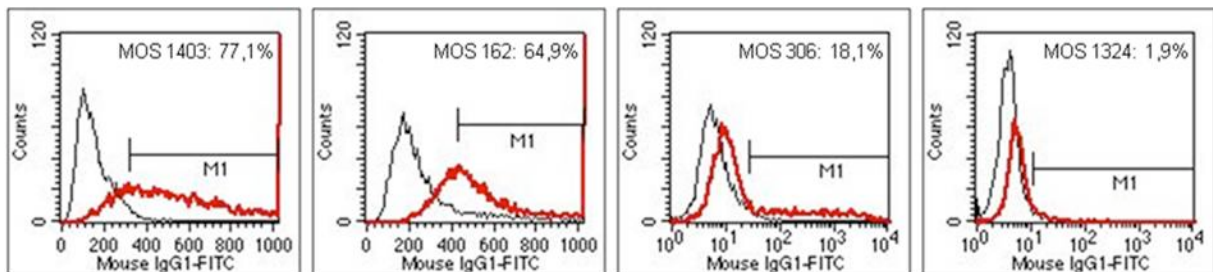
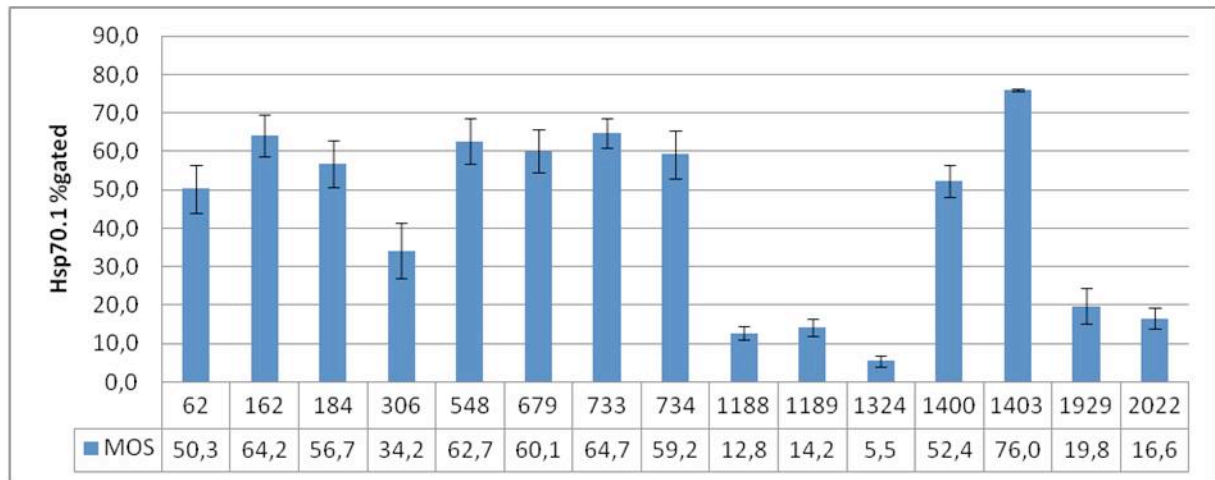


Abb.30 **Hsp70-Membranexpression** der Mausosteosarkomzelllinien (MOS) 1403, 162, 306 und 1324; MOS 1403 und 162 zeigen eine hohe Hsp70-Membranexpression (77,1% und 64,9% Hsp70-membranpositive Zellen), MOS 306 und 1324 eine niedrige (18,1% und 1,9% Hsp70-membranpositive Zellen). Je 100.000 Zellen wurden mit dem Hsp70-spezifischen FITC-konjugierten monoklonalen Antikörper cmHsp70.1 gefärbt und im FACS analysiert (rote Linie). Als Kontrolle diente die FITC-konjugierte Isotypenfärbung (schwarze Linie). Die unspezifische Färbung des Isotypen wurde von dem Prozentsatz der Hsp70-positiven Zellen abgezogen. Es ist der korrigierte Prozentsatz angegeben. Die Histogramme der Zellkulturlinien sind repräsentativ für die durchgeführten FACS-Analysen.

Eine Übersicht über den Prozentsatz Hsp70-membranpositiver Zellen aller 15 gemessenen Osteosarkomzelllinien aus der Maus gibt Diagramm 3.



Diag.3 **Hsp70-Membranexpression** der Mausosteosarkomzelllinien 62, 162, 184, 306, 679, 733, 734 (n=8), 548 (n=7), 1189, 1929 (n=4), 1324, 2022 (n=3), 1400, 1403 (n=2). Es ist der Prozentsatz der gegateten Hsp70-positiven Zellen nach Abzug der unspezifischen Färbung der Isotypenkontrolle angegeben.

Es ließ sich zeigen, dass eine Gruppe von Zelllinien (MOS 62, 162, 184, 548, 679, 733, 734, 1400, 1403) membrangebundenes Hsp70 stark exprimierte: Zwischen 50% und 80% der Zellen wiesen das Hsp70-Protein auf der Plasmamembran auf. Eine einzelne Zelllinie (MOS 306) lag mit 34,2% Membran-positiven Zellen im Mittelfeld. Fünf der gemessenen Zelllinien (MOS 1188, 1189, 1324, 1929, 2022) exprimierten nur sehr wenig Hsp70 auf der Membran: Zwischen 5% und 20% der Zellen waren positiv.

Des Weiteren ließ sich feststellen, dass von den Zellen, deren Wachstum dokumentiert wurde (MOS 62, 162, 184, 306, 548, 679, 733, 734), die zwei am schnellsten wachsenden Linien MOS 62 und 306 die niedrigste Hsp70-Membranexpression in dieser Gruppe zeigten.

3.3 Immunfluoreszenz von Mausosteosarkomzelllinien

Zur Darstellung der auf der Membran der Mausosteosarkomzellen lokalisierten Hsp70-Proteine wurden am Plattenboden anwachsende Zellen mit dem Hsp70-spezifischen FITC-konjugierten Antikörper cmHsp70.1 gefärbt und anschließend unter einem Immunfluoreszenzmikroskop betrachtet (Abb.31a,c,e,g). Der am Hsp70

gebundene FITC-konjugierte Antikörper zeigte ein grünes Farbspektrum. Die Zellkerne wurden mit dem blau fluoreszierenden Farbstoff DAPI dargestellt. Einige repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen sind in Abbildung 31a-h dargestellt.

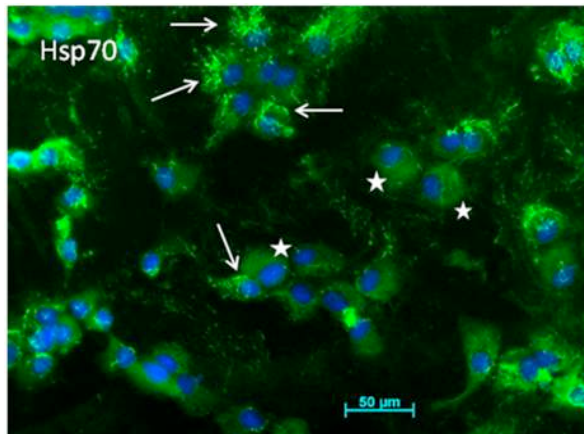


Abb.31a Linie 162 Hsp70-Färbung

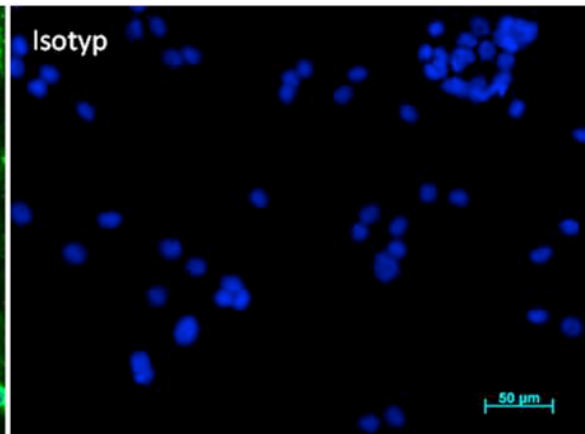


Abb.31b Linie 162 Isotypkontrolle

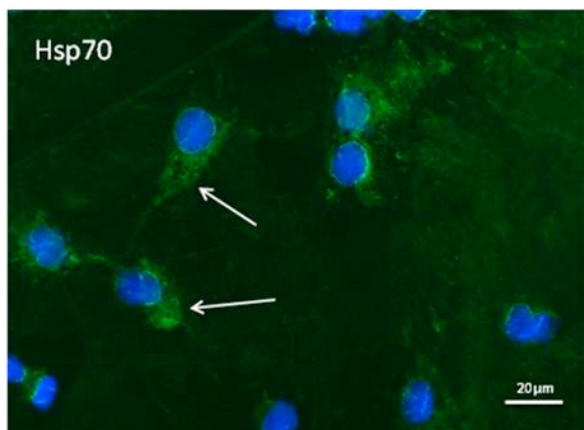


Abb.31c Linie 679 Hsp70-Färbung

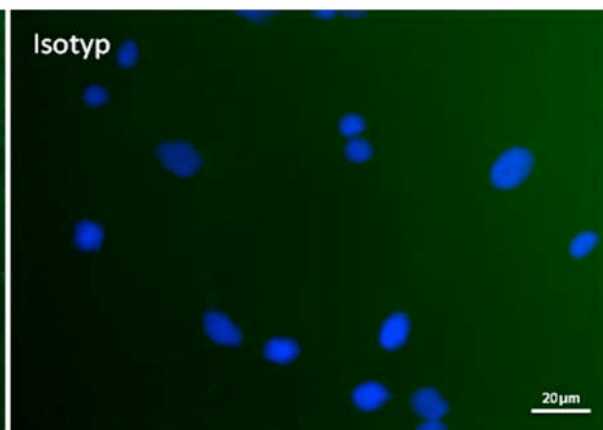


Abb.31d Linie 679 Isotypkontrolle

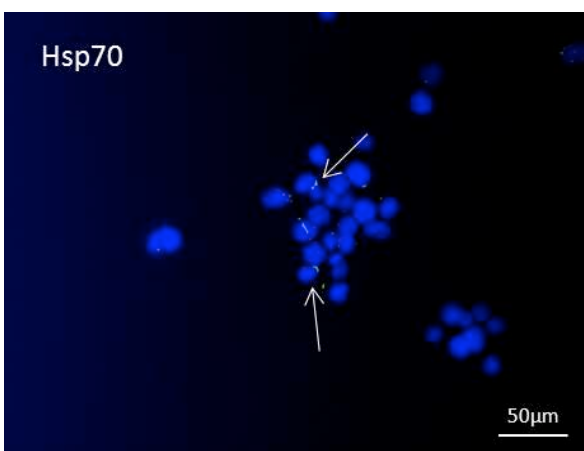


Abb.31e Linie 306 Hsp70-Färbung

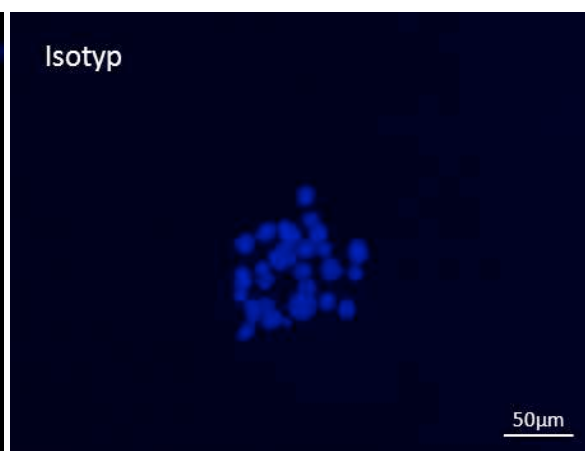


Abb.31f Linie 306 Isotypkontrolle

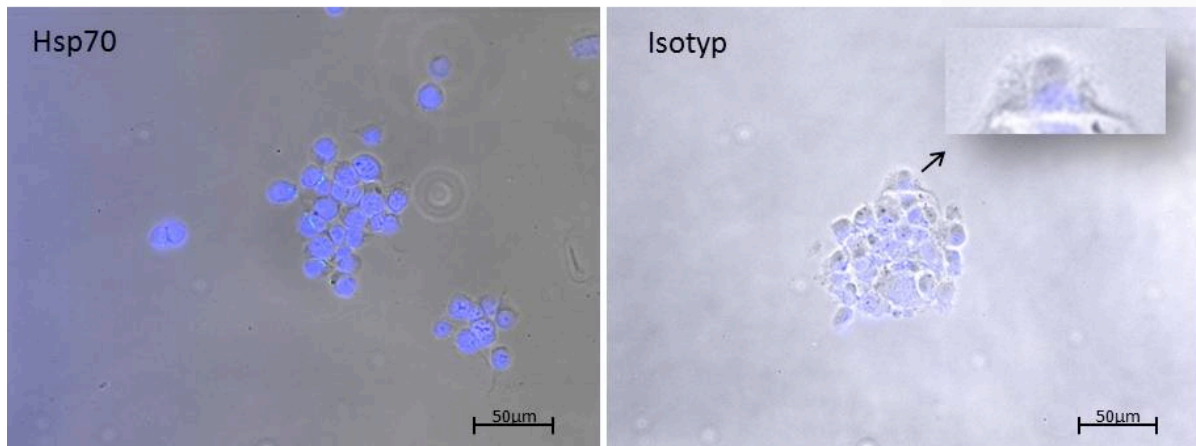


Abb.31g **Linie 306** Durchlicht (+Hsp70-Färbung) Abb.31h **Linie 306** Durchlicht (Isotypkontrolle)

Abb.31a-h **Immunfluoreszenzaufnahmen** nach Inkubation mit dem Hsp70-spezifischen FITC-konjugierten Antikörper cmHsp70.1 (Abb.31a,c,e,g) und dem Isotyp zur Kontrolle (Abb.31b,d,f,h). Eine unspezifische Bindung des Isotypen ist nicht zu beobachten. Die FITC-markierten Hsp70-Proteine erscheinen in grüner Farbe punktuell zusammengelagert auf der Zellmembran der Hsp70-hochexprimierenden Zelllinien MOS 162 und 679 (Abb.31a,c). Beide Zelllinien sind in der FACS-Analyse Hsp70 positiv: MOS 162: 64,3% und MOS 679: 60,1%. Zelllinie MOS 306 zeigt eine niedrige Hsp70-Membranpositivität in den FACS-Analysen (34,2%) und lässt sich nur sehr schwach mittels Immunfluoreszenz färben (Abb.31e Pfeile). Abbildung 31g und h zeigen neben der Immunfluoreszenzaufnahme ein Durchlicht-mikroskopisches Bild, das die Zellform erkennen lässt (s. Vergrößerung Abb.31h).

Eine unspezifische Bindung der Isotypenkontrolle konnte nicht festgestellt werden (Abb.31b,d,f,h): Es waren nur die blau fluoreszierenden Zellkerne zu sehen, aber kein grün fluoreszierender Hsp70-Antikörper. In den Abbildungen 31a und 31c sah man eine leichte zytoplasmatische Färbung: Die Hsp70-Proteine waren im Zytosol verteilt und ließen die Zelle gleichmäßig grün-gefärbt erscheinen (Sternchen). Auf der Membran lokalisiertes Hsp70 war unregelmäßig verteilt (Pfeile).

Die in der FACS-Analyse festgestellte Membranpositivität einiger Zelllinien konnte somit auch mittels Immunfluoreszenz dargestellt werden. Hsp70-positive Zellen wie die in Abbildung 31a-d exemplarisch dargestellten Linien 162 und 679 ließen sich mit dem spezifischen FITC-gekoppelten Antikörper auf der Membran stark anfärben. Die weniger stark exprimierende Zelllinie MOS 306, welche durchflusszytometrisch 34,2% Hsp70-membranpositive Zellen zeigte, stellte fast kein fluoreszierendes Signal der cmHsp70.1-gefärbten Zellen dar (Abb.31e).

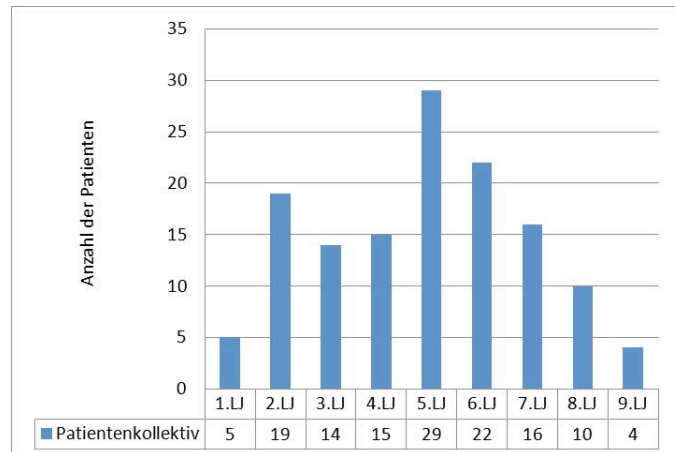
3.4 Patientenkollektiv

Von Februar 2009 bis August 2010 wurden Biopsie- und Resektionsmaterial aus der Klinik für Orthopädie und Klinik für Plastische Chirurgie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München bearbeitet und die Daten der Patienten erfasst. Für weitere Untersuchungen wurden die Patienten im drei- und sechs-Monate-Abstand nach Operation weiterbeobachtet.

Alle Patienten mit Verdacht auf einen mesenchymalen Tumor wurden in das Kollektiv aufgenommen. Da die endgültige Diagnose erst nach der Operation durch histopathologische Untersuchungen festgestellt wurde, umfasst das Kollektiv auch nicht-mesenchymale Tumoren und Differentialdiagnosen tumoröser Erkrankungen wie die Osteomyelitis.

Als gesundes Gewebe wurden Knochen- und Weichteilstücke tumorfreier Spender aus der Klinik für Orthopädie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München verwendet. Den gesunden Spendern wurde bei Hüftoperationen aufgrund degenerativer Veränderungen ein dem Hüftkopf entfernt liegendes gesundes Knochen- und Weichteilstück entnommen. Im Folgenden wird die Gruppe der gesunden Spender als *Vergleichsgruppe* bezeichnet.

Insgesamt konnten 134 Patienten in das Kollektiv eingeschlossen werden; 53% davon sind weiblich, 47% männlich. Die Altersverteilung (Diag.4) weist zwei Spitzen auf: Einige Knochenerkrankungen wie das Osteosarkom, das Ewing-Sarkom, die Fibromatose und die aneurysmatische Knochenzyste kommen gehäuft bei Jugendlichen im Alter von 10-20 Jahren (2. Lebensjahrzehnt) vor. Der zweite Peak liegt bei Patienten im Alter von 40-60 Jahren und umfasst vorwiegend Tumoren wie das Chondrosarkom, das Liposarkom und das Enchondrom. Diese Beobachtungen decken sich mit den in der Literatur geschilderten Altersverteilungen verschiedener Entitäten.



Diag.4 Altersverteilung aller in das Kollektiv eingeschlossenen Patienten. Angegeben ist die Anzahl der Patienten pro Lebensjahrzehnt. Das Kollektiv umfasst Patienten von unter 10 bis über 80 Jahre.

Anhand ihrer Diagnose wurden die Patienten verschiedenen Gruppen zugeordnet: Maligne mesenchymale Tumoren, benigne mesenchymale Tumoren, mesenchymale Tumoren mit variabler Dignität oder mit unsicherer Dignität, nicht-mesenchymale Tumoren, Metastasen nicht mesenchymalen Ursprungs, muskuloskelettale nicht-tumoröse Erkrankungen (sogenannte „Tumor-like-lesions“) (Tab.9).

Tab.9 Aufteilung des Patientenkollektivs nach Diagnosegruppen mit Angabe der Patientenzahl, der Anzahl der Patienten, von denen Biopsie- und Operationsmaterial erhalten wurde, und dem Durchschnittsalter (Einteilung in Absprache mit Dr. Specht, Pathologie MRI, und Dr. Banke, Orthopädie MRI).

