

Frauenklinik und Poliklinik der Technischen Universität München,
Klinikum rechts der Isar
(Direktorin: Univ.- Prof. Dr. M. B. Kiechle)

**Etablierung eines Enzyme linked immunosorbent Assays
(ELISA), spezifisch für humane HER2/neu-Antikörper, und
Screening der Seren eines
Mammakarzinom-Patientinnen-Kollektivs**

Gerda Marlene Amina Willems

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. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. N. Harbeck
2. Univ.- Prof. Dr. Dr. Senekowitsch-Schmidtke

Die Dissertation wurde am 02.03.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 23.09.2009 angenommen.

*Meinen Eltern Wulf und Helene Willems
und
meinem Ehemann Charles Bosson*

Inhalt

1.	ABKÜRZUNGEN	4
2.	EINLEITUNG	6
2.1.	DAS MAMMAKARZINOM	6
2.1.1.	<i>EGF-Rezeptoren in Normalgewebe/in Tumoren.....</i>	<i>8</i>
2.1.2.	<i>Klinisch-onkologische Bedeutung von HER2/neu beim Mammakarzinom</i>	<i>12</i>
2.1.3.	<i>HER2/neu als Tumorigenogen.....</i>	<i>13</i>
3.	ZIELSETZUNG	15
4.	MATERIAL UND METHODEN.....	16
4.1.	SERUMPROBEN	16
4.2.	ZELL-LINIEN	20
4.3.	METHODEN.....	21
4.3.4.	<i>Material und Reagenzien.....</i>	<i>21</i>
4.3.5.	<i>ELISA zum Nachweis humaner/Maus HER2/neu-Antikörper in Mäuseserum (Basis-ELISA).....</i>	<i>22</i>
4.3.6.	<i>Zellkultur.....</i>	<i>23</i>
4.3.7.	<i>Zellzählung und Zellaufschluß.....</i>	<i>23</i>
5.	ERGEBNISSE	25
5.1.8.	<i>ELISA zum Nachweis von HER2/neu-Antikörpern in humanem Serum: Rationale.....</i>	<i>25</i>
5.1.9.	<i>Kurzprotokoll des Basis-ELISA zum Nachweis von HER2/neu Antikörpern in Mäuseserum.....</i>	<i>25</i>
5.1.10.	<i>Messung mit modifiziertem Basis-ELISA.....</i>	<i>26</i>
5.1.11.	<i>Optimierung der Menge des Detektionsantikörpers.....</i>	<i>27</i>
5.1.12.	<i>Optimierung des Blockierungsreagens, Vergleich Plasma/Serum.....</i>	<i>28</i>
5.1.13.	<i>Messung des mit Herceptin® versetzten Serums.....</i>	<i>30</i>
5.2.	ELISA	31
5.2.14.	<i>ELISA – Kurzprotokoll.....</i>	<i>32</i>
5.2.15.	<i>Durchführung</i>	<i>32</i>
5.2.16.	<i>Qualitätssicherung.....</i>	<i>34</i>
5.2.17.	<i>Einfrier- und Auftaustabilität von Herceptin® im Serum.....</i>	<i>34</i>
5.2.18.	<i>Spezifität des ELISAs.....</i>	<i>34</i>
5.2.19.	<i>Messung der Serumproben auf Immunglobuline der Gruppe G</i>	<i>36</i>
5.2.20.	<i>Vorinkubation mit Zell-Lysat.....</i>	<i>47</i>
5.2.21.	<i>Messung von Serumproben auf Immunglobuline der Gruppe M.....</i>	<i>49</i>
6.	DISKUSSION	53
7.	AUSBLICK.....	62
8.	ZUSAMMENFASSUNG	63
9.	ABBILDUNGS-/TABELLEN-VERZEICHNIS	65
10.	LITERATURVERZEICHNIS	67
11.	DANKSAGUNG.....	73
12.	LEBENS LAUF	75
13.	PUBLIKATIONEN	76

1. Abkürzungen

B	
BSA	<u>h</u> ovines <u>S</u> erum- <u>A</u> lbumin
C	
°C	Grad Celsius
CD	<u>c</u> luster of <u>d</u> ifferentiation
CTL	zytotoxische Lymphozyten (<u>c</u> ytotoxic <u>T</u> lymphocytes)
D	
DC	dendritische Zelle, Antigen präsentierende Zelle (<u>d</u> endritic <u>c</u> ell)
DCIS	<u>d</u> uktales <u>c</u> arcinoma <u>i</u> n <u>s</u> itu
DFS	krankheitsfreies Überleben (<u>d</u> isease <u>f</u> ree <u>s</u> urvival)
DTH	immunologische Hautreaktion (<u>d</u> elayed <u>t</u> ype <u>h</u> ypersensitivity)
E	
ECD	Extrazelluläre Domäne HER2/neu (<u>e</u> xtra <u>c</u> ellular <u>d</u> omain)
EGF	epithelialer Wachstumsfaktor (<u>e</u> pithelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor)
ELISA	<u>e</u> nzyme- <u>l</u> inked- <u>i</u> mmuno <u>s</u> orbent- <u>a</u> ssay
ER	Östrogenrezeptor (<u>e</u> strogen <u>r</u> eceptor)
F	
FCS	fetales Kälberserum (<u>f</u> etal <u>c</u> alve <u>s</u> erum)
FISH	<u>F</u> luoreszenz <u>i</u> n- <u>s</u> itu <u>H</u> ybridisierung
G	
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G ₁	gut differenziertes Tumorgewebe
G ₂	intermediär differenziertes Tumorgewebe
G ₃	schlecht differenziertes Tumorgewebe
GM-CSF	Granulozyten-Macrophagen Kolonie stimulierender Faktor (<u>g</u> ranulocyte <u>m</u> acrophage colony- <u>s</u> timulating <u>f</u> actor)
H	
h	Stunden
H	<u>H</u> erceptin® (Trastuzumab)
HER1	<u>h</u> umaner <u>e</u> pithelialer Wachstumsfaktor- <u>R</u> ezeptor 1
HER2/neu	<u>h</u> umaner <u>e</u> pithelialer Wachstumsfaktor- <u>R</u> ezeptor 2
HER3	<u>h</u> umaner <u>e</u> pithelialer Wachstumsfaktor- <u>R</u> ezeptor 3
HER4	<u>h</u> umaner <u>e</u> pithelialer Wachstumsfaktor- <u>R</u> ezeptor 4
HSA	<u>h</u> umanes <u>S</u> erum- <u>A</u> lbumin
HLA	Humanes Leukozyten Antigen (<u>h</u> uman <u>l</u> eucocyte <u>a</u> ntigen)
I	
ICD	Intrazelluläre Domäne HER2/neu (<u>i</u> ntrac <u>e</u> llular <u>d</u> omain)
IgG	<u>I</u> mmunglobulin der Gruppe <u>G</u>
IgM	<u>I</u> mmunglobulin der Gruppe <u>M</u>

IHC	<u>I</u> mmun <u>h</u> isto <u>c</u> hemie
K	
kg KG	Kilogramm Körpergewicht
L	
LCIS	<u>l</u> obuläres <u>c</u> arcinoma <u>i</u> n <u>s</u> itu
M	
MAGE	melanoma-associated antigen
µg	Mikrogramm
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MUC1	Tumorantigen vom muzinösen Typ 1
MUC2	Tumorantigen vom muzinösen Typ 2
N	
NaCl	<u>N</u> atrium <u>c</u> h <u>l</u> orid
Ng	Nanogramm
Nm	Nanometer
NSCLC	nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (<u>n</u> on <u>s</u> mall <u>c</u> ell <u>l</u> ung <u>c</u> ancer)
NY-ESO	New York Ösophagus Tumorantigen (<u>N</u> ew <u>Y</u> ork <u>e</u> sophagus tumor antigen)
O	
OS	Gesamtüberleben (<u>o</u> verall <u>s</u> urvival)
OD	optische Dichte (<u>o</u> ptical <u>d</u> ensity)
P	
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
PCR	<u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
PR	Progesteronrezeptor (<u>p</u> rogeste <u>r</u> one <u>r</u> eceptor)
R	
R	<u>R</u> ituximab
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
S	
S	<u>S</u> erum
SKBR-3 Zellen	Brustkrebszellen, die HER2/neu auf der Zelloberfläche überexprimieren
T	
TGF-α	Gewebewachstumsfaktor Alpha (<u>t</u> issue <u>g</u> rowth <u>f</u> actor α)
W	
WSB	Waschpuffer (<u>w</u> ash <u>b</u> uffer)

2. Einleitung

2.1. *Das Mammakarzinom*

Unter den Malignomen ist das Mammakarzinom, mit weltweit über einer Million Neuerkrankungen pro Jahr, der häufigste bösartige Tumor der Frau. Allein in Deutschland gab es im Jahr 2000 51.710 Neuerkrankungen, dies entspricht einer Inzidenz, angepasst an die altersstandardisierte Rate, von jährlich 73,65 je 100.000 Frauen (Tumormanual Mammakarzinom, 9. Auflage, S. 1,2, <http://www.krebsinfo.de/ki/empfehlung/mamma/home-page.html>). Etwa jede 10. Frau entwickelt demnach im Laufe ihres Lebens ein Mammakarzinom. Gemessen am Anteil krebserkrankter Sterbefälle ist das Mammakarzinom, nach den durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachten Sterbefällen, die zweithäufigste Todesursache westeuropäischer und nordamerikanischer Frauen (Sasco et al., 2003).

Trotz der hohen Inzidenz von Brustkrebs und intensiver Forschung nach den Ursachen der Erkrankung konnte bis heute noch kein umfassendes genetisches Progressionsmodell, wie zum Beispiel für das Kolonkarzinom, erarbeitet werden (Fearon and Vogelstein, 1990). Mögliche Ursachen hierfür sind sowohl die vielfältigen genetischen Veränderungen, als auch die unterschiedlichen Progressionsmöglichkeiten. Wichtig für die klinische Anwendung ist allerdings die Kenntnis von Risikofaktoren für Tumoren, da diese eine wichtige Rolle für die Diagnostik und damit für die möglichst frühzeitige Behandlung von Tumoren spielen. Diese sind wie bei allen Tumoren das Alter und, spezifisch für das Mammakarzinom, die genetische Disposition, durch die Gene BRCA-1, BRCA-2 oder das Auftreten von Brustkrebs bei Verwandten ersten Grades und die Dauer, für die der Körper unter Östrogeneinfluss steht (Fentiman, 2001, Travis and Key, 2003). Für die Früherkennung haben vor allem die klinische Untersuchung der Brust mit axillären, infra- und supraclaviculären Lymphknoten und die Mammographie Bedeutung (Tumormanual Mammakarzinom, 8. Auflage, S. 9, <http://www.krebsinfo.de/ki/empfehlung/mamma/home-page.html>). Wurde Brustkrebs diagnostiziert und histologisch gesichert, wird die weitere Therapie unter Berücksichtigung der Tumorbiologie und der damit verbundenen Prognose individuell auf die Patientin zugeschnitten. Im Hinblick auf die Tumorbiologie sind die Tumorgroße, der Lymphknotenbefall, die Fernmetastasierung (Lunge, Leber, Knochen), der Grad der Entartung der Tumorzellen (Grading 1-3), die histologische Klassifizierung des Ursprungsgewebes, der Steroidhormonrezeptorstatus (Östrogen-/Progesteronrezeptoren), der HER2/neu Status und, in bestimmten Fällen, der uPA/PA-1-Status von Bedeutung.

Bezüglich der individuellen Prognose der Patientinnen mit invasivem Mammakarzinom ist der axilläre Lymphknotenstatus nach wie vor der wichtigste Faktor für Therapieentscheidung und Abschätzung des Krankheitsverlaufs nach chirurgisch-operativer

Therapie. Patientinnen mit Brustkrebs und axillären Lymphknotenmetastasen (positiver Lymphknotenstatus) haben mit einer Rezidivrate von maximal ca. 75 % eine schlechte Prognose. Dagegen bekommen nur 30 % der Patientinnen mit Brustkrebs ohne Lymphknotenbefall (negativer Lymphknotenstatus) ein Rezidiv innerhalb eines 10-jährigen Beobachtungszeitraums (Clark and McGuire, 1988). Patientinnen mit Lymphknotenbefall wird in der Regel eine adjuvante Chemotherapie und/oder, je nach Steroidhormonrezeptorstatus, eine antihormonelle Therapie empfohlen. Bei Patientinnen mit negativem Lymphknotenstatus werden weitere Faktoren, wie Tumorgrading und uPA/PA-1-Status, in Betracht gezogen, um die postoperative Therapieempfehlung und damit die Behandlung zu optimieren (Harbeck et al., 1998, Harbeck et al., 2002). Auf dem internationalen Treffen der Brustkrebs-Experten in St. Gallen 2007 wurde ein Konsens zur Einteilung dieser Risikogruppen und der entsprechenden Behandlung nach operativer Therapie erarbeitet.

Niedriges Risiko	Negativer Lymphknotenstatus und alle weiteren Kriterien: pT ≤ 2 cm und gut differenziertes Tumorgewebe (G ₁) und keine vaskuläre Invasion des Tumorgewebes und Östrogen Rezeptor und/oder Progesteron Rezeptor positiv und keine Überexpression von HER2/neu (IHC/FISH) und Alter der Patientin ≥ 35 Jahre
Mittleres Risiko	Negativer Lymphknotenstatus und zumindest eins der folgenden Kriterien: pT > 2 cm oder mäßig bis schlecht differenziertes Tumorgewebe (G ₂ , G ₃) oder vaskuläre Invasion des Tumorgewebes oder Östrogen Rezeptor und/oder Progesteron Rezeptor negativ oder HER2/neu Überexpression (IHC/FISH) oder Alter der Patientin < 35 Jahre Positiver Lymphknotenstatus mit 1-3 befallenen Lymphknoten und Östrogen Rezeptor und/oder Progesteron Rezeptor positiv und HER2/neu negativer (IHC/FISH) Tumor
Hohes Risiko	Positiver Lymphknotenstatus mit 1-3 befallenen Lymphknoten und Östrogen Rezeptor und/oder Progesteron Rezeptor negativ oder Überexpression von HER2/neu (IHC/FISH) Positiver Lymphknotenstatus mit 4 und mehr befallenen Lymphknoten

Tabelle 1 Definition der Risikogruppen für Patientinnen nach operativer Brustkrebstherapie nach Goldhirsch, übersetzt aus dem Englischen (Goldhirsch et al., 2007)

Risikokategorie	Endokrin empfindlich	Fraglich endokrin empfindlich	Endokrin unempfindlich
Niedrig	ET	ET	
Mittel HER2+	ET allein oder CT gefolgt von ET Herceptin®	CT gefolgt von ET Herceptin®	CT Herceptin®
Hoch HER2+	CT gefolgt von ET Herceptin®	CT gefolgt von ET Herceptin®	CT Herceptin®

ET = endokrine Therapie, CT = Chemotherapie

Tabelle 2 Leitlinien für die Therapieentscheidung nach operativer Brustkrebstherapie entsprechend der Risikogruppe nach Goldhirsch, übersetzt aus dem Englischen (Goldhirsch et al., 2007)

In den letzten dreißig Jahren ist die Mortalitätsrate von Brustkrebspatientinnen durch Optimierung der Früherkennung, der konventionellen lokoregionären und der System Therapie stetig zurückgegangen (Peto et al., 2000). Trotz allem sterben immer noch viele Frauen an Brustkrebs, so daß zusätzliche systemische und vor allem zielgerichtete Therapiemöglichkeiten intensiv untersucht werden.

Eine Richtung ist die Untersuchung von Tyrosinkinase (TK) als tumorbiologischen Zielstrukturen. Es gibt Rezeptor TKs mit Zellmembran überspannender Domäne und nicht-Rezeptor TKs, die im Zytosol, im Zellkern und auf der Oberfläche von Zellen vorgefunden werden. Sie regulieren Zellproliferation, -überleben, -differenzierung, -funktion und -motilität. Entdeckt wurden die ersten TKs vor mehr als 25 Jahren als Onkogene im Zusammenhang mit Tiertumoren, die durch Retroviren induziert wurden. Allerdings wurden sie lange als Therapieziele ignoriert, da ihre Bedeutung für die Tumorentwicklung deutlich unterschätzt wurde und man Bedenken bezüglich der Medikamentenspezifität und -toxizität hatte. Der Durchbruch gelang mit imatinib mesylate, einem Inhibitor der BCR-ABLTK bei chronisch myeloischer Leukämie. Die Therapieerfolge mit imatinib waren so gut, daß TKs daraufhin intensiver erforscht wurden und auf diese Weise weitere Therapeutika etabliert werden konnten (Krause and Van Etten, 2005).

In dieser Arbeit zentriere ich mich vor allem auf die Gruppe der Zellmembran überspannenden Tyrosinkinase und hier wiederum auf die Untergruppe der humanen epithelialen Wachstumsfaktor-Rezeptoren der EGFR/HER-Familie.

2.1.1. EGF-Rezeptoren in Normalgewebe/in Tumoren

Vielversprechende Zielmoleküle für die Therapie maligner Tumoren sind die humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (epidermal growth factor receptor, EGFR) mit den

vier Mitgliedern EGFR/HER1 (ErbB1), HER2/neu (ErbB2), HER3 (ErbB3), HER4 (ErbB4). Sie sind unter normalen Umständen in den meisten Geweben vorhanden und regulieren, vor allem während der Embryogenese, Zellwachstum und –proliferation (Abbildung 1).

Mitglieder dieser Familie gehören zur Gruppe der membranüberspannenden Tyrosinkinase-Rezeptoren, die Signale vom Extrazellulärraum in den Intrazellulärraum vermitteln und auf diese Weise die gezielte Expression genetischer Informationen induzieren. Der grundsätzliche Aufbau eines solchen Rezeptors besteht in der extrazellulären Domäne, einer transmembran Domäne und einer intrazellulären Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität.

Die Aktivierung der Wachstumsfaktor-Rezeptoren wird vor allem durch die räumliche und zeitliche Expression der spezifischen Liganden, wie zum Beispiel EGF, TGF- α , und Amphiregulin, die spezifisch an HER1 binden oder betacellulin, heparin-binding EGF und Epiregulin, die an HER1 und HER4 binden oder Neuregulin 1 und 2, die an HER3 und HER4 binden oder Neuregulin 3 und 2, die spezifisch an HER4 binden, kontrolliert (Riese et al., 1996). Für HER2/neu konnte bisher kein Ligand dieser Art gefunden werden, weshalb man davon ausgeht, daß es vor allem als Dimerisationspartner für die anderen Mitglieder der Familie dient und in erster Linie durch die Überexpression und die damit verbundene Häufigkeit auf der Zelloberfläche, aktiviert wird. Bei HER1, 3 oder 4 wird eine Konformationsänderung und die Bildung verschiedener Homo- und Heterodimere aus Mitgliedern der EGF-Rezeptorfamilie erst nach Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne induziert. Die Konformationsänderung und Dimerisation der Rezeptoren führt zur Phosphorylierung und somit zur Aktivierung der Tyrosinkinase. Diese aktivierte Form bietet eine Bindungsstelle für verschiedene Signalmoleküle, die wiederum die intrazelluläre Phosphorylierungskaskade in Gang setzen und Signale an den Zellkern übermitteln. Die hierdurch induzierte Veränderung in der genetischen Expression ist eine Möglichkeit der gesunden Zelle, auf äußerliche Veränderungen zu reagieren (Holbro and Hynes, 2004).

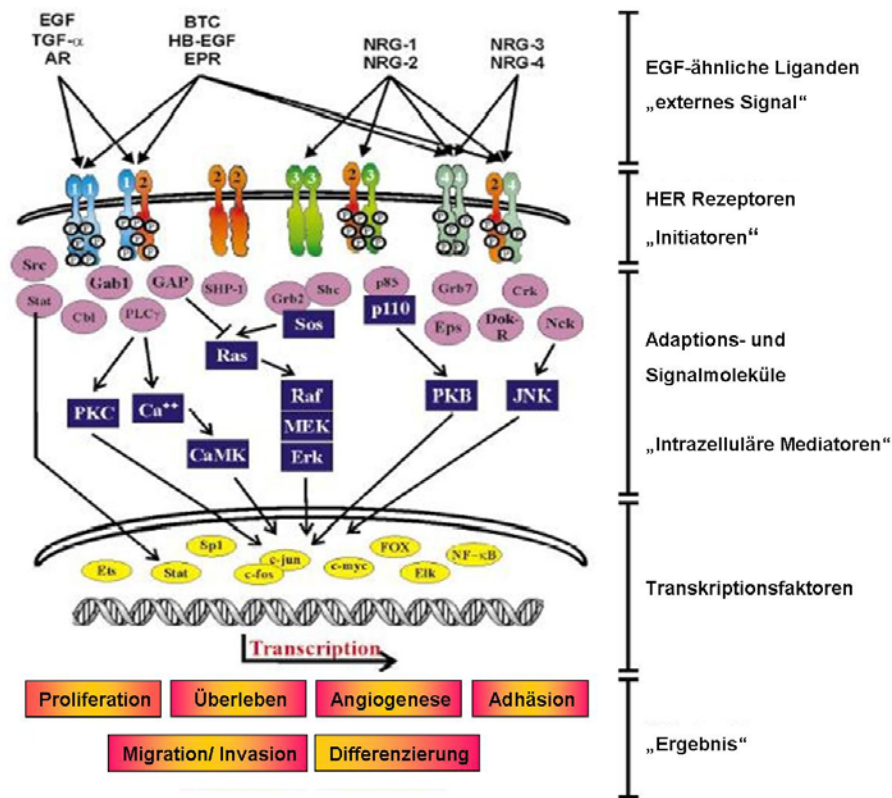


Abbildung 1 Das HER Signaltransduktions-Netzwerk, übersetzt aus dem Englischen (Holbro and Hynes, 2004)

In entarteten Geweben sind diese Wachstumsfaktor-Rezeptoren häufig, durch verschiedene Mechanismen, dauerhaft in ihrer aktivierten Form vorzufinden. Dies kann durch autokrine Überproduktion der Liganden, Rezeptormutationen oder Überexpression des Rezeptors auf der Zelloberfläche hervorgerufen werden. HER1 (EGFR), zum Beispiel, wird durch alle drei der genannten Mechanismen aktiviert. Die häufigste Mutation, die meist in Glioblastomen (Gehirntumoren) gefunden wird, ist eine Deletion in der extrazellulären Domäne, die in einer Daueraktivierung des Rezeptors resultiert. Eine Überexpression von HER1 wird unter anderem in Plattenepithel-Karzinomen und Ovarialkarzinomen gefunden. Allerdings lassen in vitro Studien vermuten, daß allein die Überexpression von HER1 in diesen Tumoren, ohne Bindung eines Liganden, für eine Aktivierung des Rezeptors nicht ausreicht. Infolgedessen ist die Coexpression von Liganden wie TGF- α oder EGF ein häufig beobachtetes Phänomen (Holbro and Hynes, 2004). Frühe klinische Studien mit kleinen Patientinnenkollektiven und jeweils verschiedenen Tumoren ließen vermuten, daß die Co-Expression von HER1 und seiner Liganden mit einer schlechten Überlebensrate einhergeht. Dies konnte durch eine Meta-Analyse (Nicholson et al., 2001), in der über 200 Veröffentlichungen untersucht wurden, untermauert werden. Sie unterstützt sogar die Vermutung, daß die Überexpression des Rezeptors eine starke prognostische Bedeutung hat, da sie mit einer Reduzierung des tumorfreien Intervalls und des Gesamtüberlebens einhergeht.

Im Gegensatz zu HER1 wird HER2/neu weder durch Liganden, noch durch eine Mutation, sondern alleine aufgrund der Überexpression und der daraus resultierenden spontanen Dimerisation zu Hetero- und Homodimeren aktiviert. Es wird in einer Reihe maligner Tumoren, wie zum Beispiel dem Mamma-, dem Ovarial-, dem Pankreasadenokarzinom und dem kolorektalen Karzinom, überexprimiert (Baxevanis et al., 2004). Gerade bei der Risikoeinschätzung des Mammakarzinoms spielt HER2/neu eine wichtige Rolle (Ross and Fletcher, 1998, Yamauchi et al., 2001).

HER3 spielt nach neueren Ergebnissen eine essentielle Rolle als Dimerisationspartner von HER2/neu bei der Wachstumsregulation von HER2/neu überexprimierenden Zellen. In Laboruntersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Empfindlichkeit von Brustkrebszellen gegenüber HER2/neu-spezifischen Therapien mit der Expression von HER3 korreliert. Fehlt einer der beiden Partner, hat es jeweils Auswirkungen auf Zellproliferation und Regulation des Zellzyklus. Dies lässt vermuten, daß die HER2/neu-Überexpression und -Aktivität alleine nicht ausreicht, um Tumorzell-Proliferation anzukurbeln (Holbro and Hynes, 2004). Der Einfluß von HER4 auf das Tumorwachstum ist weitgehend unbekannt.

Wegen ihres oben beschriebenen proliferationssteigernden Einflusses auf Tumorzellen sind Wachstumsfaktor-Rezeptoren ausführlich als therapeutische Zielstrukturen untersucht worden. Beispiele für Substanzen, die daraus als Tumorthapeutika hervorgingen, sind der Tyroinkinase-Inhibitor Gefitinib® (Iressa®), der bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC) eingesetzt wurde (Arteaga and Johnson, 2001, Wilkinson, 2002) und in der Gynäkologie der humanisierte Mausantikörper Trastuzumab (Herceptin®), der nicht nur 1998 zur Therapie HER2/neu-positiver Mammakarzinome in der metastasierten Situation zugelassen wurde, sondern dessen Wirksamkeit im Rahmen der internationalen Phase III Studie HERceptin Adjuvant (HERA) auch für die adjuvante Situation getestet wurde. Ziel dieser klinischen Studie war es, herauszufinden, ob Frauen mit ursprünglich HER2/neu positivem Brustkrebs nach operativer und anschließender Chemotherapie und ggf. Radiotherapie von einer Herceptin®-Therapie durch Überlebenszeitverlängerung und Verlängerung des krankheitsfreien Überlebens profitieren. Nach der ersten geplanten Interimsanalyse mit einer medianen Beobachtungszeit von 1 Jahr konnte ein Vorteil bezüglich des krankheitsfreien Überlebens von 8,4 Prozentpunkten nach 2 Jahren festgestellt werden (95 % Konfidenzintervall, 0,43-0,67, $P < 0,0001$). Aufgrund dieser Ergebnisse, wurde Herceptin® seit 2006 in der adjuvanten Therapie für Patientinnen mit HER2/neu positivem Brustkrebs nach operativer und Chemotherapie zugelassen (6mg/kgKG, dreiwöchentlich, für 1 Jahr) (Piccart-Gebhart et al., 2005). Auch die Ergebnisse der 2 Jahres Analyse bezüglich des krankheitsfreien Überlebens und der Überlebenszeitverlängerung bestätigen den deutlichen Vorteil einer 1 jährigen Trastuzumab Therapie unter den oben beschriebenen Voraussetzungen (Smith et al., 2007).

2.1.2. Klinisch-onkologische Bedeutung von HER2/neu beim Mammakarzinom

Eine Überexpression des Protoonkogens HER2/neu und der damit verbundene Übergang in ein Onkogen, wird bei 20-30 % aller invasiven Mammakarzinome gefunden (Baselga and Albanell, 2001). Auch wenn Tumoraggressivität und schlechtere Prognose mit dem Grad der Expression korrelieren, hat HER2/neu seit der Entwicklung von Trastuzumab als prädiktiver Faktor eine deutlich größere Relevanz denn als prognostischer Faktor (Cianfrocca and Goldstein, 2004, Schmidt et al., 2005, Slamon et al., 1987). Nachdem in klinischen Studien gezeigt werden konnte, daß Patientinnen mit einer deutlichen HER2/neu-Überexpression der Tumorzellen von einer Antikörper-Therapie mit Herceptin® profitieren (Cobleigh et al., 1999, Vogel et al., 2002), war es notwendig, eine zuverlässige Nachweismethode der HER2/neu-Expression in Tumorzellen zu entwickeln. Es wurden verschiedene Tests, wie Western-, Northern- und Southernblot, Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent Assay (ELISA), Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR), Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und immunhistochemische Tests (IHC) für Tumorgewebe, entwickelt (van de Vijver, 2002). Im klinischen Alltag haben sich zum Screening von Tumorgeweben immunhistochemische Tests, wie zum Beispiel Herceptest™ von DakoCytomation und FISH zur Evaluierung intermediärer IHC-Befunde, durchgesetzt. Bei Herceptest™ handelt es sich um eine IHC, bei der mit Hilfe polyklonaler Antikörper gegen HER2/neu dieses auf der Zelloberfläche und in der Zelle nachgewiesen werden kann. Anhand einer Skala (DAKO-Score) von 0 bis 3+ werden Tumorgewebe in HER2/neu-negativ, schwach, mittel und stark -positiv eingeteilt (www.dakocytomation.us). DAKO-Score 0 bis 1+ (ca. 66 % der Tumoren) beschreibt Tumorgewebe mit einer für die Therapie mit Herceptin® unzureichenden HER2/neu-Expression. DAKO-Score 2+ (ca. 12 % der Tumoren) entspricht einem positiven Befund, der aber mit einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auf Zellkernebene auf eine Genamplifikation hin überprüft werden muß. Nur etwa 24 % dieser Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs Befunde weisen eine erhöhte Genamplifikation für das Glykoprotein auf und können damit als positiv eingestuft werden (Dybdal et al., 2005). DAKO-Score 3+ gilt ohne weitere Untersuchungen als HER2/neu-positiv.

Patientinnen mit HER2/neu-positiven metastasierten oder lokal fortgeschrittenen Tumoren haben die Möglichkeit, Herceptin® als wöchentliche palliative Therapie (2mg/kgKG) in Kombination mit Taxanen oder als Mono-Erhaltungstherapie, in metastasiertem Krankheitsstadium bis zum Progress, zu erhalten (Slamon et al., 2001, Vogel et al., 2001). Seit Mai 2006 kann aufgrund der positiven Ergebnisse weltweit durchgeführter Studien (Baselga et al., 2006, Piccart-Gebhart et al., 2005, Romond et al., 2005) Herceptin® auch in der adjuvanten Situation angewendet werden. Dies bedeutet, daß Patientinnen mit HER2/neu positiven Primärtumoren nach operativer Therapie mit anschließender Chemotherapie und ggf. lokaler Strahlentherapie mit Herceptin® alle 3 Wochen (6mg/kgKG)

oder wöchentlich (2mg/kgKG) als adjuvante Erhaltungstherapie im Rahmen der Zulassung für 1 Jahr behandelt werden können.

