

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

**Klinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie,
Abteilung Experimentelle Radioonkologie, Strahlenbiologie
am Klinikum rechts der Isar**

**Vergleichende Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity Analyse an
murinen Kolonkarzinomzellen mit unstimulierten und TKD/IL2 stimulierten
Effektorzellen aus der Maus und dem Hsp70.1 Antikörper**

Julia Riegger

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. Univ.-Prof. Dr. G. Multhoff

2. Univ.-Prof. Dr. F. R. Greten

Die Dissertation wurde am 06.04.2010 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.07.2010 angenommen.

1	EINLEITUNG	10
1.1	Krebserkrankungen: Fakten und Zahlen.....	10
1.2	Derzeitige Standardkrebstherapie am Beispiel kolorektales Karzinom.....	10
1.3	Neue Erkenntnisse in der Strahlentherapie	12
1.4	Hitze-Schock-Proteine	14
1.4.1	Hitze-Schock-Proteine in menschlichen Zellen.....	14
1.4.2	Hitze-Schock-Proteine in Tumorzellen.....	14
1.4.3	Hitze-Schock-Proteine auf der Plasmamembran von Tumoren	15
1.5	Die zelluläre und humorale Immunantwort	16
1.6	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity („ADCC“)	17
1.7	Problemstellung	19
2	MATERIAL	20
2.1	Zelllinien und Mäuse	20
2.2	Verbrauchsmaterialien	20
2.3	Geräte	22
2.4	Stammlösungen, Puffer, Medien	23
2.5	Antikörper	27
2.5.1	Antikörper für die Durchflusszytometrie	27
2.5.2	Antikörper für den „ELISA“	27
2.5.3	Antikörper für die Immunhistochemie.....	28
3	METHODEN	29
3.1	„Fluorescence Activated Cell Sorting“ („FACS“)-Allgemeines	29
3.1.1	Theoretischer Hintergrund der Immunfluoreszenzanalyse mit Hilfe der Durchflusszytometrie .	29
3.1.2	Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz	29

3.1.3	Das Durchflusszytometer	31
3.1.3.1	Allgemeiner Aufbau und Funktion	31
3.1.3.2	„FACS“ Calibur TM und CellQuest TM.....	34
3.1.3.3	Vorbereitung und Optimierung des Durchflusszytometers für die Messung.....	35
3.1.3.4	Auswertung der erhobenen Daten	43
3.2	„ADCC“-Analyse für die Durchflusszytometrie.....	47
3.2.1	Zellzählung	47
3.2.2	Kultivierung der CT26 Zellen.....	48
3.2.3	Gewinnung von Hybridomüberstand.....	48
3.2.4	Vorbereitung der CT26 „Targetzellen“	49
3.2.4.1	Hsp70 „FACS“ von CT26.....	49
3.2.4.2	Färbung der „Targetzellen“ CT26 mit PKH67.....	50
3.2.5	Vorbereitung der Effektorzellen aus Mäusemilzen	51
3.2.5.1	Gewinnung der Effektorzellen durch Auftrennung nach ihrer Dichte (Ficollierung)	51
3.2.6	Einstellen der richtigen Konzentration der Effektorzellen	54
3.2.7	Durchflusszytometrie („FACS“-Analyse)	54
3.2.7.1	Erstellen der Proben für die „FACS“-Messung.....	54
3.2.7.2	Messung der Proben im „FACS“-Gerät	55
3.2.8	Färbung der Milzzellen für die „FACS“-Analyse.....	55
3.3	Enzyme Linked Immunosorbent Assay („ELISA“) zur Bestimmung des Antikörpergehalts im Hybridomüberstand	58
3.3.1	Herstellung der Verdünnungsreihen	58
3.3.1.1	Herstellung der Standardverdünnungsreihe.....	58
3.3.1.2	Herstellung der Verdünnungsreihe des Hybridomüberstandes	58
3.3.2	Durchführung.....	58
3.3.3	Auswertung der erhobenen Daten	60
3.4	Immunhistochemie von Paraffin-Schnitten	60
3.4.1	Gewinnung der Tumore aus Balb/c Mäusen.....	60
3.4.2	Schnitte und Antikörper.....	62
3.4.3	Durchführung.....	63
3.5	Statistische Auswertung.....	64
4	ERGEBNISSE	65
4.1	Ergebnisse des „ELISA“ des Hybridomüberstandes	65

4.2	Ergebnisse des „ADCC“-Versuchs.....	66
4.3	Ergebnisse der Anfärbung der Tumorschnitte.....	72
5	DISKUSSION	74
5.1	Zusammenfassung der Versuchsergebnisse	74
5.2	Vergleich zwischen cmHsp70.1 und klinisch erprobten Antikörpern	75
5.3	Mögliche Einsatzgebiete von cmHsp70.1 in der Tumorthherapie	76
5.4	Probleme der Therapie mit monoklonalen Antikörpern	79
6	ZUSAMMENFASSUNG	81
7	LITERATURVERZEICHNIS	82