Diagnosegruppe	Anzahl der Patienten	Davon Patienten mit Biopsie- <u>und</u> Operationsmaterial	Durchschnittsalter der Patienten
Maligne mesenchymale Tumoren (Sarkome)	69	9	44 ±2
- Chondrosarkom	16	5	52 ±4
- Liposarkom	13	1	58 ±4
- Osteosarkom	16	-	25 ±4
- Ewing-Sarkom	6	2	26 ±4
- Pleomorphe Sarkome, NOS (u.a. Malignes fibröses Histiozytom)	9	1	55 ±7
- Synovialsarkom	6	-	40 ±7

- (Häm)angiosarkom	1	-	46
- Leiomyosarkom	1	-	58
- Fibrosarkom	1	-	68
Benigne mesenchymale Tumoren	31	-	41 ±4
- Enchondrom	9	-	46 ±5
- Osteochondrom	4	-	26 ±11
- Nicht-ossifizierendes Fibrom	2	-	17 ±1
- Lipom	11	-	52 ±6
- Hämangiom	1	-	19
- Fibromatosen (u.a. Desmoid-Tumor)	1	-	16
- Chondroblastom	2	-	23 ±4
- Myxom	1	-	66
Mesenchymale Tumoren mit variabler oder unsicherer Dignität	8	2	36 ±4
- Riesenzelltumor	7	2	34 ±4
- Solitär-fibröser Tumor	1	-	51
Nicht-mesenchymale Tumoren	4	-	50 ±15
- Non-Hodgkin-Lymphom	1	-	67
- Tumoren des peripheren Nervensystems (Schwannom, Neurinom u.a.)	3	-	45 ±19
Metastasen nicht-mesenchymalen Ursprungs	3	-	66 ±13
- Malignes Melanom	1	-	81
- Adenokarzinom	1	-	77
- Keimzelltumor	1	-	40
Muskuloskelettale nicht-tumoröse Erkrankungen (Tumor-like lesion, Pseudot.)	10	-	40 ±7
- Osteomyelitis/ Brodie-Abszess	4	-	31 ±2
- Myositis ossificans	1	-	40

- Osteofibröse Dysplasie	2	-	47 ±2
- Aneurysmatische Knochenzyste	1	-	17
- Noduläre Fasziiitis	1	-	69
- Pigmentierte villonoduläre Synovialitis	1	-	58
Nicht eindeutig zuzuordnen	2	-	45 ±3
Vergleichsgruppe: Tumorfreies Spendergewebe	7	-	65 ±3
Gesamt	134	11	44 ±2

Im Folgenden wird der Focus auf den malignen Entitäten *Osteosarkom*, *Chondrosarkom*, *Liposarkom* und *Ewing-Sarkom*, der benignen Entität *Enchondrom* und der Entität *Riesenzelltumor* liegen. Der Riesenzelltumor ist von variabler Dignität, da er laut WHO-Klassifikation als benigner Tumor gilt, der jedoch lokal aggressiv wächst, zu Rezidiven neigt und hämatogen metastasieren kann (Freyschmidt et al., 2010).

Die genannten ausgewählten Gruppen weisen die höchsten Patientenzahlen auf und repräsentieren maligne und benigne Tumoren und Tumoren mit variabler Dignität.

3.5 Kultur humaner Sarkomzellen aus Primärmaterial

Pro Patient wurden 4 Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen (37°C, 95% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂) in Kultur genommen. Gewebe der Vergleichsgruppe gesunder Spender wurde nicht in Kultur genommen.

Bakterien- und Pilzinfektionen des primären Materials wurden in nur 1% der Proben beobachtet. Die mit Penicillin, Streptomycin (zusammen 1%) und Amphotericin B (1%) versetzten Medien hielten die Verunreinigungsrate der Zellkulturen unter 1%.

Nachdem die Gewebestücke und Einzelzellen wie im Kapitel 2.2.2 beschrieben in Kultur genommen worden waren, musste darauf geachtet werden, dass die Zellkulturflaschen circa drei Wochen lang nicht bewegt wurden. Mechanische Bewegungen und Erschütterungen der Flaschen konnten dazu führen, dass die

Adhärenz der aus Zellverbänden auswachsenden Zellen gestört wurde und die Zellen daraufhin über Anoikis in Apoptose gingen (Abb.32a).

Ein häufiges Problem der ersten Passagen war die starke Verunreinigung des Plattenbodens und des Mediums durch absterbende Gewebestücke, Erythrozyten und Fetttropfen (Abb.32a-d). Dies machte einen häufigen Mediumwechsel notwendig, der wiederum das Anwachsen der Zellen negativ beeinflusste.

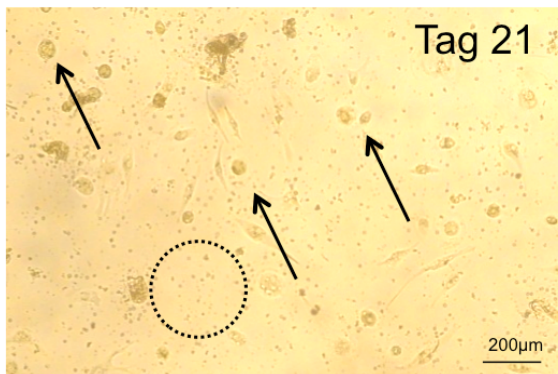


Abb.32a

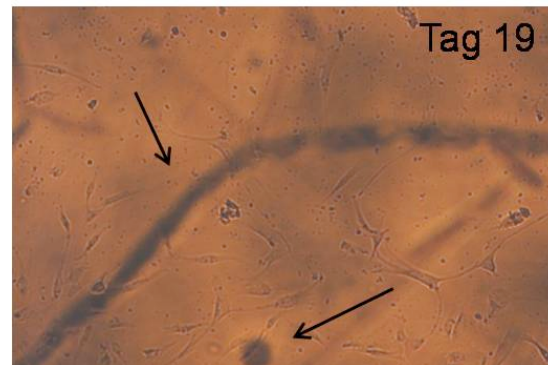


Abb.32b

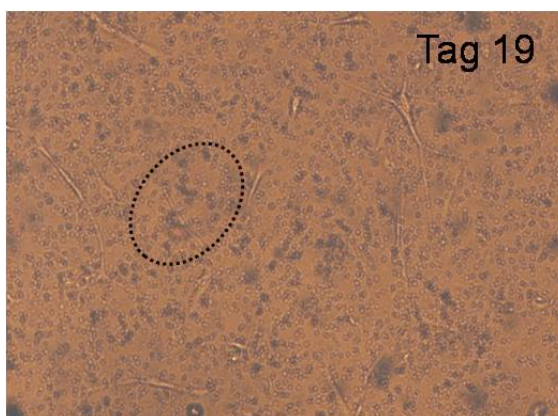


Abb.32c

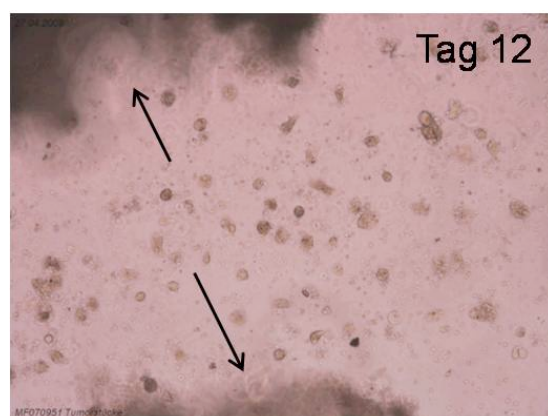


Abb.32d

Abb.32a-d **Zellkultur humaner Sarkomzellen** während der ersten 21 Tage vor der ersten Passage: Durch Bewegen der Zellkulturflasche werden die Zellen am Adhärenieren gehindert und die Zellen gehen in Apoptose und nehmen eine kugelige Form ein (Abb.32a, Pfeile). Am Plattenboden anwachsende Zellen sind zum Teil von größeren Gewebestücken (Abb.32b,d, Pfeile) und Erythrozyten (umkreiste dunkle Punkte in Abb.32a,c) verdeckt und nur schwer zu erkennen.

Ein weiteres Problem beim Versuch, Tumorzellen aus Primärgewebe anzuzüchten, war das Überwachsen durch Fibroblasten. Fibroblasten wachsen zunächst rascher als Tumorzellen und zeichnen sich dadurch aus, dass sie Kollagen produzieren. Die langen, spindelförmigen Zellen (Abb.33b) überwuchern schnell den gesamten

Plattenboden und verhinderten so ein Anwachsen der Tumorzellen. Fibroblasten erschienen im Mikroskop kontrastarm und wuchsen in parallelsträngiger Formation (Abb.33a-d).

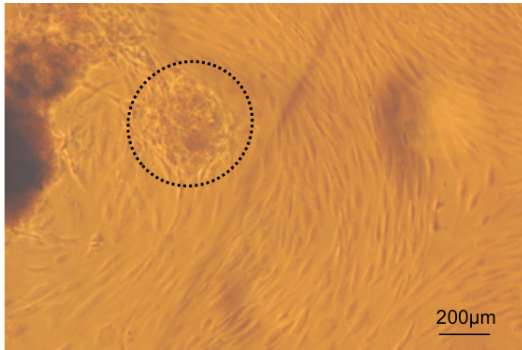


Abb.33a

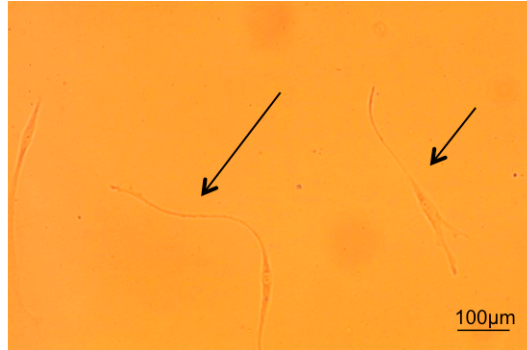


Abb.33b



Abb.33c

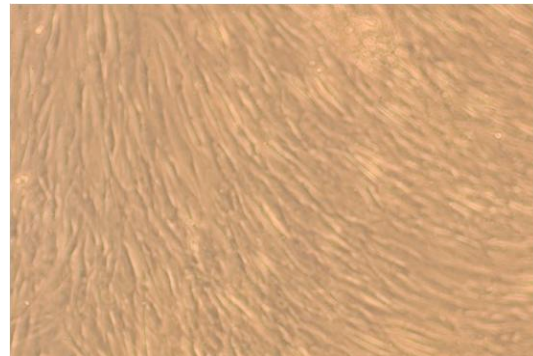


Abb.33d

Abb.33a-d **Fibroblasten** wachsen aus Zellverbänden (Abb.33a, Kreis) aus. Sie stellen sich als kontrastarme, längliche, spindelförmige Zellen mit langen Ausläufern dar (Abb.33b, Pfeile). An ihrem schnellen und dichten Wachstum und an ihrer charakteristischen parallelsträngigen Anordnung sind die Fibroblasten gut zu erkennen (Abb.33c,d).

Bei einem Teil der Zellkulturflaschen wuchsen Zellen aus Gewebestücken und Zellverbänden strahlenförmig aus (Abb.34a-c).

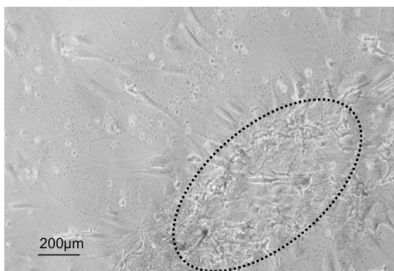


Abb.34a

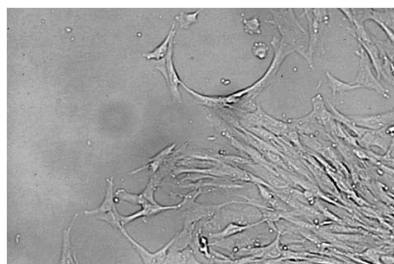


Abb.34b

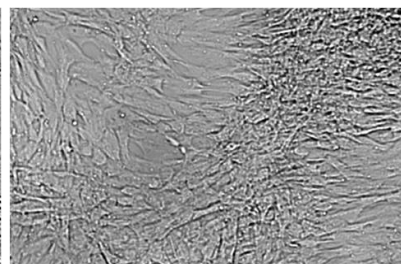


Abb.34c

Abb.34a-c Aus **Gewebestücken und Zellverbänden** (Abb.34a, Kreis) wachsen Zellen strahlenförmig aus (Abb.34b) und verteilen sich auf dem Plattenboden (Abb.34c).

Angewachsene Zellen wurden passagiert, in mehrere Zellkulturflaschen expandiert und schließlich eingefroren, um für weitere Untersuchungen zur Verfügung zu stehen.

Die so etablierten Zelllinien wurden bis zu 12 Passagen über einen Zeitraum von 180 Tagen in Kultur gehalten und fotografisch dokumentiert. In den Abbildungen 35a-f, 36a-f und 37a-f sind exemplarisch drei verschiedene Entitäten im Verlauf dargestellt.

Innerhalb einer Passage war zunächst ein subkonfluentes Wachstum der Zellen zu beobachten. Die langen Ausläufer der polygonalen Zellen waren in den Zellzwischenräumen zu erkennen. Die erst ohne Orientierung wachsenden Zellen ordneten sich mit zunehmender Kulturdauer dichter in entitätentypischer Formation an. Einige Kulturen wie die des Osteosarkoms zeigten langgestreckte, spindelförmige Zellen, die sich annähernd parallel ausrichteten (Abb.37c,e), andere wuchsen im mosaikartig-konfluenten Zellmonolayer wie die des Chondrosarkoms (Abb.35d). Auch Anordnungen in Wirbeln und Windungen wie beim Riesenzelltumor waren zu beobachten (Abb.36f). Abgestorbene Zellen lösten sich vom Plattenboden und schwammen abgekugelt im Medium (Abb.32a). Zwei- oder mehrschichtige Zellrasen wurden nicht registriert. War der Zellrasen konfluent, kam es durch Kontaktinhibition zur Wachstumsstagnation und die Zellen wurden passagiert.

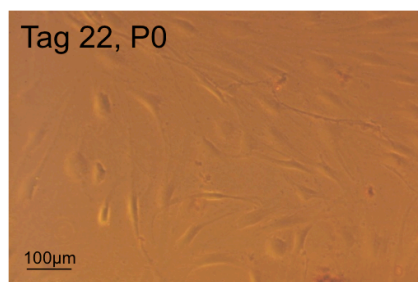


Abb.35a

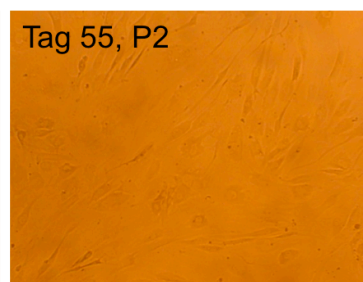


Abb.35b

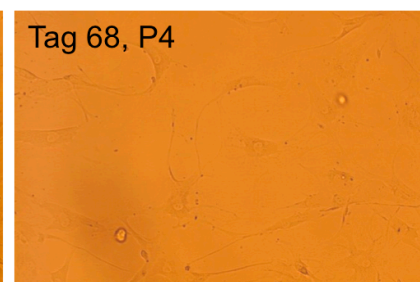


Abb.35c

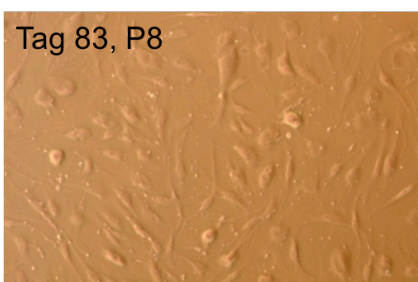


Abb.35d

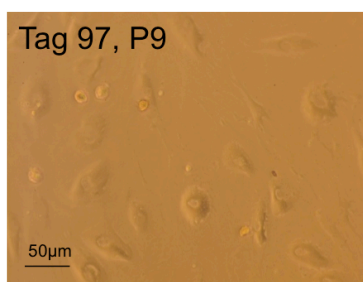


Abb.35e

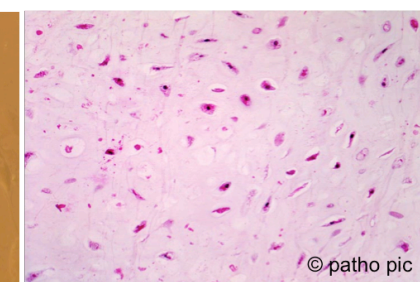


Abb.35f

Abb.35a-f **Chondrosarkom**. In einem Zeitraum von 97 Tagen können die angewachsenen Chondrosarkomzellen 9-mal passagiert werden. Die rhomboiden Zellen treten vor allem in den Phasenkontrastaufnahmen (Abb.35a,d,e) mit einem prominenten Kern hervor. Die Chondrosarkomzellen aus der Kultur sind den Zellen im histologischen Schnitt (Abb.35f) mit ihrer kreisförmigen, flächigen Zellform ähnlich.

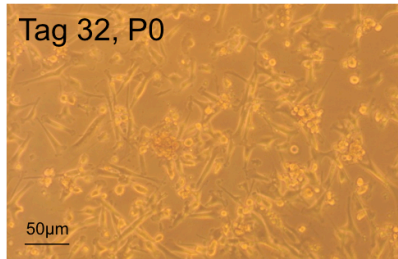


Abb.36a

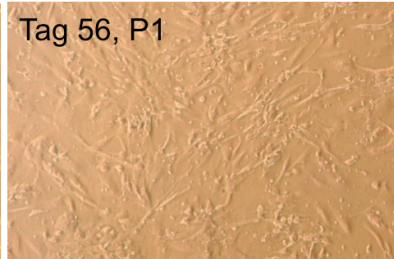


Abb.36b

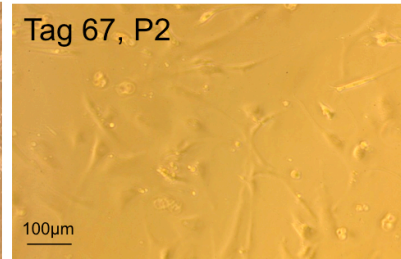


Abb.36c

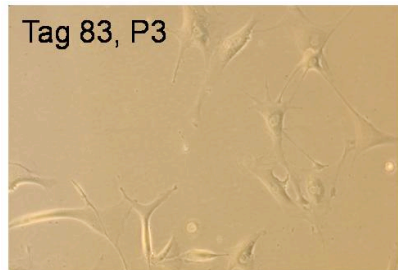


Abb.36d

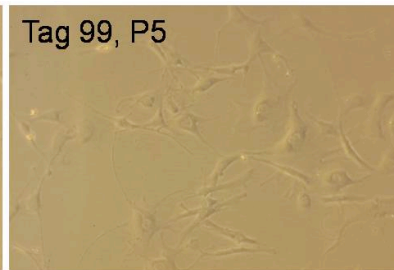


Abb.36e

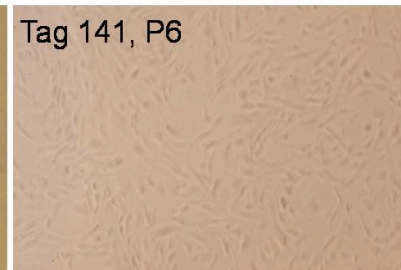


Abb.36f

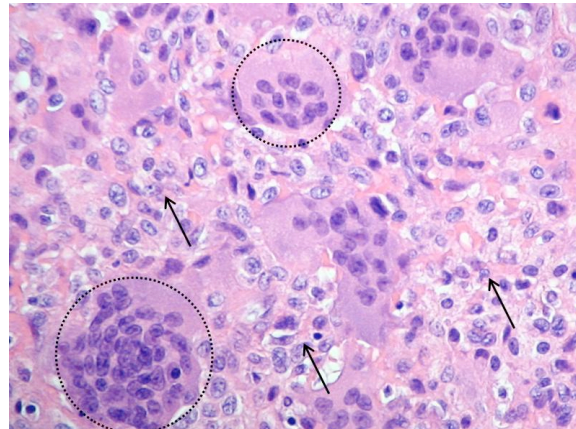


Abb.36g

Abb.36a-g **Riesenzelltumor**. Die Zellen eines Patienten mit einem Riesenzelltumor fallen über 141 Tage (6 Passagen) mit einem kleinzelligen Wachstum auf. In 100-facher Vergrößerung (Abb.36d) kann man die vielen Ausläufer der Zellen sehen, durch die sie mit anderen Zellen in Kontakt stehen. Wachsen die Zellen dichter, treten nur die Zellkerne deutlich hervor (Abb.36f). Die kultivierten Zellen entsprechen den mit Pfeilen markierten Zellen im HE-Schnitt desselben Patienten (Pathologie München, MRI) (Abb.36g). Diese mononukleären, proliferierenden Zellen unterscheiden sich deutlich von den namensgebenden mehrkernigen Riesenzellen (Kreise).

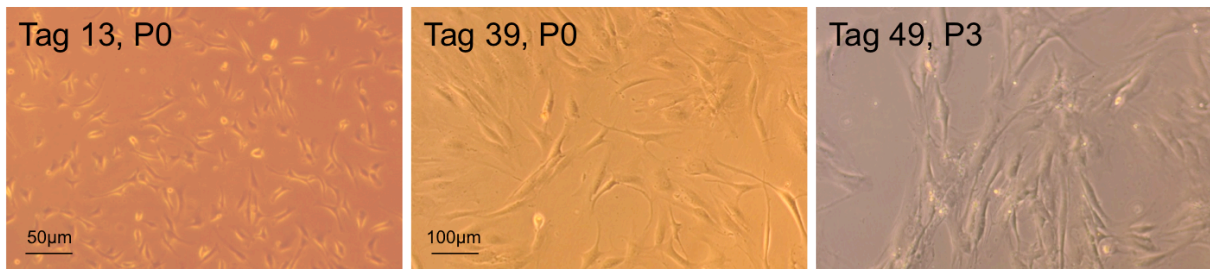


Abb.37a

Abb.37b

Abb.37c



Abb.37d

Abb.37e

Abb.37f

Abb.37a-f **Osteosarkom**. Die angewachsenen Zellen eines Osteosarkompatienten lassen sich über 5 Passagen (64 Tage) regelmäßig passagieren (Abb.37a-d). Die unregelmäßig angeordneten Zellen behalten über die ganze Zeit ihre längliche Zellform. Die Zellen in der durchlichtmikroskopischen Aufnahme eines anderen Osteosarkompatienten (Abb.37e) gleichen den Zellen in Abb.37a-d. Auch im histologischen Schnitt (Abb.37f) sind die langgezogenen, spindeligen Zellen (Quadrate) neben mehrkernigen osteoklastären Riesenzellen (Kreise) wiederzuerkennen.