2.1.3. HER2/neu als Tumorimmunogen

Neben seiner Bedeutung als Angriffspunkt (Antigen) für Herceptin® hat man HER2/neu auch als potentiell Antigen für die körpereigene Immunabwehr als so genanntes Tumorimmunogen identifiziert. Die Entdeckung, daß Tumorzellen durch zytolytische CD8 T-Zellen (CTLs) abgetötet werden können, hat die Suche nach Tumorimmunogenen verstärkt ins Leben gerufen, die dann einige solcher Immunogene identifiziert hat. Beispiele hierfür sind Melan A, häufig in Melanomzellen exprimiert, MAGE und NY-ESO, auch „cancer testis“ Antigene genannt, da sie in verschiedenen Tumoren exprimiert werden, in Normalgewebe allerdings nur in Keimzellen. Sie haben gemeinsam, daß sie durch Tumorzellen exprimiert, aber sonst im Körper normalerweise nur in speziellen Geweben oder gar nicht vorkommen und es daher möglich ist, eine Antikörperreaktion auf diese Immunogene hervorzurufen. Aufgrund der *in vitro* und bezüglich NY-ESO *in vivo* beobachteten Immunreaktion (Koranyi et al., 2004) werden aktuell Impfstoffe, bestehend aus tumorspezifischen Peptidfragmenten der Immunogene, erprobt, in der Hoffnung, eine Immunantwort *in vivo* zu verstärken oder sogar zu erzeugen. Dieses Verfahren wird als Tumorstimmung bezeichnet (Scanlan et al., 2001).

Ist auch HER2/neu ein potentiell Immunogen für eine Vakzine-Therapie? Es wird zwar durch verschiedene körpereigene Gewebe exprimiert, was zur Unterdrückung einer Immunantwort führen könnte, jedoch dort nur in geringem Maße. Hinzu kommt, daß man für andere Proteine, die von Tumorzellen gebildet werden, wie zum Beispiel MUC1 und MUC2 in Brustkrebszellen, herausgefunden hat, daß zwar im Zellkern das gleiche Gen wie in gesunden Zellen für diese Proteine vorliegt, das Endprodukt der Proteinbiosynthese aber von der physiologischen Variante durch eine andere Form der Glykosylierung abweicht und somit immunologisch ein anderes Gesicht bekommt (Brockhausen, 1999). Ein weiterer Anreiz für das Immunsystem, auf Proteine wie HER2/neu zu reagieren, könnten seine im Blut als ECD-Fragmente zirkulierenden Abbauprodukte, auch „Shed Antigens“ genannt, sein, da diese nach der Abspaltung vom Gesamtprotein vorher nicht zugängliche Epitope präsentieren (Kostler et al., 2004, Leitzel et al., 1992, Muller et al., 2004).

Aufgrund dieser Annahmen wäre es trotz immunologischer Filtermechanismen für Antikörper gegen Eigen-Proteine durchaus möglich, daß der Körper eine Immunantwort gegen HER2/neu erzeugen und Krebspatienten von einer Vakzinierungs-Therapie profitieren könnten. Basierend auf den oben genannten Annahmen hat die Arbeitsgruppe um Mary Disis in Seattle, WA, USA, 1997 als eine der ersten Autoantikörper gegen HER2/neu bei Patientinnen mit Mammakarzinom nachgewiesen (Disis et al., 1997). Zwei Jahre später wurde ein Bericht über Autoantikörper gegen HER2/neu bei Patienten mit kolorektalem Karzinom veröffentlicht (Ward et al., 1999).

Nachdem man Antikörper gegen HER2/neu nachgewiesen hatte und davon auszugehen war, daß die Immuntoleranz bezüglich HER2/neu überwunden werden kann, wurden bei Ratten, deren HER2/neu-Protein eine 89 % Homologie zum humanen HER2/neu aufweist (Disis et al., 1999), und anschließend beim Menschen verschiedene Versuche zur Evozierung einer T-Zell-Reaktion mit Hilfe von Tumorstoffen durchgeführt. In den meisten Studien wurden Freund's Adjuvants oder GM-CSF als Trägersubstanz für Peptid-basierte Vakzinen verwendet. Murray et al. (Murray et al., 2000) beschrieben, daß die Gabe von p369-377 mit GM-CSF bei den meisten Patienten eine positive Hautreaktion (DTH) in vivo und eine signifikante proliferative Reaktion bezüglich des Peptids in vitro auslöste. Im Rahmen eines ähnlichen Protokolls zeigten Knutson et al. (Knutson et al., 2002), daß die Vakzinierung mit p369-377 und GM-CSF die Precursor-Frequenz peptidspezifischer CTLs erhöhte, diese aber 5 Monate nach der letzten Impfung nicht mehr nachweisbar waren. Die Arbeitsgruppe um Mary Disis in Seattle, WA, USA (Disis et al., 2002, Disis et al., 2000) verwendete in zwei anderen Studien längere HER2/neu-Peptidabschnitte, entsprechend möglichen TH-Epitopen, um Patientinnen mit Brust- und Ovarialtumoren zu vakzinieren. In den meisten Fällen konnte eine peptidspezifische proliferative Immunantwort nachgewiesen werden, die teilweise auch gegen nicht in der Vakzine enthaltene Anteile des Proteins gerichtet war. Zytotoxizität oder klinisches Ansprechen wurden nicht beschrieben.

Die oben beschriebenen klinischen Studien haben gezeigt, daß es tatsächlich möglich ist, eine spezifische T-Zell-Antwort auf HER2/neu Peptide in Tumorstoffen hervorzurufen. Trotzdem konnte bisher keine Immunantwort hervorgerufen werden, die ein klinisches Tumorstoffen zeigt hätte. Da die Vakzinierung aufgrund der zu umgehenden Immuntoleranz nur auf immunologisch nicht dominanten Peptiden basiert werden kann, stellt sich die Frage, ob es je möglich sein wird, auf diese Weise eine Tumorstoffen zu erreichen. Eventuelle Einsatzmöglichkeiten könnten allerdings die Rezidivprophylaxe oder die Kombination mit einer Herceptin®-Therapie sein (Baxevanis et al., 2004). Diesbezüglich wird es wohl noch weiterer intensiver Forschung bedürfen.

3. Zielsetzung

Da es im Rahmen der Immun- und Vakzine-Therapie-Forschung gegen HER2/neu von Interesse wäre, humane HER2/neu-spezifische Antikörper vor allem gegen die extrazelluläre Domäne von HER2/neu nachweisen zu können und es bisher keine im klinischen Alltag etablierte Nachweismethode gab, waren folgende Punkte Ziel dieser Arbeit:

1. Etablierung eines ELISA zum quantitativen Nachweis reaktiver Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von HER2/neu
 - a) Überprüfung der Güte des ELISAs
 - b) Wiederholbarkeit der Meßergebnisse
 - c) Gute Handhabung durch Verwendung einer in der Laborroutine häufig verwendeten Basistechnologie, die in den meisten Labors durchführbar ist
2. Auffinden von Antikörpern gegen die extrazelluläre Domäne von HER2/neu
 - in Seren von Patientinnen mit Erstdiagnose Mammakarzinom
 - in Seren von Patientinnen unter Immuntherapie
3. Proof of principle: Quantitativer Nachweis und Funktionsstatus des Immunotherapeutikums Herceptin® in humanem Serum

4. Material und Methoden

4.1. Serumproben

Die Serumproben wurden im Rahmen des Forschungsantrages „Adoptiver T-Zell Transfer von HER2/neu-reaktiven T-Zellen“ (Frau Prof. Dr. med. Helga Bernhard und Frau Prof. Dr. med. Nadia Harbeck, Wilhelm Sander-Stiftung) über 2 Jahre vor allem von Patientinnen mit Verdacht auf Mammakarzinom vor Therapie, aber auch von einigen Patientinnen unter Therapie mit HER2/neu positivem Mammakarzinom und als Kontrollgruppe von gesunden Probandinnen aus der Normalbevölkerung, gesammelt. Ein entsprechendes Ethikvotum lag im Rahmen des Forschungsantrages vor und die Patientinnen wurden jeweils für die Blutentnahme aufgeklärt. Außerdem wurden uns freundlicher Weise Serumproben aus einer Her2/neu Vakzine Studie (Universitäts-Frauenklinik Tübingen) zur Verfügung gestellt. Zur Festlegung des unteren Grenzwertes für Meßergebnisse des ELISAs wurden Serumproben von 30 gesunden Frauen gesammelt.

Serumproben aus der Normalbevölkerung

Zur Festlegung eines unteren Grenzwertes für Meßergebnisse des ELISAs zum Nachweis humaner Antikörper gegen humanes HER2/neu, wurden 30 Seren von gesunden Frauen im Alter zwischen 23 und 43 Jahren gesammelt und bei -80 °C tiefgefroren.

Serumproben von Patientinnen mit Verdacht auf Mammakarzinom

Über 2 Jahre wurden 173 Serumproben von Patientinnen im Alter von 22-85 Jahren mit der Verdachtsdiagnose Mammakarzinom oder Tumorrezidiv präoperativ gesammelt und in Aliquots von 500 µl bei -80 °C tiefgefroren. Aus dieser Gruppe hatten 40 Patientinnen (23 %) einen gutartigen Befund, 13 (7,5 %) ein duktales Carcinoma in situ (DCIS), 97 (56 %) ein invasiv duktales Mammakarzinom, 16 (12 %) ein invasiv lobuläres Mammakarzinom und 3 (2 %) ein duktulo-lobuläres Karzinom. 35 (26 %) der malignen Tumoren waren HER2/neu 3+, 23 (17 %) HER2/neu 2+ und 78 (58 %) HER2/neu 0 oder 1+. Für eine detaillierte Auflistung der diesem Patientenkollektiv zugehörigen histologischen Befunde siehe Tabelle 3 und Tabelle 4.

Histologische Differenzierung	n
Fibroadenom	12
fibrozystische Mastopathie	13
Fibrose	2
Zyste	1
Narbe	1
Lipomatose	1
Papillomatose	1
intradermales Papillom	1
dermatopische Lymphadenitis	1
duktales Adenom	1
duktales Epithelhyperplasie	1
duktales Hyperplasie	4
zystisches Papillom	1
Summe benigner Befunde	40
Angaben in % bezogen auf Gesamtzahl	23,12

Tabelle 3 Detaillierte Auflistung der gutartigen histologischen Befunde des Patientenkollektivs

Histologische Verteilung	Anzahl Patienten	HER2 3+	HER2 2+	HER2 1+,0
DCIS	10	2	1	6
intraduktales Mammakarzinom	1	1	-	
Papilläres carcinoma in situ	2	-	2	-
Summe DCIS	13	-	-	
Angaben in %, bezogen auf die Summe maligner Tumoren	7,51			
LCIS	1	-	-	1
Summe CIS	14	3	3	7
Angaben in %, bezogen auf die Summe maligner Tumoren	8,09			
invasiv duktales Mammakarzinom	83	23	10	50
invasives Adenokarzinom	1	-	-	1
muzinöses Mammakarzinom	7	1	-	6
tubuläres Mammakarzinom	3	-	-	3
medulläres Mammakarzinom	1	-	-	1
papilläres Mammakarzinom	2	1	-	1
Summe duktale Mammakarzinome	97	25	10	62
Angaben in %, bezogen auf die Summe maligner Tumoren	56,07			
duktulobuläres Mammakarzinom	3	2	1	0
lobuläres Mammakarzinom	16	4	1	15
invasives Mammakarzinom	1	1	-	
Mammakarzinom Rezidiv	2	-	1	1
Summe nicht duktaler Mammakarzinome	22	7	3	16
Angaben in %, bezogen auf die Summe maligner Tumoren	12,72			
Summe maligner Tumoren	133	35	23	78
Angabe in %, bezogen auf die Summe maligner Tumoren	100	26,32	17,29	58,65
Summe insgesamt	173			

Tabelle 4 Detaillierte Auflistung der bösartigen oder potentiell bösartigen histologischen Befunde des Patientenkollektivs

Serumproben von Brustkrebspatientinnen abgenommen nach adjuvanter Chemotherapie

Des weiteren wurden 21 Seren von Patientinnen im Alter von 39-62 nach adjuvanter Strahlen- und Chemotherapie gesammelt. Davon hatten 2 (9,5 %) Patientinnen ein DCIS, 17 (80,1 %) Patientinnen ein invasiv duktales Mammakarzinom, 1 (4,7 %) Patientin ein invasiv lobuläres Karzinom und 1 (4,7 %) Patientin ein duktulo-lobuläres Mammakarzinom. Insgesamt waren 19 Tumoren HER2/neu-IHC-Score 3+ und 2 Tumoren HER2/neu-IHC-Score 2+ und HER2/neu-FISH-positiv.

Serumproben von Patientinnen unter Herceptin®-Therapie

Weitere 5 Seren stammten von Patientinnen, die dreiwöchentlich eine Herceptin®-Therapie (erste Gabe 8 mg/kg KG, dann 6 mg/kg KG) erhielten (HERA-Studie). Sie waren zwischen 41 und 62 Jahre alt, 4 von ihnen hatten ein invasiv-duktales und 1 Patientin ein duktulo-lobuläres Mammakarzinom. Alle Patientinnen hatten einen HER2/neu-Score 3+ Tumor.

Serumproben von Patientinnen unter HER2/neu Vakzine-Therapie

Diese Serumproben stammten von 8 Patientinnen, die an einer Phase-I/II-Studie zur Induktion einer systemischen Immunantwort gegen HER2/neu Tumorantigene nach Vakzinierung mit einer genetisch modifizierten, devitalisierten, HLA-A*0201 Mammakarzinom-Variante, teilnahmen (Universitäts-Frauenklinik Tübingen).

Einschlußkriterien für Patientinnen der Vakzine-Studie:

- Diagnose metastasiertes Mammakarzinom
- Metastasen in klinischen oder bildgebenden Verfahren nachweisbar
- Vorbehandlung mit mindestens einer Anthrazyklin- oder Taxan-haltigen Chemotherapie und daraus folgende komplette oder partielle Remission bzw. stabile Krankheits-Situation.
- Abschluß immunsuppressiver Therapiemodalitäten (Chemotherapie, Radiotherapie) mindestens 4 Wochen vor Vakzinierungsbeginn
- Immuntherapie (Interferone, TNF, Zytokine oder andere biologische „response modifier“) mindestens 6 Wochen vor Vakzinierungsbeginn abgeschlossen (Ausnahme: Hämatopoetische Wachstumsfaktoren)
- Alter: 18 – 80 Jahre
- Karnofsky Score von mindestens 80 %
- Lebenserwartung zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie mind. 6 Monate
- HLA-A*0201-Expression
- *In vitro* Aktivierbarkeit der Patientenlymphozyten durch Mitogene und mitogene Antikörper
- *In vitro* Aktivierbarkeit der Patientenlymphozyten durch die Vakzinierungs-Zell-Linie in einer gemischten Lymphozyten/Tumorzell-Reaktion
- Aufklärung und Einwilligung der Patientin für diese Vakzine-Studie

Ausschlußkriterien für Patientinnen der Vakzine-Studie:

- Hirnmetastasen
- Immunsupprimierende Erkrankung
- Aktive Autoimmunerkrankung
- Akute, Fieber auslösende Infektion
- Zustand nach Organtransplantation
- Zweitmalignom
- Schwangerschaft oder Stillzeit
- Psychiatrische Erkrankungen

	Alter	Diagnose	Rezeptoren	Metastasen	Vortherapien	Anzahl der Vakzinierungen
Tü-001	59	ductal invasives Mammakarzinom, G3	ER+, PR+ Her2/neu 1+	hepatisch, Ossär	CMF (6x), EC (6x) ET 1, 2, 3	3
Tü-002	62	ductal invasives Mammakarzinom, G3	ER+, PR+ Her2/neu 3+	hepatisch, Pulmonal	FEC (8x) Taxol®/Herceptin® (9x) Gemcitabine/Herceptin® (2x) Xeloda®/Herceptin® (6x) ET 1, 3	5
Tü-003	38	Mammakarzinom bds. G3	ER-, PR- Her2/neu1+	Lymphknoten	CMF (6x), EC (4x) AT (6x)	3
Tü-004	68	lobulär invasives Mammakarzinom, G2	ER+, PR+ Her2/neu2+	hepatisch, Ossär	AT (5x), AT (1x) Bendamustin (6x) ET 1	8
Tü-005	32	ductulo-lobuläres Mammakarzinom	ER+, PR+ Her2/neu1+	pulmonal, hepatisch, Haut	EC (4x), CMF (3x) ET 1 Zoladex®, Zometa®	8
Tü-006	47	ductal invasives Mammakarzinom, G3	ER+, PR+ Her2/neu 0	Lymphknoten	CMF (6x) Taxotere®/Epirubicin (6x)	8
Tü-007	46	ductal invasives Mammakarzinom bds. G2	ER-, PR- Her2/neu 0	hepatisch, Thoraxwand, Lymphknoten, Pleura	NOSTE (6x) (Stericid/Novantron) Myocet®/Taxotere® (8x)	8
Tü-008	36	lobulär invasives Mammakarzinom	ER+, PR+ Her2/neu 0	hepatisch, Ossär	EC (6x neoadjuvant) Zometa®	8

A = Adriamycin, C = Cyclophosphamid, E = Epirubicin, F = Fluouracil, M = Methotrexat, T = Taxan, ER = Östrogenrezeptor, PR = Progesteronrezeptor

Tabelle 5 Patientinnen-Daten Vakzine-Studie Universitäts-Frauenklinik Tübingen

Es wurden bis zum Zeitpunkt der Messung 8 Patientinnen eingeschlossen. Diese Patientinnen bekamen 4 Vakzinierungen an den Tagen 0, 14, 28, 56 und je nach Erkrankungsverlauf weitere 4 Vakzinierungen vierwöchentlich. Jede Injektion enthielt 1×10^7 letal bestrahlte KS24.22 – Zellen (stabil mit CD 80 und HER2/neu transfiziert) in 1 ml PBS, die intradermal in den Oberschenkel injiziert wurden. Vor jeder und nach der letzten Vakzinierung wurden Blutentnahmen für Serumpräparation entnommen. Eine der Patientinnen hatte bis 7 Wochen vor Studienbeginn Herceptin® erhalten (Tabelle 5).

Serum einer Patientin nach 1. Zyklus 2C4-Therapie:

Serum einer Patientin, die im Rahmen einer Phase II-Studie den Antikörper Pertuzumab (Omnitarg®) gegen HER2/neu infundiert bekam. Leider hatte die Patientin sehr bald eine Progression der Grunderkrankung, so daß nur 2 Serumproben (vor und nach der ersten Infusion) gewonnen werden konnten. Pertuzumab ist ein humanisierter monoclonaler Antikörper, der durch seine Bindung an HER2/neu die Dimerisierung des Rezeptors mit anderen Mitgliedern der Familie, wie EGFR und HER3, verhindert. Interessanterweise bindet Pertuzumab wie Trastuzumab (Herceptin®) auch an die ECD von HER2/neu, aber an ein anderes Epitop.

4.2. Zell-Linien

Es wurden 3 Zell-Linien verwendet: Sven-LCL-Zellen sind EBV transformierte B-Lymphozyten eines Spenders namens Sven, die mit dem Vektor MIG R1, beladen mit dem HER2/neu-Gen oder einem Leervektor, retroviral transduziert wurden.

- | | |
|---------------|---|
| Sven-LCL (+): | Vektor MIG R1 mit HER2/neu-Gen beladen, führt zu HER2/neu-Überexpression |
| Sven LCL (-): | Leervektor MIG R1, somit Kontrolle |
| SK-BR3: | humane Brustkrebs-Zell-Linie, welche HER2/neu überexprimiert „positive Zell-Linie für HER2/neu“ |
| NIH-3T3(+): | mit HER2/neu transfizierte Mäusefibroblasten, die HER2/neu auf der Zelloberfläche überexprimieren |
| NIH-3T3(-): | Mäusefibroblasten, die als „negative Zell-Linie“ für HER2/neu eingesetzt wurden. |

4.3. *Methoden*

4.3.4. Material und Reagenzien

Bovines Serumalbumin (BSA), IgG-frei, LOEWE, Sauerlach, Deutschland

Zentrifuge, Centrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

EDTA, Seromed, München, Deutschland

Extrazelluläre Domäne von HER2/neu (ECD), hergestellt in dhfr(-) transfizierten CHO-Zellen, Corixa, Seattle, WA, USA

Fetales Kälberserum (FCS), GIBCO/Invitrogen Corporation, Karlsruhe, Deutschland

Gentamycin, GIBCO/Invitrogen Corporation, Karlsruhe, Deutschland

goat-anti-human-IgM-AP, Code Nr.: 109-055-043, Dianova, Hamburg, Deutschland

goat-anti-mouse-IgG/IgM-AP-Antikörper, Code Nr.: 115-055-068, Dianova, Hamburg, Deutschland

Herceptin®, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland

Humanes Serumalbumin (HSA), Hyland Immuno 100 ml, CH.B.: 01 114 021, P 259 490, Baxter, Heidelberg, Deutschland, oder Albumin human 20 % 5x20 ml, CH.B: 2 157 396 101, DRK Blutspendedienst, Deutschland

ICD, gewonnen aus H2n/ICD-transformierten BL2pLysS Bakterienzellen

Labofuge 400R, Heraeus Kendro Instruments, Langenselbold, Deutschland

Mäuseseren (3 verschiedene Gruppen: C57 BL/6, Balb/C, HHD-Mäuse)

Mikrotiterplatte maxisorp, NUNC, Wiesbaden, Deutschland

mouse-anti-human-IgG-AP, Code Nr.: 209-055-098, Dianova, Hamburg, Deutschland

Neubauer Zählkammer

PBS, GIBCO/Invitrogen Corporation, Karlsruhe, Deutschland

p-Nitrophenyl-Phosphat und Tris(hydroxymethyl)methanamin-Puffer,

SIGMA FAST™, Lot 082K8203, Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Rituximab, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland

RhuMAB, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland

RPMI, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Spektrophotometer, SLT. Spectra, Serial Nr.: 216648, Tecan Deutschland GmbH (vorher SLT Instruments), Crailsheim, Deutschland

Triton X-100, Car Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Tween 20, Sigma-Aldrich, München, Deutschland

4.3.5. ELISA zum Nachweis humaner/Maus HER2/neu-Antikörper in Mäuseserum (Basis-ELISA)

Als Ausgangspunkt für die Entwicklung des im Ergebnisteil beschriebenen ELISA zum Nachweis von humanen HER2/neu Antikörpern in humanem Serum diene der im Folgenden beschriebene ELISA zum Nachweis humaner/Maus HER2/neu-Antikörper in Mäuseserum.

Puffer und Lösungen:

PBS 10x Stock:	80 g NaCl 2 g KH ₂ PO ₄ 11,4 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 2 g KCl ad 1.000 ml aqua destillata
ECD-Lösung:	0,5 µg ECD/ml PBS
Waschpuffer (WSB):	PBS 0,25 % bovines Serumalbumin (BSA) + 0,05 % Tween 20
Blockierungspuffer:	PBS 0,2 % BSA + 0,05 % Tween 20 Lösung
Detektionsantikörper:	20 µl Antikörper-Glycerin-Mischung, ad 10 ml WSB
Substrat:	p-Nitrophenylphosphat in Tris(hydroxymethyl)methanamin- Puffer (20 ml)

Durchführung

Eine 96-Kavitäten Mikrotiterplatte (maxisorp) wird über Nacht bei 4 °C mit extrazellulärer Domäne von HER2/neu (0,5 µg ECD/ml), gelöst in PBS, beschichtet (50 µl/Kavität). Nach dreimaligem Waschen mit WSB wird die Platte mit 300 µl Blockierungspuffer pro Vertiefung für eine Stunde bei Raumtemperatur abgedeckt stehen gelassen. Anschließend werden 50 µl Mäuseserum, Verdünnungen 1:1.000 – 1:32.000 und 1:4.000 – 1:128.000 mit ELISA-WSB, bzw. 0,1 µg Herceptin® gelöst in 50 µl ELISA-WSB als Positiv-Kontrolle, in Zwischenschritten in die Vertiefungen gegeben und die Platte für zwei Stunden bei Raumtemperatur abgedeckt stehen gelassen. Als nächster Schritt wird die Platte drei Mal mit WSB gewaschen und 50 µl des Detektionsantikörpers (goat-anti-mouse-

IgG/IgM-AP Antikörper, bzw. mouse-anti-human-IgG-AP), 1:1.000 mit Blockierungspuffer verdünnt, in die Vertiefungen pipettiert. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wird die Platte wiederum drei Mal gewaschen und pro Vertiefung 75 µl Substrat hinzu gegeben. Nach 10 und 20 Minuten wird die Extinktion in einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

4.3.6. Zellkultur

Die Zell-Linien, Sven-LCL, SKBR-3 und NIH 3T3 wurden alle zwei bis drei Tage mit Nährmedium versehen und über ca. 7 Tage inkubiert.

4.3.7. Zellzählung und Zellaufschluß

Puffer und Lösungen:

Nährmedium für Sven-LCL-Zellen:	RPMI 1640 ohne Glutamin 1 % Glutamin 10 % FCS “PenStrep“ (Penicillin und Streptomycin)
Nährmedium für SKBR-3-Zellen:	RPMI 1640 mit Glutamin + 10 % FCS + 1 ml Gentamycin
EDTA-Lösung:	EDTA 1:20 verdünnt mit PBS
TBS 10x Stock:	24,2 g Tris(hydroxymethyl)methanamin-Puffer + 73,05 g NaCl ad 1.000 ml aqua destillata Einstellung auf pH: 8,5
Lysepuffer:	TBS + 0,05 % Triton X-100

SKBR-3- und NIH 3T3-Zellen müssen, im Gegensatz zu den nicht-haftenden LCL-Zellen, vor der Verarbeitung, nach Absaugen des Nährmediums, vom Boden der 175 ml T-Flasche mit 9 ml EDTA-Lösung (10 min) abgelöst werden. Anschließend werden die Zellen in 5 ml Nährmedium aufgenommen, in 50 ml Falcon-Tubes übertragen und bei 1.300 x g 3 min bei RT zentrifugiert. Danach wird der Überstand abgenommen und die Zellen in 10 ml PBS resuspendiert. Aus dieser Suspension werden 90 µl entnommen, mit 10 µl Trypanblau versetzt und in einer Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt. Anschließend wird die Zellsuspension bei 1.300 x g für 3 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und der Zellschlag mit 1 ml Lysepuffer pro 5×10^6 Zellen

versetzt. Das Lysat wird gleichmäßig auf 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen verteilt und bei 4 °C über Nacht auf einem Drehrad rotieren gelassen. Anschließend werden die Röhrchen in einer Eppendorf-Zentrifuge für 1 h bei 10.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert und in Aliquots zu je 500 µl bei -30 °C in Eppendorf-Röhrchen tiefgefroren.

Um einen Anhaltspunkt bezüglich der Proteinkonzentration der Lysate bei gleicher Zell-Anzahl von 5×10^6 /ml zu erhalten, wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. Es ergaben sich folgende Werte:

SKBR3-Zellen:	3.271 µg/ml
NIH3T3-Zellen HER2(+):	1.035 µg/ml
NIH3T3-Zellen HER2(-):	2.189 µg/ml
Sven LCL HER2 (+):	185 µg/ml
Sven LCL HER2 (-):	152 µg/ml

5. Ergebnisse

5.1.8. ELISA zum Nachweis von HER2/neu-Antikörpern in humanem Serum: Rationale

Um eine mögliche Antikörperbildung nach Vakzinierung oder T-Zell-Transfer auf HER2/neu nachweisen zu können, ist es von Interesse, einen Test zum Nachweis dieser Antikörper zu etablieren. Außerdem ist es von Interesse zu wissen, ob im Serum dieser Patientinnen schon vor Beginn einer möglichen Therapie autologe Antikörper vorhanden sind oder ob die Menge autologer Antikörper in irgendeiner Weise mit dem Krankheitsverlauf korreliert. Aufbauend auf einem ELISA zum Nachweis von Mausantikörpern gegen humanes HER2/neu, der für Seren von Mäusen eingesetzt wurde, die mit einem HER2/neu-positiven Tumor „infiziert“ worden waren, wurde der ELISA zum Nachweis humaner IgG-Antikörper gegen HER2/neu in humanem Serum entwickelt.

5.1.9. Kurzprotokoll des Basis-ELISA zum Nachweis von HER2/neu Antikörpern in Mäuseserum

(Detaillierte Durchführung siehe Methoden)

Coating	100 µl/Kavität, ECD 0,5 µg/ml in PBS → über Nacht (ca.16 h) bei 4 °C
Waschen	4x mit WSB (mit BSA)
Blocken	300 µl/Kavität Blockierungspuffer (mit BSA) → 1h bei RT
Waschen	1x mit WSB (mit BSA)
1. AK	50 µl/Kavität Herceptin 2 µg/ml in Blockierungspuffer, Verdünnungsreihe 1:2 bzw. 50 µl/Kavität Mäuseserum verdünnt mit Blockierungspuffer 1:1.000 bis 1:32.000, bzw. 1:4.000 bis 1:128.000 → 2 h bei RT
Waschen	4x mit WSB (mit BSA)
2. AK	50 µl/Kavität, m-anti-human-IG-AP Verd. 1:1000 mit WSB → 1 h bei RT
Waschen	4x mit WSB (mit BSA)
Substrat	75 µl/Kavität
Messung	nach 10 und 20 min bei einer Wellenlänge von 405 nm

5.1.10. Messung mit modifiziertem Basis-ELISA

Um den ELISA für Mäuseseren für humane Seren anzupassen, wurde BSA gegen HSA ausgetauscht. Dies ergab folgende Pufferlösungen:

Waschpuffer (WSB): 0,1 % HSA
 + 0,05 % Tween 20
 PBS
Blockierungspuffer: 2 % HSA
 + 0,05 % Tween 20
 PBS

Das als 1. Antikörper eingesetzte Herceptin® wurde mit Blockierungspuffer zu den angegebenen Konzentrationen verdünnt. Der 2. Antikörper wurde mit WSB 1:1.000 verdünnt.

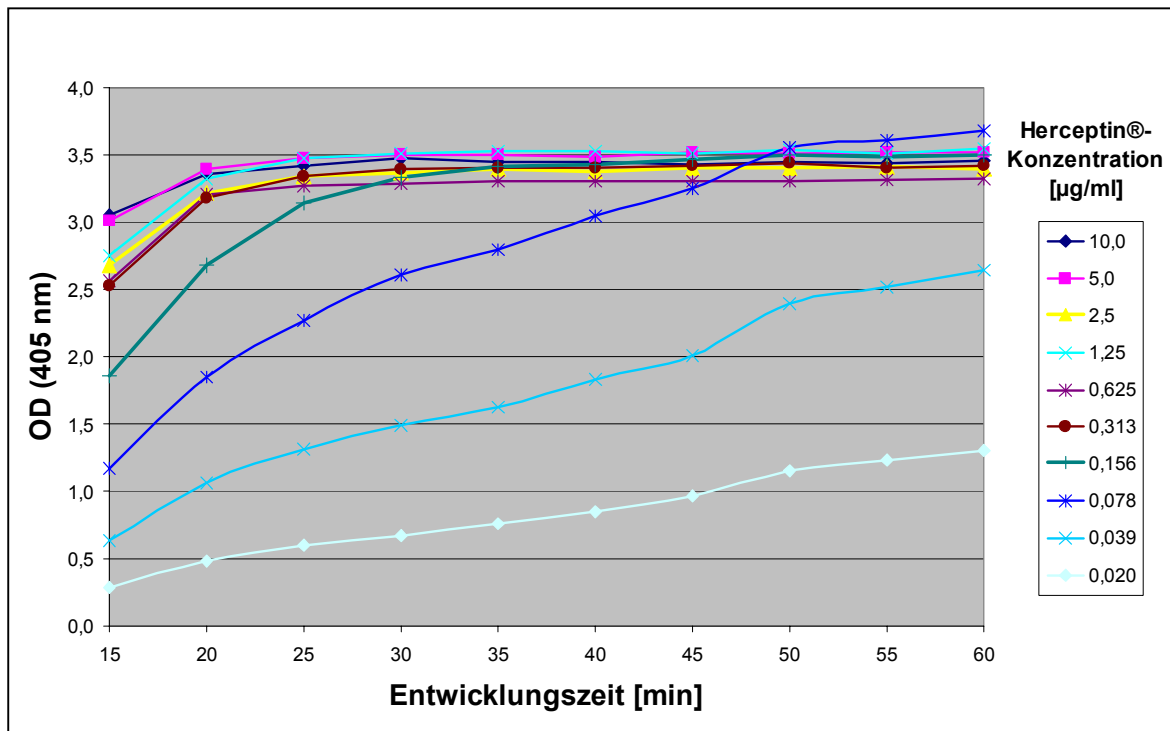


Abbildung 2 Optische Dichte versus Entwicklungszeit bei verschiedenen Herceptin®-Konzentrationen [$\mu\text{g/ml}$]

Hierbei wurde deutlich sichtbar, daß Herceptin®-Mengen im Mikrogramm-Bereich schon nach 20-25 min den oberen Meßbereich des Spektrophotometers erreichten, so daß bei späteren Messungen das Herceptin® im Nanogramm-Bereich eingesetzt wurde.

5.1.11. Optimierung der Menge des Detektionsantikörpers

Um die optimale Konzentration des Detektionsantikörpers zu ermitteln, wurde Herceptin® vertikal in verschiedenen Konzentrationen gegen verschiedene Konzentrationen des Detektionsantikörpers horizontal aufgetragen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Herceptin 0,78 ng/ml 2.AK 1:250	Herceptin 0,78 ng/ml 2.AK 1:500	Herceptin 0,78 ng/ml 2.AK 1:1.000	Herceptin 0,78 ng/ml 2.AK 1:2.000	Herceptin 0,78 ng/ml 2.AK 1:4.000	Herceptin 0,78 ng/ml 2.AK 1:8.000	Herceptin 0,78 ng/ml 2.AK 1:16.000	Herceptin 0,78 ng/ml 2.AK 1:32.000	Herceptin 0,78 ng/ml 2.AK 1:64.000	Herceptin 0,78 ng/ml 2.AK 1:128.000	Herceptin 0,78 ng/ml 2.AK 1:256.000	Herceptin 0,78 ng/ml 2.AK 0
B	Herceptin 1,563 ng/ml 2.AK 1:250	Herceptin 1,563 ng/ml 2.AK 1:500	Herceptin 1,563 ng/ml 2.AK 1:1.000	Herceptin 1,563 ng/ml 2.AK 1:2.000	Herceptin 1,563 ng/ml 2.AK 1:4.000	Herceptin 1,563 ng/ml 2.AK 1:8.000	Herceptin 1,563 ng/ml 2.AK 1:16.000	Herceptin 1,563 ng/ml 2.AK 1:32.000	Herceptin 1,563 ng/ml 2.AK 1:64.000	Herceptin 1,563 ng/ml 2.AK 1:128.000	Herceptin 1,563 ng/ml 2.AK 1:256.000	Herceptin 1,563 ng/ml 2.AK 0
C	Herceptin 3,125 ng/ml 2.AK 1:250	Herceptin 3,125 ng/ml 2.AK 1:500	Herceptin 3,125 ng/ml 2.AK 1:1.000	Herceptin 3,125 ng/ml 2.AK 1:2.000	Herceptin 3,125 ng/ml 2.AK 1:4.000	Herceptin 3,125 ng/ml 2.AK 1:8.000	Herceptin 3,125 ng/ml 2.AK 1:16.000	Herceptin 3,125 ng/ml 2.AK 1:32.000	Herceptin 3,125 ng/ml 2.AK 1:64.000	Herceptin 3,125 ng/ml 2.AK 1:128.000	Herceptin 3,125 ng/ml 2.AK 1:256.000	Herceptin 3,125 ng/ml 2.AK 0
D	Herceptin 6,25 ng/ml 2.AK 1:250	Herceptin 6,25 ng/ml 2.AK 1:500	Herceptin 6,25 ng/ml 2.AK 1:1.000	Herceptin 6,25 ng/ml 2.AK 1:2.000	Herceptin 6,25 ng/ml 2.AK 1:4.000	Herceptin 6,25 ng/ml 2.AK 1:8.000	Herceptin 6,25 ng/ml 2.AK 1:16.000	Herceptin 6,25 ng/ml 2.AK 1:32.000	Herceptin 6,25 ng/ml 2.AK 1:64.000	Herceptin 6,25 ng/ml 2.AK 1:128.000	Herceptin 6,25 ng/ml 2.AK 1:256.000	Herceptin 6,25 ng/ml 2.AK 0
E	Herceptin 12,5 ng/ml 2.AK 1:250	Herceptin 12,5 ng/ml 2.AK 1:500	Herceptin 12,5 ng/ml 2.AK 1:1.000	Herceptin 12,5 ng/ml 2.AK 1:2.000	Herceptin 12,5 ng/ml 2.AK 1:4.000	Herceptin 12,5 ng/ml 2.AK 1:8.000	Herceptin 12,5 ng/ml 2.AK 1:16.000	Herceptin 12,5 ng/ml 2.AK 1:32.000	Herceptin 12,5 ng/ml 2.AK 1:64.000	Herceptin 12,5 ng/ml 2.AK 1:128.000	Herceptin 12,5 ng/ml 2.AK 1:256.000	Herceptin 12,5 ng/ml 2.AK 0
F	Herceptin 25 ng/ml 2.AK 1:250	Herceptin 25 ng/ml 2.AK 1:500	Herceptin 25 ng/ml 2.AK 1:1.000	Herceptin 25 ng/ml 2.AK 1:2.000	Herceptin 25 ng/ml 2.AK 1:4.000	Herceptin 25 ng/ml 2.AK 1:8.000	Herceptin 25 ng/ml 2.AK 1:16.000	Herceptin 25 ng/ml 2.AK 1:32.000	Herceptin 25 ng/ml 2.AK 1:64.000	Herceptin 25 ng/ml 2.AK 1:128.000	Herceptin 25 ng/ml 2.AK 1:256.000	Herceptin 25 ng/ml 2.AK 0
G	Herceptin 50 ng/ml 2.AK 1:250	Herceptin 50 ng/ml 2.AK 1:500	Herceptin 50 ng/ml 2.AK 1:1.000	Herceptin 50 ng/ml 2.AK 1:2.000	Herceptin 50 ng/ml 2.AK 1:4.000	Herceptin 50 ng/ml 2.AK 1:8.000	Herceptin 50 ng/ml 2.AK 1:16.000	Herceptin 50 ng/ml 2.AK 1:32.000	Herceptin 50 ng/ml 2.AK 1:64.000	Herceptin 50 ng/ml 2.AK 1:128.000	Herceptin 50 ng/ml 2.AK 1:256.000	Herceptin 50 ng/ml 2.AK 0
H	Herceptin 0 ng/ml 2.AK 1:250	Herceptin 0 ng/ml 2.AK 1:500	Herceptin 0 ng/ml 2.AK 1:1.000	Herceptin 0 ng/ml 2.AK 1:2.000	Herceptin 0 ng/ml 2.AK 1:4.000	Herceptin 0 ng/ml 2.AK 1:8.000	Herceptin 0 ng/ml 2.AK 1:16.000	Herceptin 0 ng/ml 2.AK 1:32.000	Herceptin 0 ng/ml 2.AK 1:64.000	Herceptin 0 ng/ml 2.AK 1:128.000	Herceptin 0 ng/ml 2.AK 1:256.000	Herceptin 0 ng/ml 2.AK 0

Abbildung 3 Design der Mikrotiterplatte mit Herceptin®-Verdünnungsreihe vertikal und der Verdünnungsreihe des Detektionsantikörpers horizontal

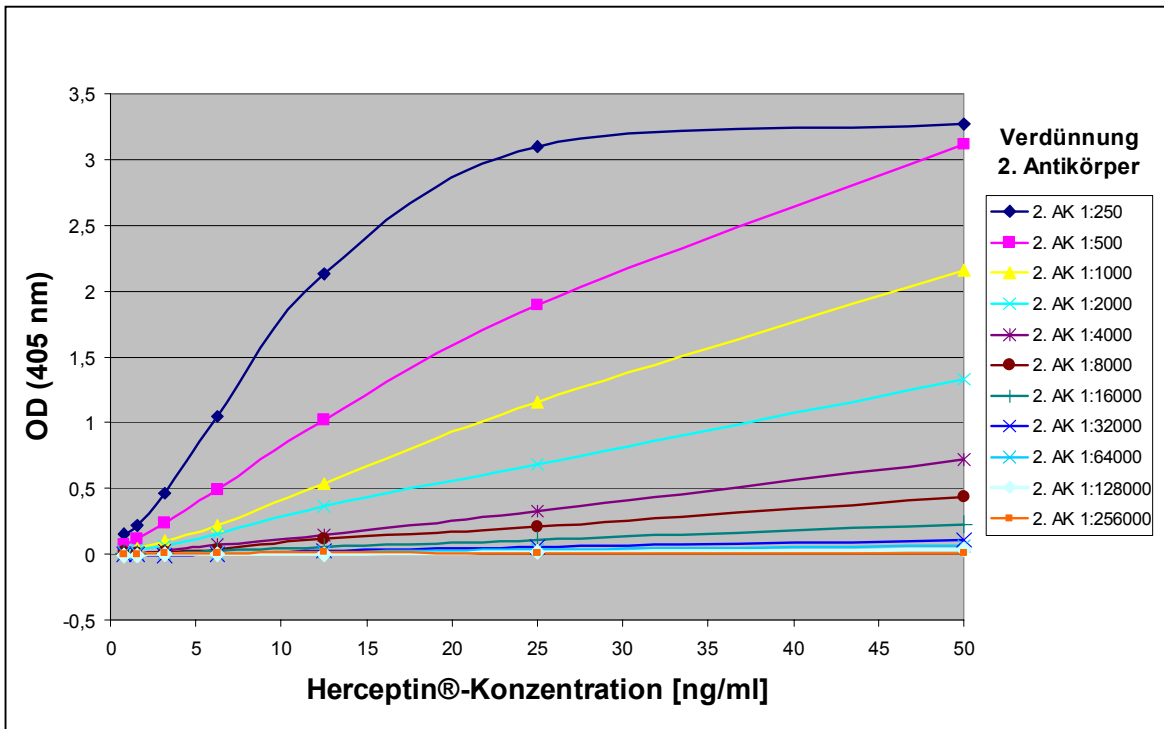


Abbildung 4 Optimierung des Detektionsantikörpers
optische Dichte versus Herceptin®-Konzentration [ng/ml]
gemessen nach 30 min Entwicklungszeit

Im Bereich von 10 ng/ml Herceptin® und mehr eignet sich der Kurve nach am besten eine Verdünnung von 1:1.000 (gelb in Abbildung 4), da sie nach 30 min Entwicklungszeit eine Gerade mit mäßiger Steigung ergibt, die eine möglichst große Meßspannweite der Konzentration des 1. Antikörpers zulässt und trotzdem ausreichend divergierende y-Werte ermöglicht, um die Konzentrationsunterschiede des 1. Antikörpers ausreichend präzise zu erfassen.

5.1.12. Optimierung des Blockierungsreagens, Vergleich Plasma/Serum

Nach der Beschichtung der Mikrotiterplatte mit Antigen (ECD) wurden die verbliebenen Zwischenräume mit Blockierungsmedium ausgefüllt, damit keine anderen Antikörper, sei es aus dem Serum oder der sekundäre Antikörper, dort anhaften können und ein hohes unspezifisches Signal geben. Ziel der Optimierung des Blockierungsmediums ist es, ein möglichst kleines Hintergrundsignal zu erhalten, um eine möglichst sensitive Meßmethode zu erstellen. Es sollte demnach eine Blockierungssubstanz ausgewählt werden, die eine möglichst geringe Reaktion mit unspezifischen Antikörpern aus dem Serum und dem sekundären Antikörper aufweist.

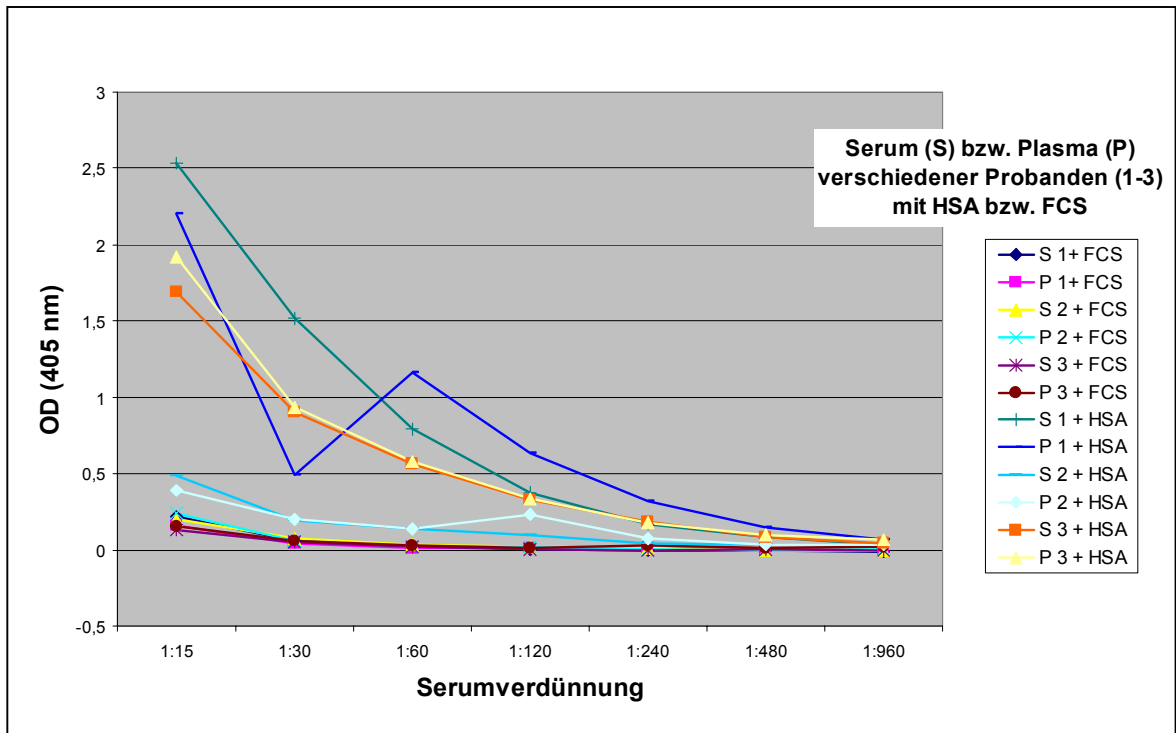


Abbildung 5 Vergleich HSA versus FCS als Blockiermedium, gleichzeitig Vergleich Plasma versus Serum als Medium des 1. Antikörpers
Messung nach 30 min Entwicklungszeit ohne Zugabe des 1. Antikörpers

Im Vergleich von HSA und FCS als Blockierungsreagenzien (Abbildung 5) stellt sich heraus, daß Seren gesunder Probandinnen, geblockt mit FCS, ein deutlich geringeres Hintergrundsignal zeigen. Aus diesem Grund wird bei allen weiteren ELISA Messungen FCS anstelle von HSA verwendet. Als nächster Schritt wurde untersucht, ob Plasma oder Serum das bessere Medium zum Nachweis des primären Antikörpers darstellt. Da die Ergebnisse für Serum und Plasma keinen Unterschied aufwiesen, wurde im weiteren Verlauf Serum eingesetzt, da Serum keine Gerinnungsfaktoren und somit weniger potentielle Störfaktoren als Plasma enthält.

5.1.13. Messung des mit Herceptin® versetzten Serums

Nachdem das Blockierungsmedium festgelegt war, wurden Serum und Plasma gesunder Probandinnen noch einmal, diesmal aber versetzt mit Herceptin® in verschiedenen Konzentrationen, verglichen (Abbildung 6).

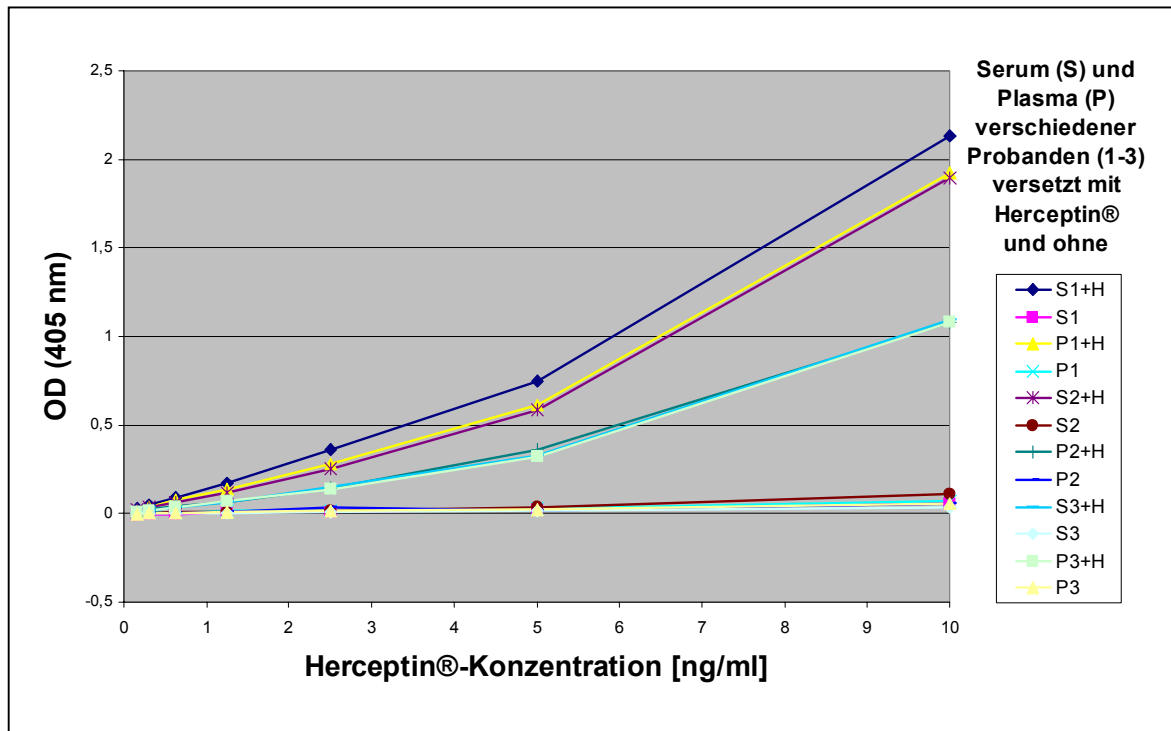


Abbildung 6 Vergleich von Serum mit Herceptin® versetzt mit Plasma mit Herceptin® versetzt, Messung nach 30 min Entwicklungszeit

Bei wiederum gleichen Ergebnissen wurde Serum gesunder Probandinnen mit Herceptin® versetzt und bei zwei verschiedenen Konzentrationen (1:500, 1:1.000) des sekundären Antikörpers gemessen. Auch hier ergab der sekundäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:1.000 ein optimales Ergebnis für den gewünschten Messbereich (Abbildung 7).

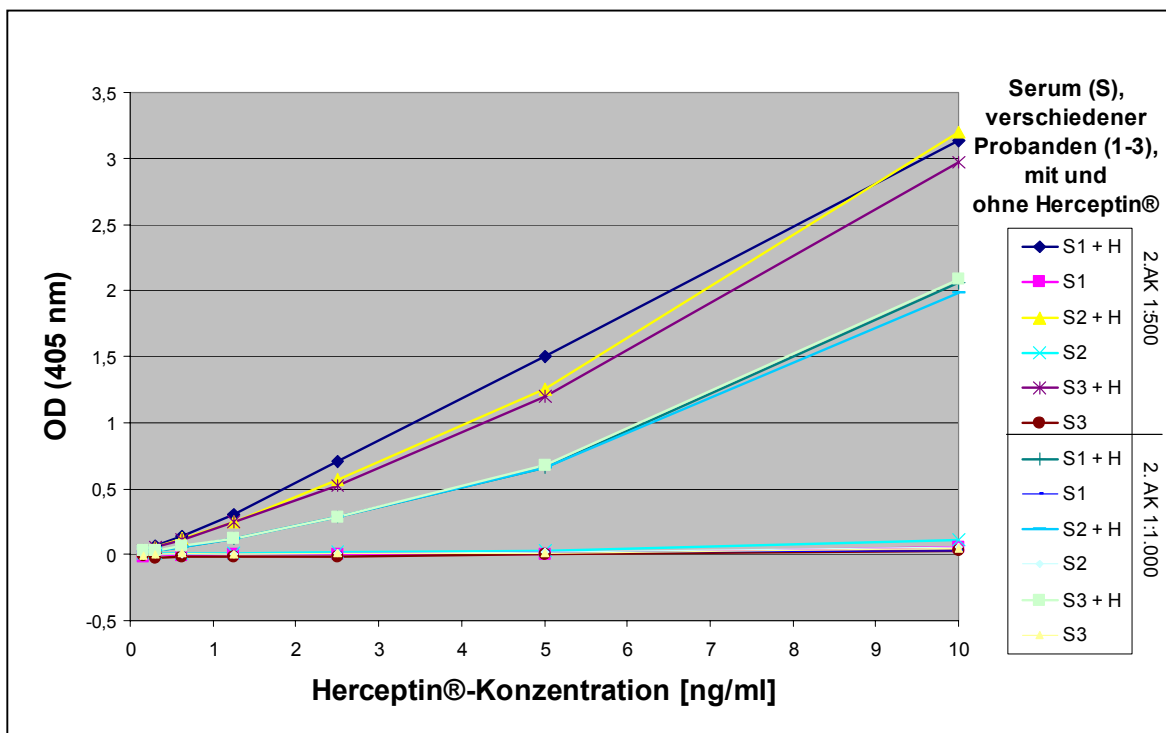


Abbildung 7 Vergleich Verdünnung Detektionsantikörper 1:500 versus 1:1.000 Serum mit und ohne Herceptin® Messung nach 30 min Entwicklungszeit

Nach dieser Optimierung konnte der ELISA für humane Seren eingesetzt werden.

5.2. ELISA

Puffer und Lösungen

ECD-Lösung: 0,5 µg ECD/ml PBS

Waschpuffer (WSB): PBS,
0,1 % fetales Kälberserum (FCS)
0,05 % Tween 20

Blockierungspuffer: PBS
10 % fetales Kälberserum (FCS)
0,05 % Tween 20

Lösung 2. AK: 20 µl Antikörper-Glycerin-Mischung,
gelöst in 4,98 ml WSB und 5 ml 2 M NaCl in Aqua destillata

Substrat: p-Nitrophenyl Phosphat und Tris(hydroxymethyl)methanamin

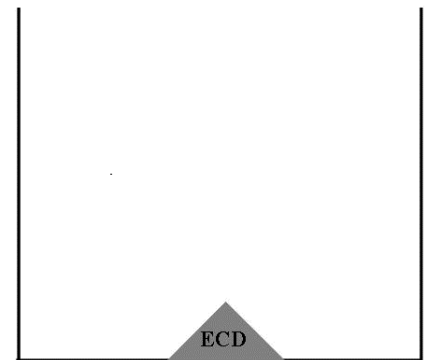
5.2.14. ELISA – Kurzprotokoll

Coating	100 µl/Kavität, ECD 0,5 µg/ml in PBS → über Nacht (ca.16 h) bei 4 °C
Waschen	4x mit WSB
Blocken	200 µl/Kavität Blockierungspuffer → 1h bei RT
Waschen	1x mit WSB
1. AK	100 µl/Kavität Herceptin 20 ng/ml in Blockierungspuffer, Verdünnungsreihe 1:2 bzw. 100 µl/Kavität Patientenserum verdünnt mit Blockierungspuffer → 2 h bei RT
Waschen	4x mit WSB
Detektions-antikörper	100 µl/Kavität, m-anti-human-IG-AP Verd. 1:1000 mit WSB → 1 h bei RT
Waschen	4x mit WSB
Substrat	100 µl/Kavität
Messung	nach 30 min bei einer Wellenlänge von 405 nm

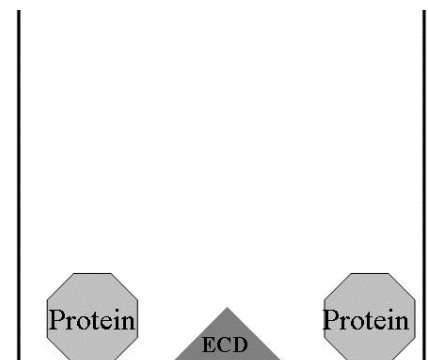
Tabelle 6 Elisa - Kurzprotokoll

5.2.15. Durchführung

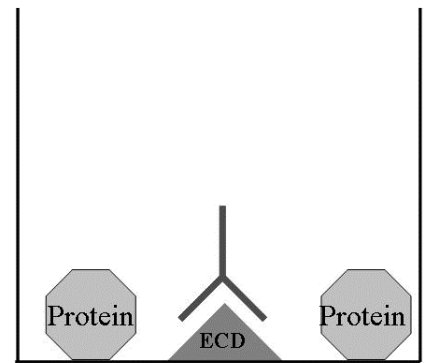
Eine 96-Kavitäten Mikrotiterplatte, maxisorp, wird über Nacht bei 4 °C mit Extrazellulärer Domäne (ECD) von HER2/neu, gelöst in PBS, beschichtet (100 µl/Vertiefung).



Nach viermaligem Waschen mit Waschpuffer und anschließendem „Trockenschlagen“ der Mikrotiterplatte auf einem Papierhandtuch wird die Platte, mit 200 µl Blockierungspuffer pro Vertiefung, für eine Stunde bei Raumtemperatur abgedeckt stehen gelassen.

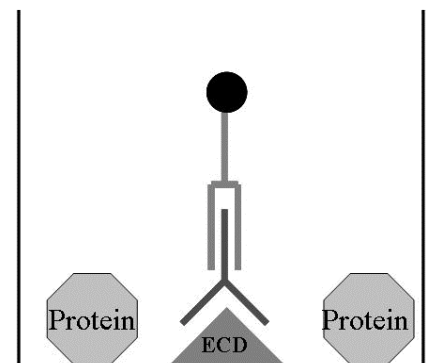


Anschließend wird die Platte einmal, mit WSB gewaschen und „trockengeschlagen“, 100 µl humanes Serum von verschiedenen Patienten, Verdünnung 1:10 mit Blockierungspuffer, in die Vertiefungen gegeben und die Platte für zwei Stunden bei Raumtemperatur abgedeckt stehen gelassen. Als Standardkurve wird Serum einer gesunden Person, Verdünnung 1:10 mit Blockierungspuffer, versetzt mit Herceptin® in verschiedenen Konzentrationen (20-0,625 ng/ml), verwendet.



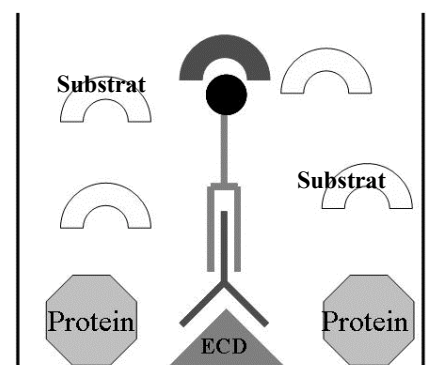
1. AK Herceptin®

Danach wird die Platte vier Mal mit WSB gewaschen, wiederum „trockengeschlagen“ und 100 µl des sekundären Antikörpers (mouse-anti-human IG-AP), 1:1.000 verdünnt, in die Vertiefungen pipettiert.



1. AK Herceptin®
2. AK Maus anti-human-IgG AP

Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wird die Platte wiederum vier Mal gewaschen und „trockengeschlagen“ und pro Vertiefung 100 µl Substrat hinzugegeben (Es wird direkt im Anschluß an den vorherigen Schritt hergestellt und bis zum Gebrauch im Dunkeln gelagert). Nach 30 Minuten wird die Extinktion mit dem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.



1. AK Herceptin®
2. AK Maus anti-human-IgG AP

Seren von Patientinnen unter Herceptin®-Therapie wurden in diesem ELISA bei einer Serumverdünnung von 1:5.000 bis 1:160.000 gemessen.

5.2.16. Qualitätssicherung

Nachdem der grundsätzliche Aufbau des ELISAs mit möglichst niedrigem Hintergrundsignal feststand, wurde die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, bei gleicher Herceptin®-Konzentration, an verschiedenen Stellen der Mikrotiterplatte (Intravarianz) getestet. Die Konstanz der Ergebnisse von Mikrotiterplatte zu Mikrotiterplatte (Interplattenvarianz) wurde auch überprüft. Hierbei ergab sich eine Intravarianz von < 5 % (2,24 % bei 10 ng/ml und 3,75 % bei 20 ng/ml) und eine Interplattenvarianz von < 15 % (12,1 % bei 10 ng/ml und 7,9 % bei 20 ng/ml).