Von 127 Patienten, von denen bei elf zweimal Material (Biopsie und Operationsresektat) erhalten wurde, konnten insgesamt 552 Zellkulturflaschen in Kultur genommen werden. Bei 20% der Zellkulturflaschen wuchsen keine Zellen an, bei 35% wuchsen Fibroblasten an und in weiteren 45% der Zellkulturflaschen gelang es, Zellen aus dem Primärgewebe zu isolieren und als Linie zu etablieren (Tab.10).

Tab.10 Bei 57 Patienten (45%) konnten Zellen aus den Tumorbiopsien isoliert und als Linie etabliert werden. Bei den restlichen 55% Prozent gelang dies nicht, wobei bei 35% Fibroblasten aus dem Gewebe auswanderten und anwuchsen.

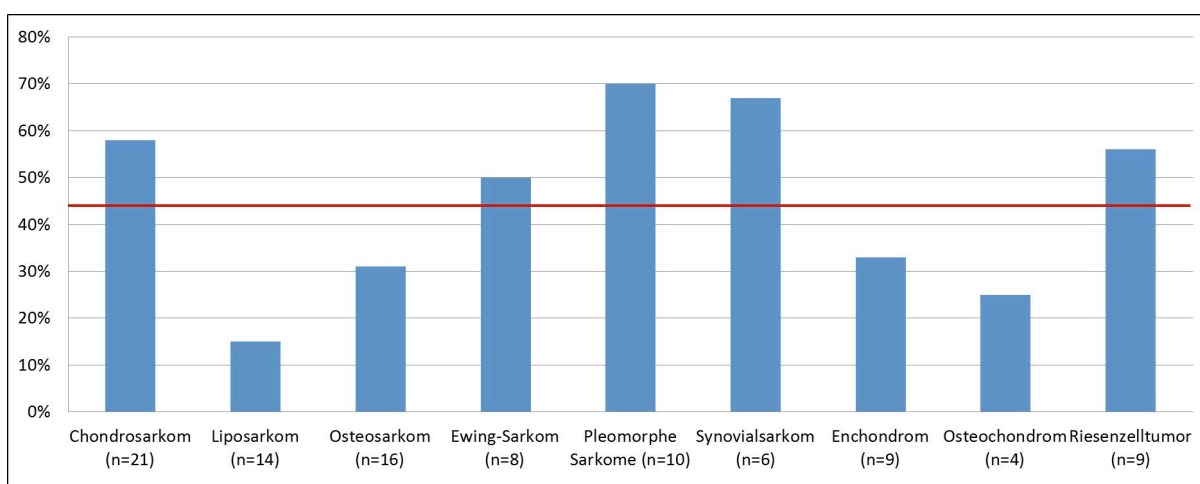
Anzahl aller Patienten (ohne gesunde Spender)	127	
Anzahl der Patienten ohne Zellwachstum	25	20%
Anzahl der Patienten mit Tumorzellwachstum	57	45%
Anzahl der Patienten mit Fibroblastenadhäsion	45	35%

64% der kryokonservierten Tumorzellen stammten aus den Zellkulturflaschen, die mit den Geweberesten aus dem 70µm-Zellsieb in Kultur genommen worden waren. Die

anderen 36% konnten aus den Zellkulturflaschen mit den Einzelzellsuspensionen gewonnen werden. Der größere Erfolg beim Anwachsen der Primärzellen aus Geweberesten könnte dadurch erklärt werden, dass die Zellen bis zum Auswandern im physiologischen Milieu des Gewebeverbandes gut erhalten blieben, während die als Einzelzellsuspension separierten Zellen ein höheres Risiko hatten, in Apoptose zu gehen. Diese Suspension-induzierte Apoptose wird *Anoikis* genannt (Zhao et al., 2010) und reduziert die Anwachswahrscheinlichkeit.

Noch empfindlicher schienen die Fibroblasten zu sein: Nur 30% der eingefrorenen Tubes mit Fibroblasten stammten aus Kulturen mit Einzelzellen. Der größere Teil der Fibroblasten (70%) wuchs aus Gewebestücken aus.

Zwischen den verschiedenen Entitäten gab es Unterschiede im Anwachsverhalten: Von den malignen Entitäten Chondrosarkom, Ewing-Sarkom, Pleomorphe Sarkome und Synovialsarkom konnten in mehr als 50% der jeweiligen Patienten Tumorzellen als Linien etabliert werden (Diag.5). Die benignen Zellen aus Biopsien von Enchondrom- und Osteochondrompatienten ließen sich nur in 33% bzw. 25% der Fälle in Kultur anzüchten und lagen damit wie auch das Osteo- (31%) und Liposarkom (15%) unter dem Durchschnitt von 45%. Der benigne Riesenzelltumor wies eine hohe Anwachsrate auf, was durch sein charakteristisches lokal aggressives Wachstumsverhalten erklärt werden könnte.



Diag.5 Anwachsrate verschiedener Entitäten. Die malignen Tumoren (Chondrosarkom, Ewing-Sarkom, Pleomorphe Sarkome, Synovialsarkom) zeigen bis auf das Osteo- und Liposarkom eine über dem Durchschnitt (rote Linie) liegende Anwachsrate. Die beiden benignen Entitäten Enchondrom und Osteochondrom liegen in ihrer Anwachsrate von 33% bzw. 25% unter dem Durchschnitt.

3.6 Durchflusszytometrie von primären Sarkom- und Referenzzellen

Nachdem eine Hsp70-Membranexpression auf Osteosarkomzelllinien aus der Maus nachgewiesen werden konnte (s. Kap. 3.2), wurden im weiteren Verlauf Zellen aus humanem Primärmaterial durchflusszytometrisch untersucht. Die Verwendung von frisch isolierten menschlichen Zellen repräsentiert das Tumorgeschehen im Patienten besser als Tumorzelllinien, die über viele Passagen in Zellkultur gehalten wurden, und ist somit von höherer klinischer Relevanz.

Einige FACS-Analysen ließen sich aufgrund geringer Zellzahlen in Region 2 nicht auswerten, da es in diesen Fällen nicht gelungen war, genügend lebende Tumor- bzw. Referenzzellen aus dem Gewebe für die FACS-Analyse zu isolieren (Abb.38a).

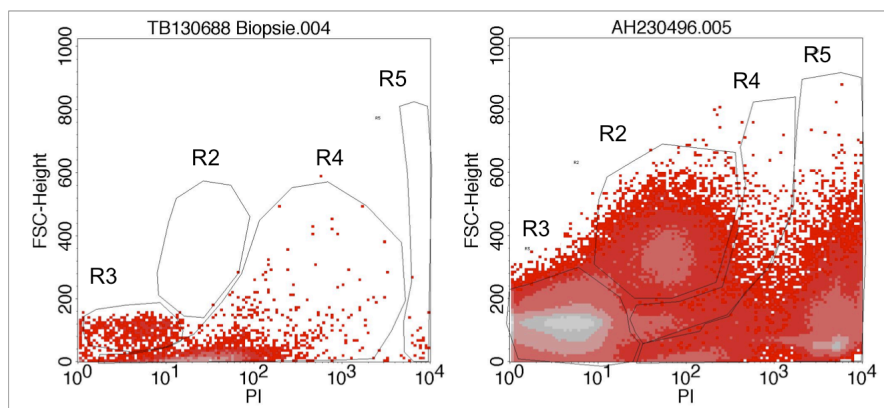


Abb.38a

Abb.38b

Abb.38a+b **Nicht auswertbare FACS-Analyse** (Abb.38a, repräsentatives Beispiel). Aus dem Tumorgewebe einer Osteosarkompatientin konnten keine Tumorzellen extrahiert werden, weshalb sich in Region R2 keine Zellen befinden. Abbildung 38b zeigt ein repräsentatives Beispiel für eine **auswertbare FACS-Analyse** (Osteosarkompatient) mit vielen Tumorzellen in Region R2.

In der Tabelle 11 sind die Patientenzahlen und die Anzahl der auswertbaren Tumor- und Referenz-durchflusszytometrischen Analysen dargestellt. Die n-Zahlen besonders der einzeln aufgelisteten Entitäten Osteosarkom, Chondrosarkom, Liposarkom, Enchondrom und Riesenzelltumor sind gering. Die genannten Tumoren kommen jedoch nur selten vor und zudem kann es sehr schwierig sein, aus dem zum Teil harten knöchernen Tumormaterial Einzelzellen für die FACS-Analyse zu gewinnen.

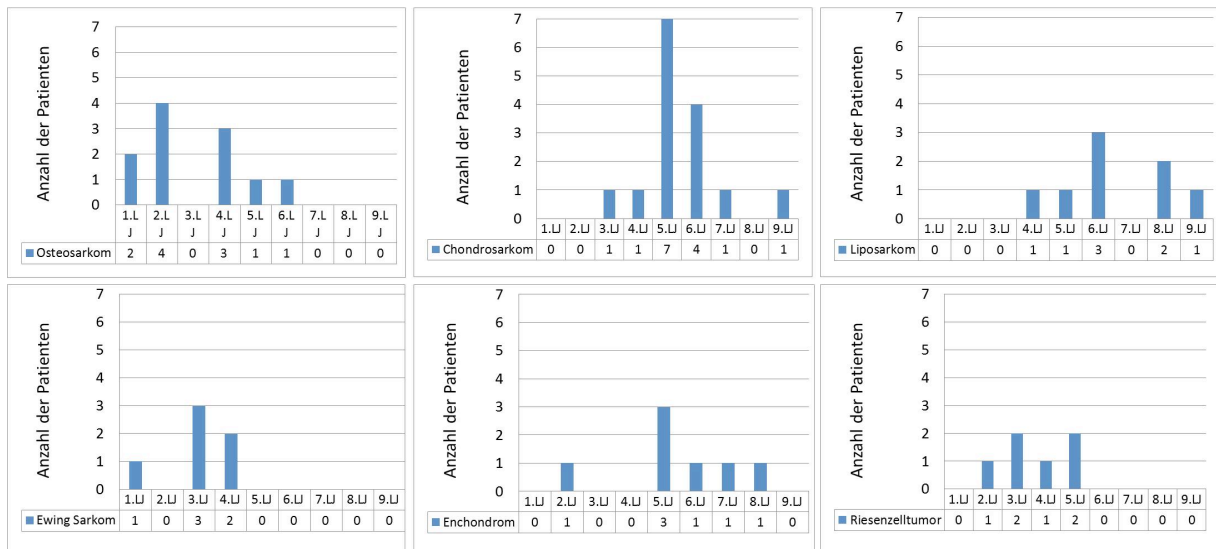
Tab.11a+b Patientenzahlen verschiedener Diagnosegruppen und Entitäten mit Anzahl der auswertbaren Tumor- und Referenzgewebe-FACSe. Die Anzahl der Paare ist die Zahl der Patienten, bei denen sowohl das Tumor- als auch Referenzgewebe-FACS auswertbar ist.

Diagnosegruppen	Erhaltene Biopsien Tumor/Referenzgewebe	Auswertbare FACSe Tumor/Referenzgewebe	Paare
Maligne mesenchymale Tumoren	69/64	55/32	31
Benigne mesenchymale Tumoren	31/28	19/8	7
Mesenchymale Tumoren mit variabler oder unsicherer Dignität	8/8	8/4	3
Nicht-mesenchymale Tumoren	4/3	3/0	0
Metastasen nicht-mesenchymalen Ursprungs	3/3	2/0	0
Muskuloskelettale nicht-tumoröse Erkrankungen	10/10	8/6	6
Vergleichsgruppe: Tumorfreies Spendergewebe	7/-	2/-	-

Tab.11a

Ausgesuchte Entitäten	Erhaltene Biopsien Tumor/Referenzgewebe	Auswertbare FACSe Tumor/Referenzgewebe	Paare
Osteosarkom	16/14	11/5	5
Chondrosarkom	16/15	15/8	8
Ewing-Sarkom	6/5	6/4	4
Liposarkom	13/13	8/6	6
Enchondrom	9/9	6/1	1
Riesenzelltumor	7/7	7/4	3

Tab.11b



Diag.6 **Altersverteilung verschiedener Entitäten.** Aufgetragen sind die Anzahl der Patienten der jeweiligen Lebensjahrzehnte. Es wurden nur Patienten mit auswertbaren FACS-Analysen gezählt. Das Osteo- und Ewing-Sarkom und der Riesenzelltumor treten bei Patienten mit einem Altersdurchschnitt von 25-34 Jahren auf. Die Entitäten Chondrosarkom und Liposarkom kommen hingegen bei Patienten mit einem Altersdurchschnitt von 51-56 Jahren vor.

In der dargestellten Altersverteilung (Diag.6) der einzelnen Entitäten wurden nur die Patienten einbezogen, deren FACS-Analysen auswertbar waren. Dabei decken sich die Angaben mit Aussagen aus der Literatur (Böcker et al., 2004, Freyschmidt et al., 2010): Entitäten wie das Osteosarkom, das Ewing-Sarkom und der Riesenzelltumor kommen vorwiegend bei Patienten im 2. und 3. Lebensjahrzehnt vor, während Patienten mit einem Chondro- oder Liposarkom häufig zwischen 50 und 60 Jahre alt sind.

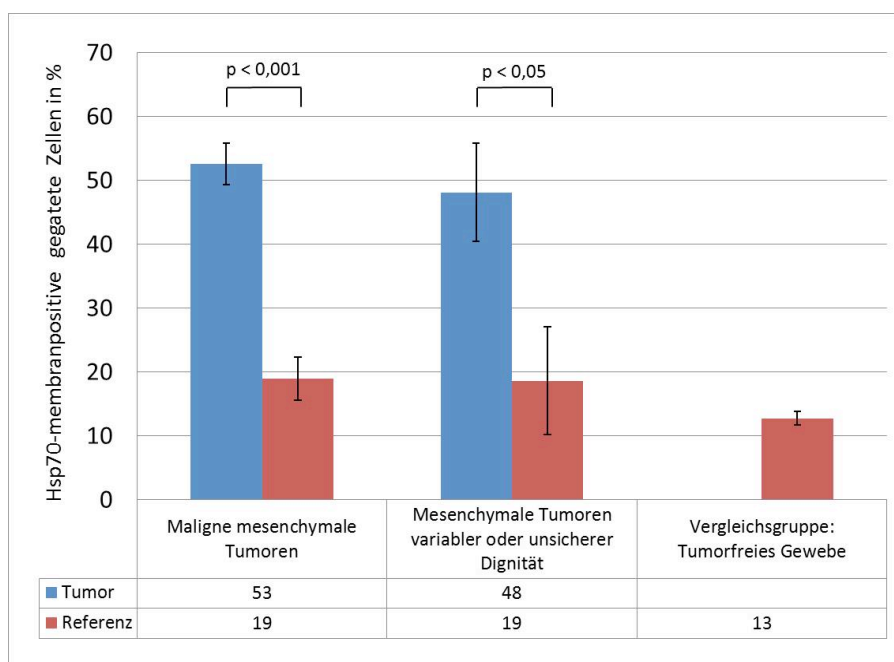
Bei der Analyse der durchflusszytometrisch gewonnenen, auswertbaren Messwerte können mehrere Ergebnisse dargestellt werden, welche im Folgenden einzeln beleuchtet werden:

Die in Diagramm 7 dargestellte FACS-Analyse zeigt den Prozentsatz der gegateten Hsp70-membranpositiven Zellen auf, unterteilt nach den Diagnosegruppen *Maligne mesenchymale Tumoren*, *mesenchymale Tumoren variabler oder unsicherer Dignität* und der Vergleichsgruppe *Tumorfrees Spendergewebe*. Es wurden sowohl die Tumorzellen (blauer Balken) als auch die korrespondierenden gesunden

Referenzzellen (roter Balken) gemessen. Bei den ausgewählten Diagnosegruppen maligner (53% Hsp70-positive Zellen) bzw. semimaligner (48% Hsp70-positive Zellen) Tumoren zeigt sich im Vergleich zum Referenzgewebe, dem gesunden Gewebe des Sarkompatienten (19% Hsp70-positive Zellen), ein über das Doppelte erhöhter Prozentsatz Hsp70-positiver Zellen. Dabei unterscheiden sich die bei Tumor und Referenz gemessenen Werte signifikant ($p < 0,001$ bzw. $p < 0,05$).

Die krankhaften Tumorzellen lassen sich durch die Hsp70-Membranexpression von den gesunden Körperzellen desselben Individuums abgrenzen.

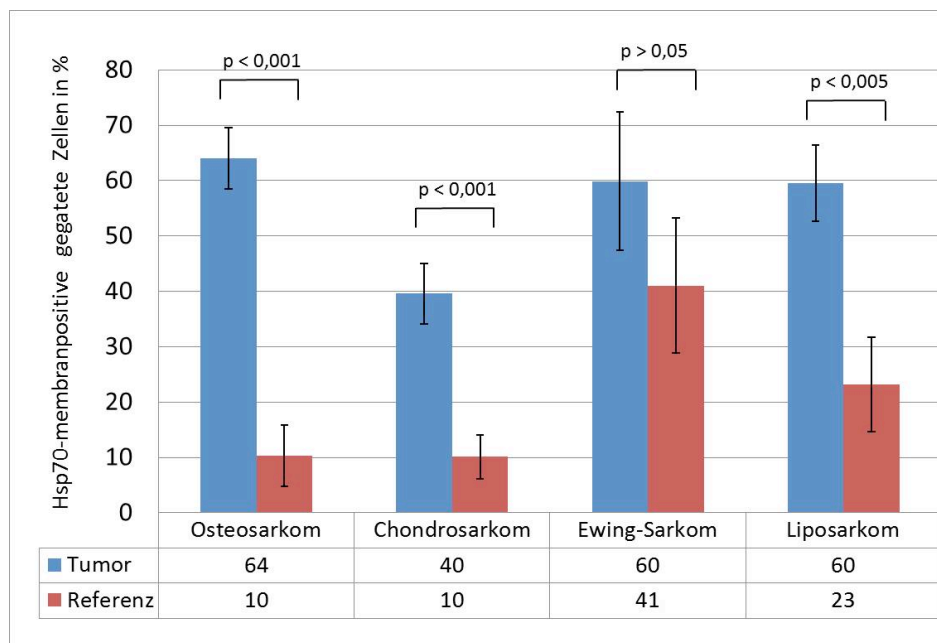
Die bei gesunden Spendern gemessenen Werte (13% Hsp70-positive Zellen) sind ähnlich hoch wie das Referenzgewebe der Tumorpatienten (19% Hsp70-positive Zellen).



Diag.7 Hsp70-membranpositive, gefärbte Zellen ausgewählter Diagnosegruppen in Prozent. Die blauen Balken sind die Werte der Tumoren, die roten Balken sind die Werte der Referenzgewebe, beides angegeben mit Standardfehler und Signifikanzniveau. Bei dem *tumorfrees Gewebe* gibt es keine Trennung Tumor/Referenzgewebe.

Diese Beobachtung konnte auch bei detaillierter Untersuchung der einzelnen Entitäten bestätigt werden: Die malignen Entitäten *Osteosarkom*, *Chondrosarkom*, *Ewing-Sarkom* und *Liposarkom* sind in Diagramm 8 mit der Prozentzahl der Hsp70-

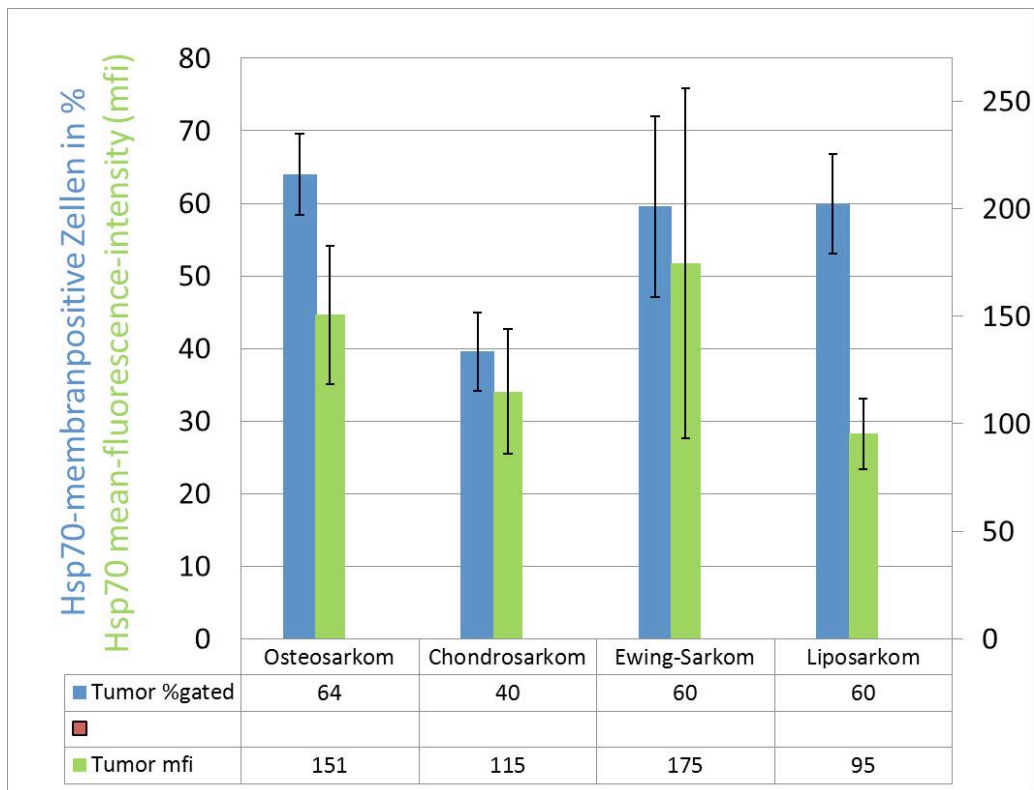
positiven Zellen dargestellt. Bei allen Diagnosegruppen kommen im Tumorgewebe signifikant ($p < 0,01$) mehr Hsp70-membranpositive Zellen vor als im Referenzgewebe (Ausnahme Ewing-Sarkom: $p > 0,05$ wegen hohen Standardfehlers). Den geringsten Prozentsatz Hsp70-membranpositiver Tumorzellen zeigt das Chondrosarkom (40%), wobei bei dieser Entität auch die Referenzzellen einen vergleichsweise geringen Prozentsatz aufweisen (10%).



Diag.8 Hsp70-membranpositive, gatede Zellen ausgewählter Entitäten in Prozent. Die blauen Balken sind die Werte der Tumoren, die roten Balken sind die Werte der Referenzgewebe, beides angegeben mit Standardfehler und Signifikanzniveau.

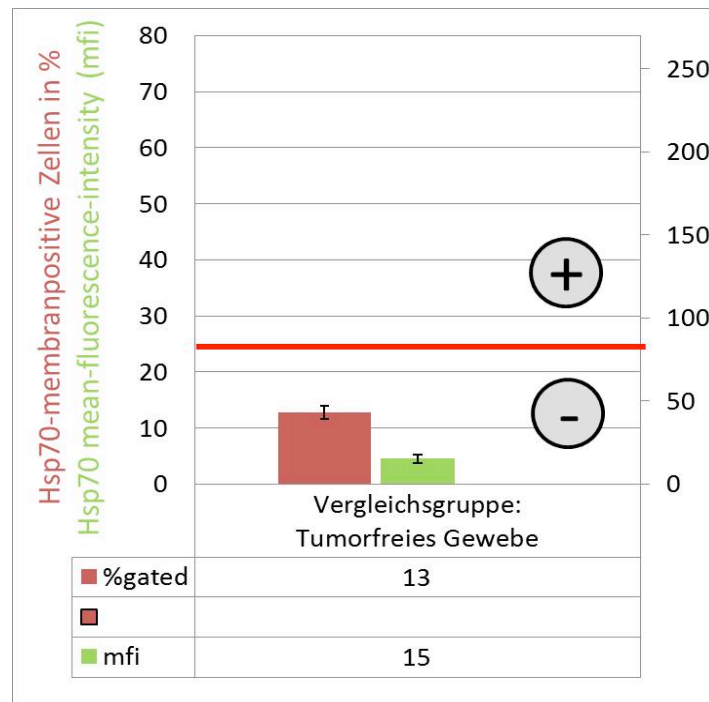
Neben dem Prozentsatz Hsp70-positiver Zellen wurde in der Auswertung auch die durchflusszytometrisch gemessene durchschnittliche Fluoreszenzintensität berücksichtigt. Bei den oben genannten Entitäten gibt es keinen direkten Zusammenhang zwischen dem Prozentsatz der Hsp70-positiven Zellen und der Dichte an Hsp70-Molekülen auf der Zellmembran (*Mean-fluorescence-intensity, mfi*) (Diag.9). So weist zum Beispiel das Ewing-Sarkom mit 60% Hsp70-positiven Zellen einen mfi-Wert von 175 auf, während das Liposarkom bei gleich hoher Prozentzahl Hsp70-positiver Zellen einen geringeren mfi-Wert von 95 aufweist. Tendenziell zeigt sich,

dass die Zellen des Liposarkoms weniger Hsp70-Proteine auf der Membran tragen als beispielsweise das Ewing-Sarkom oder Osteosarkom.



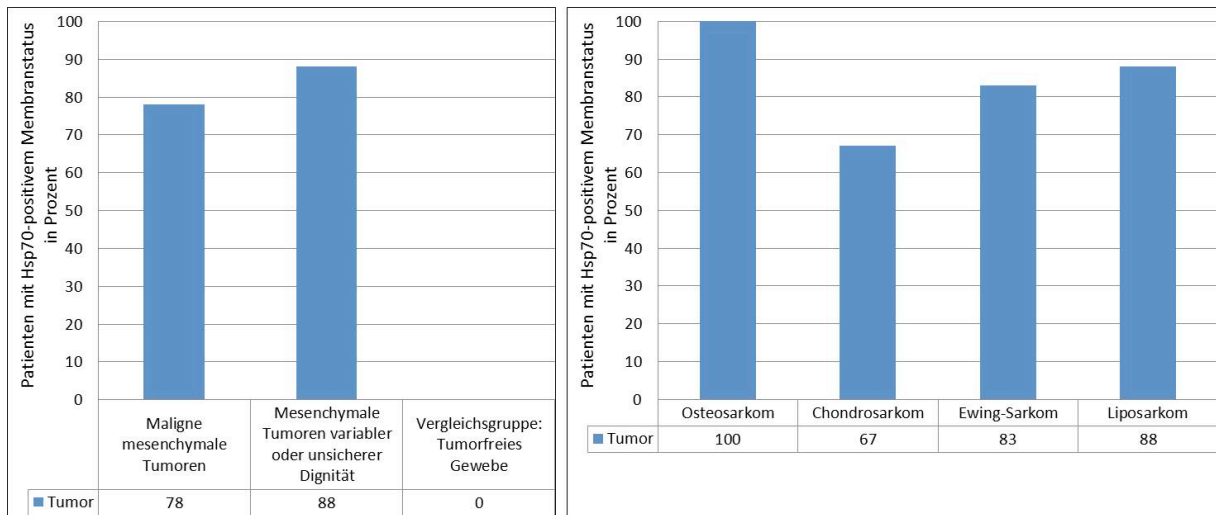
Diag.9 Hsp70-Werte der Tumoren ausgewählter Entitäten. Der blaue Balken zeigt die Hsp70-membranpositiven, gegateten Zellen in Prozent. Der grüne Balken zeigt den mfi-Wert der Zellen. Ein niedriger mfi-Wert bei hohem Prozentwert, wie es beim Liposarkom der Fall ist, bedeutet, dass es viele Hsp70-membranpositive Zellen gibt, auf diesen aber pro Zelle vergleichsweise wenig Hsp70-Proteine lokalisiert sind. Beim Ewing-Sarkom hingegen ist der mfi-Wert hoch (175): Die 60% Hsp70-membranpositiven Zellen haben eine hohe Dichte an Hsp70-Proteinen und deshalb ein starkes Fluoreszenzsignal (= hoher mfi-Wert).

Die gemessenen Werte des Vergleichsgewebes aus gesunden Spendern zeigen, dass auch Normalgewebe eine geringe Expression von membranständigem Hsp70 aufweist (13% Hsp70-positive Zellen, mfi 15) (Diag.10). Daher kann man erst ab einem Schwellenwert von ca. 25% Hsp70-positiven Zellen von einer abnormalen, d.h. von gesundem Gewebe abweichenden Hsp70-Expression sprechen. Bei der Dichte der Expression (mfi) lässt sich der Schwellenwert bei ca. 80 definieren. Gewebe, deren Zellen eine über dem Schwellenwert liegende Hsp70-Membranexpression aufweisen, werden als *Hsp70-positiv* bezeichnet.



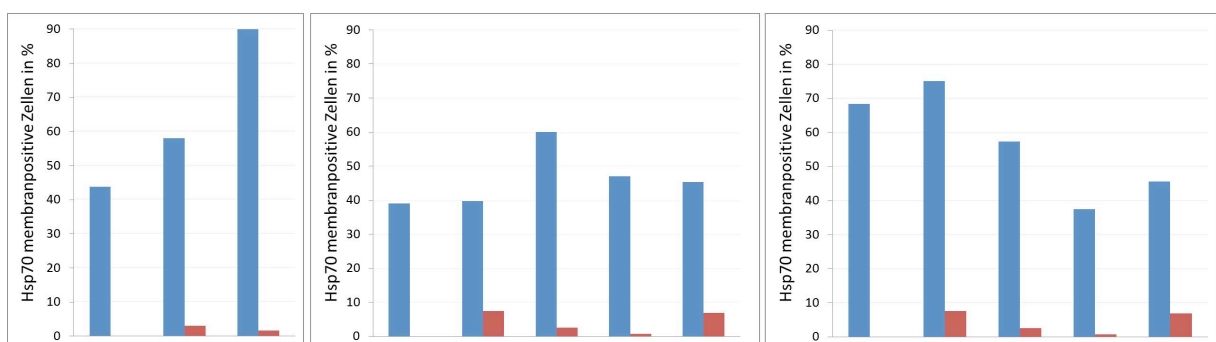
Diag.10 Das Vergleichsgewebe tumorfreier Spender zeigt einen Anteil Hsp70-membranpositiver Zellen von 13%. Der mfi-Wert beträgt 15. Die rote Linie stellt den Threshold für mesenchymale Tumoren in der FACS-Analyse dar: Tumoren mit über 25% Hsp70-positiven Zellen bzw. einem mfi-Wert von über 80 gelten als Hsp70-positiv. Tumoren mit unter den Schwellenwerten liegenden Werten gelten als Hsp70-negativ.

Daraus ergibt sich, dass die in Diagramm 7 und 8 dargestellten Messwerte der Referenzgewebe aller Gruppen bzw. Entitäten mit Ausnahme des Ewing-Sarkom unterhalb des Schwellenwertes liegen und somit Hsp70-negativ sind. Die durchschnittlich gemessenen Prozentwerte Hsp70-positiver Zellen der malignen Tumoren liegen jedoch alle über dem Schwellenwert. Analysiert man die Patienten einzeln, so zeigt sich, dass zwischen 67% und 100% der Patienten der großen Diagnosegruppen und der ausgewählten malignen Entitäten ein Tumorgewebe mit über 25% Hsp70-membranpositiven Zellen haben und somit Hsp70-positiv sind (Diag.11).



Diag.11 Anteil der Patienten mit Hsp70-positivem Membranstatus. Die Patienten der aufgezeigten Diagnosegruppen und Entitäten weisen in 67% bis 100% Hsp70-positive Tumoren auf. In der Vergleichsgruppe tumorfreier Spender ist kein Gewebe Hsp70-positiv.

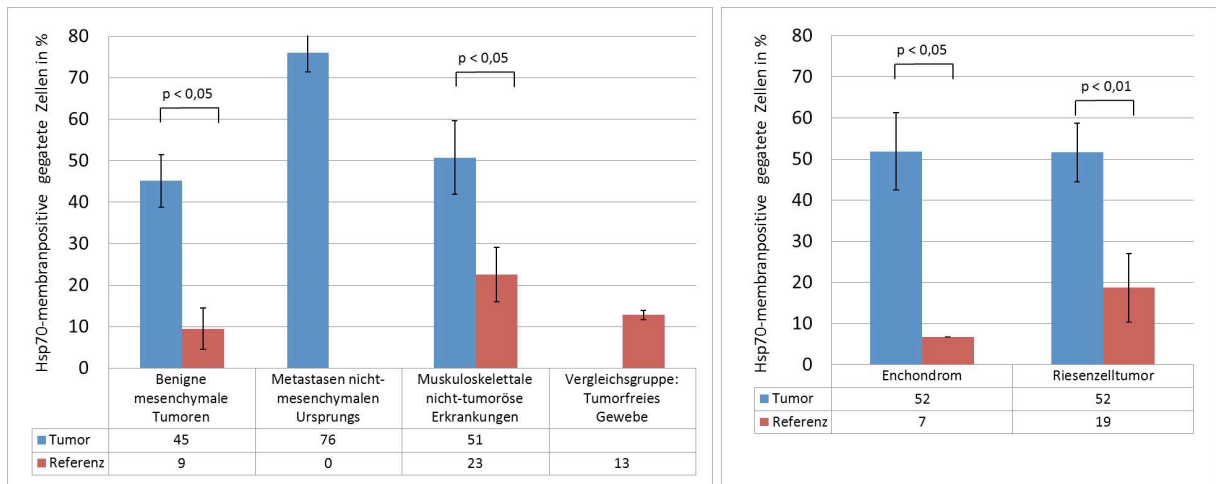
Die Expression von Hsp70 auf der Membran von Tumorgewebe im Gegensatz zum Normalgewebe lässt sich auch auf das Individuum bezogen aufzeigen. In Diagramm 12 kann an Patienten der Osteo-, Chondro- und Liposarkomgruppe gezeigt werden, dass das entartete Gewebe Hsp70-positiv ist, während das gesunde Referenzgewebe eine Hsp70-Expression unterhalb des Schwellenwertes (Diag.10) aufweist.



Diag.12a Osteosarkom 12b Chondrosarkom 12c Liposarkom

Hsp70-membranpositive, gegatete Zellen ausgewählter Entitäten in Prozent. Dargestellt sind jeweils Pärchen von Tumorgewebe (blau) und Referenzgewebe (rot) desselben Patienten, bei denen das Tumorgewebe Hsp70-positiv (>25% Hsp70 positive Zellen) und das Referenzgewebe Hsp70-negativ (<25% Hsp70 positive Zellen).

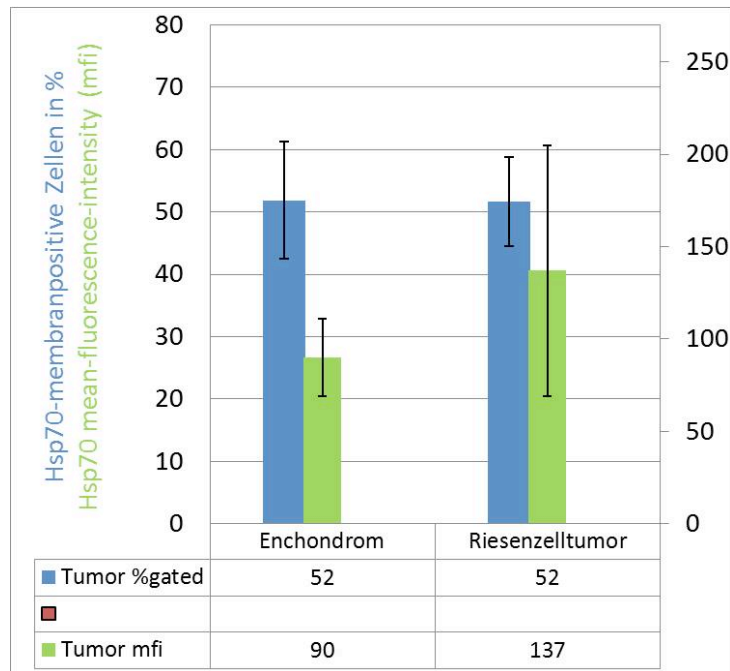
Bei der Auswertung der Ergebnisse lässt sich zeigen, dass auch Tumoren mit benigner Entartung eine im Vergleich zum Normalgewebe veränderte Hsp70-Membranexpression aufweisen (Diag.13). Die Metastasen nicht-mesenchymalen Ursprungs fallen mit einem besonders hohem Prozentsatz Hsp70-positiver Zellen auf (76% Hsp70-positive Zellen).



Diag.13 Hsp70-membranpositive, gegatete Zellen ausgewählter Diagnosegruppen in Prozent. Die blauen Balken sind die Werte der Tumoren, die roten Balken sind die Werte der Referenzgewebe, beides angegeben mit Standardfehler und Signifikanzniveau. Bei dem *tumorfrees Gewebe* gibt es keine Trennung Tumor/Referenzgewebe.

Die Gruppe der *muskuloskeletalen nicht-tumorösen Erkrankungen* ist Hsp70-membranpositiv; die Diagnosegruppe setzt sich aus Entzündungen zusammen (Osteomyelitis, Myositis, Synovialitis) und weist eine Membranexpression bei 51% der Zellen mit einem mfi-Wert von 141 auf. Das Referenzgewebe dieser Patienten weist nur in 23% der Zellen Hsp70 auf der Membran auf.

Betrachtet man die Dichte der Hsp70-Membranexpression, so fällt auf, dass das gutartige Enchondrom im Vergleich den niedrigsten mfi-Wert (mfi 90) zeigt (Diag.14).



Diag.14 Hsp70-Werte bei Enchondrom und Riesenzelltumor. Der blaue Balken zeigt die Hsp70-membranpositiven, gegateten Zellen in Prozent. Der grüne Balken zeigt den mfi-Wert der Zellen. Im Vergleich zum Enchondrom befinden sich beim Riesenzelltumor durchschnittlich mehr Hsp70-Proteine auf der Zellmembran.

Es lässt sich feststellen, dass sich Tumorzellen maligner (53% Hsp70-positive Zellen) und benigner (45% Hsp70-positive Zellen) Entitäten in ihrer Hsp70-Membranexpression nicht signifikant ($p = 0,09$) unterscheiden, jedoch sowohl bei den malignen als auch bei den benignen Tumoren die Tumorzellen eine im Vergleich zu den Referenzzellen mehr als doppelt so hohe Hsp70-Expression aufweisen. Somit unterscheidet sich in einem Individuum Tumorgewebe von Normalgewebe ($p < 0,01$).

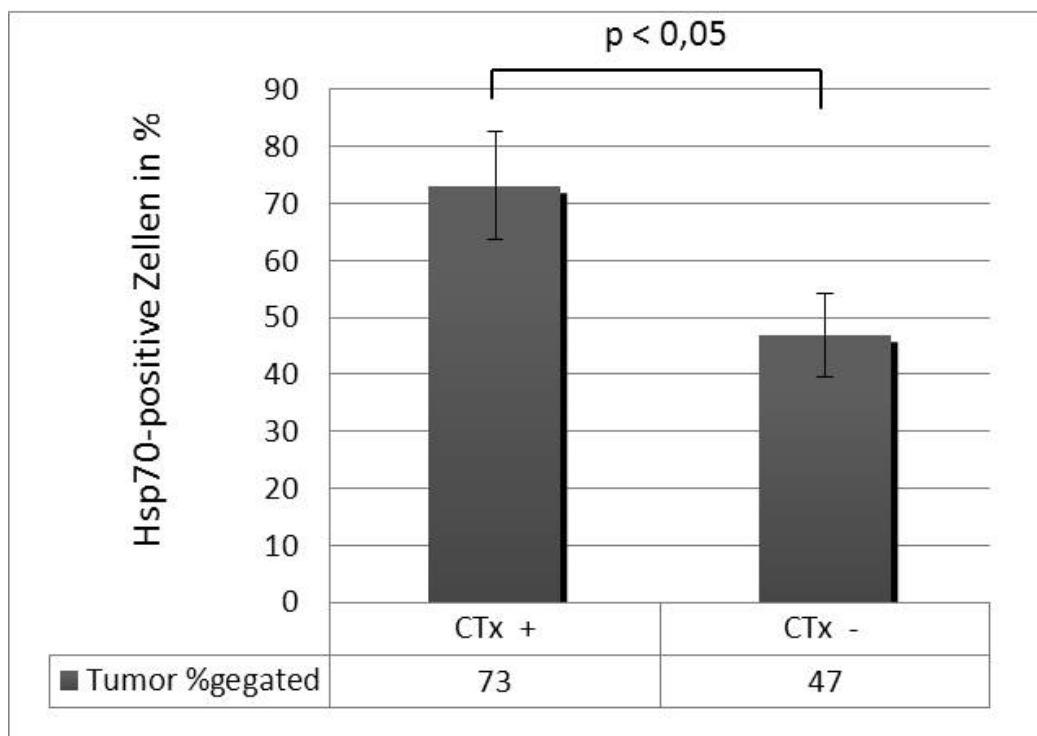
Wie in Kapitel 2.2.7.2 beschrieben wurden die Zellen mit dem 4. Antikörperpanel im FACS auf CD77 hin untersucht, einen Marker für die Lipidkomponente Globoyl-triaosylceramid, die bei gastrointestinalen Tumoren eine tumorspezifische Verankerung von Hsp70 in der Membran ermöglicht (Gehrmann et al., 2008). Eine Hsp70-Gb3-Verankerung konnte bei Sarkomen ausgeschlossen werden, da Sarkome keine CD77-Expression aufwiesen (Daten sind nicht gezeigt). Anhand der Tumorzellkulturen sollen zukünftig weitere Lipidanalysen durchgeführt werden, um den Bindungspartner von Hsp70 in der Zellmembran von Sarkomen zu identifizieren.