5.2.17. Einfrier- und Auftaustabilität von Herceptin® im Serum

Mit Herceptin® gespiktes Serum (20 ng/ml und 40 ng/ml Herceptin®), welches als Positivkontrolle verwendet wird, wurde vier Einfrier- und Auftauzyklen ausgesetzt. Tiefgefroren wurde es jedes Mal in flüssigem Stickstoff (-196 °C) und anschließend bei RT aufgetaut. Hier beläuft sich die Standardabweichung auf 10,4 % bei 20 ng/ml und 14,1 % bei 40 ng/ml.

5.2.18. Spezifität des ELISAs

Als nächster Schritt wurde die Spezifität des ELISAs überprüft. Hierzu wurden verschieden präparierte Seren gemessen (Abbildung 8). Es wurde mit Herceptin® versetztes Serum, einerseits mit ECD-Suspension (0,25 µg/ml) in einer Mikrotiterplatte von Greiner vorinkubiert (2h), andererseits ohne weiteren Zusatz, gemessen. Außerdem wurde das Serum einer Patientin unter Herceptin®-Therapie mit und ohne Vorinkubation (2h) mit ECD-Suspension (0,25 µg/ml) gemessen. Ziel der Vorinkubation mit ECD war es das im Serum enthaltene Herceptin® durch Bindung an die gelöste ECD abzufangen. Weist der ELISA eine hohe Spezifität für Herceptin® auf, wird das Farbsignal deutlich geringer ausfallen, da weniger freie Antikörper im Serum enthalten sind, die an die ECD auf der ELISA-Platte binden.

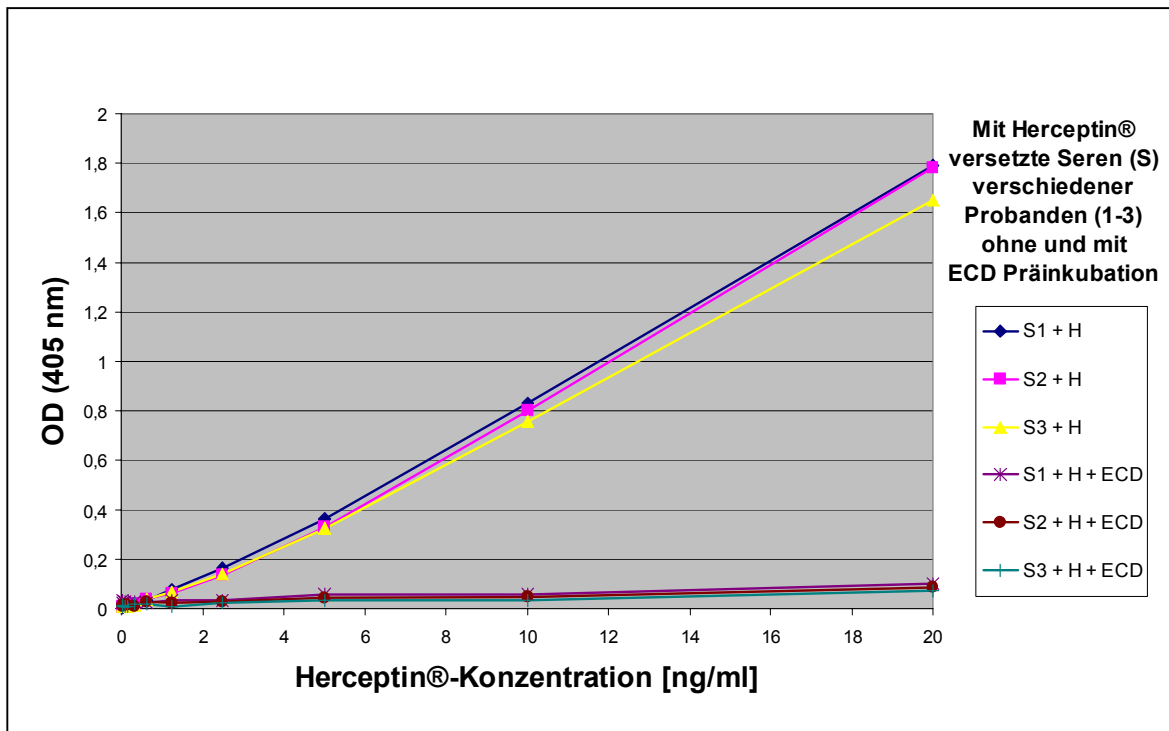


Abbildung 8 Mit Herceptin® versetzte Seren ohne und mit Präinkubation mit ECD (0,25 µg/ml) für 2h
Messung nach 30 min Entwicklungszeit

Wie erwartet, ergab sich für die Seren, die mit ECD-Suspension vorinkubiert worden waren, eine Herceptin®-Konzentration im Bereich der Null-Linie, wohingegen nicht vorinkubierte, mit Herceptin® gespikete Seren bei einer Herceptin®-Konzentration von 20 ng/ml eine OD bis 1,8 ergaben. Das Serum der Patientin unter Herceptin®-Therapie erreichte bei einer Verdünnung von 1:5.000 eine OD von 1,6, dies entspricht einer Herceptin®-Konzentration von 75 µg/ml (Daten nicht in Graphik enthalten).

Als weitere Spezifitätskontrolle wurden zwei Seren gesunder Probandinnen neben Herceptin® auch mit Rituximab® (R), einem monoklonalen Antikörper gegen CD 20 auf B-Lymphozyten, versetzt. Außerdem wurde mit Herceptin® (H) gespiketes Serum einmal mit ECD- und einmal mit ICD-Suspension (ICD= intrazelluläre Domäne von HER2/neu) vorinkubiert.

Als Negativ Kontrolle wurde kein Serum, sondern nur die FCS Lösung, die zur Verdünnung der Seren eingesetzt wurde, verwendet („blank“).

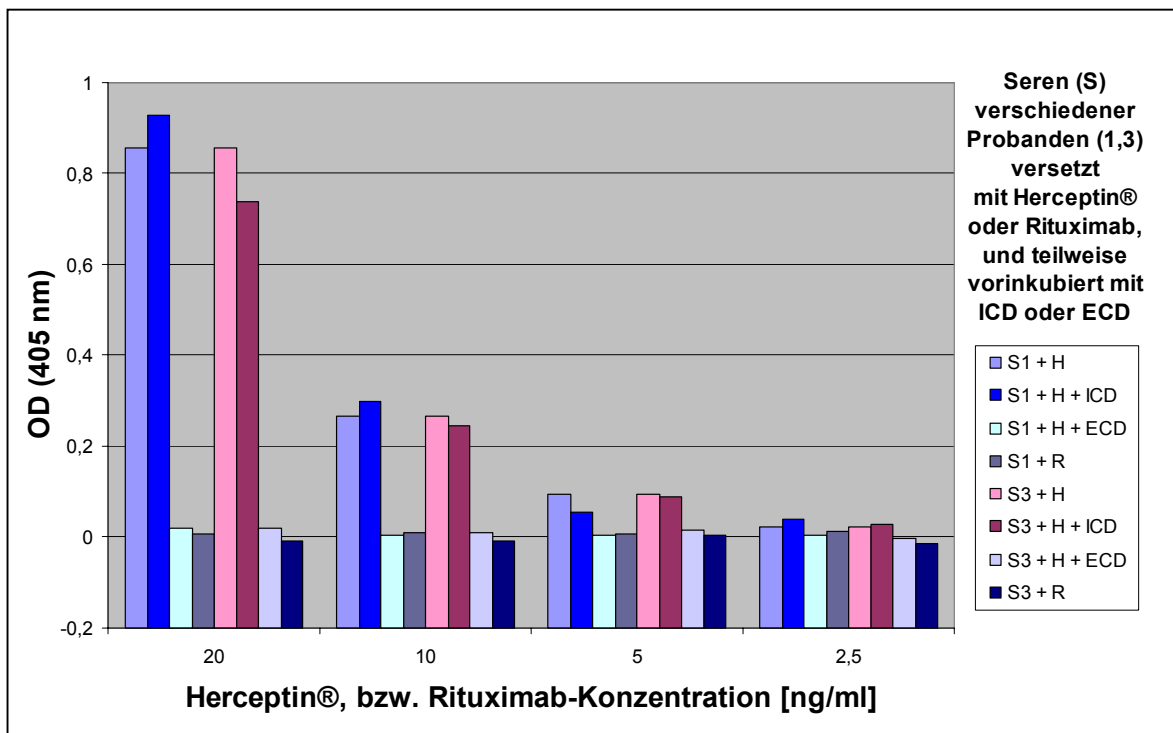


Abbildung 9 ELISA-Spezifitäts-Testung mit ICD, ECD, Herceptin®, Rituximab
Messung nach 30 min Entwicklungszeit

Da Herceptin® nur an die ECD von HER2/neu bindet, war bezüglich des Farbausschlages bei mit ICD vorinkubierten Seren kein Unterschied zu Seren zu sehen, die mit Herceptin® versetzt waren. Bei Zugabe von Rituximab zum Serum gab es keine Farbreaktion. Eine weitere Bestätigung dafür, daß ECD-spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

5.2.19. Messung der Serumproben auf Immunglobuline der Gruppe G

Festlegung des unteren Grenzwertes

Zur Bestimmung des unteren Grenzwertes der ELISA-Meßwerte wurden 30 Seren gesunder Probandinnen gemessen. Nach der Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung wurde der untere Grenzwert auf 65,4 ng/ml festgelegt (CI 95 %) (Abbildung 10).

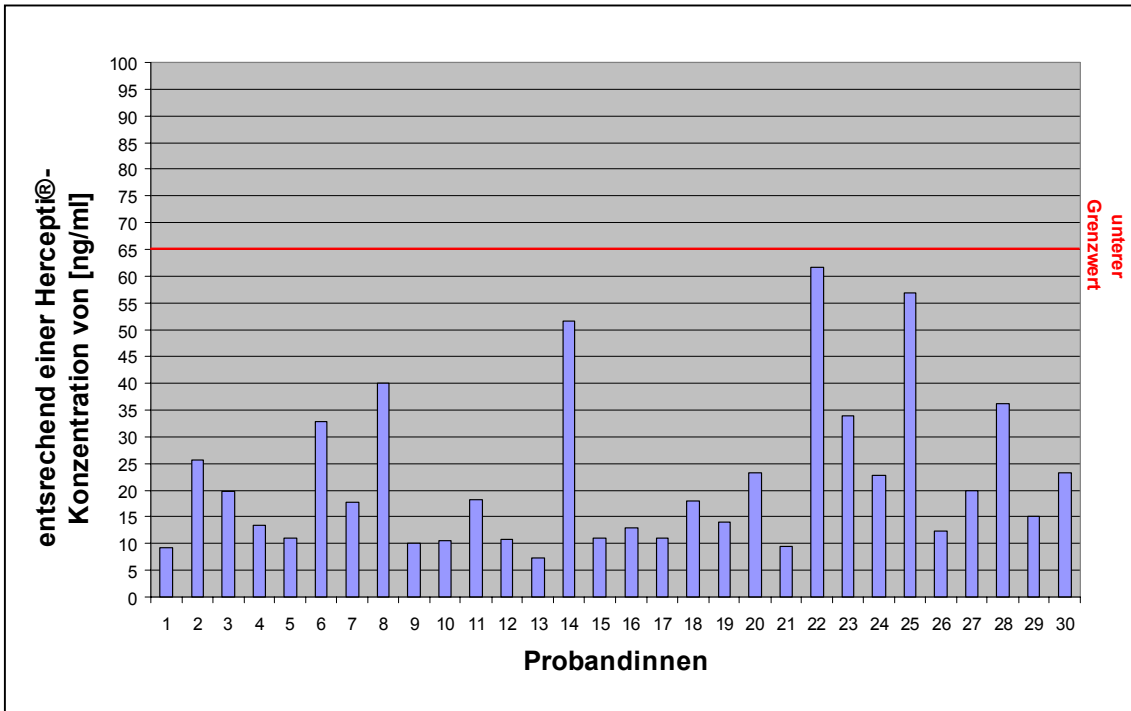


Abbildung 10 Bestimmung des unteren Grenzwertes,
Messung von 30 Seren gesunder Probandinnen aus der Normalbevölkerung

**Messung der Serumproben von Patientinnen mit Verdacht auf Mammakarzinom
– Fortlaufende Darstellung der Messergebnisse**

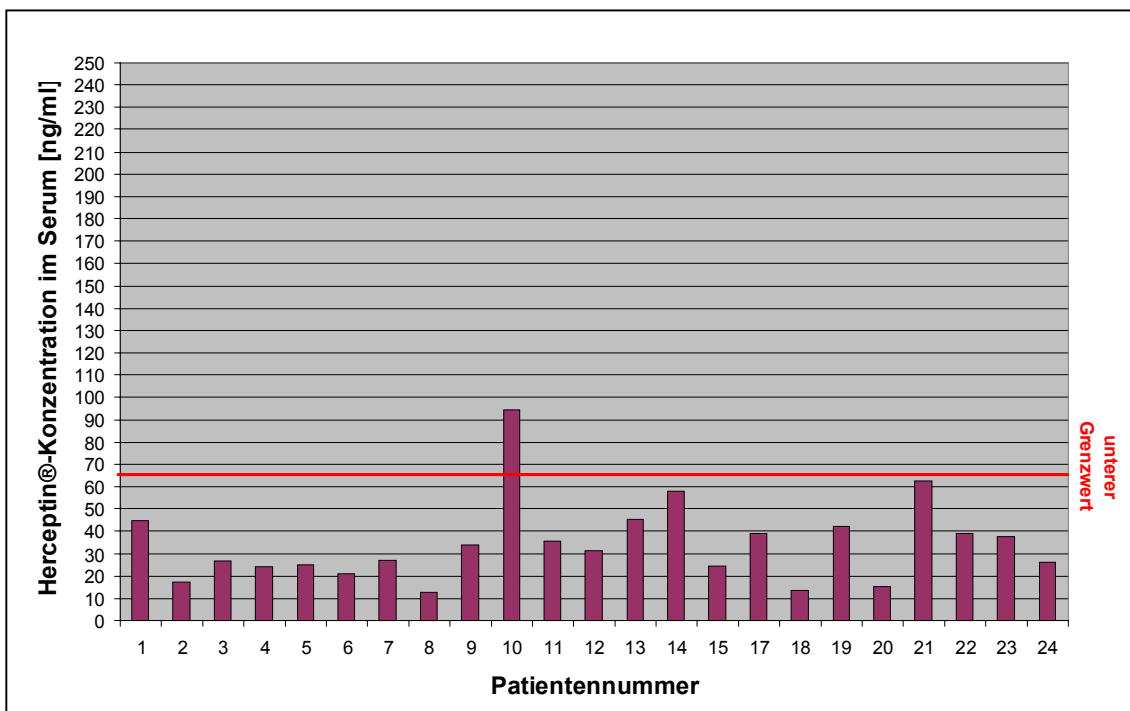


Abbildung 11 Patientenserum I

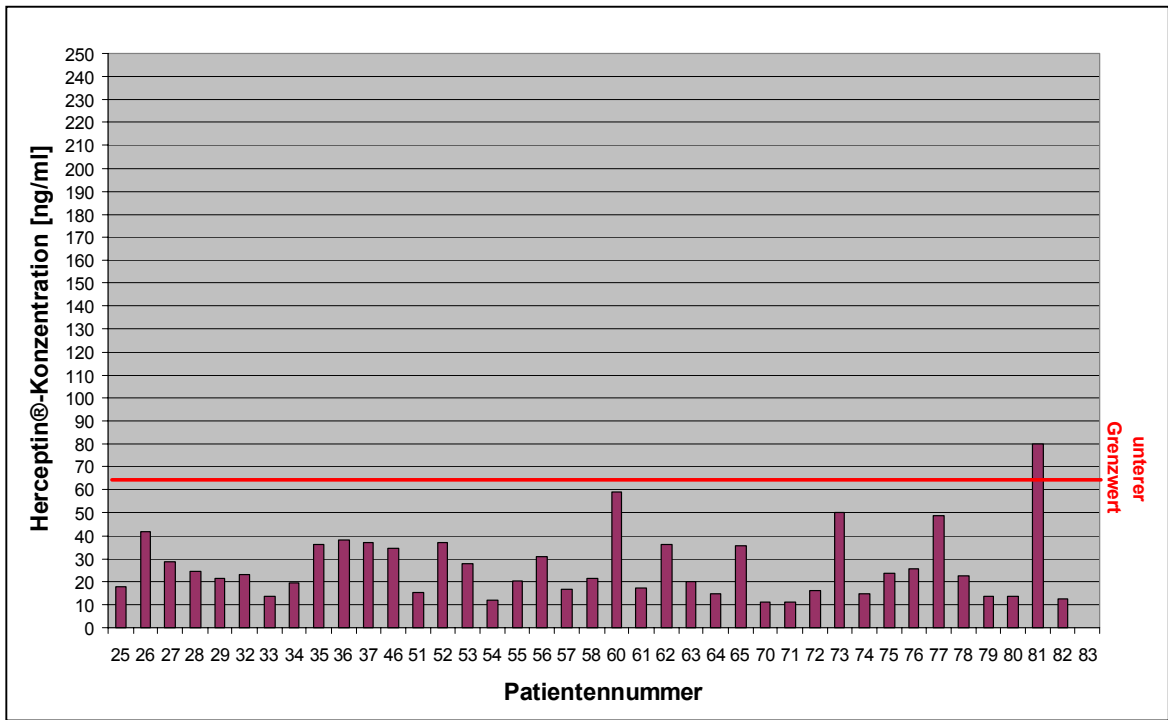


Abbildung 12 Patientenseren II

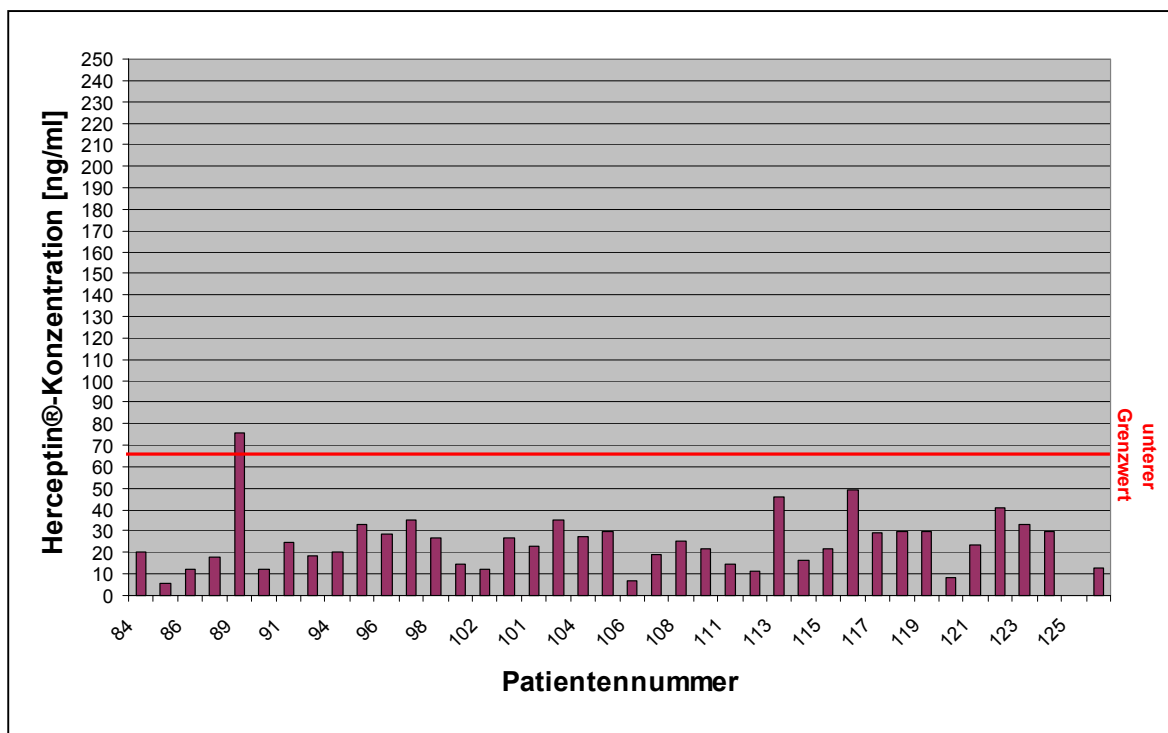


Abbildung 13 Patientenseren III

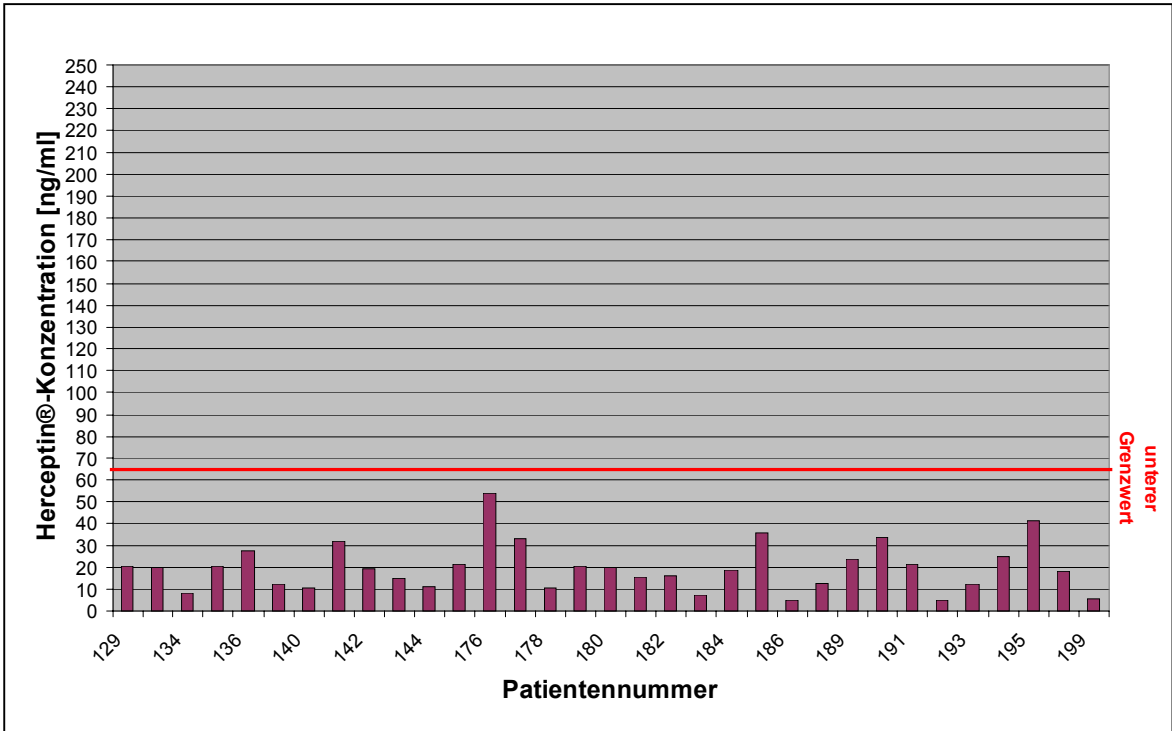


Abbildung 14 Patientenseren IV

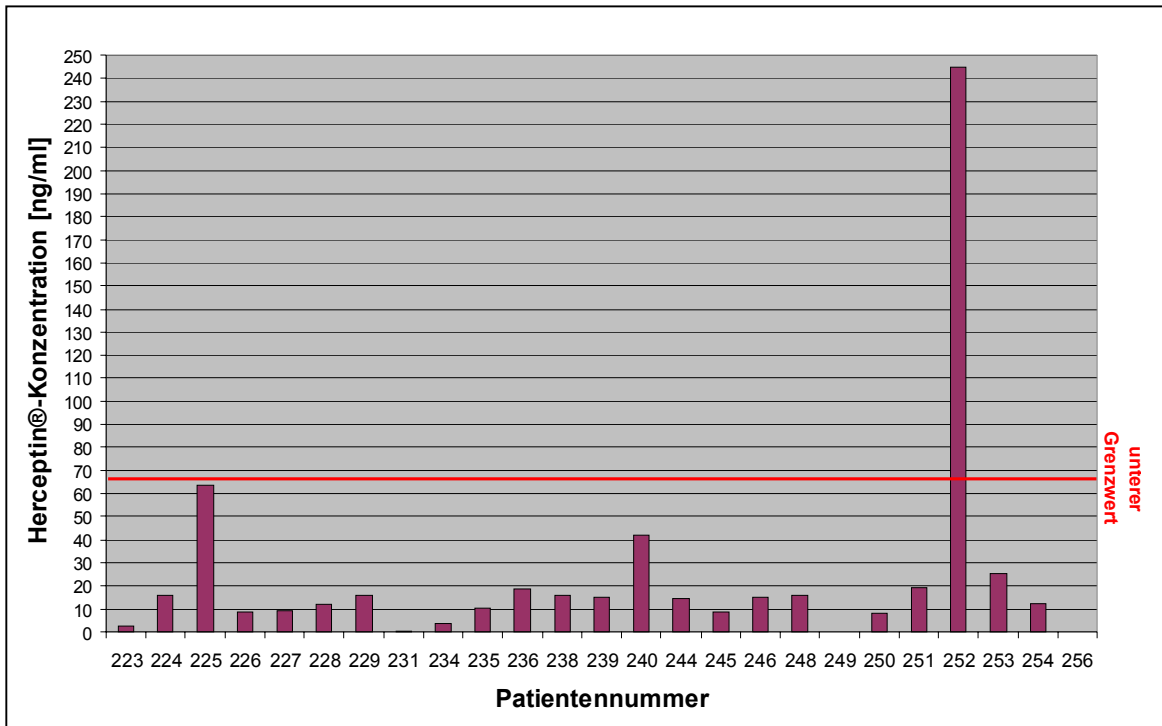


Abbildung 15 Patientenseren V

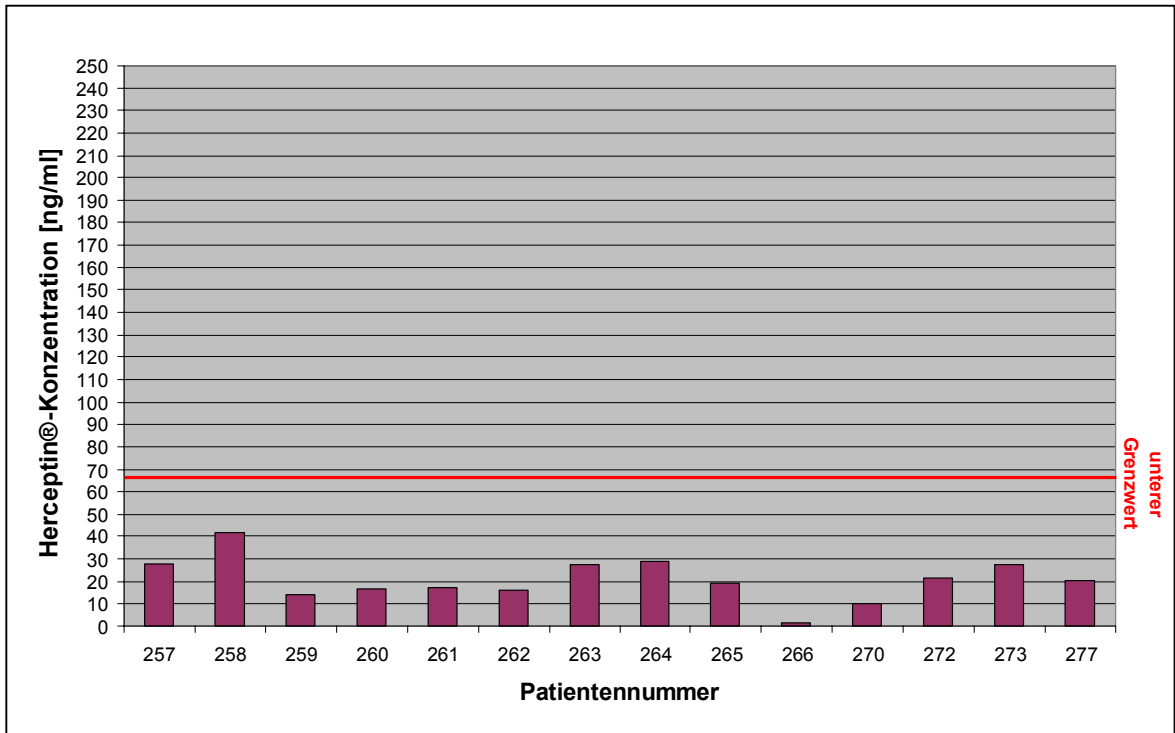


Abbildung 16 Patientenserien VI

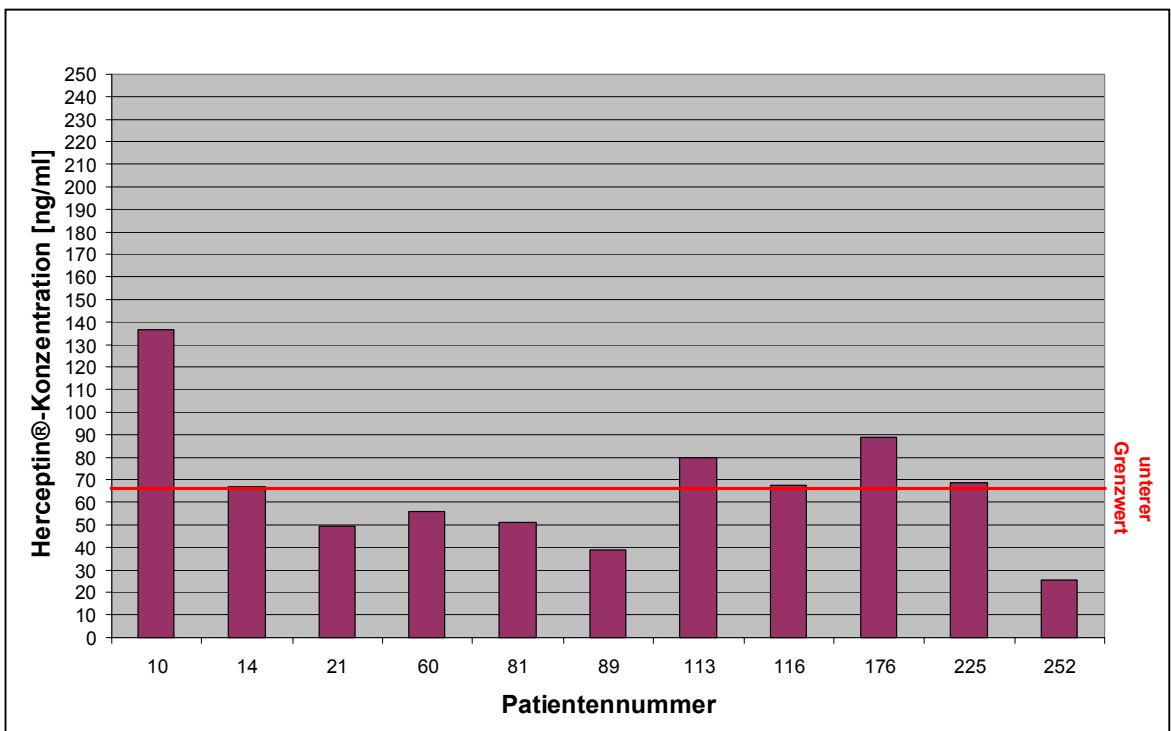


Abbildung 17 Patientenserien VII, Wiederholungsmessung der Seren mit Werten oberhalb des unteren Grenzwertes

Von 173 Patientenseren, die bei Klinikaufnahme wegen des Verdachts auf ein Mammakarzinom abgenommen wurden, zeigten 11 Seren einen Farbumschlag oberhalb des Grenzwertes von 65,4 ng/ml.