3.7 Durchflusszytometrische Analysen in Patientensubgruppen

Einige Ergebnisse, die bei der Zusammenschau der FACS-Analysen aufgefallen waren, lagen nur in geringer Fallzahl vor. Dennoch sind einzelne Aspekte im folgenden Kapitel dargestellt, um mögliche Tendenzen aufzuzeigen.

Einfluss von Chemotherapie auf die Hsp70-Membranexpression bei Osteosarkomen

Patienten mit einem Osteosarkom erhielten nach der EURAMOS-Studie 10 Wochen lang neoadjuvant Methotrexat, Doxorubicin und Cisplatin und bei Non-respondern wurde das Regime um Ifosfamid und Etoposid erweitert. Bei Tumorgewebe, das vor der FACS-Analyse chemotherapeutisch behandelt worden ist, liegt der Anteil Hsp70-positiver Zellen mit 73% höher als bei unbehandeltem Tumorgewebe (47%) (Diag.15).

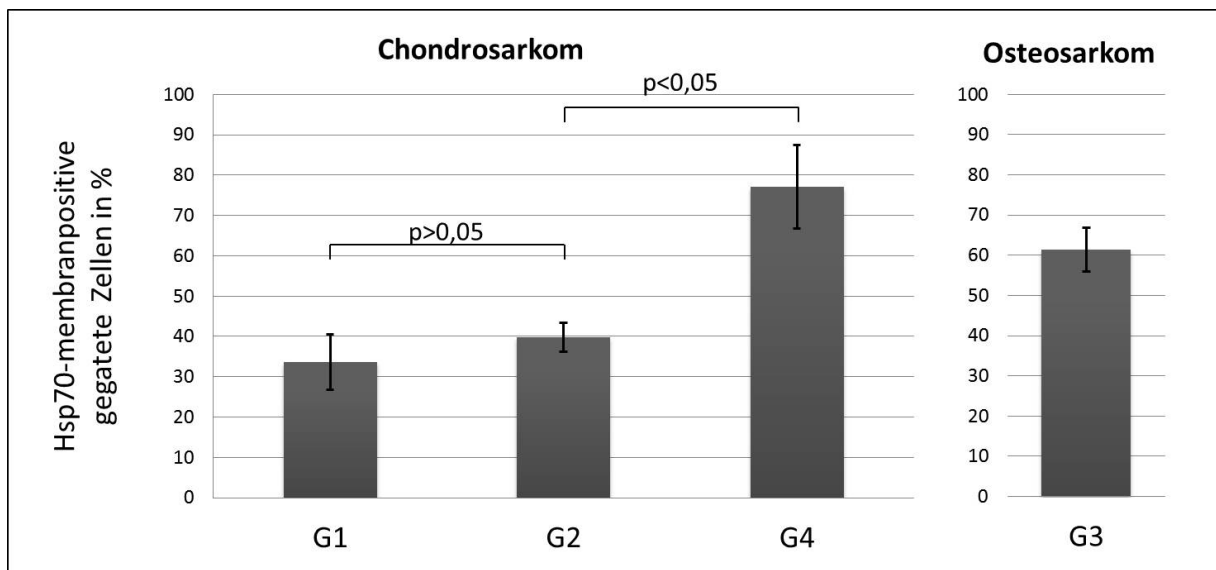


Diag.15 Hsp70-positive gatede Zellen von Osteosarkomgewebe verschiedener Patienten in Prozent. Ein Teil der Patienten (n=5) hat bereits vor der FACS-Analyse eine Chemotherapie erhalten (CTX +), ein anderer Teil (n=3) erst nach der FACS-Analyse (CTX -). Somit liegt von der zweiten Gruppe zum Analysezeitpunkt unbehandeltes Gewebe vor, welches mit 47% weniger Hsp70 auf der Membran exprimiert als die chemotherapeutisch behandelte Gruppe (73% gatede Zellen).

Hsp70-Membranexpression von Tumoren unterschiedlichen Gradings

Anhand histologischer Merkmale werden Tumoren graduiert, wodurch man auf das voraussichtliche biologische Verhalten des Tumors, d.h. seine lokale Aggressivität und die Wahrscheinlichkeit der Metastasierung, schließen kann (Freyschmidt et al., 2010). Die Unterteilung erfolgt beim Chondro- und Osteosarkom in einer vierstufigen Skala, wobei Grad 1 eine hohe Differenzierung und Grad 4 einen anaplastischen Tumor bezeichnet.

Es ließ sich feststellen, dass Chondrosarkome mit zunehmender Graduierung vermehrt Hsp70 auf der Zellmembran exprimieren. Entdifferenzierte Chondrosarkome vom Grad 4 zeigen mit 77% Hsp70-membranpositiven Zellen eine mehr als doppelt so hohe Expression wie Chondrosarkome vom Grad 1 (34%). Die 10 analysierten Osteosarkome vom Grad 3 exprimieren mit 61% getageten Zellen mehr Hsp70 auf ihrer Membran als Chondrosarkome vom Grad 2, jedoch weniger als Chondrosarkome vom Grad 4 (Diag.16).

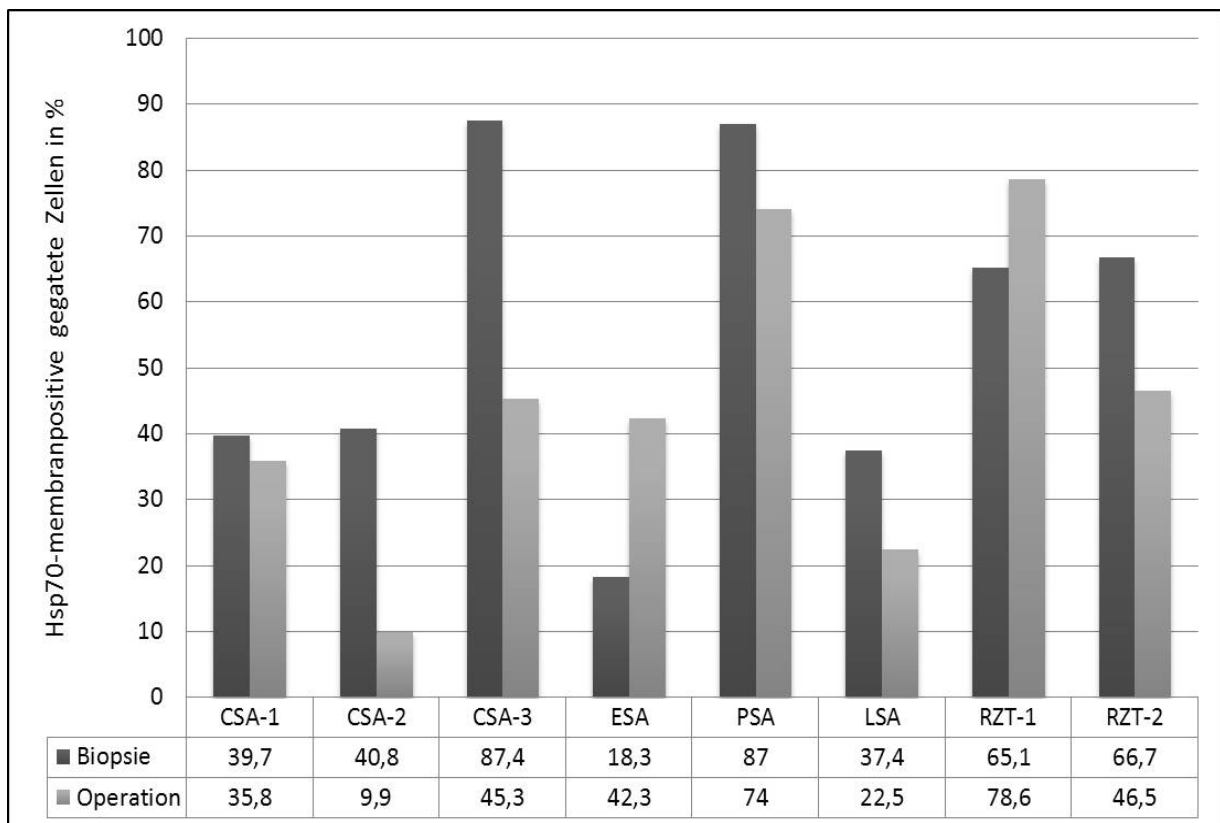


Diag.16 **Hsp70-Membranexpression in Abhängigkeit vom Grading.** Dargestellt sind die Hsp70-membranpositiven Zellen in Prozent der Gradingstufen G1, G2 und G4 des Chondrosarkoms und G3 des Osteosarkoms. G1 (n=10) mit 34%, G2 (n=3) mit 40% und G4 (n=2) mit 77% des Chondrosarkoms zeigen eine Zunahme der Hsp70-Membranexpression bei steigendem Grading. Die Osteosarkome liegen mit der Gradingstufe G3 (n=10) mit 61% zwischen G2 und G4 des Chondrosarkoms.

Hsp70-Membranexpression verschiedener Tumoren im Verlauf

Bei einigen Patienten wurde sowohl das bei der offenen Biopsie also auch das bei der resezierenden Operation entnommene Gewebe analysiert. Der Abstand zwischen Biopsie und Operation betrug zwischen 2 und 16 Wochen. Analysiert wurden 8 Patienten, welche an einem Chondrosarkom, Ewing-Sarkom, Pleomorphem Sarkom, Liposarkom oder Riesenzelltumor erkrankt waren.

Die FACS-Analysen zeigten unterschiedliche Ergebnisse der beiden Materialentnahmen eines Patienten. Bei sechs der acht Patienten wurde im Operationsmaterial eine niedrigere Hsp70-Membranexpression nachgewiesen als im Biopsiematerial (Diag.17).



Diag.17 Patienten mit zwei Probenentnahmen: Offene Biopsie und resezierende Operation. Dargestellt ist die Anzahl Hsp70-membranpositiver gegateter Zellen von drei Chondrosarkomen (CSA), je einem Ewing-Sarkom (ESA), Pleomorphes Sarkom (PSA), Liposarkom (LSA) und zwei Riesenzelltumoren (RZT) bei Biopsie und Operation. Nur beim Ewing-Sarkom und dem Riesenzelltumor-1 ist der Wert des während der Operation entnommenen Gewebes höher.

4 Diskussion

Hsp70 – ein Tumormarker für Sarkome

Das molekulare Chaperon *Heat shock protein 70* (Hsp70) wird durch endogene und exogene Stimuli induziert (Multhoff, 2007) und erfüllt intrazellulär protektive Funktionen, indem es die Proteinhomöostase stabilisiert und antiapoptotische Wirkmechanismen reguliert (Frydman, 2001, Sherman, Multhoff, 2007, Giffard et al., 2008).

Tumorzellen zeigen eine erhöhte intrazelluläre Hsp70-Expression, welche einen Einfluss auf die Tumorbilologie und Therapieresistenz hat (Guzhova, Margulis, 2006, Didelot et al., 2007, Shu, Huang, 2008). Neben dem intrazellulär vorkommenden Hsp70 ist bei vielen Tumorentitäten im Gegensatz zu gesundem Gewebe ein membrangebundenes Hsp70 nachgewiesen (Multhoff et al., 1995, Shin et al., 2003, Multhoff, Hightower, 2011), das mit dem Immunsystem auf vielfältige Weise in Kontakt tritt (Didelot et al., 2007, Shu, Huang, 2008). Daher bietet Hsp70 als Zielstruktur interessante Möglichkeiten für die Diagnostik und Therapie von Tumoren. Sarkome wurden – im Gegensatz zu Karzinomen und Leukämien – bislang noch nicht auf eine mögliche Hsp70-Membranexpression untersucht. Die malignen Knochen- und Weichteiltumoren sind selten und die unspezifischen Symptome werden häufig lange verkannt, was zu radikalen Resektionen und schlechten Prognosen führt (Bielack et al., 2009). Um Sarkompatienten Zugang zu besseren diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten zu verschaffen, musste zunächst geklärt werden, ob Hsp70 auf der Membran von mesenchymalen Tumoren exprimiert wird.

Mit dieser Zielsetzung wurden zuerst Osteosarkome aus Mäusen untersucht. Durchflusszytometrische Analysen von 15 etablierten Zelllinien ergaben eine Gruppe mit hoher (>60%, n=9), intermediärer (35%, n=1) und niedriger (<20%, n=5) Hsp70-Membranexpression. Die Arbeitsgemeinschaft um Dr. Rosemann (HMGU KKG Sarkom) bestrahlte diese 15 Zelllinien mit 2 Gy, wobei bei zwei Linien (MOS 306 und 1929) keine Wachstumshemmung nach Radiotherapie eintrat. Diese beiden strahlenresistenten Linien zeigten eine intermediäre bzw. niedrige Hsp70-Membranexpression. Der in Publikationen beschriebene Zusammenhang zwischen

einer erhöhten zytosolischen Hsp70-Expression und Strahlenresistenz bei humanen Tumoren (Gehrmann et al., 2008) konnte nicht auf die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Ergebnisse bei Maustumoren übertragen werden, da radiosensitive Maustumorzelllinien sowohl hohe als auch niedrige Hsp70-Membranexpressionen aufwiesen. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich Zelllinien von Mäusen im Vergleich zu humanen Tumorgeweben unterschiedlich verhalten. Die strahlenresistente Linie MOS 306 wuchs im Vergleich zu den strahlensensiblen Linien, deren Wachstum dokumentiert wurde, mehr als doppelt so schnell und zeigte im Vergleich mit der Gruppe, deren Wachstumsverhalten dokumentiert wurde (>50% Hsp70-positive Zellen), als einzige Linie einen niedrigen Wert (34,2%).

Der Nachweis von Hsp70 auf der Zellmembran von Osteosarkomlinien gelang nicht nur mittels Durchflusszytometrie, sondern konnte auch durch Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden.

Nachdem eine membranständige Hsp70-Expression auf murinen Osteosarkomzelllinien gezeigt werden konnte, wurden im nächsten Schritt mesenchymale Tumoren aus Primärmaterial des Menschen untersucht.

Aus Biopsie- und Operationsgewebe isolierte Zellen von 134 Patienten standen für die Durchflusszytometrie und den Versuch, Zelllinien mesenchymaler Tumoren zu etablieren, zur Verfügung.

Dabei wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Methode entwickelt, vitale Zellen aus Tumor und Normalbiopsien zu kultivieren, indem zunächst die Gewebeproben manuell mit dem Skalpell zerkleinert wurden, ohne die Zellen wie in etablierten Standardverfahren mit proteolytischen Enzymen zu behandeln (Alberts et al., 2002). Nach Aussaat der Zellen in DMEM-Medium mit Zusätzen (s. Kap. 2.2.3) musste darauf geachtet werden, die Zellkulturflaschen drei Wochen lang keiner Erschütterung oder Bewegung auszusetzen, um ein Auswachsen von Tumorzellen aus Zellaggregaten zu ermöglichen. Auf diese Weise gelang es, in 45% der Versuche Zellen anwachsen zu lassen, welche nach wenigen Passagen kryokonserviert wurden und für weitere Versuche zur Verfügung stehen. Ergebnisse aus Experimenten mit diesen aus primärem Material gewonnenen Zellen bieten den Vorteil, näher an der Realität zu liegen und damit von größerer klinischer Bedeutung zu sein.

Fibroblasten, welche häufig den dominanten Zelltyp bei Kulturen aus Primärmaterial darstellen (Lodish et al., 2000), überwuchsen in 35% der Versuche den Flaschenboden und verhinderten ein Tumorzellwachstum.

Ein Zusammenhang zwischen der Dignität der Tumoren und deren Fähigkeit, in Zellkultur anzuwachsen, konnte nicht hergestellt werden (s. Kap. 3.5, Diag.5). Maligne Zellen haben gegenüber nicht-malignen Zellen den Vorteil, dass sie weniger abhängig von Wachstumsfaktoren proliferieren (Cooper, 2000); aufgrund einer verminderten Expression von Zelladhäsionsmolekülen sind maligne Zellen jedoch weniger adhärent als benigne Zellen (Cooper, 2000).

Die verschiedenen Entitäten unterschieden sich nicht nur in der Anwachsrate sondern auch in der Zellmorphologie und der Wachstumsgeschwindigkeit. Die einzelnen Zellen zeigten einen großen Durchmesser bis zu 60µm und beanspruchten einen flächigen Kontakt zum Plattenboden. Dr. Mathias Gehrman konnte dies mittels animierter 3-D-Immunfluoreszenz-Mikroskopie bestätigen: Zellen eines Chondrosarkoms erstreckten sich über 50µm auf dem Plattenboden und zeigten nur ein geringes Wachstum in die Höhe (unveröffentlichte Daten). *In vivo* wachsende Chondrozyten hingegen zeigen eingebettet in hyaliner Knorpelmasse eine runde Zellform von ca. 11µm Durchmesser (Nevo et al., 1988, Welsch, 2002). Allgemein zeigten die mesenchymalen Zellen eine niedrige Verdopplungsrate.

Die Gewebeproben wurden neben den Kulturversuchen auch durchflusszytometrisch analysiert. Nach histopathologischer Diagnosestellung wurden die 134 Patienten des Kollektivs entsprechend ihres Befundes Diagnosegruppen und –subgruppen zugeordnet. Neben 68 malignen und 31 benignen Tumoren mesenchymalen Ursprungs und 8 mesenchymalen Tumoren variabler oder unsicherer Dignität wurden auch 17 Patienten in das Kollektiv einbezogen, deren Diagnosen Differenzialdiagnosen der mesenchymalen Tumoren darstellen, wie nicht-mesenchymale Tumoren und muskuloskelettale, nicht-tumoröse Erkrankungen. Das Gewebe von 7 tumorfreien Patienten stellte die Vergleichsgruppe dar.

Die zweigipflige Altersverteilung des Kollektivs spiegelt die in der Literatur (Freyschmidt et al., 2010) beschriebenen Beobachtungen wieder, dass einige Tumoren wie das Osteo- und Ewing-Sarkom gehäuft bei Jugendlichen vorkommen, während Tumoren wie das Chondro- oder Liposarkom und das Enchondrom vorwiegend in der 5. und 6. Lebensdekade auftreten.

Aus der Auswertung wurden Proben ausgeschlossen, welche bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen zu niedrige Eventzahlen im definierten Gate aufwiesen. Der Grund für zu niedrige Zellzahlen war, dass aus dem Tumor- bzw. Referenzgewebe zu wenige vitale Zellen isoliert werden konnten. Dies könnte zum einen an der Beschaffenheit des schwer zu zerkleinernden harten knorpeligen und knöchernen Materials gelegen haben, zum anderen besonders beim Referenzgewebe an der relativ niedrigen Zelldichte: Gesunder Knochen enthält nur 20-30% organische Matrix (Beniash, 2011). Bei einigen Tumoren, wie dem Riesenzelltumor und dem Ewing-Sarkom, die kaum extrazelluläre Matrix produzieren (Freyschmidt et al., 2010), ist die Zelldichte höher. Entsprechend der Tumorentität wurde beispielsweise beim Liposarkom nicht Knochen oder Knorpel sondern gesundes Fettgewebe als Referenz verwendet. Es zeigte sich jedoch auch hier, dass nicht-entartetes Gewebe schwieriger durchflusszytometrisch zu messen war. Eine Erklärung könnte sein, dass die gesunden Adipozyten, welche wegen der großen Fettvakuolen nur einen schmalen, das Zytoskelett stabilisierenden zytoplasmatischen Randsaum haben (Welsch, 2002), bereits bei geringer mechanischer Belastung ihre Zellintegrität verlieren. Besonders gering war der Erfolg Einzelzellsuspensionen aus Gewebe gesunder Spender zu gewinnen. Im Gegensatz dazu ließen sich mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode aus Tumorgeweben, die eine veränderte Zytokohäsivität und eine weichere Beschaffenheit aufwiesen (Riede et al., 2004), leichter Einzelzellsuspensionen generieren.

Ein weiteres generelles Problem der angewandten Methodik stellte die Heterogenität der Zellsuspension dar. Während Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zur Oberflächenexpression von Hitze-Schock-Proteinen auf Tumorzellen mit homogenen Kulturlinien durchgeführt worden waren (Tamura et al., 1993, Piselli et al., 1995, Altmeyer et al., 1996), enthielten die Einzelzellsuspensionen, die bei der Verarbeitung von primären humanen Materialien gewonnen wurden, neben den Tumorzellen auch andere Zellen wie z.B. Leukozyten oder Endothelzellen (Frelinger et al., 2010). Trotz Verwendung leukozytenspezifischer Antikörper (anti-CD45) und geeigneter Negativkontrollen gelang die Abgrenzung von Tumor- und Normalgeweben nicht immer. Es wurden auch unspezifische Bindungen der Antikörper an totes Zellmaterial beobachtet. Um keine falsch positiven Daten zu gewinnen, wurden deshalb nur die Zellen in ausgewertete Regionen einbezogen, die

im vitalen Gate lokalisiert waren und eine eindeutige positive Färbung aufwiesen. Somit ging ein kleiner Teil (schwach) positiver Tumorzellen in der Auswertung verloren. Dieser Nachteil gegenüber homogenen Zelllinien steht jedoch dem Vorteil gegenüber, dass die aus der Verarbeitung frischen Primärmaterials gewonnenen Daten näher an der Realität liegen und damit klinisch von höherer Relevanz sind. Außerdem konnte auf diese Weise die Hsp70-Membranexpression unterschiedlichster Tumorentitäten im Vergleich untersucht werden.

Die Zuordnung der einzelnen Patienten des Kollektivs zu übergeordneten Diagnosegruppen zeigte, dass maligne mesenchymale Tumoren und Tumoren variabler bzw. unsicherer Dignität Hsp70 auf ihrer Membran exprimieren. Der Anteil der durchflusszytometrisch positiv gemessenen Zellen lag dabei über 48% und ist somit mit den von Hantschel bei Karzinomen gemessenen Werten von durchschnittlich 43% Hsp70-membranpositiven Zellen vergleichbar (Hantschel et al., 2000).

Um als mögliche Zielstruktur diagnostisch oder therapeutisch relevant zu sein, wurde zusätzlich untersucht, ob sich das Hitzeschockprotein 70 in der Membranexpression bei gesundem mesenchymalem Gewebe von der Membranexpression des Tumorgewebes derselben Patienten unterschied. Beim Normalgewebe von Sarkompatienten wurden Werte unter 20% Hsp70-membranpositiver Zellen gemessen. Auch das als Kontrollgruppe verwendete Gewebe tumorfreier Individuen zeigte eine niedrige Hsp70-Membranexpression von 13%. Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die eine negative Hsp70-Expression auf gesundem Gewebe zeigen, ließen sich dadurch bestätigen (Hantschel et al., 2000, Kleinjung et al., 2003, Farkas et al., 2003, Markopoulos et al., 2009).

Gewebeproben wurden als *Hsp70-membranpositiv* bezeichnet, wenn sie mindestens 25% positive gefärbte Zellen im Gate enthielten und sich somit von Basiswerten gesunder Gewebe, die im Mittel zwischen 10-20% lagen, unterschieden. Die betrachteten Gewebeproben maligner Tumoren waren zu über 78% Hsp70-membranpositiv. In der Vergleichsgruppe tumorfreier Individuen gab es keine Hsp70-membranpositive Gewebeprobe.

Die in der Einführung genauer charakterisierten Entitäten mesenchymaler Tumoren zeigten von 67% Hsp70-positiven Gewebeproben beim Chondrosarkom bis zu 100%

positiven Gewebeproben beim Osteosarkom einen hohen Hsp70-positiven Membranstatus.

Das Normalgewebe der Sarkompatienten lag unter dem Schwellenwert von 25% im als negativ definierten Bereich. Somit unterscheiden sich Tumorzellen von gesunden Körperzellen in der Hsp70-Membranexpression. Dies konnte auch intraindividuell nachgewiesen werden und ist daher von besonderer klinischer Relevanz.

Ausnahme bildeten Gewebeproben von Ewing-Sarkompatienten: Es konnten im Durchschnitt 60% Hsp70-membranpositive Tumorzellen durchflusszytometrisch detektiert werden, beim Referenzgewebe dieser Patienten wurden 41% positive Zellen gemessen. Diese erhöhte Hsp70-Membranexpression nicht-tumoröser Zellen könnte durch die allgemeine Entzündungsreaktion mit Anämie, Fieber, Leukozytose und erhöhter Blutsenkungsgeschwindigkeit bedingt sein, die bei Ewing-Sarkomen im Gegensatz zu anderen Knochengeschwülsten auftreten können (Freyschmidt et al., 2010). Bei Inflammation und Fieber wird die intrazelluläre Hsp70-Transkription erhöht (De Maio, 1999), um eine Proteinaggregation zu verhindern und protektive Funktionen auf die Zellhomöostase auszuüben (Multhoff et al., 2007).

Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung entzündlich veränderter, mesenchymaler Gewebe konnte im Rahmen der durchgeführten Experimente eine Erhöhung der Hsp70-Expression festgestellt werden.

Neben den nicht-tumorösen, entzündlichen muskuloskelettalen Erkrankungen stellen auch die Tumoren nicht-mesenchymalen Ursprungs Differenzialdiagnosen zu den mesenchymalen Tumoren dar. Untersucht wurden Tochtergeschwülste von Patienten mit nicht-mesenchymalen Tumoren; sie zeigten mit 76% Hsp70-membranpositiven Zellen eine höhere Hsp70-Expression als mesenchymale Primärtumoren. In der Literatur ist beschrieben, dass Metastasen Hsp70 auf ihrer Zellmembran stärker exprimieren als das Muttergeschwulst (Farkas et al., 2003, Pfister et al., 2007). So lag beispielsweise die Metastase eines Adenokarzinoms mit 71% über dem Durchschnitt von 37% bei kolorektalen Karzinomen aus den Daten Hantschels (Hantschel et al., 2000).

Auch das benigne Enchondrom und der „semimaligne“ Riesenzelltumor lagen mit 52% Hsp70-positiven Zellen im positiven Bereich. Die Tumorzellen grenzten sich vom Referenzgewebe ab, dessen Membranexpression im Hsp70-negativen Bereich lag. Entartungen mesenchymalen Gewebes ohne maligne Wachstumstendenz

zeigten in den durchgeführten Messungen somit eine veränderte Membranexpression des Hitzeschockproteins 70. Eine erhöhte Hsp70-Expression konnte auch bei Gliomen, gutartigen Tumoren des zentralen Nervensystems, bestätigt werden (Deighton et al., 2010).

Bei der durchflusszytometrischen Analyse der Zellsuspensionen wurden neben dem Prozentsatz der Hsp70-positiven Zellen auch die *Mean-fluorescence-intensity* (mfi) ermittelt, welche die durchschnittliche Leuchtstärke und somit Dichte der Hsp70-Moleküle pro Zelle wiedergibt. Die einzelnen Entitäten zeigten dabei unterschiedliche Intensitäten: Beim Chondro- und Ewing-Sarkom ließ sich im Gegensatz zum Liposarkom eine fast doppelt so hohe Dichte membrangebundener Hsp70-Moleküle nachweisen.

Die von Hantschel gemessenen mfi-Werte bei Karzinomen (kolorektales Karzinom, Lungen- und Pankreas Karzinom) liegen mit Werten zwischen 38 und 51 mfi (Hantschel et al., 2000) unter den mittleren mfi-Werten der Sarkome (95-175 mfi). Auch die von meiner Arbeitsgemeinschaft mit der gleichen technischen Ausstattung untersuchten Zellen von Karzinomen aus dem HNO-Bereich wiesen mit einer durchschnittlichen Fluoreszenzintensität von 32mfi (Standardfehler: 9) eine niedrigere Dichte membrangebundenen Hsp70 auf als Sarkome (unveröffentlichte Daten).

Das Osteosarkom ist der häufigste Knochentumor des Kindes- und Jugendalters (Freyschmidt et al., 2010) und wird neoadjuvant mit Chemotherapie behandelt. Das Überleben der Patienten hängt dabei vor allem vom Stadium der Erkrankung bei Diagnosestellung und der rechtzeitigen Erkennung von Rezidiven und Metastasen ab (Bielack et al., 2010). Zahlreiche experimentelle Arbeitsgemeinschaften untersuchen die biologischen Eigenschaften von Osteosarkomen mit dem Ziel, Fortschritte in der Therapie zu erreichen (Wachtel, Schäfer, 2010, Dai et al., 2011). Moon und Mitarbeiter wiesen immunhistochemisch eine hohe Hsp70-Expression in konventionellen Osteosarkomen nach (Moon et al., 2010). Alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysierten Osteosarkome waren Hsp70-membranpositiv mit durchschnittlich 61% positiven Zellen. Die untersuchten Osteosarkome exprimierten mehr membrangebundenes Hsp70 als das Chondro-, Lipo- und Ewing-Sarkom.

Ein Teil der Patienten erhielt vor Analyse der Gewebeproben eine neoadjuvante Chemotherapie nach dem EURAMOS-Schema und zeigte mit 69% positiven Zellen

eine höhere Hsp70-Membranexpression als Tumorproben unbehandelter Patienten (47% Hsp70-positive Zellen). Die unterschiedlich wirkenden Chemotherapeutika könnten als exogene Stress induzierende Faktoren eine erhöhte Hsp70-Expression aller Tumorzellen bewirken. Möglich ist aber auch, dass die Zellen mit einer niedrigeren Hsp70-Expression empfänglicher für die chemotherapeutische Wirkung waren und nur die Hsp70 stark exprimierenden, resistenten Zellen übrig blieben und somit selektioniert wurden. So würde eine hohe membrangebundene Hsp70-Expression für eine Chemotherapie-Resistenz sprechen. Von Didelot und Joly wurde bereits demonstriert, dass chemotherapieresistente Zellen eine hohe *intrazelluläre* Hsp70-Expression aufweisen (Didelot et al., 2007, Joly et al., 2010).

Die Graduierung von Tumoren anhand histologischer Merkmale korreliert mit der Aggressivität des Tumors, mit dessen Wahrscheinlichkeit zur Metastasierung und somit auch mit der Überlebenszeit (Gelderblom et al., 2008). Chondro- und Osteosarkome werden in vier Grade von 1 (gut differenziert) bis 4 (anaplastisch) eingeteilt (Freyschmidt et al., 2010). Die Hsp70-Membranexpression liegt bei G1-Sarkomen bei 34% membranpositiven Zellen und erhöht sich mit jedem Grad. Gewebeproben des Grades 4 zeigen 77% Hsp70-positive Zellen ($p < 0,05$ im T-Test). Moser konnte in seiner Dissertationsarbeit keine Korrelation zwischen einer Hsp70-Membranexpression und dem Grading kolorektaler Karzinome darstellen (Moser, 2005).

Bei einigen Patienten wurde sowohl bei der Biopsie als auch in zeitlichem Abstand während der Operation Gewebe entnommen und durchflusszytometrisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass sich der Anteil der Hsp70-membranpositiven Zellen in den Messungen der zwei Gewebeproben teilweise unterschied. Die entnommenen 1-2cm³ großen Gewebestücke können nicht die Biologie des gesamten Tumorpräparates repräsentieren, welches eine starke Heterogenität aufweisen kann: So kommen hochproliferierende Abschnitte mit Angiogenese, Bereiche mit hämorrhagischen und zystischen Degenerationen und teilweise vermehrter Bildung extrazellulärer Matrix neben nekrotischen, hypoxischen Gewebeabschnitten vor (Kumar et al., 2005). Der Zusammenhang zwischen Hypoxie und erhöhter Hsp70-Membranexpression wurde bereits mehrfach belegt (Schilling et al., 2009). Dies und weitere Phänomene der biologischen Tumoheterogenität könnten die Variabilität der gemessenen Hsp70-Membranexpression innerhalb eines Individuums erklären.

Die geringen Fallzahlen bei den Analysen einzelner Subgruppen lassen nur Aussagen über Tendenzen zu, sind aber angesichts der geringen Inzidenz von Knochensarkomen (0,8 pro 100.000 Personen, Freyschmidt et al., 2010) dennoch wertvoll und könnten in Zukunft im Rahmen größerer Studien mit gerichteter Fragestellung näher untersucht werden.

Experimente mit Zelllinien humaner Knochentumore bestätigten die im Rahmen dieser Arbeit gemessene Hsp70-Membranexpression humanen Primärmaterials auch im *in vitro* Modell. Kollegen meiner Arbeitsgruppe wiesen mittels Durchflusszytometrie 74% (± 5) Hsp70-membranpositive Zellen bei den Osteosarkomzelllinien SaOS, HOS und U2OS nach (unveröffentlichte Ergebnisse). Auch Grzesiak zeigte mittels Immunoblotting einen positiven Hsp70-Membranstatus der SaOS-Zelllinie (Grzesiak et al., 2005).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchflusszytometrisch analysierten Tumorgewebe wurden in Kultur gegeben und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie von Kollegen meiner Arbeitsgruppe untersucht. Auch mit diesem Verfahren konnte eine Hsp70-Membranexpression nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten).

In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass dem Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) nicht nur eine intrazelluläre zytoprotektive Rolle als Chaperon zukommt (Frydman et al., 2001, Hartl, Hayer-Hartl, 2002, Jones et al., 2011), sondern es auch tumorspezifisch auf der Zelloberfläche lokalisiert ist und immunmodulatorische Funktionen übernimmt (Janetzki et al., 2000, Asea et al., 2000, 2002, Shu, Huang, 2008, Joly et al., 2010).

Sarkome, Tumoren mesenchymalen Ursprungs, waren noch nicht auf eine mögliche Hsp70-Membranexpression untersucht worden und sind somit den diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten, die sich im Rahmen der immunologischen Eigenschaften des Hsp70 ergeben, bislang unzugänglich.

Diese Doktorarbeit befasste sich mit Tumoren mesenchymalen Ursprungs im Allgemeinen und mit Sarkomen im Speziellen, welche - wenn auch selten vorkommend - für die oft jungen Patienten trotz moderner Chemotherapieschemata und radikaler Chirurgie häufig eine infauste Prognose bedeuten (Bielack et al., 2009). Mittels durchflusszytometrischer Experimente konnte gezeigt werden, dass sowohl Tumorkulturzelllinien als auch humanes Tumor-Primärmaterial eine Hsp70-Membranexpression aufweisen. Auf Zellen gesunden Referenzgewebes konnte keine Hsp70-Oberflächenexpression detektiert werden. Diese Befunde lassen die Aussage zu, dass es sich bei der Hsp70-Membranexpression um ein tumorspezifisches Merkmal handelt. Zielstrukturen, die in normalen Zellen intrazellulär, auf entarteten Zellen jedoch membrangebunden exprimiert werden, haben eine große klinische Bedeutung, da sie Zielstrukturen für tumorspezifische „anticancer agents“ darstellen, die die Spezifität von Tumortherapien erhöhen und somit die Nebenwirkungen bei verbesserter Prognose senken (Weidle et al., 2011).

Im Serum von Sarkompatienten konnte eine Kollegin meiner Arbeitsgruppe einen im Vergleich zu gesunden Personen erhöhten Hsp70-Serumspiegel nachweisen (unveröffentlichte Ergebnisse). Dabei korrelierte das Vorkommen im Serum mit der im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemessenen Expression auf der Tumorzellmembran subgruppen- und entitätenspezifisch ($p < 0,001$). Der Tumor kann als Quelle des im Serum detektierten Hsp70 vermutet werden. Diese Korrelation ist von klinischer Relevanz, da somit eine risikoarm und schnell durchführbare Blutentnahme mit Serumdiagnostik eine durchflusszytometrische Hsp70-Analyse einer Gewebeprobe ersetzen könnte.

Somit bietet das Hitzeschockprotein 70 interessante diagnostische, therapeutische und prognostische Möglichkeiten:

Zum einen kann das **membranständige** Hsp70 Zielstruktur für Antikörpergekoppelte Radionuklide, Fluorochrome oder metallische Nanopartikel sein, welche mittels moderner bildgebender Verfahren nicht-invasiv eine Lokalisierung und Bestimmung biologischer Tumorparameter (Größe, Aktivität, Vaskularisation etc.) zulassen könnte (Ferro-Flores et al., 2010, Olafsen, Wu, 2010, Lee et al., 2010). Stangl markierte Hsp70-positive Kolonkarzinomzellen mit fluoreszenzmarkierten Hsp70-Antikörpern und konnte den Tumor somit intraoperativ darstellen (Stangl et al., 2011). Es ließ sich zeigen, dass der Antikörper-Hsp70-Komplex bei physiologischer Körpertemperatur tumorselektiv mittels Endozytose internalisiert wurde und sich intrazellulär anreicherte. Somit wurde im Mausmodell die Spezifität des Hsp70-Antikörpers *in vivo* gezeigt. Dies bietet die Möglichkeit, Hsp70 in Zukunft nicht nur diagnostisch sondern auch therapeutisch als tumorspezifisches Target für Antikörpergekoppelte Chemo- oder Radiotherapien zu nutzen (Stangl et al., 2011).

Des Weiteren dient das membranständige Hsp70 auch als Zielstruktur für das eigene Immunsystem (Abb.39). In Experimenten mit immundefizienten Mäusen konnte bereits nachgewiesen werden, dass injizierte NK-Zellen eine Tumorprogression Hsp70-positiver Karzinome verhindern (Multhoff et al., 2000, Moser et al., 2002). *In vitro* stimulierte NK-Zellen zeigten im *ex vivo* und *in vivo* Modell eine gesteigerte wachstumsinhibierende Wirkung (Multhoff et al., 2000, Elsner et al., 2007). In einer Phase-I-Studie zeigte sich bei 10 von 12 Karzinompatienten nach einer *ex vivo* Stimulation der eigenen, anschließend reinfundierten NK-Zellen mit dem Hsp70-Peptid *TKD* und Interleukin 2 ein biologisches Ansprechen. Zwei von fünf Patienten, die mehr als vier NK-Zelltherapiezyklen durchlaufen haben, wiesen ein klinisches Ansprechen auf (Krause et al., 2004). Hitzeschockprotein 70 als Erkennungsstruktur für eine spezifische Anti-Hsp70-Immunantwort, bietet eine vielversprechende Möglichkeit für eine adjuvante Immuntherapie z.B. mit NK-Zellen gegen Hsp70-positive Tumoren und Metastasen (Multhoff et al., 2000) oder mit Hsp70-spezifischen Antikörpern.

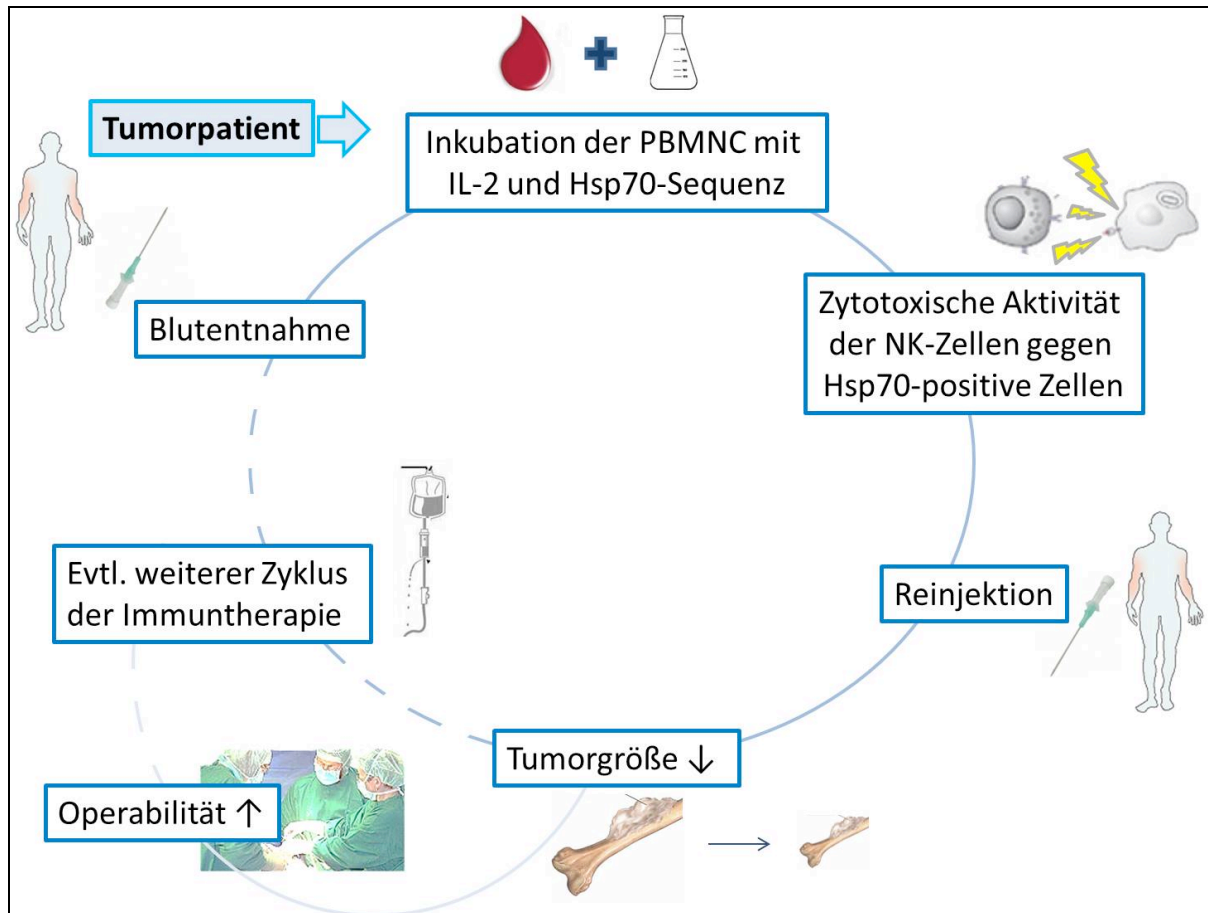


Abb.39 **Modell der NK-Zell-Therapie**: Aus dem Blut des Tumorpatienten gewonnene Lymphozyten werden mit der 14-Aminosäuren-Sequenz *TKD* des Hsp70-Proteins und low-dose Interleukin-2 (IL-2) inkubiert, wodurch NK-Zellen gegen Hsp70 als tumorspezifische Erkennungsstruktur stimuliert werden und eine zytotoxische Aktivität gegen Hsp70-positive Zellen entwickeln. Die gereinigten, aktivierten Zellen werden dem Patienten reinfundiert und bewirken eine Reaktion des Immunsystems gegen den Tumor und Metastasen: Der Tumor nimmt an Größe ab und ist einer operativen Therapie leichter zugänglich. Weitere Therapiezyklen mit kurativem Ziel können sich anschließen (nach Krause et al., 2004).