Zur Bestätigung wurden die positiven Seren erneut gemessen (Abbildung 17) und die 9 Seren mit den höchsten Werten für eine weitere Messung eingesetzt (Abbildung 18). Um sicher zu gehen, daß die positiven Messwerte bei einer Serumverdünnung von 1:10 kein Matrixeffekt waren, wurden diese Seren erneut gemessen. Diesmal wurden sie wie zuvor bei einer Verdünnung von 1:10 und außerdem parallel mit ECD (0,25 µg/ml) vorinkubiert gemessen. Wenn die Ursache des ursprünglichen Farbausschlages Antikörper gegen die ECD von HER2/neu wäre, dürften die mit ECD vorinkubierten Seren eine deutlich geringere Farbreaktion zeigen, als die Seren ohne Vorinkubation. Bezogen auf die Ergebnisse des mit Herceptin® versetzten Serums war diese Annahme richtig. Bei den Patientenseren brachte die Vorinkubation mit der ECD von HER2/neu aber keine wesentliche Änderung in den Messwerten oder wie am Beispiel von Serum 10, einen entgegen gesetzten Effekt (Abbildung 18).

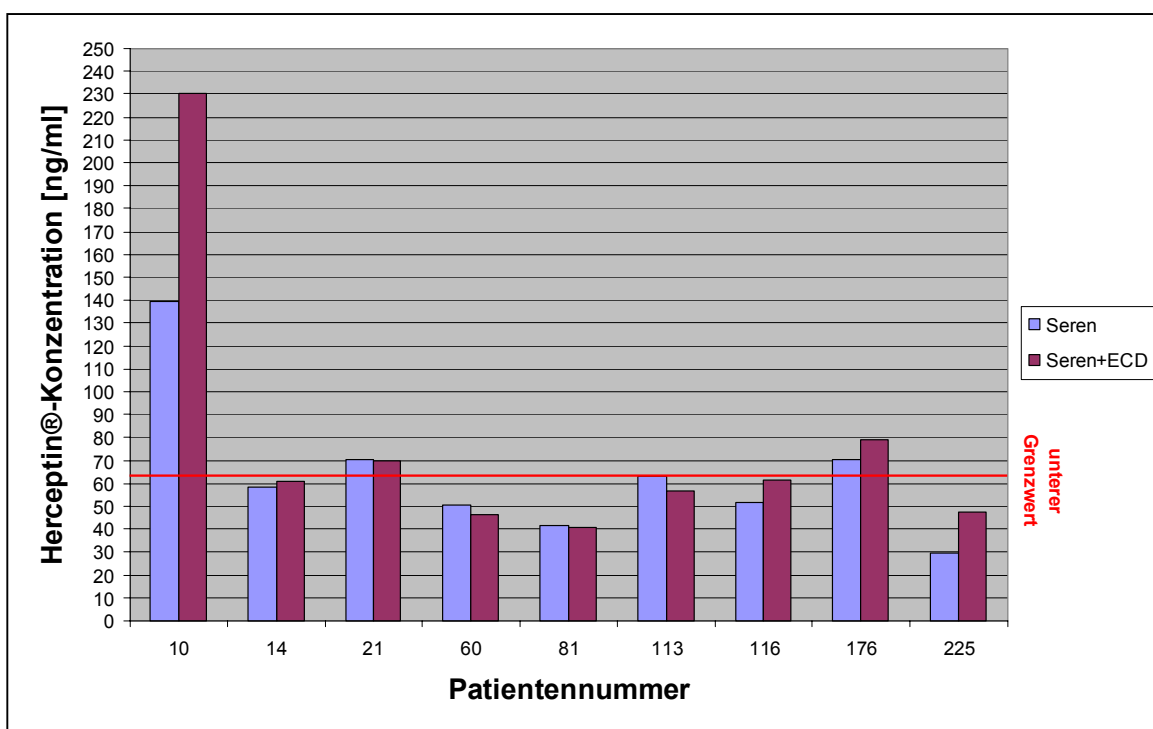


Abbildung 18 Überprüfung der Spezifität der positiv gemessenen Patientenseren durch Präinkubation mit ECD von HER2/neu

Um zu eruieren, bei welcher Verdünnung der Seren der Matrix Effekt nicht mehr zum Tragen kam, wurden die Seren nochmals, aber diesmal bei verschiedener Verdünnung, gemessen (Abbildung 19).

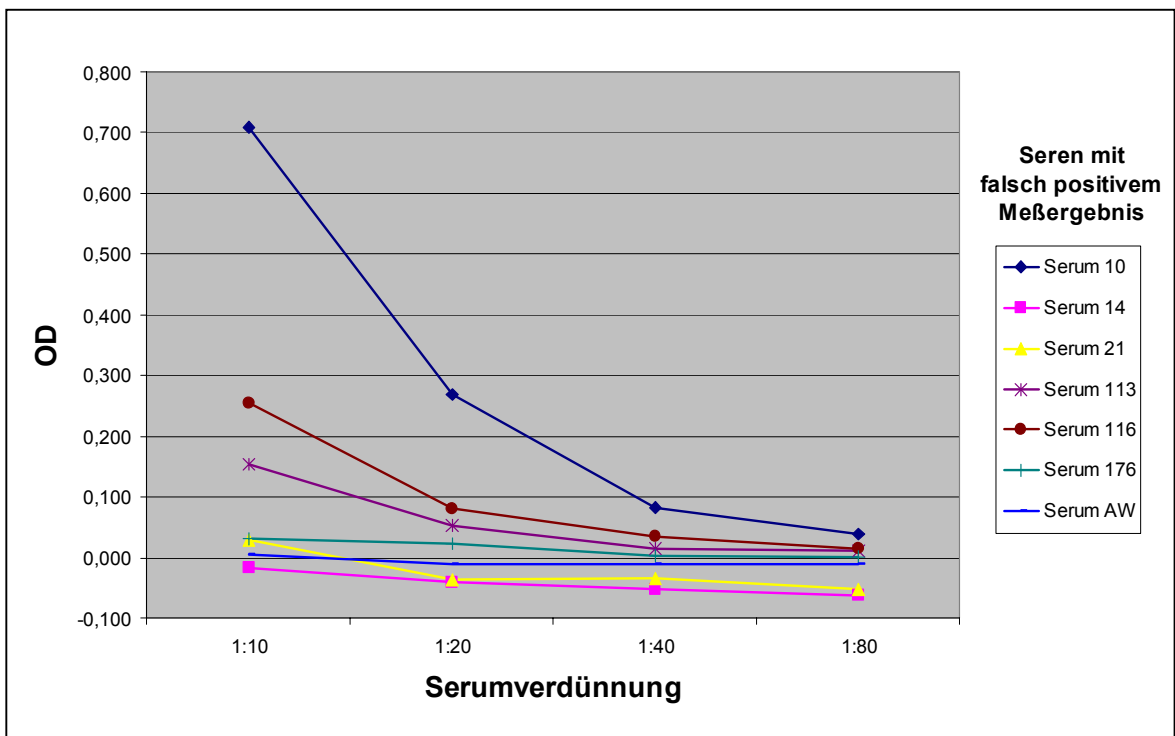


Abbildung 19 Serumverdünnung versus optische Dichte zur Festlegung der Verdünnung, bei der der Matrixeffekt nicht mehr zum Tragen kommt

Hier zeigte sich, daß der Matrixeffekt bei einer Verdünnung von 1:80 nicht mehr zum Tragen kam.

Serumproben von Patientinnen nach adjuvanter Chemotherapie

Es wurden 21 Seren von Patientinnen nach abgeschlossener adjuvanter Chemotherapie gemessen (17 HER2/neu 3+, 2 HER2/neu 2+ (200, 214) und 2 mit unbekanntem HER2/neu Status, (93, 197)).

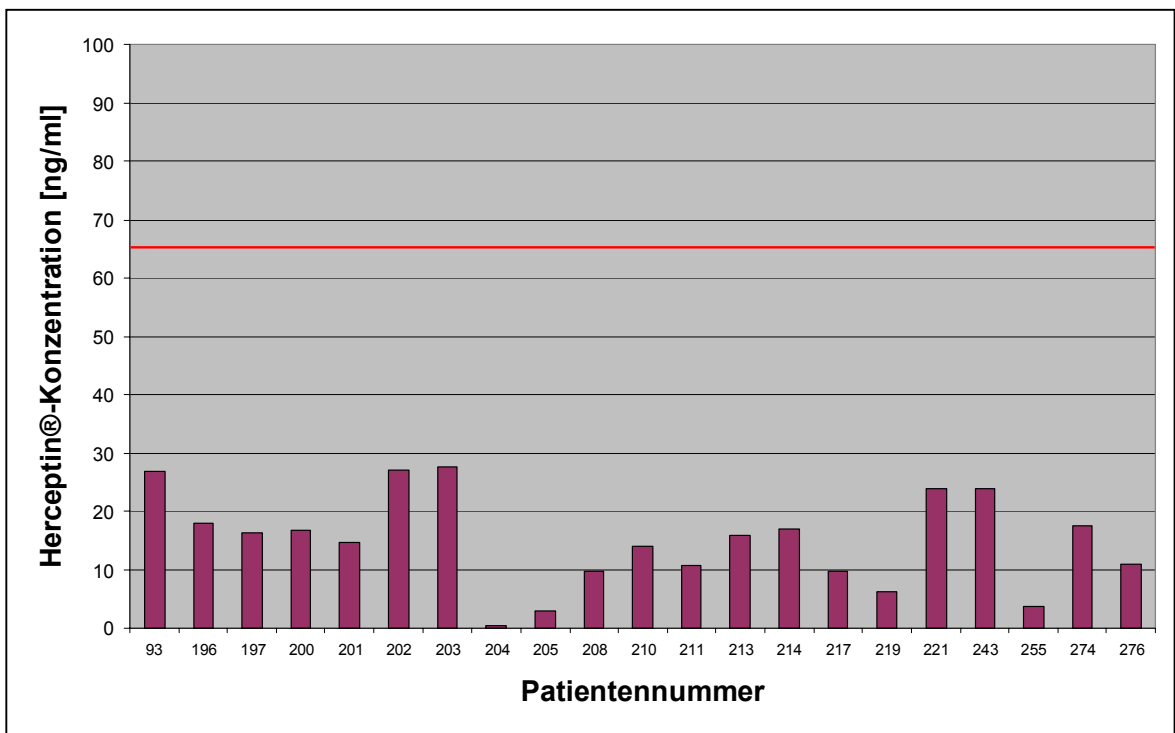


Abbildung 20 Patientenserum nach adjuvanter Chemotherapie

Wie aus der Graphik ersichtlich (Abbildung 20), waren alle Messergebnisse weit unterhalb des unteren Grenzwertes.

Serumproben von Patientinnen unter adjuvanter Herceptin®-Therapie

Seren von Patientinnen unter adjuvanter Herceptin®-Therapie (im Rahmen der HERA-Studie) ergaben bei einer Verdünnung von 1:10.000 und höher ein deutlich positives Ergebnis, mit ähnlichen Ergebnissen für Behandlungswoche 25 und 52.

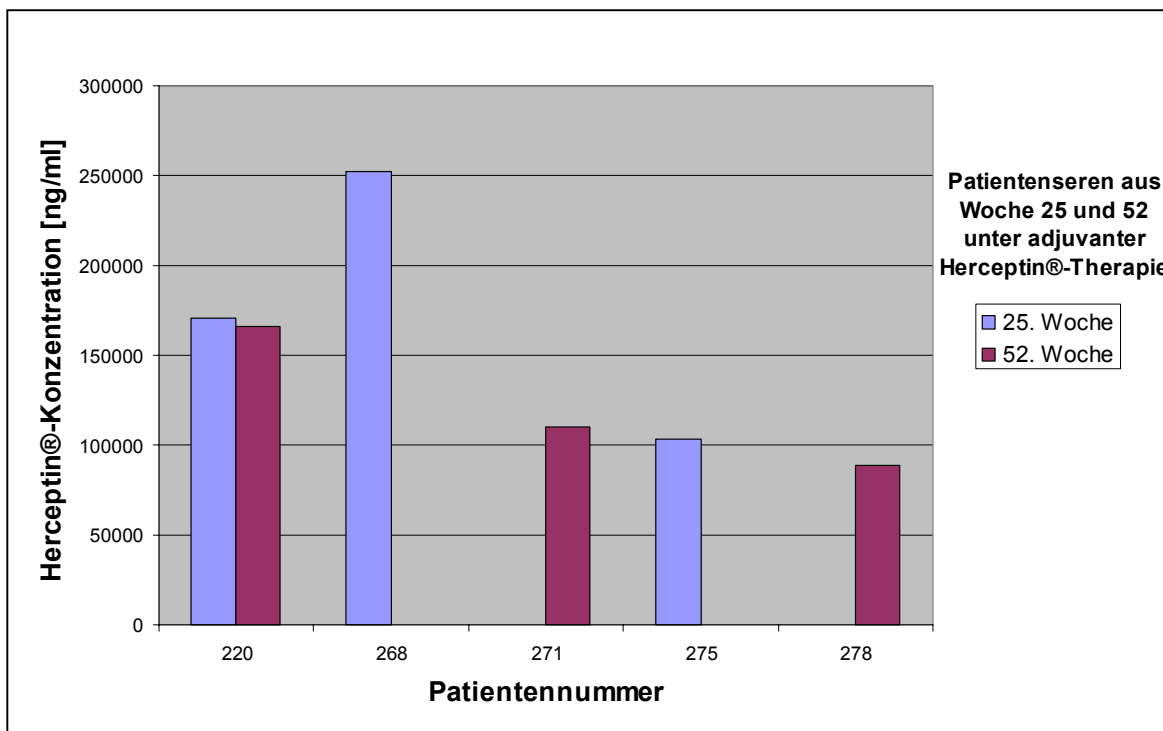


Abbildung 21 Seren von Patientinnen unter adjuvanter Herceptin®-Therapie

Zusätzlich wurde der Verlauf einer Patientin unter adjuvanter Herceptin®-Therapie (1 Jahr 6mg/kg KG, initial 8mg/kg KG, q21) von vor Beginn der Behandlung bis Zyklus 16 gemessen (Abbildung 22). Die Serumproben wurden jeweils vor und nach Infusionsgabe abgenommen. Der Wert vor der ersten Herceptin® Infusion ist so gering (9 ng/ml), daß er in der Graphik nicht sichtbar ist. Die Serumabnahmen vor und nach der vierten Infusionsgabe, nach der siebten und vor der dreizehnten Infusionsgabe konnten aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden.

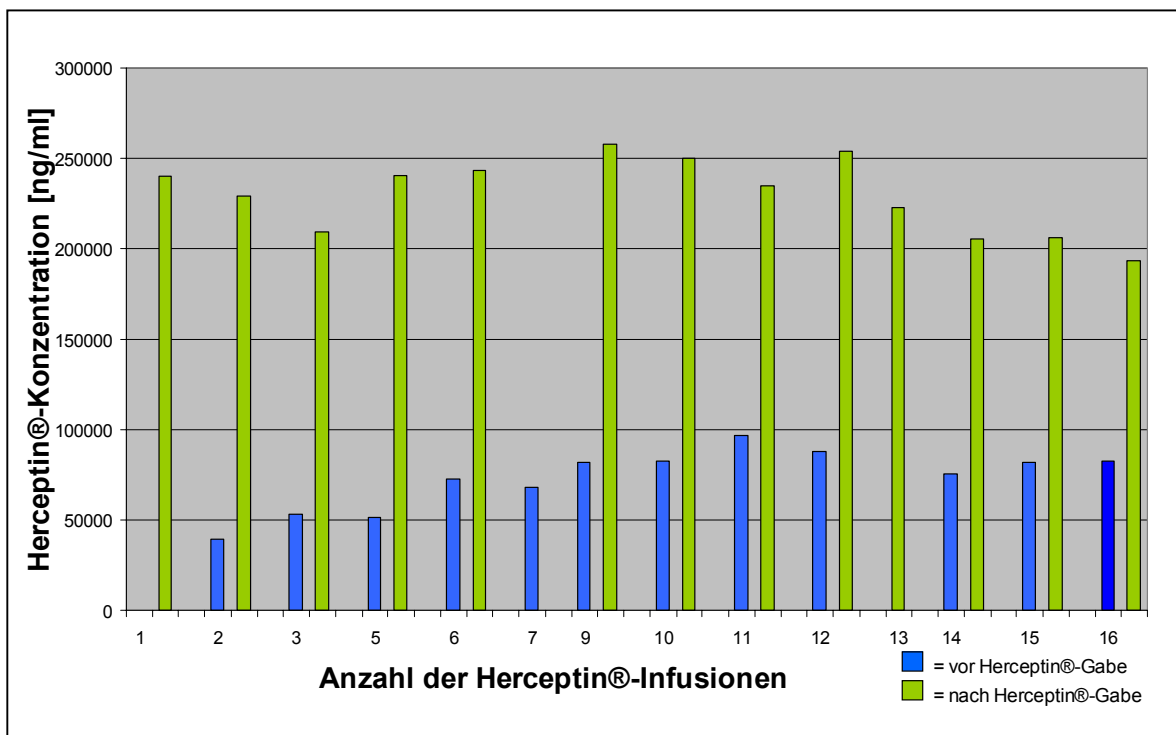


Abbildung 22 Herceptin®-Verlauf im Serum einer Patientin unter adjuvanter Herceptin®-Therapie (6mg/kg KG, q21)

Serumprobe einer Patientin unter 2C4-Therapie

Da es auf Grund einer Phase II-Studie zur Evaluierung eines weiteren monoklonalen Antikörpers, genannt RhuMAb 2C4, Pertuzumab oder Omnitarg®, mit Bindungsdomäne für die HER2/neu-ECD, die Möglichkeit gab, Serum einer behandelten Patientin zu gewinnen, wurde auch für Omnitarg® die Extinktion bestimmt. Das Ergebnis entspricht dem von Patientinnen unter Herceptin®-Therapie, der Wert vor Infusion ist so gering (11 ng/ml), daß er in der Graphik nicht sichtbar ist.

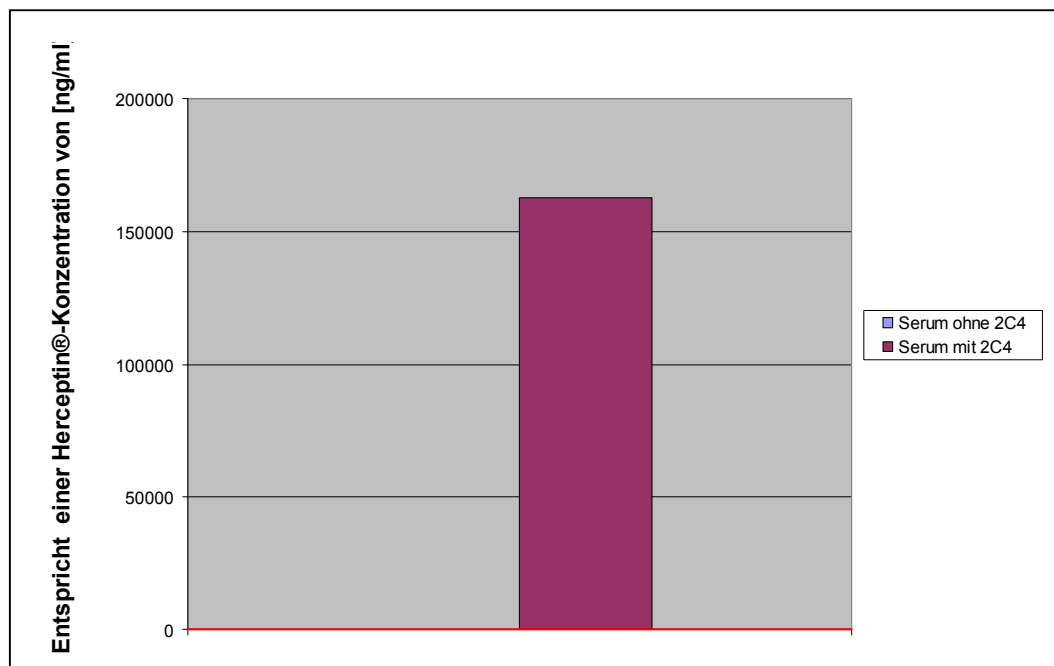


Abbildung 23 Patientenserum vor und nach Omnitarg®-Infusion

Serumproben von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom unter HER2/neu-Vakzinetherapie

Diese Serumproben stammten von 8 Patientinnen, die an einer Phase-I/II-Studie zur Induktion einer systemischen Immunantwort gegen HER2/neu Tumorantigene nach Vakzinierung mit einer genetisch modifizierten, devitalisierten, HLA-A*0201 Mammakarzinom-Variante teilnahmen. Ziel war es, eine Antikörperreaktion gegen Anteile des HER2/neu-Proteins zu generieren. Zur Orientierung wurde in den ersten ELISA-Messungen die zuletzt gesammelte Serumprobe einer jeden Patientin in verschiedenen Verdünnungen gemessen. Im Falle einer erfolgreichen Vakzinierung und Antikörperbildung hätten diese Serumproben den höchsten HER2/neu-Antikörpertiter und somit den größten Farbausschlag aufweisen müssen.

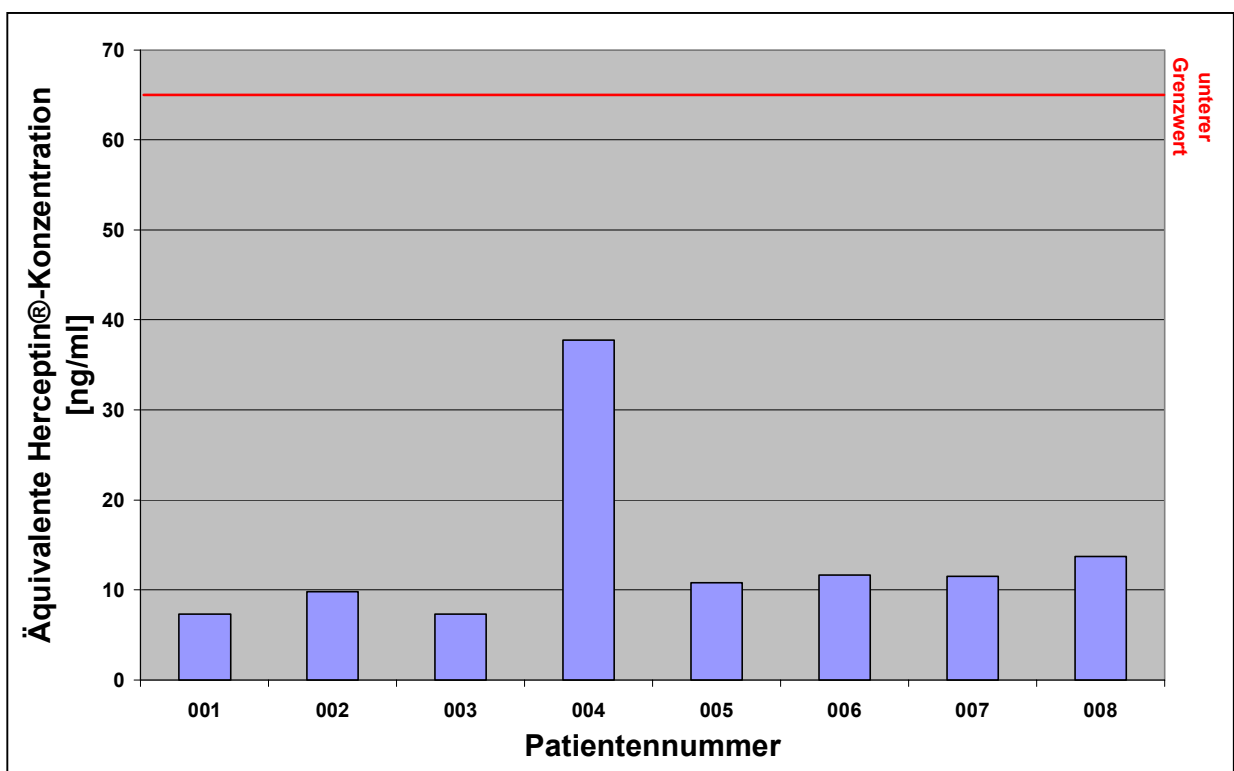


Abbildung 24 Seren von Patientinnen aus der Vakzinierungsstudie Frauenklinik Tübingen. Jeweils letzte verfügbare Abnahme, Seren 001 bis 008

Anschließend wurden weitere Serumproben aus Tübingen auf HER2/neu-Antikörper überprüft.

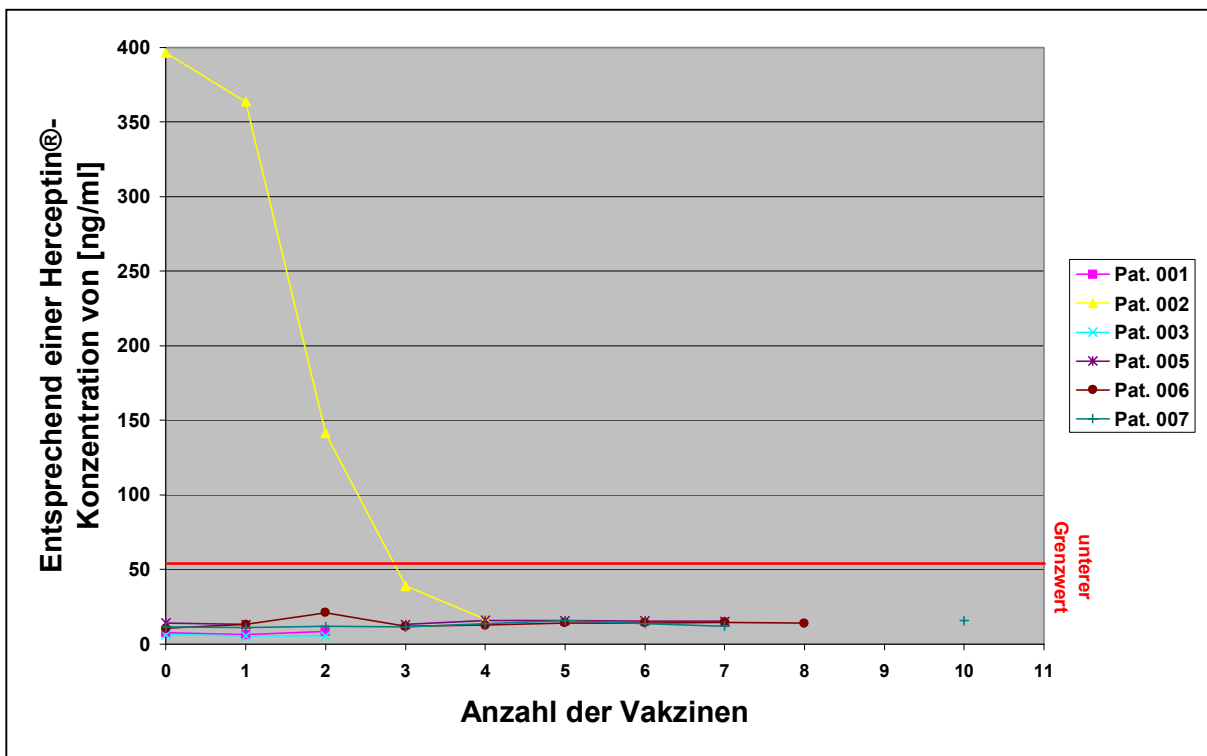


Abbildung 25 Verlaufsdarstellung der Meßwerte von Patientenseren aus der Vakzinierungsstudie Frauenklinik Tübingen

Es stellte sich heraus, daß die Serumproben von Patientin 002, deren letzte Herceptin®-Infusion bei Beginn der Vakzinetherapie 47 Tage zurück lag, einen deutlichen Farbausschlag entsprechend einer Herceptin®-Konzentration bis zu 396 ng/ml zeigte, der mit jeder Blutentnahme weiter abfiel.

Unter der Annahme, daß es sich hier um den Nachweis von noch im Serum vorhandenem Herceptin® handelt, wurden diese Seren mit und ohne ECD-Vorinkubation gemessen.