Zum anderen stimuliert das **lösliche** Hsp70 das Immunsystem, indem es als Träger immunogener Peptide auf antigenpräsentierenden Zellen eine Zytokin-Freisetzung bewirkt und zytotoxische T-Zellen aktiviert (Multhoff, 2009).

Ausblick

Eine Erhöhung der Fallzahl des Kollektivs in der Zukunft ist sinnvoll, um einzelne Entitäten und Subgruppen der Tumorpatienten spezifischer untersuchen zu können. Eine Weiterbeobachtung der Patienten des Kollektivs im 1-3-5-Jahresabstand mit Evaluierung klinischer Parameter, Rezidiven und Metastasen und Messung des Hsp70-Status im Serum kann der Frage nachgehen, ob Hsp70 ein Tumorwachstum verlässlich anzeigt und eine Aussage über die Prognose zulässt. Dabei muss vor allem der initiale Wert sowohl der Hsp70-membranpositiven Zellen der Tumorbiopsie als auch des im Serum vorhandenen löslichen Hsp70 mit dem Verlauf der Tumorerkrankung des jeweiligen Patienten in Zusammenhang gebracht werden. Somit könnte das lösliche Hsp70 mittels quantifizierender Messung des Serums eines Tumorpatienten Aussage über Größe, Aggressivität, Ansprechen auf eine Chemotherapie und die Prognose des Tumors geben und somit die Rolle eines Tumormarkers übernehmen (Abb.40).

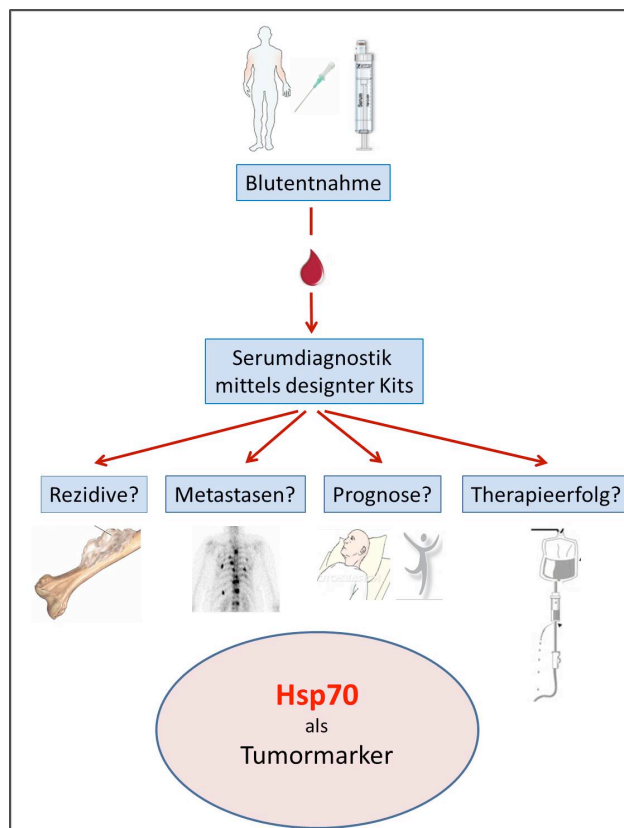


Abb.40 Modell: **Hsp70 als Tumormarker**. Mittels quantitativer Hsp70-Bestimmung im Serum von Sarkompatienten erfolgt ein Therapie-Monitoring: Der Hsp70-Wert könnte in Zukunft Auskunft über den Erfolg und das Ansprechen auf eine Chemotherapie geben und Rezidive und Metastasen anzeigen. Ausgangs- und Verlaufswerte könnten die Überlebenszeit prognostisch eingrenzen.

5 Anhang

5.1 Abkürzungsverzeichnis

aa	Amino acid (Aminosäure)
Abb.	Abbildung
AIF	Apoptosis inducing factor
APC	Allophycocyanin
BSA	Bovine Serum Albumine (Serumalbumin aus dem Rind)
C	Celsius
CaCl ₂	Calciumchlorid
CHIP	Carboxyl Terminus of Hsc70-Interacting Protein
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSA	Chondrosarkom
CT	Computertomogramm
DAPI	4'-6-Diamidin-2'-Phenylindol
Dest.	Destilliert
Diag.	Diagramm
Dist.	Distal
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ESA	Ewing-Sarkom
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FCS	Foetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward-Scatter (Vorwärtsstreulicht)
g	Gramm
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hip	Hsp70 interacting protein
Hop	Hsp70 organizing protein
Hsc	Konstitutives Hitzeschockprotein
HSF	Hitzeschockfaktoren
Hsp70	Hitzeschockprotein 70 = HSPA1A, Hsp70 auch als Plural- bzw. Genitivform

IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IL-2	Interleukin 2
k.A.	Keine Angabe
kDa	kiloDalton
Kap.	Kapitel
KT	Knochentumoren
mfi	Mean fluorescence intensity
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute(n)
Mio.	Million(en)
ml	Milliliter
mM	Millimolar (10^{-3} mol/L)
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
MOS	Maus-Osteosarkom-Zelllinie
MRI	Klinikum Rechts der Isar München
MRT	Magnetresonanztomogramm
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NOS	Non otherwise specified
NSCLC	Non-small cell lung cancer (Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom)
LJ	Lebensjahr
LSA	Liposarkom
OP	Operation
OS	Osteosarkom
P	Passage
Pat.	Patient
PBMNC	Peripheral blood mononuclear cell
PI	Propidiumiodid
PNET	Peripherer neuroektodermaler Tumor des Knochens
Prox.	Proximal
PSA	Pleomorphes Sarkom
rpm	Rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Zellkulturmedium (im Roswell Park Memorial Institute entwickelt)
RZT	Riesenzelltumor
SSC	Sideward-Scatter (Seitwärtsstreulicht)

Tab.	Tabelle
TKD-Peptid	14 Aminosäuren lange Sequenz der Substratbinde-Domäne des Hsp70
TLR	Toll-Like-Rezeptoren
vs.	versus
WT	Weichteiltumor
x	-fache Vergrößerung (50x =50-fache Vergrößerung am Mikroskop)
ZKF	Zellkulturflasche

5.2 Abbildungsverzeichnis

Nummer	Beschreibung	Quelle
Abb.1	Chondrosarkom, Röntgenbild	Björnsson et al., 1998
Abb.2	Osteosarkom, Röntgenbild	Erlemann, Wörtler, 2005
Abb.3	Chondrosarkom, MRT	Björnsson et al., 1998
Abb.4	Riesenzelltumor, Röntgenbild	Erlemann, Wörtler, 2005
Abb.5	Osteosarkom, Makroskopisches Bild	Erhalten von PD Dr. Weirich, Institut für Pathologie der TU München
Abb.6	Osteosarkom, HE-Färbung, 200x	Glatz-Krieger, 2004, ©Patho Pic, Präparat 146/JK4
Abb.7	Chondrosarkom, HE-Färbung, 50x	Glatz-Krieger, 2004, ©Patho Pic, Präparat 145/JK4
Abb.8	Ewing-Sarkom, HE-Färbung, 50x	Glatz-Krieger, 2004, ©Patho Pic, Präparat 142/JK4
Abb.9	Liposarkom, HE-Färbung, 630x	Glatz-Krieger, 2004, ©Patho Pic, Präparat 143/JK4
Abb.10	Enchondrom, HE-Färbung	Freyschmidt et al., 2010
Abb.11	Riesenzelltumor, HE-Färbung	Freyschmidt et al., 2010
Abb.12	Strukturmodell Hsp70	Wisniewska et al., 2010 und Sondermann et al., 2001
Abb.13	Lungenkarzinom – Hsp70 Membranstatus mit Überlebenskurve	Pfister et al., 2007

Abb.14a	Tumorstück mit Skalpell	Eigene Aufnahme, Foto
Abb.14b	Zellsuspension mit Sieb	Eigene Aufnahme, Foto
Abb.15	Neubauer Zählkammer	Eigene Aufnahme, Mikroskop
Abb.16	Dotplot (PI-FSC)	Eigene FACS-Analyse
Abb.17	Markersetzung am Isotyp	Eigene FACS-Analyse
Abb.18	Hsp70-Färbung (rot) und Isotyp	Eigene FACS-Analyse
Abb.19	Region 2	Eigene FACS-Analyse
Abb.20	Region 1	Eigene FACS-Analyse
Abb.21	Markersetzung am Isotyp	Eigene FACS-Analyse
Abb.22	Hsp70-Färbung (rot) und Isotyp	Eigene FACS-Analyse
Abb.23	Annexin- und PI-Färbung	Eigene FACS-Analyse
Abb.24a	Linie 62, Tag 2	Eigene Aufnahme, Durchlicht, 100x
Abb.24b	Linie 62, Tag 3	Eigene Aufnahme, Phasenkontrast, 100x, Maßstab wie in Abb.24a
Abb.24c	Linie 62, Tag 4	Eigene Aufnahme, Phasenkontrast, 100x, Maßstab wie in Abb.24a
Abb.25	Linie 162, Tag 4	Eigene Aufnahme, Durchlicht, 100x, Maßstab wie in Abb.24a
Abb.26a	Linie 306, Tag 4	Eigene Aufnahme, Phasenkontrast, 100x, Maßstab wie in Abb.24a
Abb.26b	Linie 306, Tag 4	Eigene Aufnahme, Phasenkontrast, 200x
Abb.27	Linie 679, Tag 4	Eigene Aufnahme, Durchlicht, 100x, Maßstab wie in Abb.24a
Abb.28	Linie 1189, Tag 3	Eigene Aufnahme, Phasenkontrast, 100x, Maßstab wie in Abb.24a
Abb.29	Linie 1929, Tag 3	Eigene Aufnahme, Phasenkontrast, 100x, Maßstab wie in Abb.24a
Abb.30	Hsp70-Membranexpression verschiedener Mausosteosarkomzelllinien (FACS)	Eigene FACS-Analysen
Abb.31a	Linie 162 Hsp70-Färbung	Eigene Aufnahme, IF, 200x

Abb.31b	Linie 162 Isotyp-Kontrolle	Eigene Aufnahme, IF, 200x
Abb.31c	Linie 679 Hsp70-Färbung	Eigene Aufnahme, IF, 400x
Abb.31d	Linie 679 Isotypkontrolle	Eigene Aufnahme, IF, 400x
Abb.31e	Linie 306 Hsp70-Färbung	Eigene Aufnahme, IF, 200x
Abb.31f	Linie 306 Isotypkontrolle	Eigene Aufnahme, IF, 200x
Abb.31g	Linie 306 Durchlicht, Hsp70-Färbung	Eigene Aufnahme, IF, Durchlicht, 200x
Abb.31h	Linie 306 Durchlicht, Isotyp	Eigene Aufnahme, IF, Durchlicht, 200x
Abb.32a	Verunreinigte ZKF, Apoptose	Eigene Aufnahme, Durchlicht, 50x
Abb.32b	Verunreinigte ZKF	Eigene Aufnahme, Durchlicht, 50x, Maßstab wie in Abb.32a
Abb.32c	Verunreinigte ZKF, Erythrozyten	Eigene Aufnahme, Durchlicht, 50x, Maßstab wie in Abb.32a
Abb.32d	Verunreinigte ZKF	Eigene Aufnahme, Durchlicht, 50x, Maßstab wie in Abb.32a
Abb.33a	Fibroblasten	Eigene Aufnahme, Phasenkontrast, 50x
Abb.33b	Einzelne Fibroblasten	Eigene Aufnahme, Durchlicht, 100x
Abb.33c	Fibroblasten	Eigene Aufnahme, Phasenkontrast, 50x, Maßstab wie in Abb.33a
Abb.33d	Fibroblasten	Eigene Aufnahme, Phasenkontrast, 50x, Maßstab wie in Abb.33a
Abb.34a	Auswachsende Zellen	Eigene Aufnahme, Phasenkontrast, 50x
Abb.34b	Auswachsende Zellen	Eigene Aufnahme, Durchlicht, 50x, Maßstab wie in Abb.34a
Abb.34c	Auswachsende Zellen	Eigene Aufnahme, Durchlicht, 50x, Maßstab wie in Abb.34a
Abb.35a	Chondrosarkom, Tag 22, P0	Eigene Aufnahme, Phasenkontrast, 100x
Abb.35b	Chondrosarkom, Tag 55, P2	Eigene Aufnahme, Durchlicht, 100x, Maßstab wie in Abb.35a
Abb.35c	Chondrosarkom, Tag 68, P4	Eigene Aufnahme, Durchlicht, 100x, Maßstab wie in Abb.35a
Abb.35d	Chondrosarkom, Tag 83, P8	Eigene Aufnahme, Phasenkontrast, 100x, Maßstab wie in Abb.35a

Abb.35e	Chondrosarkom, Tag 97, P9	Eigene Aufnahme, Phasenkontrast, 50x
Abb.35f	Chondrosarkom, HE-Färbung, 200x	Glatz-Krieger, 2004, ©Patho Pic, Präparat 145/JK4
Abb.36a	Riesenzelltumor, Tag 32, P0	Eigene Aufnahme, Phasenkontrast, 50x
Abb.36b	Riesenzelltumor, Tag 56, P1	Eigene Aufnahme, Phasenkontrast, 50x, Maßstab wie in Abb.36a
Abb.36c	Riesenzelltumor, Tag 67, P2	Eigene Aufnahme, Phasenkontrast, 100x
Abb.36d	Riesenzelltumor, Tag 83, P3	Eigene Aufnahme, Phasenkontrast, 100x, Maßstab wie in Abb.36c
Abb.36e	Riesenzelltumor, Tag 99, P5	Eigene Aufnahme, Phasenkontrast, 100x, Maßstab wie in Abb.36c
Abb.36f	Riesenzelltumor, Tag 141, P6	Eigene Aufnahme, Phasenkontrast, 50x, Maßstab wie in Abb.36a
Abb.36g	Riesenzelltumor, Gewebeschnitt, HE-Färbung	Erhalten von Dr. Specht, Institut für Pathologie der TU München
Abb.37a	Osteosarkom, Tag 13, P0	Eigene Aufnahme, Phasenkontrast, 50x
Abb.37b	Osteosarkom, Tag 39, P0	Eigene Aufnahme, Phasenkontrast, 100x
Abb.37c	Osteosarkom, Tag 49, P3	Eigene Aufnahme, Phasenkontrast, 100x, Maßstab wie in Abb.37b
Abb.37d	Osteosarkom, Tag 64, P5	Eigene Aufnahme, Phasenkontrast, 100x, Maßstab wie in Abb.37b
Abb.37e	Osteosarkom, Tag 88, anderer Pat.	Eigene Aufnahme, Durchlicht, 100x, Maßstab wie in Abb.37b
Abb.37f	Osteosarkom, HE-Färbung, 400x	Glatz-Krieger, 2004, ©Patho Pic, Präparat 146/JK4
Abb.38a	Nicht auswertbare FACS-Analyse	Eigene FACS-Analyse (Osteosarkompatientin)
Abb.38b	Auswertbare FACS-Analyse	Eigene FACS-Analyse (Osteosarkompatient)
Abb.39	Schaubild „NK-Zell-Therapie“	Eigener Entwurf
Abb.40	Schaubild „Tumormarker“	Eigener Entwurf

5.3 Tabellenverzeichnis

Nummer	Beschreibung	Quelle
Tab.1	WHO-Klassifikation der Knochentumoren, Lyon 2002	Freyschmidt et al., 2010
Tab.2	Definitionen (WHO-Klassifikation) ausgewählter Entitäten	Freyschmidt et al., 2010
Tab.3	Epidemiologische Daten ausgewählter Entitäten	Nach den Angaben des Baseler Knochentumor-Referenzzentrums (Böcker et al., 2004) und den Daten von Dahlin und Schajowitz (Freyschmidt et al., 2010)
Tab.4	Verteilung verschiedener Sarkomentitäten im Skelett mit Lokalisation im Knochen	Nach den Angaben des Baseler Knochentumor-Referenzzentrums (Böcker et al., 2004) und den Daten von Freyschmidt (Freyschmidt et al., 2010)
Tab.5	Radiologische Diagnosekriterien ausgewählter Entitäten	Niethard, Pfeil, 2005 und Freyschmidt et al., 2010
Tab.6	Makroskopische und histopathologische Diagnosekriterien ausgewählter Entitäten	Nach den Daten des Baseler Knochentumor-Referenzzentrums (Böcker et al., 2004)
Tab.7	Staging der Knochentumoren	Nach Enneking 1985 (Erlemann, Wörtler, 2005)
Tab.8	Therapiemöglichkeiten ausgewählter Entitäten	Nach den Daten des Baseler Knochentumor-Referenzzentrums (Böcker et al., 2004) und Angaben von Dalal (Dalal et al., 2008)
Tab.9	Aufteilung des Patientenkollektivs	Eigene Zusammenstellung
Tab.10	Outcome der humanen Zellkultur	Eigene Zusammenstellung
Tab.11a+b	Übersicht FACS-Auswertungen	Eigene Zusammenstellung

5.4 Danksagung

Ausdrücklicher Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. Gabriele Multhoff, Leiterin der Experimentellen Radioonkologie und Strahlentherapie des Klinikums Rechts der Isar München, für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit, die hervorragende Betreuung und die vielen anregenden Gespräche. Die Arbeit mit ihr hat meine wissenschaftlichen und experimentellen Erfahrungen enorm bereichert.

Besonders möchte ich mich bei Dr. Mathias Gehrmann bedanken, der mir immer zuverlässig mit offenem Ohr und wertvollen, praktischen Tipps zur Seite stand und mich stets mit positiver Kritik motivierte.

Des Weiteren danke ich den Orthopäden Dr. Ingo Banke und Dr. Peter Prodingler für die gute und effiziente Zusammenarbeit, wodurch das humane Primärmaterial der Tumorpatienten für meine experimentellen Untersuchungen zahlreich und frisch zur Verfügung stand.

Ich bedanke mich bei Priv.-Doz. Dr. Katja Specht und Priv.-Doz. Dr. Gregor Weirich vom Institut für Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie der Technischen Universität München für die freundliche Überlassung von makroskopischem und mikroskopischem Bildmaterial meiner Patienten.

Ebenso danke ich Dr. Rosemann für die gute Zusammenarbeit und Überlassung der Mausosteosarkomzelllinien.

Großer Dank gilt auch all meinen Laborkollegen, die mich professionell in die angewandten Arbeitsmethoden eingewiesen haben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Ich habe sehr gerne mit ihnen zusammen gearbeitet.

Schließlich gebührt großer Dank all den Patienten, die trotz der Sorge um ihre Krankheit und den Unannehmlichkeiten zur Biopsie- und Blutentnahme bereit waren.

Außerdem danke ich meinen Kommilitoninnen Kristin Kuhs und Kathrin Hube, die mich nicht nur im Studium, sondern auch bei der Arbeit im Labor in enger Freundschaft begleiteten.

Zuletzt gilt der Dank meiner Familie und meinen Freunden, besonders meinen lieben Eltern, die mir stets bei der Verwirklichung meiner Ziele zur Seite stehen; ohne ihr Interesse, ihre Kritik und hilfreiche Unterstützung während meines Studiums wäre diese Arbeit nicht entstanden.

5.5 Literaturverzeichnis

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.

Isolating cells and growing them in culture, cells can be isolated from a tissue suspension and separated into different types.

In: "Molecular Biology of the Cell", Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (Hrsg.)

Garland Science, New York - London, 2002, 4. Auflage, Teil III, Kapitel 8, 469-78

Altmeyer, A., Maki, R.G., Feldweg, A.M., Heike, M., Protopopov, V.P., Masur, S.K., Srivastava, P.K.

Tumor-specific cell surface expression of the -KDEL containing, endoplasmic reticular heat shock protein gp96.

Int. J. Cancer. 69 (1996) 340-9

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

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

J. Immunol. 162 (1999) 3757-60

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

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

Nat. Med. 6 (2000) 435-42

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

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

J. Biol. Chem. 277 (2002) 15028-34

Basu, S., Srivastava, P.K.

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

Cell Stress Chaperones. 5 (2000) 443-51

Beniash, E.

Biomaterials-hierarchical nanocomposites: the example of bone.

Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol. 3 (2011) 47-69

Bielack, S., Jürgens, H., Jundt, G., Kevric, M., Kühne, T., Reichardt, P., Zoubek, A., Werner, M., Winkelmann, W., Kotz, R.

Osteosarcoma: the COSS experience.

Cancer Treat. Res. 152 (2009) 289-308

Björnsson, J., McLeod, R.A., Unni, K.K., Ilstrup, D.M., Pritchard, D.J.

Primary chondrosarcoma of long bones and limb girdles.

Cancer. 83 (1998) 2105-19

Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph.U. (Hrsg.)

Pathologie.

Urban&Fischer, München, 2004, 3. Auflage

Botzler, C., Issels, R., Multhoff, G.

Heat-shock protein 72 cell-surface expression on human lung carcinoma cells is associated with an increased sensitivity to lysis mediated by natural killer cells.

Cancer Immunol. Immunother. 43 (1996) 226-30

Botzler, C., Li, G., Issels, R., Multhoff, G.

Definition of extracellular localized epitopes of Hsp70 involved in an NK immune response.

Cell Stress Chaperones. 3 (1998) 6-11

Botzler, C., Ellwart, J., Günther, W., Eissner, G., Multhoff, G.

Synergistic effects of heat and ET-18-OCH₃ on membrane expression of hsp70 and lysis of leukemic K562 cells.

Exp. Hematol. 27 (1999) 470-8

Bramer, J.A.M., Abudu, A.A., Grimer, R.J., Carter, S.R., Tillman, R.M.

Do pathological fractures influence survival and local recurrence rate in bony sarcomas?

Eur. J. Cancer. 43 (2007) 1944-51

Bukau, B., Horwich, A.L.

The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines.

Cell. 92 (1998) 351-66

Carter, N.P., Ormerod, M.G.

Introduction to the principles of flow cytometry.

In: „Flow cytometry“, Ormerod, M.G. (Hrsg.)

Oxford University press, Oxford, 2000, 3.Auflage, 1-22

Cooper, G. M.

The cell - a molecular approach. The development and causes of cancer, properties of cancer cells.

Sinauer Associates, Inc., Sunderland, 2000, 2. Auflage, Teil IV, Kapitel 15

Csermely, P.

A nonconventional role of molecular chaperones: involvement in the cytoarchitecture.

News Physiol. Sci. 16 (2001) 123-6

Dai, X., Ma, W., He, X., Jha, R.K.

Review of therapeutic strategies for osteosarcoma, chondrosarcoma, and Ewing's sarcoma.

Med. Sci. Monit. 17 (2011) 177-190

Dalal, K.M., Antonesu, C.R., Singer, S.

Diagnosis and management of lipomatous tumors.

J. Surg. Oncol. 97 (2008) 298-313

De Maio, A.

Heat shock proteins: Facts, thoughts, and dreams.

Shock. 11 (1999) 1-12

De Maio, A.

Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa.

Cell Stress Chaperones. 16 (2011) 235-49

Deighton, R.F., McGregor, R., Kemp, J., McCulloch, J., Whittle, I.R.

Glioma pathophysiology: insights emerging from proteomics.

Brain Pathol. 20 (2010) 691-703

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

Weichteilsarkome des Erwachsenen.

([http://www.medizin.uni-](http://www.medizin.uni-tuebingen.de/uktmedia/Einrichtungen/Zentren/Tumorzentrum/PDF_Archiv-p-765/Therapieempfehlungen/TLL_Weichteilsarkome_DGHO_2006_06_28.pdf)

[tuebingen.de/uktmedia/Einrichtungen/Zentren/Tumorzentrum/PDF_Archiv-p-765/Therapieempfehlungen/TLL_Weichteilsarkome_DGHO_2006_06_28.pdf](http://www.medizin.uni-tuebingen.de/uktmedia/Einrichtungen/Zentren/Tumorzentrum/PDF_Archiv-p-765/Therapieempfehlungen/TLL_Weichteilsarkome_DGHO_2006_06_28.pdf))

Stand: 12.01.2012

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

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

Curr. Med. Chem. 14 (2007) 2839-47

Erlemann, R., Wörtler, K.

Knochtumoren.

In: „Handbuch diagnostischer Radiologie, Muskuloskelettales System 2“, Stäbler, A., Freyschmidt, J. (Hrsg.)

Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg, 2005, 1. Auflage, 125-326

Elsner, L., Muppala, V., Gehrman, M., Lozano, J., Malzahn, D., Bickeböller, H., Brunner, E., Zientkowska, M., Herrmann, T., Walter, L., Alves, F., Multhoff, G., Dressel, R.

The heat shock protein HSP70 promotes mouse NK cell activity against tumors that express inducible NKG2D ligands.

J. Immunol. 179 (2007) 5523-33

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

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

Melanoma Res. 13 (2003) 147-52

Feige, U., Polla, B.S.

Hsp70 – a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications.
Experientia. 50 (1994) 979-86

Ferrarini, M., Heltai, S., Zocchi, M.R., Rugarli, C.

Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells.
Int. J. Cancer. 51 (1992) 613-9

Ferro-Flores, G., Ramírez, Fde M., Meléndez-Alafort, L., Santos-Cuevas, C.L.

Peptides for in vivo target-specific cancer imaging.
Mini. Rev. Med. Chem. 10 (2010) 87-97

Florijn, R.J., Slats, J., Tanke, H.J., Raap, A.K.

Analysis of antifading reagents for fluorescence microscopy.
Cytometry. 19 (1995) 177-82

Frelinger, J., Ottinger, J., Gouttefangeas, C., Chan, C.

Modeling flow cytometry data for cancer vaccine immune monitoring.
Cancer Immunol. Immunother. 59 (2010) 1435-41

Freyschmidt J., Ostertag H., Jundt G.

Knochentumoren.

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

Frydman, J.

Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones.
Annu. Rev. Biochem. 70 (2001) 603-47

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

Role of Hsp70 in regulation of stress-kinase JNK: implications in apoptosis and aging.
FEBS Lett. 438 (1998) 1-4

Gehrmann, M., Liebisch, G., Schmitz, G., Anderson, R., Steinem, C., De Maio, A., Pockley, G., Multhoff, G.

Tumor-specific Hsp70 plasma membrane localization is enabled by the glycosphingolipid Gb3.

PLoS One. 3 (2008) e1925

Gehrmann, M., Radons, J., Molls, M., Multhoff, G.

The therapeutic implications of clinically applied modifiers of heat shock protein (Hsp70) expression by tumor cells.

Cell Stress Chaperones. 13 (2008) 1-10

Gelderblom, H., Hogendoorn, P.C., Dijkstra, S.D., van Rijswijk, C.S., Krol, A.D., Taminiau, A.H., Bovée, J.V.

The clinical approach towards chondrosarcoma.

Oncologist. 13 (2008) 320-9

Giffard, R.G., Han, R.Q., Emery, J.F., Duan, M., Pittet, J.F.

Regulation of apoptotic and inflammatory cell signaling in cerebral ischemia: the complex roles of heat shock protein 70.

Anesthesiology. 109 (2008) 339-48

Glatz-Krieger, K. (2004)

Institut für Pathologie Basel. Pathologie-Präparate.

(<http://alf3.urz.unibas.ch/hipaku/stud/frame?l=bs&s=2>)

Stand: 12.01.2012

Godley, K., Watts, A.C., Robb J.E.

Pathological femoral fracture caused by primary bone tumour: a population-based study.

Scott. Med. J. 56 (2011) 5-9

Grzesiak, J.J., Smith, K.C., Chalberg, C., Truong, C., Burton, D.W., Deftos, L.J., Bouvet, M.

Heat shock protein-70 expressed on the surface of cancer cells binds parathyroid hormone-related protein in vitro.

Endocrinology. 146 (2005) 3567-76

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

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

Novartis Found Symp. 291 (2008) 59-68

Guzhova, I., Margulis, B.

Hsp70 chaperone as a survival factor in cell pathology.

Int. Rev. Cytol. 254 (2006) 101-49

Haas, I.G.

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

Experientia. 50 (1994) 1012-20

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

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

Cell Stress Chaperones. 5 (2000) 438-42

Harrison, C.J., Hayer-Hartl, M., Di Liberto, M., Hartl, F.U., Kuriyan, J.

Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK.

Science. 276 (1997) 431-5

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

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

Science. 295 (2002) 1852-8

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

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

Cell Prolif. 33 (2000) 341-65

Höhfeld, J., Jentsch, S.

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

EMBO J. 16 (1997) 6209-16

Höhfeld, J., Cyr, D.M., Patterson, C.

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

EMBO Rep. 2 (2001) 885-90

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

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

EMBO J. 17 (1998) 6124-34

Jäättelä, M.

Escaping cell death: survival proteins in cancer.

Exp. Cell Res. 248 (1999) 30-43

Janetzki, S., Palla, D., Rosenhauer, V., Lochs, H., Lewis, J.J., Srivastava, P.K.

Immunization of cancer patients with autologous cancer-derived heat shock protein gp96 preparations: a pilot study.

Int. J. Cancer. 88 (2000) 232-8

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

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

J. Cell Biol. 156 (2002) 775-81

Joly, A.L., Wettstein, G., Mignot, G., Ghiringhelli, F., Garrido, C.

Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity.

J. Innate Immun. 2 (2010) 238-47

Jones, Q., Voegeli, T.S., Li, G., Chen, Y., Currie, R.W.

Heat shock proteins protect against ischemia and inflammation through multiple mechanisms.

Inflamm. Allergy Drug Targets. 10 (2011) 247-59

Jundt G. (1997)

Knochen tumoren - Ursachen, Symptome, Diagnose, Behandlung, Heilungschancen - Eine Information der Krebsliga.

Knochentumor-Referenzzentrum Basel

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

Stand: 12.01.2012

Jung, S., Kasper, B.

Palifosfamid, a bifunctional alkylator for the treatment of sarcomas.

IDrugs. 13 (2010) 38-48

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

Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins.

Cell Stress Chaperones. 14 (2009) 105-11

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

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

Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 57 (2003) 820–6

Krause, S.W., Gastpar, R., Andreesen, R., Gross, C., Ullrich, H., Thonigs, G., Pfister, K., Multhoff, G.

Treatment of colon and lung cancer patients with ex vivo heat shock protein 70-activated, autologous natural killer cells: a clinical phase I trial.

Clin. Cancer Res. 10 (2004) 3699-707

Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N.

Bones, Joints, and Soft Tissue Tumors.

In: „Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease“, Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. (Hrsg.)

Elsevier, Philadelphia, 2005, 7. Auflage, 1295

Lasserre, A., Blohm, L.

Kurzlehrbuch Radiologie.

Urban & Fischer Verlag, München – Jena, 2003, 3. Auflage

Lee, S., Xie, J., Chen, X.

Peptide-based probes for targeted molecular imaging.

Biochemistry. 49 (2010) 1364-76

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Damell, J.E.

Growth of animal cells in culture.

In: „Molecular cell biology“, Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Damell, J.E. (Hrsg.)

W.H. Freeman, New York, 2000, 4. Auflage, Kapitel 6.2

Lindquist, S.

The heat-shock response.

Annu. Rev. Biochem. 55 (1986) 1151-91

Lindquist, S., Craig, E.A.

The heat-shock proteins.

Annu. Rev. Genet. 22 (1988) 631-77

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

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

J. Immunol. 177 (2006) 7849-57

Markopoulos, A.K., Deligianni, E., Antoniadis, D.Z.

Heat shock protein 70 membrane expression in oral cancer: a possible new target in antineoplastic therapy?

Chemotherapy. 55 (2009) 211-4

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

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

Mol. Cell Biol. 18 (1998) 5091-8

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

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

Mol. Cell Biol. 21 (2001) 7163-71

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

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

Nat. Cell Biol. 3 (2001) 100-5

Ménoret, A., Chandawarkar, R.Y., Srivastava, P.K.

Natural autoantibodies against heat-shock proteins hsp70 and gp96: implications for immunotherapy using heat-shock proteins.

Immunology. 101 (2000) 364-70

Merchant, T.E., Kushner, B.H., Sheldon, J.M., LaQuaglia, M., Healey, J.H.

Effect of low-dose radiation therapy when combined with surgical resection for Ewing sarcoma.

Med. Pediatr. Oncol. 33 (1999) 65-70

Messerschmitt, P.J., Garcoa, R.M., Abdul-Karim, F.W., Freenfield, E.M., Getty, P.J.

Osteosarcoma.

J. Am. Acad. Orthop. Surg. 17 (2009) 515-27

Moon, A., Bacchini, P., Bertoni, F., Olvi, L.G., Santini-Araujo, E., Kim, Y.W., Park, Y.K.

Expression of heat shock proteins in osteosarcomas.

Pathology. 42 (2010) 421-5

Morimoto, R.I.

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

Genes Dev. 12 (1998) 3788-96

Moser, C., Schmidbauer, C., Gürtler, U., Gross, C., Gehrmann, M., Thonigs, G., Pfister, K., Multhoff, G.

Inhibition of tumor growth in mice with severe combined immunodeficiency is mediated by heat shock protein 70 (Hsp70)-peptide-activated, CD94 positive natural killer cells.

Cell Stress Chaperones. 7 (2002) 365-73

Moser C.

Korrelation der Heat Shock Protein (Hsp) 70-Membranexpression mit klinisch-pathologischen Parametern bei Kolorektalen Karzinomen.

Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg, 2005

Mulder, R.L., Paulides, M., Langer, T., Kremer, L.C., van Dalen, E.C.

Cyclophosphamid versus ifosfamide for paediatric and young adult bone and soft tissue sarcoma patients.

Cochrane Database Syst. Rev. 17 (2010) CD006300

Multhoff, G., Botzler, C., Wiesnet, M., Müller, E., Meier, T., Wilmanns, W., Issels, R.

A stress-inducible 72-kDa heat shock protein (Hsp72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells.

Int. J. Cancer. 61 (1995) 272-9

Multhoff, G., Botzler, C., Jenne, L., Schmidt, J., Ellwart, J., Issels, R.

Heat shock protein 72 on tumor cells: a recognition structure for natural killer cells.

J. Immunol. 158 (1997) 4341-50

Multhoff, G., Pfister, K., Botzler, C., Jordan, A., Scholz, R., Schmetzer, H., Burgstahler, R., Hiddemann, W.

Adoptive transfer of human natural killer cells in mice with severe combined immunodeficiency inhibits growth of Hsp70-expressing tumors.

Int. J. Cancer. 88 (2000) 791-7

Multhoff, G., Pfister, K., Gehrman, M., Hantschel, M., Gross, C., Hafner, M., Hiddemann, W.

A 14-mer Hsp70 peptide stimulates natural killer (NK) cell activity.

Cell Stress Chaperones. 6 (2001) 337-44

Multhoff, G.

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

Methods. 43 (2007) 229-37

Multhoff, G.

Activation of natural killer cells by heat shock protein 70.

Int. J. Hyperthermia. 25 (2009) 169-75

Multhoff, G., Hightower, L.E.

Distinguishing integral and receptor-bound heat shock protein 70 (Hsp70) on the cell surface by Hsp70-specific antibodies.

Cell Stress Chaperones. 16 (2011) 251-5

Nevo, Z., Beit-Or, A., Eliam, Y.

Slowing down aging of cultured embryonal chick chondrocytes by maintenance under lowered oxygen tension.

Mech. Ageing Dev. 45 (1988) 157-65

Niethard, F.U., Pfeil, J.

Orthopädie.

Thieme, Stuttgart, 2005, 5. Auflage

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

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

J. Biochem. 137 (2005) 551-5

Olafsen, T., Wu, A.M.

Antibody vectors for imaging.

Semin. Nucl. Med. 40 (2010) 167-81

Papagelopoulos, P.J., Mavrogenis A.F., Savvidou O.D., Benetos I.S., Galanis, E.C., Soucacos, P.N.

Pathological fractures in primary bone sarcomas.

Injury. 39 (2008) 395-403

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

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

Cancer. 15 (2007) 926-35

Piselli, P., Vendetti, S., Poccia, F., Cicconi, R., Mattei, M., Bolognesi, A., Stirpe, F., Colizzi, V.

In vitro and in vivo efficacy of heat shock protein specific immunotoxins on human tumor cells.

J. Biol. Regul. Homeost. Agents. 9 (1995) 55-62

Pockley, A.G., Multhoff, G.

Cell stress proteins in extracellular fluids: friend or foe?

Novartis Found Symp. 291 (2008) 86-95

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

Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor.

Nat. Cell Biol. 3 (2001) 839-43

Riede, U.N., Walch, A., Wiestler, O.D.

Autonomes Wachstum (Tumorpathologie).

In: „Allgemeine und spezielle Pathologie“, Riede, U.N., Werner, M., Schäfer, H.E. (Hrsg.)

Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York, 2004, 5.Auflage, 338-85

Rosemann, M., Kuosaitė, V., Kremer, M., Favor, J., Quintanilla-Martinez, L., Atkinson, M.J.

Multilocus inheritance determines predisposition to alpha-radiation induced bone tumourigenesis in mice.

Int. J. Cancer. 118 (2006) 2132-8

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

Stress proteins and immunity mediated by cytotoxic T lymphocytes.

Curr. Opin. Immunol. 11 (1999) 109-13

Schilling, D., Gehrman, M., Steinem, C., De Maio, A., Pockley, A.G., Abend, M., Molls, M., Multhoff, G.

Binding of heat shock protein 70 to extracellular phosphatidylserine promotes killing of normoxic and hypoxic tumor cells.

FASEB J. 23 (2009) 2467-77

Sherman, M., Multhoff, G.

Heat shock proteins in cancer.

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

Sheth, D.S., Yasko A.W., Johnson M.E., Ayala A.G., Murray, J.A., Romsdahl, M.M.

Chondrosarcoma of the pelvis. Prognostic factors of 67 treated with definitive surgery.

Cancer. 78 (1996) 745-50

Shin, B.K., Wang, H., Yim, A.M., Le Naour, F., Brichory, F., Jang, J.H., Zhao, R., Purvas, E., Tra, J., Michael, C.W., Misek, D.E., Hanash, S.M.

Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function.

J. Biol. Chem. 278 (2003) 7607-16

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

HSP70s: From tumor transformation to cancer therapy.

Clin. Med. Oncol. 2 (2008) 335-45

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

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

J. Exp. Med. 191 (2000) 1965-74

Sondermann, H., Scheufler, C., Schneider, C., Hohfeld, J., Hartl, F.U., Moarefi, I.

Structure of a Bag/Hsc70 complex: convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors.

Science. 291 (2001) 1553-7

Srivastava, P.K.

Heat shock proteins in immune response to cancer: the fourth paradigm.

Experientia. 50 (1994) 1054-60

Stangl, S., Gehrmann, M., Dressel, R., Alves, F., Dullin, C., Themelis, G., Ntziachristos, V., Staeblein, E., Walch, A., Winkelmann, I., Multhoff G.

In vivo imaging of CT26 mouse tumors by using cmHsp70.1 monoclonal antibody.

J. Cell. Mol. Med. 15 (2011) 874-87

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

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

Experientia. 50 (1994) 1002-11

Tamura, Y., Tsuboi, N., Sato, N., Kikuchi, K.

70 kDa heat shock cognate protein is a transformation-associated antigen and a possible target for the host's anti-tumor immunity.

J. Immunol. 151 (1993) 5516-24

Terlecky, S.R.

Hsp70s and lysosomal proteolysis.

Experientia. 50 (1994) 1021-5

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

Facets of heat shock protein 70 show immunotherapeutical potential.

Immunology. 110 (2003) 1-9

Udono, H., Srivastava, P.K.

Comparison of tumor-specific immunogenicities of stress-induced proteins GP96, Hsp90 and Hsp70.

J. Immunol. 152 (1994) 5398-403

Vega, V.L., Rodríguez-Silva, M., Frey, T., Gehrmann, M., Diaz, J.C., Steinem, C., Multhoff, G., Arispe, N., De Maio, A.

Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages.

J. Immunol. 180 (2008) 4299-307

Wachtel, M., Schäfer, B.W.

Targets for cancer therapy in childhood sarcomas.

Cancer Treat. Rev. 36 (2010) 318-27

Walden, M.J., Murphey, M.D., Vidal, J.A.

Incidental enchondromas of the knee.

AJR Am. J. Roentgenol. 190 (2008) 1611-5

Wei, Y.Q., Zhao, X., Kariya, Y., Teshigawara, K., Uchida, A.

Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by abrogation of heat-shock protein (HSP) 70 expression in tumor cells.

Cancer Immunol. Immunother. 40 (1995) 73-8

Weidle, U.H., Maisel, D., Klostermann, S., Schiller, C., Weiss, E.H.

Intracellular proteins displayed on the surface of tumor cells as targets for therapeutic intervention with antibody-related agents.

Cancer Genomics Proteomics. 8 (2011) 49-63

Welsch, U.

Sobotta Atlas Histologie.

Urban & Fischer, München - Jena, 2002, 6. Auflage

Wisniewska, M., Karlberg, T., Lehtiö, L., Johansson, I., Kotenyova, T., Moche, M., Schüler, H.

Crystal structures of the ATPase domains of four human Hsp70 isoforms: HSPA1L/Hsp70-hom, HSPA2/Hsp70-2, HSPA6/Hsp70B`, and HSPA5/BiP/GRP78.

PLoS ONE 5 (2010) e8625

Zhao, Q., Barclay, M., Hilkens, J., Guo, X., Barrow, H., Rhodes, J.M., Yu, L.G.

Interaction between circulating galectin-3 and cancer-associated MUC1 enhances tumour cell homotypic aggregation and prevents anoikis.

Mol. Cancer. 9 (2010) 154

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

Hsp70 interaction with the p53 tumour suppressor protein.

EMBO J. 20 (2001) 4634-8