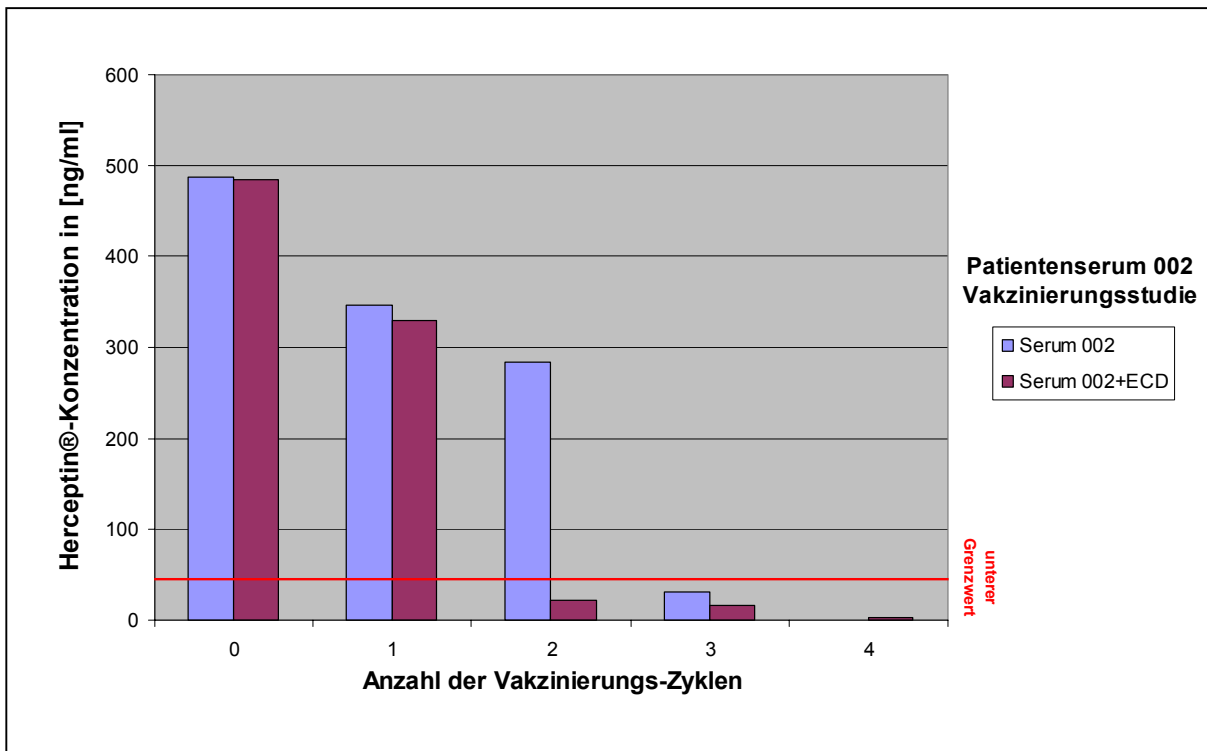


Abbildung 26 Seren der Patientin 002 aus der Vakzinierungsstudie der Frauenklinik Tübingen mit und ohne ECD-Präinkubation

Es lässt sich erkennen, daß die Menge an ECD (25 µg/ml) für den Überschuß an Herceptin® erst zum Abnahmezeitpunkt des Serums vor dem 2. Vakzinierungszyklus (1) ausreichend war, um einen Unterschied in der Herceptin®-Menge erkennen zu lassen. In der dritten Abnahme (2. Vakzinierungszyklus) ist der Unterschied am deutlichsten zu sehen.

5.2.20. Vorinkubation mit Zell-Lysat

Zur Überprüfung, daß negative Ergebnisse bezüglich körpereigener Antikörper gegen HER2/neu in Seren von Tumorpatientinnen nicht in der mangelnden Antigenität der rekombinanten ECD von HER2/neu begründet liegen, wurde mit Herceptin® gespicktes Serum mit verschiedenen Zell-Lysaten vorinkubiert. Mit einem dieser Zell-Lysate sollte in einem weiteren Versuch die Mikrotiterplatte anstelle von ECD beschichtet werden.

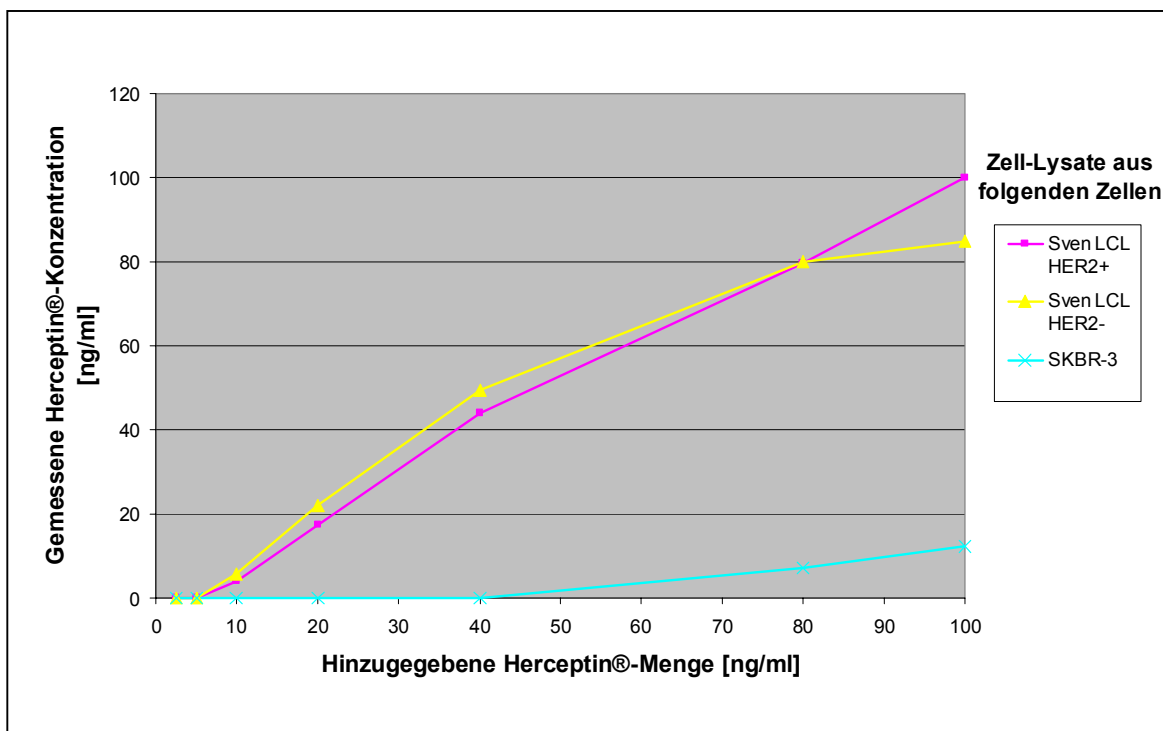


Abbildung 27 Vorinkubation des mit Herceptin® gespickten Serums mit Zell-Lysat (Sven LCL -, Sven LCL +, SKBR-3)

Nach Vorinkubation mit SVEN-LCL-Zell-Lysat ergab sich kein Unterschied zwischen HER2/neu positiven und negativen Zellen. Dies ist vermutlich mit der Proteinmenge im Lysat zu begründen, die, trotz etwa gleicher Zellzahl/ml, deutlich geringer ausfiel, als die Proteinmenge der anderen Zell-Lysate.

Nach Vorinkubation mit SKBR3-Zellen, die für ihre HER2/neu-Überexpression auf der Zellmembran bekannt sind, zeigte sich ein deutlicher Abfall in der Herceptin®-Konzentration.

Da es für diese Zellen keine Negativkontrolle im Sinne von HER2/neu-negativen SKBR3-Zellen gibt und dies wichtig wäre, um das Ausmaß des Hintergrundsignals bei einem ELISA mit Lysat-Beschichtung besser abschätzen zu können, wurde ein weiterer Versuch mit NIH 3T3-Zellen durchgeführt, d.h. mit Herceptin® gespicktes Serum mit dem entsprechenden Zell-Lysat vorinkubiert.

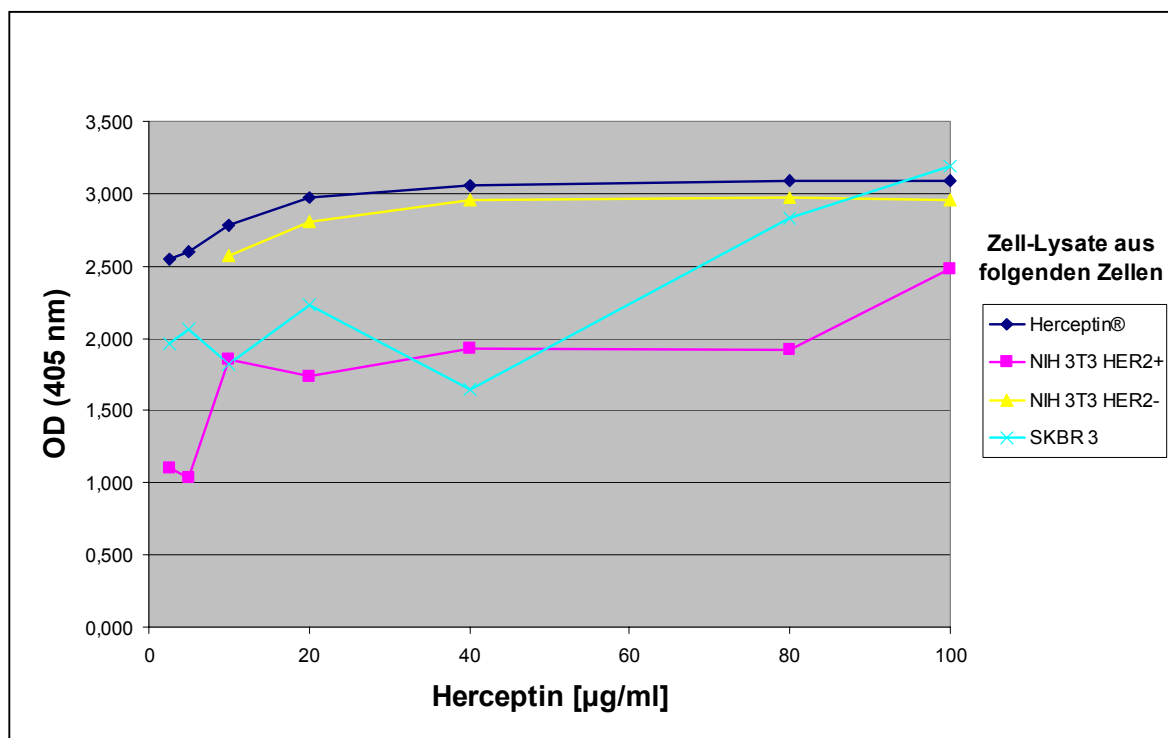


Abbildung 28 Optische Dichte versus Herceptin®-Konzentration
Vorinkubation mit NIH 3T3-Zellen, HER2/neu positiv, bzw. negativ und SKBR-3-Zellen
Messung nach 30 min

Hier zeigt sich bei NIH 3T3 HER2/neu+ und SKBR-3 Zellen ein deutlicher Abfall der Extinktion. Deshalb wurde ein ELISA mit ECD und NIH3T3-Lysat als Coating-Medium durchgeführt.

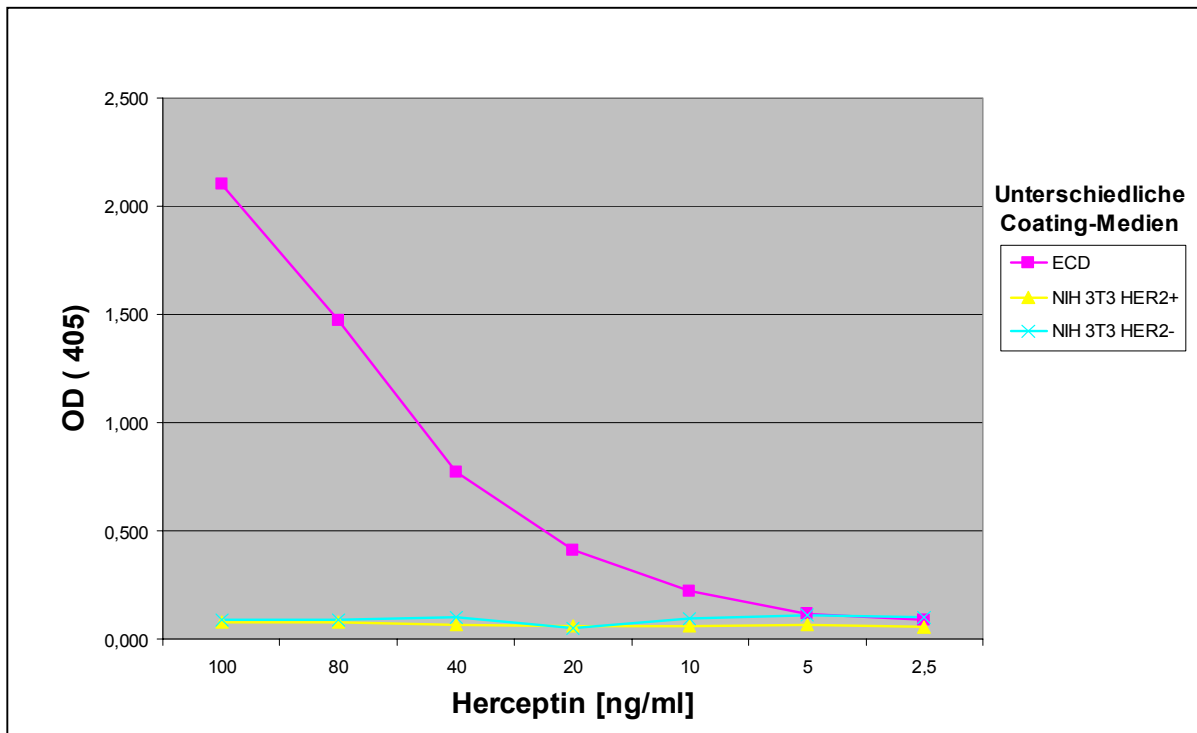


Abbildung 29 Optische Dichte versus Herceptin®-Konzentration bei unterschiedlichem Coating-Medium, Messung nach 30 min

Wie man anhand der Graphik (Abbildung 29) sehen kann, gab es im Bereich der mit NIH 3T3 beschichteten Vertiefungen keinen Farbausschlag, im Bereich, der mit ECD beschichteten einen typischen Extinktionsverlauf. Demnach wird das Zell-Lysat nicht ausreichend an der Platte gehaftet haben, da es im vorherigen ELISA in gelöster Form eine Reduktion der Extinktion hervorgerufen hat. Aufgrund der geschilderten Schwierigkeiten wurde dieser Ansatz vorerst nicht weiter verfolgt.

5.2.21. Messung von Serumproben auf Immunglobuline der Gruppe M

Wenn ein körperfremdes Antigen andauernd präsent ist, wie zum Beispiel im Fall des Blutgruppen-Antigens, gibt es Situationen, in denen die Immunabwehr kaum IgG-Antikörper, sondern vor allem IgM-Antikörper bildet. HER2/neu als Glykoprotein auf der Zelloberfläche ist aufgrund seiner Wachstum regulierenden Funktion in der Normalsituation und auch im Falle eines überexprimierenden Tumors dauerhaft präsent. Als körpereigenes Protein sollte es keine Immunantwort hervorrufen. Da man aber vermutet, daß Glykoproteine in Tumorgewebe anders glykosiliert werden als in Normalgewebe (Brockhausen, 1999) und mit dem vorher beschriebenen ELISA bisher keine körpereigenen IgG-Antikörper nachgewiesen werden konnten, wäre es durch die im Tumor vorhandene Dauerpräsentation von HER2/neu durchaus möglich, daß als Immunantwort in erster Linie IgM-Antikörper gebildet werden. Diese hätten mit dem bisher eingesetzten ELISA nicht nachgewiesen werden können, da der sekundäre Antikörper ausschließlich IgG erfasst. Deshalb wurde in diesem Versuchsaufbau der sekundäre Antikörper gegen einen goat-anti-human-IgM ausgetauscht.

Festlegung des unteren Grenzwertes für IgM

Zur Festlegung des unteren Grenzwertes wurden die schon für den IgG-ELISA verwendeten 30 Seren gesunder Probandinnen gemessen und die doppelte Standardabweichung bestimmt (CI 95 %). Es ergab sich ein unterer Grenzwert entsprechend einer Herceptin®-Konzentration von 64 ng/ml.

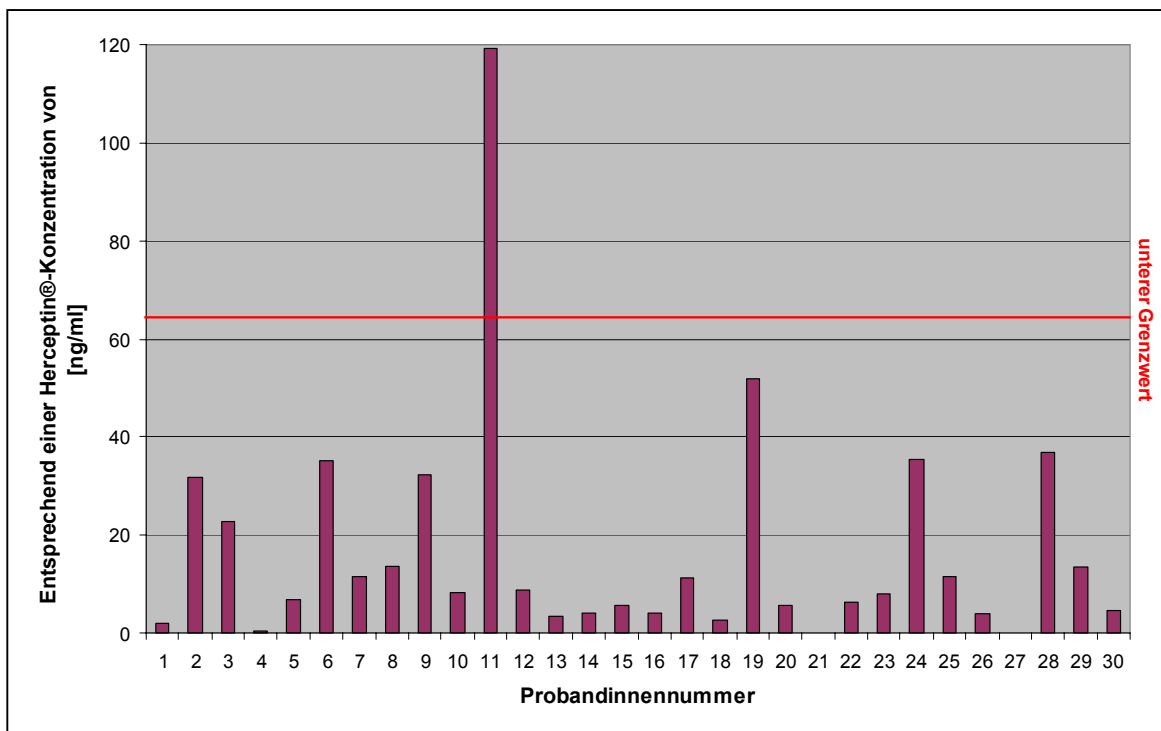


Abbildung 30 Seren 30 gesunder Probandinnen aus der Normalbevölkerung, zur Festlegung des unteren Grenzwertes des IgM-Antikörper-ELISA

Messung von Serumproben auf IgM

Anschließend wurden die ersten 28 Seren aus dem bekannten Kollektiv ausgewählt, wovon 8 der Seren von Patientinnen mit HER2/neu überexprimierenden Tumoren stammten. Als Positivkontrolle diente nach wie vor Herceptin®, hier wurde der sekundäre Antikörper wie bisher beibehalten

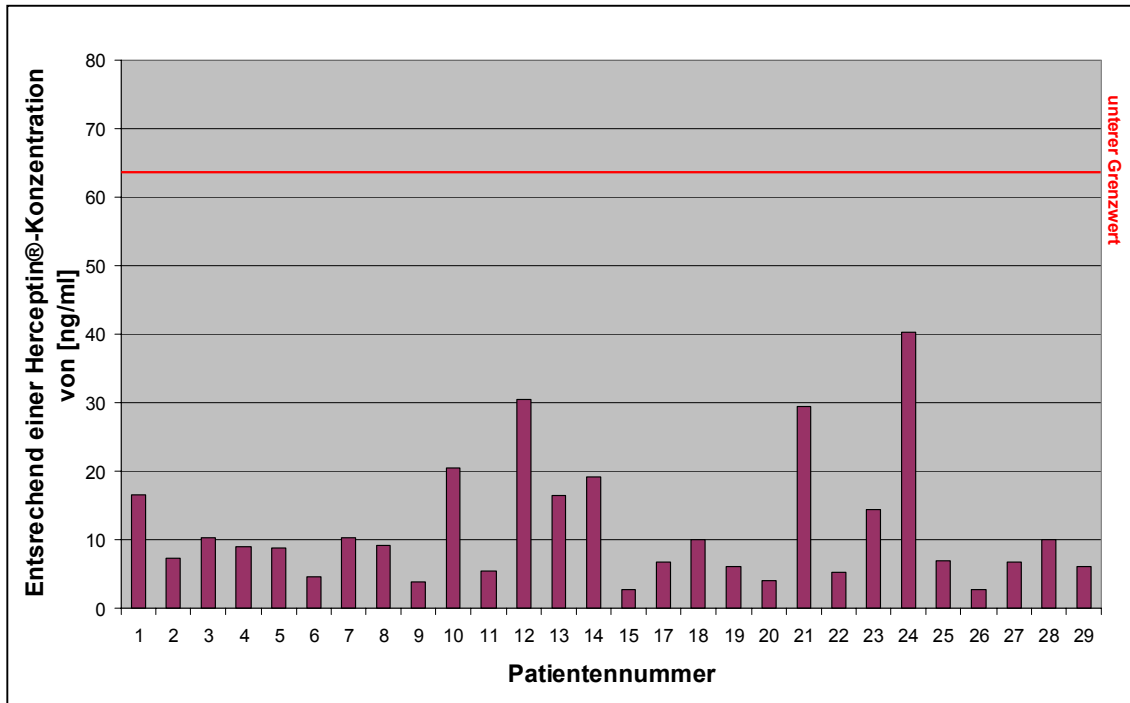


Abbildung 31 Seren von Patientinnen präoperativ abgenommen auf IgM-Antikörper überprüft

Wie aus den Meßergebnissen ersichtlich, wurde für keines der Seren ein über das normale Maß hinausgehender IgM-Antikörper-Wert gegen die ECD von HER2/neu gemessen, so daß auch diese Idee nicht weiter verfolgt wurde, da nach Messung eines repräsentativen Anteils des Patientenkollektives nicht mehr davon ausgegangen wurde positive IgM-Antikörper-Werte zu erzielen.

Messung von Serumproben auf ICD-Antikörper

Festlegung des unteren Grenzwertes für ICD-Antikörper

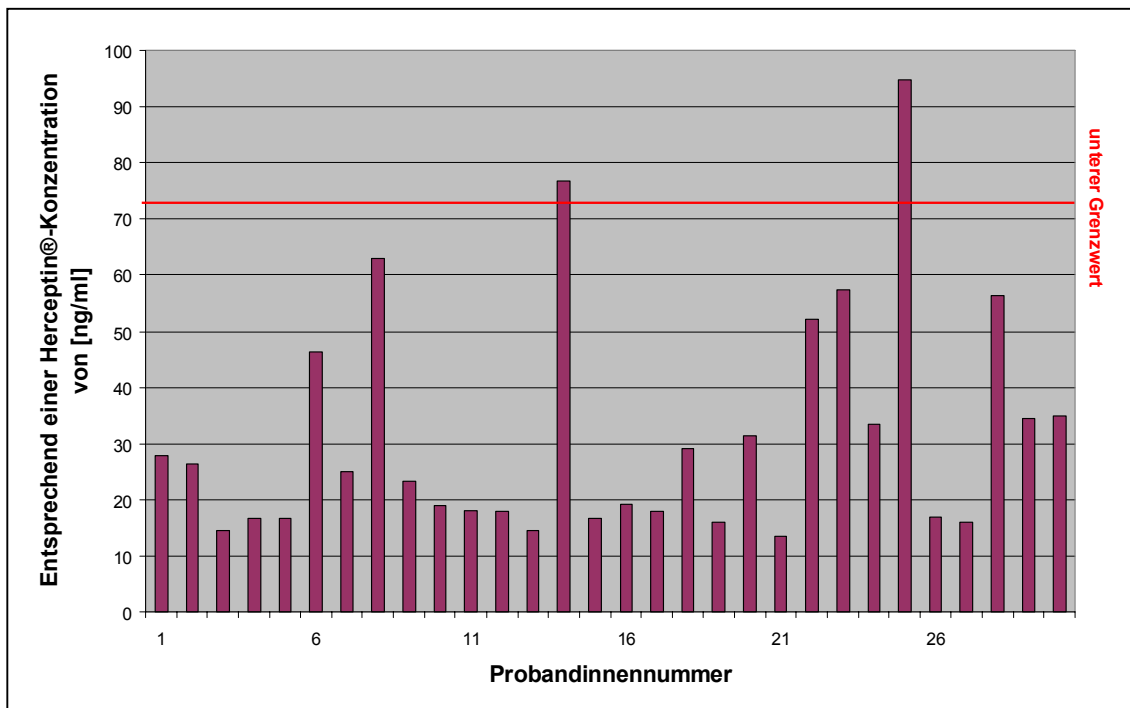


Abbildung 32 Seren 30 gesunder Probandinnen aus der Normalbevölkerung, zur Festlegung des unteren Grenzwertes des HER2/neu ICD-ELISA

Zur Festlegung des unteren Grenzwertes wurden die schon für den IgG-ELISA verwendeten 30 Seren gesunder Probandinnen gemessen und die doppelte Standardabweichung bestimmt (CI 95 %). Es ergab sich ein unterer Grenzwert entsprechend einer Herceptin®-Konzentration von 72,2 ng/ml (Abbildung 32).

Messung von Serumproben auf ICD-Antikörper

In diesem Fall wurden Serumproben von Patientinnen mit HER2/neu positivem Tumor ausgewählt und gemessen, da angenommen wurde, daß wenn vorhanden die Konzentration von Antikörpern im Serum dieser Patientinnen am höchsten sein sollte. Keiner der gemessenen Werte kam auch nur annähernd an den unteren Grenzwert entsprechend der Herceptin®-Konzentration von 72,2 ng/ml heran. Auch für die ICD konnten auf diese Weise keine Antikörper nachgewiesen werden.

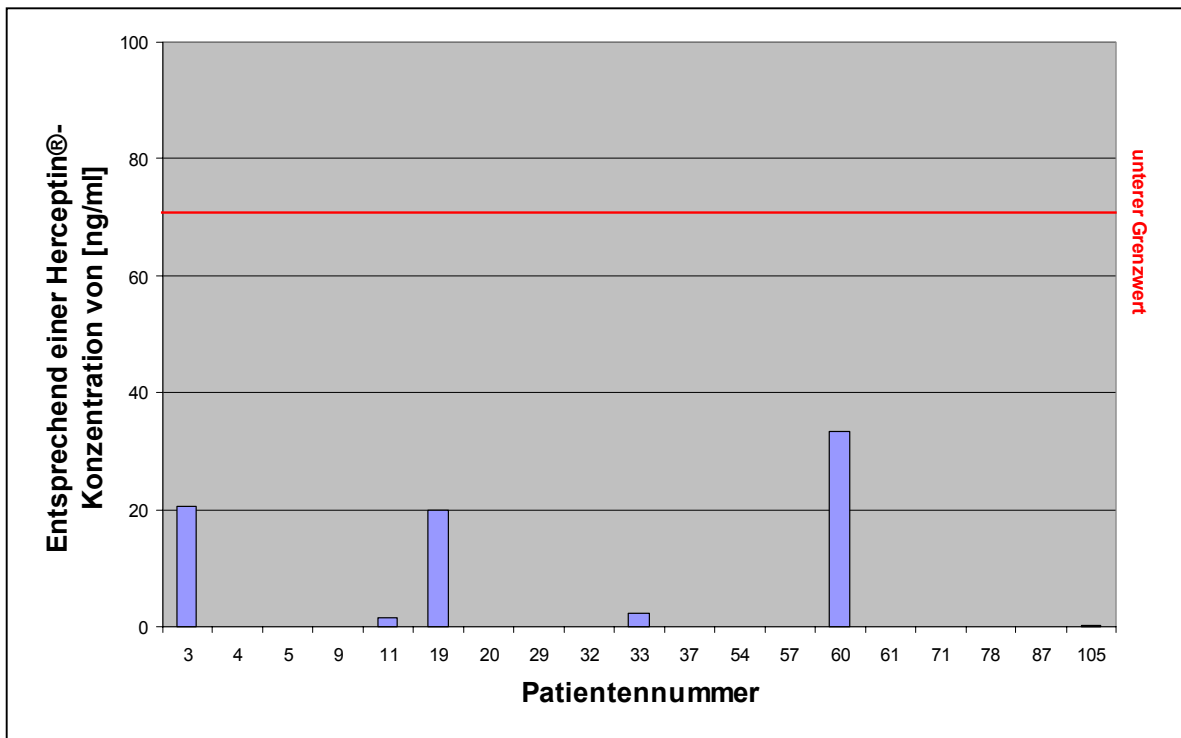


Abbildung 33 Messung HER2/neu positiver Serumproben des Patientenkollektivs mit Erstdiagnose Mammakarzinom zum Nachweis möglicher Antikörper gegen die ICD von HER2/neu

6. Diskussion

Die Etablierung eines ELISA zum quantitativen Nachweis reaktiver humaner Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von HER2/neu konnte erfolgreich umgesetzt werden, da der hier aufgeführte ELISA monoklonale humanisierte Antikörper wie Trastuzumab und Pertuzumab, beide gegen die extrazelluläre Domäne von HER2/neu gerichtet, qualitativ und quantitativ in einem Bereich von 10 bis 100 ng/ml zuverlässig nachweisen kann. Die Wiederholbarkeit der Ergebnisse konnte durch die Plattenintravarianz $< 5\%$, Plattenintervarianz $< 15\%$ und die gleichbleibenden Ergebnisse nach mehreren Einfrier- und Auftauzyklen bestätigt werden.

Die Basistechnik ELISA wurde unter anderem ausgewählt, da sie eine etablierte Routinetechnik, die keine für eine Laboreinrichtung ungewöhnlichen Voraussetzungen benötigt, darstellt. Hinzu kommt, daß die verwendeten Reagenzien frei erhältlich sind und keiner für ein Labor unüblichen Handhabung bedürfen.

Als nächster Schritt wurden Seren von Patientinnen mit Verdachtsdiagnose Mammakarzinom mit dem neu etablierten ELISA auf eventuelle Autoantikörper gegen die extrazelluläre Domäne von HER2/neu überprüft. Hier konnten, trotz einer sehr geringen Verdünnung der Seren bis zu 1:10, keine spezifischen Autoantikörper gefunden werden. Auch in Seren von Patientinnen, die an einer Vakzinierungsstudie zur Induktion einer Antikörperbildung gegen HER2/neu teilgenommen hatten, konnten bis auf eine Ausnahme keine spezifischen Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von HER2/neu nachgewiesen werden. Die einzige Patientin mit einem positiven Meßergebnis, das von Blutabnahme zu Blutabnahme im Verlauf der Studie immer schwächer wurde, hatte bis 6 Wochen vor Studienbeginn eine Therapie mit Trastuzumab erhalten. Da die nachweisbare Antikörperkonzentration im Verlauf der Studie geringer wurde anstatt anzusteigen, ist davon auszugehen, daß es sich in diesem Fall um Trastuzumab handelte und nicht um eine Antikörperreaktion auf die Vakzinierung. Auch dieses Ergebnis bestätigt, daß das Immunotherapeutikum Herceptin® (Trastuzumab) mit Hilfe dieses ELISAs zuverlässig im Serum der Patientinnen nachgewiesen werden kann. Da der monoklonale Antikörper Trastuzumab eine aktive Bindung mit dem Antigen, in diesem Fall der extrazellulären Domäne von HER2/neu, eingehen muß, um nachgewiesen werden zu können, folgt, daß nur funktionell aktives und somit therapeutisch aktives bzw. im Serum frei verfügbares Trastuzumab nachgewiesen wird. Dies ist von besonderem Interesse, da es zu Beginn dieser Arbeit auch nach Aussage des Herstellers von Trastuzumab keinen solchen Test gab, auch wenn er wünschenswert erschien. Die kommerzielle Überprüfung des Funktionsstatus von Trastuzumab wird bisher mit Hilfe eines im Detail nicht näher bekannten Tier-Assays durchgeführt. Deshalb war bisher ein Vergleich mit Werten des Herstellers und somit eine weitere Überprüfung der eigenen Ergebnisse nicht möglich.

Seitdem bekannt ist, daß gezielte tumorbiologische Therapien mit monoklonalen Antikörpern gegen Tyrosinkinase-Rezeptoren, wie beispielsweise das Immunotherapeutikum Trastuzumab beim Mammakarzinom, oder niedermolekulare Tyrosinkinaseinhibitoren wie Imatinib bei chronisch myeloischer Leukämie, im Vergleich zu herkömmlichen Chemotherapeutika ein verhältnismäßig kleines Spektrum an Nebenwirkungen bei guter Wirksamkeit zeigen, hat man die Suche nach weiteren Onkogenen, die als Angriffspunkte für eine gezielte tumorbiologische Therapie dienen könnten, verstärkt. Im Rahmen solcher Untersuchungen wurde herausgefunden, daß vor allem im fortgeschrittenen Tumorstadium autologe Antikörper gegen Tumorzellepitope, so genannte Tumorantigene, gebildet werden. Beispiele für solche Tumorantigene sind NY-ESO, ein so genanntes „cancer-testis“ Antigen, das unter anderem im fortgeschrittenen Stadium des Oesophaguskarzinoms im Rahmen des Abbauprozesses freigesetzt wird und unter physiologischen Bedingungen nur in Keimzellen auftritt, oder Melan A₂₆₋₃₅ A_{27L}, welches vor allem in Melanomzellen und Zellen der Melanozyten-Zell-Linie zu finden ist. Beide Antigene haben gemeinsam, daß sie unter physiologischen Bedingungen in nur einigen Gewebetypen und dann nur in sehr geringer Menge und sehr oft intrazellulär vorkommen (Valmori et al., 2003). Aus diesem Grund dürfte es für das Immunsystem möglich sein, beim Zerfall des Tumors in den letzten Stadien der Erkrankung auf ein Überangebot an Onkogen zu reagieren. Basierend auf diesen Ergebnissen gab und gibt es verschiedene Ansätze, eine Immunreaktion auf Tumorzell-Antigene und somit auf Tumorzellen durch Tumor-Vakzine im Körper des Krebspatienten zu verstärken, wenn nicht gar zu induzieren und als Tumortherapie einzusetzen (Trefzer et al., 2005, Valmori et al., 2003).

HER2/neu hingegen ist sowohl ein intrazelluläres als auch ein extrazelluläres körpereigenes Glykoprotein aus der Gruppe der Wachstumsfaktor-Rezeptoren, das vorrangig in der Embryonalperiode, aber auch, in deutlich geringerer Menge, in verschiedenen adulten Normalgeweben als transmembranes Rezeptorproteinanalogon exprimiert wird. Normalerweise ist es ein an der Steuerung von Zellwachstum, -proliferation und -überleben beteiligtes Protoonkogen, welches erst durch seine Überexprimierung in Tumorzellen und die Induktion zu verstärktem Zellwachstum zu einem Onkogen wird. Im Rahmen des zellulären Abbauprozesses wird die extrazelluläre Domäne von HER2/neu als sogenanntes „shed antigen“ ins Serum abgegeben (Luftner et al., 2003). Dieses Proteinfragment von 185 kD würde sich prinzipiell als Tumorimmunogen eignen, vor allem, da durch den Abspaltungsprozess der extrazellulären Domäne von HER2/neu eine Region mit nicht dauerhaft im Körper präsenten neuen Epitopen freigesetzt wird. Trotzdem ist es Teil eines körpereigenen Oberflächenproteins mit permanenter physiologischer Präsenz, weshalb die Bildung von HER2/neu-spezifischen Antikörpern ursprünglich als eher unwahrscheinlich angesehen wurde.

1993 war eine der ersten Forschergruppen, die mit Hilfe eines Immunoblots Antikörper gegen HER2/neu im Serum von Mammakarzinom-Patientinnen nachweisen konnten, die von Mary L. Disis in Seattle, WA, USA. Es wurden 20 Serumproben

postmenopausaler Frauen mit Brustkrebs auf Antikörper gegen HER2/neu untersucht. In 11 Fällen konnte eine Immunreaktion gegen das aus SKBR-3 Zell-Lysat gewonnene HER2/neu nachgewiesen werden. Das Zell-Lysat wurde mit Hilfe eines Westernblots auf die Präsenz von HER2/neu überprüft. Die Patientin mit der stärksten Immunreaktion wurde auch auf die Präsenz von Antikörpern gegen die ICD von HER2/neu und das Vorhandensein spezifischer T-Zellen untersucht. Beide Ergebnisse waren positiv, die Antikörper, die gefunden wurden, waren in beiden Fällen Immunglobuline der Gruppe G (IgG) (Disis et al., 1994). Etwa zeitgleich wies eine Arbeitsgruppe um Serenella Pupa in Mailand Antikörper im Überstand von B-Zell-Klonen nach. Hier handelte es sich um 20 Serumproben von Patientinnen mit und ohne HER2/neu überexprimierenden Tumor und/oder Lymphangiosis carcinomatosa (15 mit Lymphangiosis carcinomatosa, davon 9 mit HER2/neu-Überexpression und 5 weder mit Lymphangiosis carcinomatosa noch mit einer Überexpression von HER2/neu). Antikörper im Serum konnten von dieser Arbeitsgruppe allerdings nicht nachgewiesen werden, wohingegen im Überstand von B-Zell-Klonen die von Epstein-Barr Virus transformierten peripheren Blut-Lymphozyten von 10 dieser Patientinnen stammten, bei 6 von 7 Patientinnen mit Lymphangiosis carcinomatosa Antikörper nachgewiesen werden konnten. Der Nachweis wurde über eine indirekte Immunfluoreszenz an lebenden Zell-Linien, HER2-überexprimierenden (SKBR-3, SKOV-3, Calu-3) und HER2/neu-nicht überexprimierenden (z.Bsp.: MCF-7, MDA-MB-468, HAT-29) als Kontrolle, geführt und durch Immunpräzipitation bestätigt. In diesem Fall waren die Antikörper Immunglobuline der Gruppe M (IgM) (Pupa et al., 1993).

Vier Jahre später wurden die Daten aus einem Kollektiv von 107 Patientinnen (44 Tumore HER2/neu positiv, 63 Tumore HER2/neu negativ) mit Erstdiagnose Mammakarzinom veröffentlicht. Als Nachweismethode wurde ein Sandwich-ELISA mit Zell-Lysat von SKBR-3-Zellen als Antigen und einem unteren Grenzwert von einem Titer von 1:100 verwandt. Zwölf der 107 Patientinnen hatten einen HER2/neu Antikörper-Titer von $> 1:100$ im Serum, 5 der 107 Patientinnen hatten sogar einen Titer von über 1:5.000. Neun der 44 Patientinnen mit HER2/neu überexprimierendem Tumor hatten einen positiven Titer (20 %), bei drei Patientinnen konnten trotz eines HER2/neu negativen Tumors Antikörper im Serum nachgewiesen werden (Disis et al., 1997). Interessanterweise konnte in einer Studie mit Seren von Patientinnen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom, Stadium III/IV, mit der gleichen Nachweismethode eine deutlich geringere Prozentzahl an HER2/neu-Antikörper positiven Seren (7 %) gefunden werden (Disis et al., 2000).

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde in Versuchen mit Tieren die mögliche Entwicklung einer Vakzinierung gegen HER2/neu und somit die Umgehung der Immuntoleranz bezüglich körpereigener Proteine untersucht. Ratten erschienen hierfür besonders geeignet, da das Ratten neu-Onkogen zu 89 % homolog zu HER2/neu ist. Bei Impfversuchen mit dem vollständigen HER2/neu-Protein konnte aber weder eine T-Zell-Antwort, noch eine Antikörperbildung nachgewiesen werden, wohingegen Peptidbasierte

Impfungen eine Immunantwort gegen die in der Impfung enthaltenen Peptidstränge und gegen andere Proteinabschnitte hervorriefen (Disis and Cheever, 1998, Disis et al., 1996).

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurde unter anderem eine Studie initiiert, an der 64 Patientinnen mit fortgeschrittenem, austherapiertem, HER2/neu positivem Mammakarzinom, Ovarialkarzinom oder nicht kleinzelligem Bronchialkarzinom mit kompetentem Immunsystem teilnehmen konnten. Diese Patientinnen wurden entweder mit einer ECD-Vakzine (Peptide p42-56, p98-114, p328-345), einer ICD-Vakzine (Peptide p776-790, p927-941, p1166-1180) oder mit einer HLA-A2 Vakzine, entsprechend dem HLA-Typ (Peptide p369-384, p688-703, p971-984), behandelt; bei allen drei Gruppen wurde GM-CSF als Zusatz eingesetzt, einmal pro Monat intradermal vakziniert und anschließend die T-Zell-Antwort im Serum und die immunologische Hautreaktion (DTH) an der Injektionsstelle untersucht. Besonderer Wert wurde auf den Nachweis von CD4+ T-Zellen gelegt, da diese bei der Bildung eines immunologischen Gedächtnisses eine wichtige Rolle spielen. Von den 64 eingeschlossenen Patienten erhielten 38 alle 6 Vakzinierungen. Es gab keine Grad 3 oder 4 Toxizitäten und eine befürchtete Immunreaktion gegen andere Organe wie Leber, Verdauungstrakt oder Haut, die dafür bekannt sind, HER2/neu zu exprimieren, konnte auch nicht nachgewiesen werden. Acht der 13 Patientinnen, die die ECD-Vakzine erhalten hatten, entwickelten gegen zumindest eines der Peptide eine T-Zell-Antwort, drei der Patientinnen sogar gegen Anteile der ECD, die nicht in der Vakzine enthalten waren, ein sogenanntes „epitope spreading“. Nach der Gabe von ICD-Vakzinen entwickelten neun von 11 Patientinnen eine T-Zell-Antwort gegen eines der Peptide, zwei gegen Anteile der ECD und sieben gegen Anteile der ICD, die nicht in der Vakzine enthalten waren. In der Gruppe der Patienten mit HLA-A2-spezifischer Vakzine entwickelten 13 von 14 eine peptidspezifische T-Zell-Antwort, neun der 14 Patienten entwickelten eine Immunreaktion gegen eine der HER2/neu Domänen. Diese Studie konnte zeigen, daß die Mehrzahl der Patienten nicht nur eine Immunantwort auf die spezifischen Peptidepitope, sondern auch auf andere Anteile des Onkogens entwickelten und diese bei einigen sogar bis zu 12 Monaten anhielt. Dies ist ein bedeutender Schritt in Richtung Entwicklung einer Tumorstoffimpfung, da es bisher zwar gelungen war, T-Zell-Antworten hervorzurufen, diese aber nicht von langer Dauer waren (Disis et al., 2002).

Auch andere Arbeitsgruppen haben sich mit dem Thema beschäftigt und T-Zell-Antworten nicht nur von CD4+, sondern auch von zur Tumorzell-Lyse wichtigen CD8+ T-Zellen hervorrufen können (Baxevanis et al., 2002, Knutson et al., 2001). Hoch interessant an diesen Ergebnissen ist, daß es tatsächlich möglich ist, *in vivo* eine T-Zell-Antwort, die nicht nur auf die Peptide der Vakzinen, sondern auch auf andere Epitope des Proteins ausgerichtet ist, erzeugen zu können. Leider ist die Intensität der immunologischen Reaktion noch zu gering, als daß man eine Reduktion gegebener Tumormassen erwarten könnte.

Ein anderer Ansatz ist es, HER2/neu spezifische CD8+ T-Zellen (CTL) mit Hilfe von retroviral transduzierten autologen dendritischen Zellen (DC) zu evozieren, die anschließend geklont und expandiert und Tumorstoffimpfungen injiziert werden könnten, ein sogenannter

„adoptiver T-Zell-Transfer“. Durch den Einsatz retroviral mit HER2/neu transduzierter DCs spart man sich außerdem die mühsame Arbeit, immunogene Peptide zu identifizieren und herzustellen, da diese Arbeit von den dendritischen Zellen übernommen wird (Meyer zum Buschenfelde et al., 2000).

Bisher wurde bei der Auswahl der Epitope für die Vakzinierungsversuche allerdings nicht geklärt, ob die gebildeten Antikörper eher eine aktivierende oder inhibierende Wirkung auf den Rezeptor und somit auf das Tumorwachstum haben. Da man weiß, daß Trastuzumab eine inhibierende Wirkung auf das Tumorwachstum hat, hat eine Arbeitsgruppe aus Wien mit Hilfe einer „phage display“ Technik fünf Epitope, so genannte „mimotopes“, definiert, die von Trastuzumab erkannt werden. Anschließend wurden mit Hilfe eines Computerprogramms die den „mimotopes“ entsprechenden Epitope auf dem HER2/neu Protein gesucht, und alle fünf Epitope konnten im Bereich der bekannten Bindungsstelle für Trastuzumab (Cho et al., 2003) gefunden werden. Da diese Epitope sogar alle auf der gleichen Proteinschleife liegen, wird vermutet, daß es sich hier um den immunologisch dominantesten Teil der Trastuzumab-Bindungsstelle handelt (Riemer et al., 2005). Ein weiterer Schritt wäre, die gefundenen Epitope in einer Vakzinierungs-Studie zu erproben.

Bei all diesen Versuchen, eine Vakzine für HER2/neu herzustellen, wäre es hilfreich die Immunreaktion qualitativ und quantitativ mit einem verhältnismäßig einfachen Test evaluieren zu können. Ein mögliches Maß für die Immunreaktion wäre die Messung des Antikörpertiters im Serum, der mit Hilfe eines Enzyme-linked-immunosorbent-Assays (ELISA) gemessen werden könnte. Aufbau und Etablierung eines solchen ELISA war aus diesem Grund hauptsächliches Thema meiner Arbeit. Eine zusätzliche Aufgabe war es, mit diesem Test ein gemischtes Kollektiv von 173 Seren, vor allem von Patientinnen mit Erstdiagnose Mammakarzinom und einigen Patientinnen mit benignen Befunden, zu messen und den Gehalt an Antikörpern gegen die extrazelluläre Domäne von HER2/neu zu bestimmen. Als Antigen wurde rekombinante ECD von HER2/neu verwendet, mit der die Mikrotiterplatte direkt beschichtet wurde. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit einer FCS-Lösung blockiert und nach mehrmaligem Waschen Patientinnenserum als potentieller Träger des ersten Antikörpers hinzugegeben. Nach zwei Stunden wurde die Mikrotiterplatte wiederum mit Waschpuffer gewaschen und der zweite Antikörper, ein Peroxidase-konjugierter Mausantikörper gegen humanes IgG, hinzugegeben. Als Substrat wurde p-Nitrophenylphosphat und Tris(hydroxymethyl)methanamin-Puffer hinzugegeben und die Extinktion nach 30 min Entwicklungszeit in einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Als Positivkontrolle wurde der HER2/neu-spezifische monoklonale humanisierte Mausantikörper Trastuzumab mit einem Nachweisbereich von 10 bis 100 ng/ml anstelle des Patientinnenserums eingesetzt. Die zu messenden 173 Serumproben wurden über 2 Jahre von Patientinnen mit der Verdachtsdiagnose Mammakarzinom oder Tumorrezidiv im Alter von 22-85 Jahren gesammelt. Aus dieser Gruppe hatten 40 Patientinnen (23 %) einen gutartigen Befund, 13 (7,5 %) ein duktales carcinoma in situ (DCIS), 97 (56 %) ein invasiv duktales Mammakarzinom, 16 (12 %) ein invasiv lobuläres Mammakarzinom und 3 (2 %) ein

duktulo-lobuläres Karzinom. Insgesamt waren 35 (26 %) der malignen Tumoren HER2/neu 3-fach positiv (DAKO-Score 3+), 23 (17 %) HER2/neu 2-fach positiv (DAKO-Score 2+) und 78 (58 %) HER2/neu negativ (DAKO-Score 1+, 0) (siehe Tabelle 3 und Tabelle 4).

Außerdem wurden Seren von 8 Patientinnen aus einer HER2/neu Vakzinierungsstudie der Universitäts-Frauenklinik Tübingen gemessen. Diese Patientinnen erhielten 4 Vakzinierungen (1×10^7 letal bestrahlte KS24.22-Zellen, stabil mit CD 80 und HER2/neu transfiziert, in 1ml PBS gelöst, intradermal verabreicht) an den Tagen 0,14, 28 und 56 und je nach Krankheitsverlauf weitere 4 Vakzinierungen in vierwöchentlichen Abständen. Vor jeder Vakzinierung und nach der letzten Gabe wurde Blut zur Serumpräparation abgenommen (siehe Tabelle 5).

Auch bei einer nur sehr geringen Verdünnung von 1:10 konnten bei keinem der Patientenserum autologe IgG- oder IgM-Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von HER2/neu nachgewiesen werden, wobei die Seren nur stichprobenartig auf IgM-Antikörper überprüft wurden, nachdem keine IgG-Antikörper gefunden werden konnten. Allerdings ist der ELISA-Test sehr sensitiv, denn es gelang in einem Fall auch 6 Wochen nach der letzten Trastuzumab-Infusion zuverlässig der Trastuzumab-Nachweis im Patientenserum. Außerdem konnte mit dem neu etablierten ELISA anstelle von Trastuzumab auch Pertuzumab, ein weiterer monoklonaler Antikörper gegen die ECD von HER2/neu, problemlos nachgewiesen werden.

Was könnten die Gründe für den fehlgeschlagenen Nachweis von möglichen autologen HER2/neu Antikörpern sein? Eine Möglichkeit ist, daß keine Antikörper gegen die ECD von HER2/neu vorhanden waren, bzw. deren Menge unter der Nachweisgrenze von 10 ng/ml lag. Unter Berücksichtigung der oben genannten Veröffentlichungen (Disis et al., 1994, Disis et al., 2000, Disis et al., 1997) ist dies allerdings unwahrscheinlich, da dort Antikörper-Titer von über 1:100 in 11% und in 4,6 % sogar über 1:5.000 gefunden wurden. Eine Menge, die bei der hohen Sensitivität des ELISA für Trastuzumab und Pertuzumab und der eingesetzten Verdünnung von 1:10 in einem sehr ähnlichen Patientenkollektiv hätte meßbar sein müssen. Eine andere Möglichkeit ist, daß die als Antigen verwendete, gentechnisch hergestellte ECD entweder in ihrer Oberflächenstruktur nicht ausreichend dem natürlichen HER2/neu ähnelt oder sie sich so ungünstig auf der Mikrotiterplatte positioniert, daß antigene Strukturen verdeckt werden und autologe Antikörper nicht an die so gebundene ECD binden können. Diese beiden Argumente wären insofern zu hinterfragen, als daß Trastuzumab und Pertuzumab, die an zwei verschiedenen Stellen mit der ECD von HER2/neu interagieren, nachgewiesen werden konnten und außerdem mit dem Prototyp des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten ELISA, bei dem die gleiche ECD verwendet wurde, Mausantikörper gegen HER2/neu nachgewiesen werden konnten. Eine weitere Möglichkeit ist, daß die autologen Antikörper durch das „shed antigen“, der abgespaltenen ECD von HER2/neu, im Serum abgefangen werden. Studien zur Messung des Serumspiegels dieses „shed antigen“ in Patientinnen mit Erstdiagnose Mammakarzinom zeigen, daß die Werte zwischen 5,4 und 19,6 ng/ml liegen, wobei der untere Grenzwert für einen erhöhten

Serumspiegel bei 15 ng/ml liegt (Pallud et al., 2005). Wenn auf diese Weise alle Antikörper abgefangen würden, entspräche dies einer sehr geringen Menge an Antikörpern.

Da es in der Hämatologie Fälle gibt, in denen der Körper bei einer Dauerpräsenz eines Antigens, wie dem der Blutgruppe B zum Beispiel, über das Stadium der IgM-Bildung nicht hinauskommt und dieser ELISA zum Nachweis von IgG aufgebaut wurde, wurde der 2. Antikörper ausgetauscht, um gegebenenfalls vorhandenes IgM nachweisen zu können. Es wurden Seren stichprobenartig untersucht, IgM-Antikörper gegen HER2/neu konnten aber nicht nachgewiesen werden.

Parallel zu dieser Arbeit wurde ein ähnlicher ELISA zum Nachweis von Trastuzumab in Patientenserum in den USA entwickelt (Maple et al., 2004). Es handelte sich um einen Sandwich-ELISA, bei dem die Mikrotiterplatte mit Mausantikörpern gegen die intrazelluläre Domäne von HER2/neu beschichtet wurde, um das anschließend hinzugegebene HER2/neu als Gesamtprotein aus der Lösung zu binden. Um Matrixeffekte zu reduzieren, wurde die HER2/neu-Suspension mit 10 % Polyethylen-Glykol (PEG) versehen. Als nächster Schritt wurden die Serumproben, die vorher zur Vermeidung von Matrixeffekten von Antikörpern gegen IgG durch einen Adsorptionsassay gereinigt wurden, aufgetragen. Als zweiter Antikörper wurde ein Peroxidase-konjugierter Antikörper verwendet, der mit TMB-Substrat 30 min im Dunkeln inkubiert und bei 450 nm Testfilter und 620 nm Referenzfilter gemessen wurde. Probleme bei diesem ELISA gab es vor allem bezüglich des Matrixeffektes, der vermutlich durch die Interaktion des Serums mit dem Maus-Antikörper, der zum Beschichten der Mikrotiterplatte verwendet wurde, verursacht wurde. Durch Hinzugabe von Maus γ -Globulinen zur Verdünnungslösung und die Zugabe von 10 %iger PEG-Lösung zu den verdünnten Serumproben konnten diese behoben werden. Der Nachweisbereich von Herceptin® reichte von 5 bis 100 ng/ml.

Der in dieser Promotionsarbeit beschriebene ELISA hat einen Nachweisbereich von 10 bis 100 ng/ml und liegt mit seiner Intra- und Interplattenvarianz im Vergleich mit anderen in der klinischen Chemie eingesetzten ELISAs im akzeptablen Bereich. Auch bei diesem ELISA gab es bei zu geringer Verdünnung falsch-positive Ergebnisse für 6 Patientenserum von 173 (3 %), die sich allerdings ab einer Verdünnung der Proben von 1:80 nicht mehr nachweisen ließen, aber bei der Serumverdünnung von 1:10, bei der die Seren auf autologe Antikörper überprüft wurden, ins Gewicht fielen. Daß es sich um Antikörper gegen die ECD von HER2/neu handelte, konnte durch Vorinkubation der Seren mit ECD und anschließender Messung der Proben ausgeschlossen werden. Wären die positiven Ergebnisse durch Haftung der Antikörper an die auf der Mikrotiterplatte gebundene ECD entstanden, hätten die Ergebnisse der mit ECD vorinkubierten Seren deutlich geringer ausfallen müssen, da ein Teil der Antikörper abgefangen worden wäre. Dies war nicht der Fall. Bei Patientinnen unter Trastuzumab-Therapie lagen die Seren erst bei Verdünnungen von über 1:1.000 im Meßbereich, so daß kaum ein Effekt auf Meßergebnisse aufgrund des Matrixeffektes zu erwarten war. Durch das direkte Beschichten der Mikrotiterplatte mit der ECD von HER2/neu

konnten Interaktionen mit anderen Antikörpern umgangen werden, und der Einsatz von FCS als Blockierungsmedium verringerte das Hintergrundsignal auf ein Minimum.

Trotz dieser optimierten Voraussetzungen konnten keine autologen Antikörper in den Seren des hier verwendeten Patientenkollektives nachgewiesen werden. Hier stellt sich die Frage, ob es daran lag, daß der in dieser Arbeit entwickelte ELISA zu unempfindlich war oder sich in den Seren des verwendeten Patientenkollektives keine autologen Antikörper gegen die ECD von HER2/neu befanden. Daß der ELISA zu unempfindlich wäre, ist aus vorher ausführlich diskutierten Gründen (siehe Seite 58) unwahrscheinlich. Hierdurch würde die These, daß es in den Seren dieses Patientenkollektives keine frei zirkulierenden reaktiven autologen Antikörper gegen die ECD von HER2/neu gab, unterstützt. Mary L. Disis konnte in 12 der 107 Patientenserum ihres Kollektives Antikörper gegen HER2/neu mit Titern von $\geq 1:100$ nachweisen (Disis et al., 1997). In dem von ihr verwendeten Sandwich ELISA (das Antigen wird durch vorher auf die Mikrotiterplatte aufgetragene Antikörper gebunden und dann die Lösung mit dem zu detektierenden Antikörper hinzugegeben) wurde als Antigen Lysat von SKBR3 Zellen (eine HER2/neu positive Brustkrebs Zell-Linie) verwendet. Dieses Lysat wurde durch Western blot Analyse auf die Präsenz von humanem HER2/neu überprüft und auf die Mikrotiterplatte aufgetragen, die mit monoklonalem Mäuseantikörper (IgG) gegen die ECD von HER2/neu beschichtet war. Anschließend wurden die Patientenserum in verschiedenen Verdünnungen aufgetragen und die gebundenen Antikörper mit horseradish peroxidase konjugierten Antikörpern und anschließend aufgetragenem Substrat nachgewiesen. Zwischen jedem dieser Schritte wurde die Mikrotiterplatte gewaschen. Als Positivkontrolle wurde ein Patientenserum mit einem Titer von 1:200 verwendet. Bei dem Aufbau dieses ELISAs ist es durchaus möglich, daß nicht nur die ECD von HER2/neu auf der Mikrotiterplatte festgehalten wurde, sondern auch größere Zellbestandteile, die die ECD von HER2/neu enthielten. Dementsprechend könnten die nachgewiesenen Antikörper nicht gegen HER2/neu, sondern gegen andere Bestandteile der SKBR3 Zellen gerichtet gewesen sein. Das in dieser Promotionsarbeit verwendete Patientenkollektiv (Tabelle 3Tabelle 4) kann mit seinem hohen Anteil an duktalem Mammakarzinom und einem Anteil von 26% HER2/neu positiver Tumoren als repräsentativ bezeichnet werden. Deshalb ist es erstaunlich, daß mit dem sehr empfindlichen im Rahmen dieser Arbeit entwickelten ELISA auch bei einer Verdünnung von 1:10 keine autologen Antikörper gegen HER2/neu nachgewiesen werden konnten. Entweder enthielten die Seren des hier verwendeten Patientenkollektives keine aktiven autologen Antikörper gegen HER2/neu und die von Mary L. Disis verwendeten in fast 10% der Fälle oder die von ihr nachgewiesenen Antikörper waren nicht gegen die ECD von HER2/neu, sondern gegen andere Bestandteile des SKBR3 Zell-Lysats oder Bestandteile der verwendeten Mausantikörper ihres ELISAs gerichtet. Das würde bedeuten, daß es keine autologen frei im Serum zirkulierenden reaktiven Antikörper gegen die ECD von HER2/neu gäbe und sie dementsprechend auch nicht nachgewiesen werden konnten. Demnach läge es nicht an dem in dieser Arbeit etablierten ELISA, sondern an dem Mangel von Antikörpern, daß der Nachweis nicht möglich ist.

In jedem Fall würde sich der neu etablierte ELISA in der Diagnostik zur Messung der Trastuzumab- oder Pertuzumab-Konzentration in verschiedenen Körperflüssigkeiten eignen. Außerdem ist ein Einsatz in der Produktionskontrolle bezüglich Funktion und Stabilität des Antikörpers denkbar, da die Antikörper nur in ihrer ungebundenen, reaktiven Form nachgewiesen werden können.

7. Ausblick

Auch wenn keine autologen Antikörper gegen die ECD von HER2/neu mit dem hier etablierten ELISA nachgewiesen werden konnten, kann der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Test für weitere Anwendungen eingesetzt werden. So kann funktionell aktives Trastuzumab qualitativ und quantitativ in verschiedenen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden, was klinisch und wissenschaftlich interessante Möglichkeiten eröffnet. Eine naheliegende Verwendungsmöglichkeit ist es, den individuellen Verlauf der aktiven Herceptin®-Konzentration im Serum von Patientinnen unter Therapie zu überwachen, um somit interindividuelle Unterschiede und gegebenenfalls Gründe für besseres oder schlechteres Ansprechen der Therapie herausfinden zu können. Ein anderer Ansatzpunkt wäre die häufig beobachtete zerebrale Metastasierung von Brustkrebs unter palliativer Herceptin®-Therapie. Dies kommt vermutlich durch die gute periphere Wirksamkeit von Herceptin® zustande, die sich aufgrund der Blut-Hirn-Schranke, die das Passieren des Antikörpers stark einschränkt und damit ein deutliches Konzentrationsgefälle zwischen Serum und Liquor cerebrospinalis hervorruft, im zentralnervösen Raum nicht entfalten kann (Clayton et al., 2004, Shmueli et al., 2004). Hier wäre es von Interesse herauszufinden, unter welchen Umständen Herceptin® die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann und ob es sich als sinnvoll erweist, Herceptin® intrathekal zu verabreichen. Dann wäre es wiederum wichtig, zu evaluieren, wieviel Herceptin® und in welchen Abständen verabreicht werden muß, um im Liquor cerebrospinalis eine ähnliche Konzentration wie im Serum zu erreichen. Aktuell wird in Zusammenarbeit mit Prof. Heinemann und PD Dr. Stemmler, III. Medizinische Klinik der LMU München, die Herceptin®-Konzentration in Serum- und Liquor-Proben von Patientinnen mit zerebral metastasiertem Mammakarzinom unter Herceptin®-Therapie gemessen (Stemmler et al., 2007). Die Herceptin®-Konzentration im Liquor cerebrospinalis war bei Patientinnen mit vermutlich intakter Blut-Hirn-Schranke ungefähr 420fach geringer als im Serum. Bei Patientinnen nach Ganzhirn Bestrahlung verringerte sich das Verhältnis auf 1:76. Bei Patientinnen mit meningealer Karzinomatose sogar auf 1:49. Hier ist davon auszugehen, daß aufgrund einer defekten Blut-Hirn-Schranke mehr Trastuzumab in den Liquorraum gelangt. Interessante Fragen für die Zukunft wären: Ist es sinnvoll die Blut-Hirnschranke bei zerebraler Metastasierung durch Bestrahlung durchlässiger zu machen und wenn ja, zu welchem Zeitpunkt der Erkrankung? Wäre es statt Bestrahlung vielleicht besser, Herceptin® direkt über, zum Beispiel ein Ommaya-Reservoir intrathekal zu verabreichen, und welche klinischen Erfolge bewirkt dies bei welcher Herceptin®-Konzentration?

8. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) zum quantitativen Nachweis humaner HER2/neu-Antikörper und in einem zweiten Schritt die Untersuchung von Seren von Patienten mit Mammaläsionen auf mögliche autologe HER2/neu-Antikörper.

Ausgangspunkt für die Entwicklung des ELISA zum Nachweis humaner HER2/neu-Antikörper war ein ELISA zum Nachweis tierischer (Maus-)Antikörper gegen humanes HER2/neu. Dieser wurde in mehreren Schritten umgewandelt, um humane Antikörper gegen humanes HER2/neu nachweisen zu können, und zwar mit Herceptin®, dem monoklonalen humanisierten Mausantikörper, als Standardsubstanz.

Die verwendeten Serumproben stammten von 3 verschiedenen Patientenkollektiven. Die größte Anzahl der Seren wurde von Patientinnen mit Verdacht auf Brustkrebs in der Frauenklinik der TU München, vor der operativen Behandlung gesammelt und anschließend mit dem histologischen Ergebnis dokumentiert.

Desweiteren wurde Serum von Patientinnen mit HER2/neu-positivem Brustkrebs nach operativer Behandlung und vor adjuvanter Herceptin®-Gabe gesammelt. Von einer dieser Patientinnen wurde Serum dreiwöchentlich vor und nach der Gabe von Herceptin® im Verlauf gesammelt.

Als weiteres Patientenkollektiv wurden uns freundlicherweise Seren von 8 Patientinnen einer HER2/neu-Vakzine-Studie aus der Uniklinik Tübingen zur Verfügung gestellt, die vor und zu verschiedenen Zeitpunkten während der Studie abgenommen worden waren.

Es konnten mit dem neu entwickelten ELISA keine autologen IgG- oder IgM-Antikörper in humanem Serum gegen HER2/neu nachgewiesen werden. Allerdings gelang es zuverlässig, quantitative Bestimmungen von Herceptin® im Serum bis zu einer Konzentration von 10 ng/ml durchzuführen und aufgrund des Testaufbaus Herceptin® in anderen Körperflüssigkeiten quantitativ nachzuweisen.

Auch wenn der Teil des ursprünglichen Ziels, humane autologe Antikörper gegen HER2/neu in Patientenseren nachzuweisen, nicht erreicht wurde, ist dieser ELISA eine gute Voraussetzung, den Gehalt von Herceptin® in verschiedenen Körperflüssigkeiten zu bestimmen.

Eine klinische Fragestellung, die seit der Therapie mit Herceptin® relevant wurde, ergibt sich aus der Indikation, daß eine größere Anzahl von Patientinnen unter Herceptin®-Therapie nicht mehr an peripheren, sondern an zentral-nervösen Metastasen verstirbt.

Hypothese hierfür ist, daß der Antikörper nur in geringen Mengen die Blut-Hirn-Schranke überwindet und dementsprechend im Gehirn nicht seine volle Wirksamkeit entfalten kann. Messungen der unterschiedlichen Konzentrationen von Herceptin® in Serum und Liquor cerebrospinalis wurden durchgeführt. Ein deutliches Konzentrationsgefälle konnte bestätigt werden, und alternative Therapie-Optionen wie intrathekale Applikation von Herceptin® untersucht oder ob die Blut-Hirn-Schranke durch ohnehin notwendige Therapien wie Bestrahlung oder chirurgische Eingriffe durchlässiger für Herceptin® wird (Stemmler et al., 2006, Stemmler et al., 2007).

Eine weitere Möglichkeit für die klinische Anwendung des ELISA wäre die Bestimmung des interindividuellen Verlaufs der Herceptin®-Serum-Konzentration bei Patientinnen unter Therapie und die Korrelation mit deren Krankheitsverlauf. Dies könnte potentiell zu einer Therapie- und Dosisoptimierung des teuren Medikaments führen.

Zusammenfassend handelt es sich bei dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten ELISA für humane HER2/neu Antikörper um einen vielseitig anwendbaren Test, der sich bereits unter Studienbedingungen in klinischer Anwendung befindet.

9. Abbildungs-/Tabellen-Verzeichnis

Abbildung 1	Das HER Signaltransduktions-Netzwerk, übersetzt aus dem Englischen (Holbro and Hynes, 2004)	10
Abbildung 2	Optische Dichte versus Entwicklungszeit bei verschiedenen Herceptin®-Konzentrationen [$\mu\text{g/ml}$]	26
Abbildung 3	Design der Mikrotiterplatte mit Herceptin®-Verdünnungsreihe vertikal und der Verdünnungsreihe des Detektionsantikörpers horizontal	27
Abbildung 4	Optimierung des Detektionsantikörpers optische Dichte versus Herceptin®-Konzentration [ng/ml] gemessen nach 30 min Entwicklungszeit	28
Abbildung 5	Vergleich HAS versus FCS als Blockiermedium, gleichzeitig Vergleich Plasma versus Serum als Medium des 1. Antikörpers Messung nach 30 min Entwicklungszeit ohne Zugabe des 1. Antikörpers	29
Abbildung 6	Vergleich von Serum mit Herceptin® versetzt mit Plasma mit Herceptin® versetzt, Messung nach 30 min Entwicklungszeit	30
Abbildung 7	Vergleich Verdünnung Detektionsantikörper 1:500 versus 1:1.000 Serum mit und ohne Herceptin® Messung nach 30 min Entwicklungszeit	31
Abbildung 8	Mit Herceptin® versetzte Seren ohne und mit Präinkubation mit ECD ($0,25 \mu\text{g/ml}$) für 2h, Messung nach 30 min Entwicklungszeit	35
Abbildung 9	ELISA-Spezifitäts-Testung mit ICD, ECD, Herceptin®, Rituximab Messung nach 30 min Entwicklungszeit	36
Abbildung 10	Bestimmung des unteren Grenzwertes, Messung von 30 Seren gesunder Probandinnen aus der Normalbevölkerung	37
Abbildung 11	Patientenseren I	37
Abbildung 12	Patientenseren II	38
Abbildung 13	Patientenseren III	38
Abbildung 14	Patientenseren IV	39
Abbildung 15	Patientenseren V	39
Abbildung 16	Patientenseren VI	40
Abbildung 17	Patientenseren VII, Wiederholungsmessung der Seren mit Werten oberhalb des unteren Grenzwertes	40
Abbildung 18	Überprüfung der Spezifität der positiv gemessenen Patientenseren durch Präinkubation mit ECD von HER2/neu	41
Abbildung 19	Serumverdünnung versus optische Dichte zur Festlegung der Verdünnung, bei der der Matrixeffekt nicht mehr zum Tragen kommt	42
Abbildung 20	Patientenseren nach adjuvanter Chemotherapie	42
Abbildung 21	Seren von Patientinnen unter adjuvanter Herceptin®-Therapie	43
Abbildung 22	Herceptin®-Verlauf im Serum einer Patientin unter adjuvanter Herceptin®-Therapie (6mg/kg KG , q21)	44
Abbildung 23	Patientenserum vor und nach Omnitarg®-Infusion	44
Abbildung 24	Seren von Patientinnen aus der Vakzinierungsstudie Frauenklinik Tübingen. Jeweils letzte verfügbare Abnahme, Seren 001 bis 008	45
Abbildung 25	Verlaufsdarstellung der Meßwerte von Patientenseren aus der Vakzinierungsstudie Frauenklinik Tübingen	46
Abbildung 26	Seren der Patientin 002 aus der Vakzinierungsstudie der Frauenklinik Tübingen mit und ohne ECD-Präinkubation	46

Abbildung 27	Vorinkubation des mit Herceptin® gespikten Serums mit Zell-Lysat (Sven LCL -, Sven LCL +, SKBR-3)	47
Abbildung 28	Optische Dichte versus Herceptin®-Konzentration Vorinkubation mit NIH 3T3-Zellen, HER2/neu positiv, bzw. negativ und SKBR-3-Zellen Messung nach 30 min	48
Abbildung 29	Optische Dichte versus Herceptin®-Konzentration bei unterschiedlichem Coating-Medium	49
Abbildung 30	Seren 30 gesunder Probandinnen aus der Normalbevölkerung, zur Festlegung des unteren Grenzwertes des IgM-Antikörper-ELISA	50
Abbildung 31	Seren 30 gesunder Probandinnen aus der Normalbevölkerung, zur Festlegung des unteren Grenzwertes des HER2/neu ICD-ELISA	51
Abbildung 32	Seren 30 gesunder Probandinnen aus der Normalbevölkerung, zur Festlegung des unteren Grenzwertes des HER2/neu ICD-ELISA	51
Abbildung 33	Messung HER2/neu positiver Serumproben des Patientenkollektivs mit Erstdiagnose Mammakarzinom zum Nachweis möglicher Antikörper gegen die ICD von HER2/neu	52
Tabelle 1	Definition der Risikogruppen für Patientinnen nach operativer Brustkrebstherapie nach Goldhirsch, übersetzt aus dem Englischen (Goldhirsch et al., 2007)	7
Tabelle 2	Leitlinien für die Therapieentscheidung nach operativer Brustkrebstherapie entsprechend der Risikogruppe nach Goldhirsch, übersetzt aus dem Englischen (Goldhirsch et al., 2007)	8
Tabelle 3	Detaillierte Auflistung der gutartigen histologischen Befunde des Patientenkollektivs	16
Tabelle 4	Detaillierte Auflistung der bösartigen oder potentiell bösartigen histologischen Befunde des Patientenkollektivs	17
Tabelle 5	Patientinnen-Daten Vakzine-Studie Universitäts-Frauenklinik Tübingen	19
Tabelle 6	Elisa - Kurzprotokoll	32

10. Literaturverzeichnis

- Arteaga, C.L., Johnson, D.H., Tyrosine kinase inhibitors-ZD1839 (Iressa). *Curr Opin Oncol* 13 (2001) 491-8.
- Baselga, J., Albanell, J., Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies. *Ann Oncol* 12 Suppl 1 (2001) S35-41.
- Baselga, J., Perez, E.A., Pienkowski, T., Bell, R., Adjuvant trastuzumab: a milestone in the treatment of HER-2-positive early breast cancer. *Oncologist* 11 Suppl 1 (2006) 4-12.
- Baxevas, C.N., Gritzapis, A.D., Tsitsilonis, O.E., Katsoulas, H.L., Papamichail, M., HER-2/neu-derived peptide epitopes are also recognized by cytotoxic CD3(+)CD56(+) (natural killer T) lymphocytes. *Int J Cancer* 98 (2002) 864-72.
- Baxevas, C.N., Sotiropoulou, P.A., Sotiriadou, N.N., Papamichail, M., Immunobiology of HER-2/neu oncoprotein and its potential application in cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 53 (2004) 166-75.
- Brockhausen, I., Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1473 (1999) 67-95.
- Cho, H.S., Mason, K., Ramyar, K.X., Stanley, A.M., Gabelli, S.B., Denney, D.W., Jr., Leahy, D.J., Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Hereptin Fab. *Nature* 421 (2003) 756-60.
- Cianfrocca, M., Goldstein, L.J., Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist* 9 (2004) 606-16.
- Clark, G.M., McGuire, W.L., Steroid receptors and other prognostic factors in primary breast cancer. *Semin Oncol* 15 (1988) 20-5.
- Clayton, A.J., Danson, S., Jolly, S., Ryder, W.D., Burt, P.A., Stewart, A.L., Wilkinson, P.M., Welch, R.S., Magee, B., Wilson, G., Howell, A., Wardley, A.M., Incidence of cerebral metastases in patients treated with trastuzumab for metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 91 (2004) 639-43.
- Cobleigh, M.A., Vogel, C.L., Tripathy, D., Robert, N.J., Scholl, S., Fehrenbacher, L., Wolter, J.M., Paton, V., Shak, S., Lieberman, G., Slamon, D.J., Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 17 (1999) 2639-48.
- Disis, M.L., Bernhard, H., Gralow, J.R., Hand, S.L., Emery, S.R., Calenoff, E., Cheever, M.A., Immunity to the HER-2/neu oncogenic protein. *Ciba Found Symp* 187 (1994) 198-207; discussion 207-11.
- Disis, M.L., Calenoff, E., McLaughlin, G., Murphy, A.E., Chen, W., Groner, B., Jeschke, M., Lydon, N., McGlynn, E., Livingston, R.B., et al., Existent T-cell and antibody

- immunity to HER-2/neu protein in patients with breast cancer. *Cancer Res* 54 (1994) 16-20.
- Disis, M.L., Cheever, M.A., HER-2/neu oncogenic protein: issues in vaccine development. *Crit Rev Immunol* 18 (1998) 37-45.
- Disis, M.L., Gooley, T.A., Rinn, K., Davis, D., Piepkorn, M., Cheever, M.A., Knutson, K.L., Schiffman, K., Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after active immunization with HER-2/neu peptide-based vaccines. *J Clin Oncol* 20 (2002) 2624-32.
- Disis, M.L., Grabstein, K.H., Sleath, P.R., Cheever, M.A., Generation of immunity to the HER-2/neu oncogenic protein in patients with breast and ovarian cancer using a peptide-based vaccine. *Clin Cancer Res* 5 (1999) 1289-97.
- Disis, M.L., Gralow, J.R., Bernhard, H., Hand, S.L., Rubin, W.D., Cheever, M.A., Peptide-based, but not whole protein, vaccines elicit immunity to HER-2/neu, oncogenic self-protein. *J Immunol* 156 (1996) 3151-8.
- Disis, M.L., Knutson, K.L., Schiffman, K., Rinn, K., McNeel, D.G., Pre-existent immunity to the HER-2/neu oncogenic protein in patients with HER-2/neu overexpressing breast and ovarian cancer. *Breast Cancer Res Treat* 62 (2000) 245-52.
- Disis, M.L., Pupa, S.M., Gralow, J.R., Dittadi, R., Menard, S., Cheever, M.A., High-titer HER-2/neu protein-specific antibody can be detected in patients with early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 15 (1997) 3363-7.
- Dybdal, N., Leiberman, G., Anderson, S., McCune, B., Bajamonde, A., Cohen, R.L., Mass, R.D., Sanders, C., Press, M.F., Determination of HER2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization and concordance with the clinical trials immunohistochemical assay in women with metastatic breast cancer evaluated for treatment with trastuzumab. *Breast Cancer Res Treat* 93 (2005) 3-11.
- Fearon, E.R., Vogelstein, B., A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61 (1990) 759-67.
- Fentiman, I.S., Fixed and modifiable risk factors for breast cancer. *Int J Clin Pract* 55 (2001) 527-30.
- Goldhirsch, A., Wood, W.C., Gelber, R.D., Coates, A.S., Thurlimann, B., Senn, H.J., Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Ann Oncol* 18 (2007) 1133-44.
- Harbeck, N., Dettmar, P., Thomssen, C., Henselmann, B., Kuhn, W., Ulm, K., Janicke, F., Hofler, H., Graeff, H., Schmitt, M., Prognostic impact of tumor biological factors on survival in node-negative breast cancer. *Anticancer Res* 18 (1998) 2187-97.
- Harbeck, N., Kates, R.E., Look, M.P., Meijer-Van Gelder, M.E., Klijn, J.G., Kruger, A., Kiechle, M., Janicke, F., Schmitt, M., Foekens, J.A., Enhanced benefit from adjuvant chemotherapy in breast cancer patients classified high-risk according to urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (n = 3424). *Cancer Res* 62 (2002) 4617-22.

- Holbro, T., Hynes, N.E., ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44 (2004) 195-217.
- Knutson, K.L., Schiffman, K., Cheever, M.A., Disis, M.L., Immunization of cancer patients with a HER-2/neu, HLA-A2 peptide, p369-377, results in short-lived peptide-specific immunity. *Clin Cancer Res* 8 (2002) 1014-8.
- Knutson, K.L., Schiffman, K., Disis, M.L., Immunization with a HER-2/neu helper peptide vaccine generates HER-2/neu CD8 T-cell immunity in cancer patients. *J Clin Invest* 107 (2001) 477-84.
- Korangy, F., Ormandy, L.A., Bleck, J.S., Klemmner, J., Wilkens, L., Manns, M.P., Greten, T.F., Spontaneous tumor-specific humoral and cellular immune responses to NY-ESO-1 in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 10 (2004) 4332-41.
- Kostler, W.J., Steger, G.G., Soleiman, A., Schwab, B., Singer, C.F., Tomek, S., Brodowicz, T., Krainer, M., Wiltschke, C., Horvat, R., Jakesz, R., Zielinski, C.C., Monitoring of serum Her-2/neu predicts histopathological response to neoadjuvant trastuzumab-based therapy for breast cancer. *Anticancer Res* 24 (2004) 1127-30.
- Krause, D.S., Van Etten, R.A., Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med* 353 (2005) 172-87.
- Leitzel, K., Teramoto, Y., Sampson, E., Mauceri, J., Langton, B.C., Demers, L., Podczaski, E., Harvey, H., Shambaugh, S., Volas, G., et al., Elevated soluble c-erbB-2 antigen levels in the serum and effusions of a proportion of breast cancer patients. *J Clin Oncol* 10 (1992) 1436-43.
- Luftner, D., Luke, C., Possinger, K., Serum HER-2/neu in the management of breast cancer patients. *Clin Biochem* 36 (2003) 233-40.
- Maple, L., Lathrop, R., Bozich, S., Harman, W., Tacey, R., Kelley, M., Danilkovitch-Miagkova, A., Development and validation of ELISA for herceptin detection in human serum. *J Immunol Methods* 295 (2004) 169-82.
- Meyer zum Buschenfelde, C., Nicklisch, N., Rose-John, S., Peschel, C., Bernhard, H., Generation of tumor-reactive CTL against the tumor-associated antigen HER2 using retrovirally transduced dendritic cells derived from CD34+ hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* 165 (2000) 4133-40.
- Muller, V., Witzel, I., Luck, H.J., Kohler, G., von Minckwitz, G., Mobus, V., Sattler, D., Wilczak, W., Loning, T., Janicke, F., Pantel, K., Thomssen, C., Prognostic and predictive impact of the HER-2/ neu extracellular domain (ECD) in the serum of patients treated with chemotherapy for metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 86 (2004) 9-18.
- Murray, J.L., Przepiorka, D., Ioannides, C.G., Clinical trials of HER-2/neu-specific vaccines. *Semin Oncol* 27 (2000) 71-5; discussion 92-100.
- Nicholson, R.I., Gee, J.M., Harper, M.E., EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 37 Suppl 4 (2001) S9-15.

- Pallud, C., Guinebretiere, J.M., Guepratte, S., Hacene, K., Neumann, R., Carney, W., Pichon, M.F., Tissue expression and serum levels of the oncoprotein HER-2/neu in 157 primary breast tumours. *Anticancer Res* 25 (2005) 1433-40.
- Peto, R., Boreham, J., Clarke, M., Davies, C., Beral, V., UK and USA breast cancer deaths down 25% in year 2000 at ages 20-69 years. *Lancet* 355 (2000) 1822.
- Piccart-Gebhart, M.J., Procter, M., Leyland-Jones, B., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I., Gianni, L., Baselga, J., Bell, R., Jackisch, C., Cameron, D., Dowsett, M., Barrios, C.H., Steger, G., Huang, C.S., Andersson, M., Inbar, M., Lichinitser, M., Lang, I., Nitz, U., Iwata, H., Thomssen, C., Lohrisch, C., Suter, T.M., Ruschoff, J., Suto, T., Greatorex, V., Ward, C., Straehle, C., McFadden, E., Dolci, M.S., Gelber, R.D., Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353 (2005) 1659-72.
- Pupa, S.M., Menard, S., Andreola, S., Colnaghi, M.I., Antibody response against the c-erbB-2 oncoprotein in breast carcinoma patients. *Cancer Res* 53 (1993) 5864-6.
- Riemer, A.B., Kraml, G., Scheiner, O., Zielinski, C.C., Jensen-Jarolim, E., Matching of trastuzumab (Herceptin) epitope mimics onto the surface of Her-2/neu--a new method of epitope definition. *Mol Immunol* 42 (2005) 1121-4.
- Riese, D.J., 2nd, Bermingham, Y., van Raaij, T.M., Buckley, S., Plowman, G.D., Stern, D.F., Betacellulin activates the epidermal growth factor receptor and erbB-4, and induces cellular response patterns distinct from those stimulated by epidermal growth factor or neuregulin-beta. *Oncogene* 12 (1996) 345-53.
- Romond, E.H., Perez, E.A., Bryant, J., Suman, V.J., Geyer, C.E., Jr., Davidson, N.E., Tan-Chiu, E., Martino, S., Paik, S., Kaufman, P.A., Swain, S.M., Pisansky, T.M., Fehrenbacher, L., Kutteh, L.A., Vogel, V.G., Visscher, D.W., Yothers, G., Jenkins, R.B., Brown, A.M., Dakhil, S.R., Mamounas, E.P., Lingle, W.L., Klein, P.M., Ingle, J.N., Wolmark, N., Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353 (2005) 1673-84.
- Ross, J.S., Fletcher, J.A., The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *Oncologist* 3 (1998) 237-252.
- Sasco, A.J., Kaaks, R., Little, R.E., Breast cancer: occurrence, risk factors and hormone metabolism. *Expert Rev Anticancer Ther* 3 (2003) 546-62.
- Scanlan, M.J., Gout, I., Gordon, C.M., Williamson, B., Stockert, E., Gure, A.O., Jager, D., Chen, Y.T., Mackay, A., O'Hare, M.J., Old, L.J., Humoral immunity to human breast cancer: antigen definition and quantitative analysis of mRNA expression. *Cancer Immunol* 1 (2001) 4.
- Schmidt, M., Lewark, B., Kohlschmidt, N., Glawatz, C., Steiner, E., Tanner, B., Pilch, H., Weikel, W., Kolbl, H., Lehr, H.A., Long-term prognostic significance of HER-2/neu in untreated node-negative breast cancer depends on the method of testing. *Breast Cancer Res* 7 (2005) R256-66.
- Shmueli, E., Wigler, N., Inbar, M., Central nervous system progression among patients with metastatic breast cancer responding to trastuzumab treatment. *Eur J Cancer* 40 (2004) 379-82.

- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., McGuire, W.L., Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235 (1987) 177-82.
- Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J., Norton, L., Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344 (2001) 783-92.
- Smith, I., Procter, M., Gelber, R.D., Guillaume, S., Feyereislova, A., Dowsett, M., Goldhirsch, A., Untch, M., Mariani, G., Baselga, J., Kaufmann, M., Cameron, D., Bell, R., Bergh, J., Coleman, R., Wardley, A., Harbeck, N., Lopez, R.I., Mallmann, P., Gelmon, K., Wilcken, N., Wist, E., Sanchez Rovira, P., Piccart-Gebhart, M.J., 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 369 (2007) 29-36.
- Stemmler, H.J., Schmitt, M., Harbeck, N., Willems, A., Bernhard, H., Lassig, D., Schoenberg, S., Heinemann, V., Application of intrathecal trastuzumab (Herceptintrade mark) for treatment of meningeal carcinomatosis in HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Oncol Rep* 15 (2006) 1373-7.
- Stemmler, H.J., Schmitt, M., Willems, A., Bernhard, H., Harbeck, N., Heinemann, V., Ratio of trastuzumab levels in serum and cerebrospinal fluid is altered in HER2-positive breast cancer patients with brain metastases and impairment of blood-brain barrier. *Anticancer Drugs* 18 (2007) 23-8.
- Travis, R.C., Key, T.J., Oestrogen exposure and breast cancer risk. *Breast Cancer Res* 5 (2003) 239-47.
- Trefzer, U., Herberth, G., Wohlan, K., Milling, A., Thiemann, M., Sharav, T., Sparbier, K., Sterry, W., Walden, P., Tumour-dendritic hybrid cell vaccination for the treatment of patients with malignant melanoma: immunological effects and clinical results. *Vaccine* 23 (2005) 2367-73.
- Valmori, D., Dutoit, V., Ayyoub, M., Rimoldi, D., Guillaume, P., Lienard, D., Lejeune, F., Cerottini, J.C., Romero, P., Speiser, D.E., Simultaneous CD8+ T cell responses to multiple tumor antigen epitopes in a multi-peptide melanoma vaccine. *Cancer Immun* 3 (2003) 15.
- van de Vijver, M., Emerging technologies for HER2 testing. *Oncology* 63 Suppl 1 (2002) 33-8.
- Vogel, C.L., Cobleigh, M.A., Tripathy, D., Gutheil, J.C., Harris, L.N., Fehrenbacher, L., Slamon, D.J., Murphy, M., Novotny, W.F., Burchmore, M., Shak, S., Stewart, S.J., First-line Herceptin monotherapy in metastatic breast cancer. *Oncology* 61 Suppl 2 (2001) 37-42.
- Vogel, C.L., Cobleigh, M.A., Tripathy, D., Gutheil, J.C., Harris, L.N., Fehrenbacher, L., Slamon, D.J., Murphy, M., Novotny, W.F., Burchmore, M., Shak, S., Stewart, S.J., Press, M., Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20 (2002) 719-26.
- Ward, R.L., Hawkins, N.J., Coomber, D., Disis, M.L., Antibody immunity to the HER-2/neu oncogenic protein in patients with colorectal cancer. *Hum Immunol* 60 (1999) 510-5.

Wilkinson, E., Surprise phase III failure for ZD1839. *Lancet Oncol* 3 (2002) 583.

Yamauchi, H., Stearns, V., Hayes, D.F., When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. *J Clin Oncol* 19 (2001) 2334-56.

11. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Marion Kiechle, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Manfred Schmitt, Frau Prof. Dr. med. Nadia Harbeck und Frau Prof. Dr. med. Helga Bernhard, die mir die Möglichkeit gegeben haben, in der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik und dem Forschungslabor der III. Medizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München (TUM) im Rahmen meiner wissenschaftlichen Dissertation zu arbeiten

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Manfred Schmitt möchte ich mich für die Betreuung während der Laborarbeiten bedanken.

Bei Frau Prof. Dr. med. Nadia Harbeck möchte ich mich insbesondere für die sehr gute Betreuung während des ganzen Projektes vor allem in klinischer und menschlicher Hinsicht bedanken.

Bei Frau Prof. Dr. med. Helga Bernhard und Frau Prof. Dr. med. Nadia Harbeck möchte ich mich für die Bereitstellung der Gelder der Wilhelm Sander-Stiftung (2000.017.2) zur Finanzierung des Projektes, die Bereitstellung der Serumproben, der Reagenzien und die wissenschaftliche Ausbildung bedanken.

Bei Frau Dr. med. Glückel, Universitätsklinik Tübingen, möchte ich mich sehr für die Bereitstellung der Proben aus der HER2/neu Vakzine Studie bedanken.

Weiterhin möchte ich Frau Cordula Henrichs (Ärztin und Mit-Doktorandin) für das mühsame Sammeln der Serumproben über Jahre hinweg und die stimmungshebende Zusammenarbeit danken.

Im gleichen Maße möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Klinischen Forschergruppe bedanken. Alex Sturm und Christl Schnelldorfer haben mich in die Technik des ELISA eingearbeitet und wenn notwendig Messungen für mich durchgeführt. Bei Stefanie Neubauer, Claudia Abu Ajram, Daniela Loessner und Anke Bengel möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft und die sehr gute Zusammenarbeit bedanken.

Diese Arbeit wäre ohne die großzügige Unterstützung der Wilhelm Sander-Stiftung (2000.017.2) nicht ohne weiteres möglich gewesen.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Vater Dr. med Wulf Willems bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat die Basistechnik des ELISA zu erlernen und in vielen technischen Fragen während des ganzen Projektes zur Diskussion zu Verfügung stand.

Und bei meiner langjährigen Freundin Dr. Georgia Christinidis für das „Ziehen an der Kommawolke“ und literarische Ratschläge.

Schließlich möchte ich meinen Eltern Helene und Wulf Willems danken, die mir das Medizinstudium ermöglicht haben und meinem Ehemann Charles Bosson für die ausdauernde emotionale Unterstützung.

12. Lebenslauf

Name Amina Willems
Adresse 14, Bevington Way
St. Neots, Cambridgeshire
PE19 2HQ
UK

Geburtstag 13.02.1974
Geburtsort Niamey, Niger
Staatsangehörigkeit deutsch
Familienstand verheiratet

Schulabschluß

Abitur 06/93 Liebigschule, Gießen

Studium

Architektur	10/93 - 09/96	RWTH Aachen, Vor-Diplom
Medizin	10/96 - 09/98	LMU München, Physikum
	10/98 - 09/99	TU Dresden, 1. Staatsexamen
	10/99 - 04/00	Universität Paris 7, „Denis Diderot“
	05/00 - 09/01	TU München, 2. Staatsexamen
	10/01 - 10/02	TU München, PJ (Chirurgie, Gynäkologie, 3. Terial Innere CHU Nantes), 3. Staatsexamen
ÄiP	02/03 - 08/04	Frauenklinik, Klinikum rechts der Isar, München
Assistenzärztin	08/04 – 09/05	Frauenklinik, Klinikum rechts der Isar, München
Assistenzärztin	01/06 – 04/06	Frauenklinik, New Cross Hospital, Wolverhampton, UK
Assistenzärztin	06/06 – 07/07	Lincoln County Hospital, Lincoln, UK
Assistenzärztin	08/07 – 11/07	Derby City General Hospital, Derby, UK
Mutterschaft	12/07 – 07/08	
Assistenzärztin	08/08 –	Bedford Hospital, Bedford, UK

Sprachen

Englisch Fließend in Schrift und Wort, Fachenglisch (Medizin)
Französisch Konversationsfranzösisch, Fachfranzösisch (Medizin)

13. Publikationen

Stemmler, H.J., Schmitt, M., Harbeck, N., **Willems, A.**, Bernhard, H., Lassig, D., Schoenberg, S., Heinemann, V., Application of intrathecal trastuzumab (Herceptintrade mark) for treatment of meningeal carcinomatosis in HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Oncol Rep* 15 (2006) 1373-7.

Stemmler, H.J., Schmitt, M., **Willems, A.**, Bernhard, H., Harbeck, N., Heinemann, V., Ratio of trastuzumab levels in serum and cerebrospinal fluid is altered in HER2-positive breast cancer patients with brain metastases and impairment of blood-brain barrier. *Anticancer Drugs* 18 (2007) 23-8.