Abkürzungsverzeichnis

%ig	prozentig
ρ	Dichte
μg	Mykrogramm
μl	Mykroliter
μm	Mykrometer
°	Grad
°C	Grad Celsius
5-FU	5-Fluorouracil
Abb.	Abbildung
ADCC	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
AK	Antikörper
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
B-Lymphozyten	Bone marrow-derived Lymphozyten
BD	Becton Dickinson
BSA	Bovines Serumalbumin
BZM	B-Zell-Medium
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Complement Dependent Cytotoxicity
cm	Zentimeter
CmHsp	Cell membrane heat shock protein
CO ₂	Kohlendioxyd
CT26 Zellen	Murine Kolonkarzinom Zelllinie
DAB	Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoximid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E/T Ratio	Effektorzellen/Targetzellen Verhältnis
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtOH	Ethanol

EZ	Effektorzelle/n
F	Phenylalanin
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FasL	Fas-Ligand
FAZA	Fluoroazomycinarabinosid
Fc	Crystallizable Fragment
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FL 1-4	Fluoreszenz 1-4
FSC	Forward Scatter
FST	Fine Science Tools
g	Gramm
GRP	Glucose-Regulated Protein
h	Stunde/n
HLA	Human Leukocyte Antigen
Her-2/Erb-2/Neu	Human Epidermal Growth factor receptor 2
H ₂ O dd	Aqua bidestillata
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hsc	Constitutive expressed heat shock protein
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
Hsp	Hitzeschockprotein/e
Ig	Immunglobulin
ILT	Immunglobulin like transcript
IL2	Interleukin 2
Iso	Isotyp
IVC	Individually Vented Cages
KIR	Killer cell immunglobulin-like receptor
m	Meter
M	Molar/e
mAb	Monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm

MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute/n
Mio	Million/en
ml	Milliliter
MMCC	Maximal Malignancy Criteria Count
Na	Natrium
Na-Azid	Natrium-Azid
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzelle/n
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
Nr.	Nummer
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Personal Computer
PE	Phycoerythrin
PET	Positronen Emissions Tomographie
pH	potentia Hydrogenii
PI	Propidiumiodid
PKH67	Paul Karl Horan 67
PMTs	Photomultiplier Tubes
POD	Peroxidase
rpm	Rotations per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde/n
SSC	side scatter
Std.	Stunde/n
Tab.	Tabelle

Th1-Zelle	T-Helfer-Zelle
T-Lymphozyten	Thymus-Lymphozyten
TKD	Aminosäuresequenz T K D N N L L G R F E L S (450-463)
TMB	Tetramethylbenzidin
TNM	Tumor, Nodes , Metastasen
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TUM	Technische Universität München
U	Unit
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
V	Valin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1 Einleitung

1.1 Krebserkrankungen: Fakten und Zahlen

Krebserkrankungen stellen eine große Bedrohung der Gesundheit dar.

Weltweit ist jeder achte Todesfall durch Krebs bedingt. In den Industrienationen ist Krebs die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislaufkrankungen. Männer erkranken hier vor allem an Prostata-, Lungen- und kolorektalen Karzinomen. Bei Frauen tritt Brustkrebs am häufigsten auf, gefolgt von kolorektalen- und Lungenkarzinomen. Die drei häufigsten Krebsarten verursachen auch die meisten Todesfälle. 2007 wurden die Fälle von neu aufgetretenen Krebserkrankungen auf weltweit 12 Mio. und die korrespondierenden Todesfälle auf 7,6 Mio. (ca. 20.000 Tote pro Tag) geschätzt. 2050 rechnet man mit ca. doppelt so vielen Neuerkrankungen und Todesfällen, da die Bevölkerung weltweit immer mehr wächst, und jeder einzelne immer älter wird (27).

Angesichts dieser erschreckenden Zahlen kommt der Prävention, Früherkennung und Therapie von Krebserkrankungen eine sehr wichtige Rolle zu. Die Therapie stützt sich auf vier verschiedene Säulen: Chemotherapie, Operation, Strahlentherapie und Modulation des Immunsystems durch z. B. Antikörper oder Zytokinen. Diese Verfahren können einzeln oder kombiniert angewendet werden.

1.2 Derzeitige Standardkrebstherapie am Beispiel kolorektales Karzinom

Da die Versuche im praktischen Teil dieser Doktorarbeit mit Kolonkarzinomzellen aus der Maus durchgeführt wurden, soll hier als Beispiel für eine interdisziplinäre Krebstherapie das kolorektale Karzinom herangezogen werden. Wie weiter oben schon erwähnt, handelt es sich bei dieser Krankheit um eine weltweit sehr häufige Tumorentität. In Deutschland geht man von einer Inzidenz von über 40/100.000/Jahr aus. Die Ursachen eines kolorektalen Karzinoms sind vielseitig. Seine Entstehung kann durch genetische Faktoren, Ernährungsgewohnheiten, Risikoerkrankungen wie

kolorektale Adenome oder chronisch-entzündliche Darmerkrankungen und andere Risikofaktoren wie langjähriges Zigarettenrauchen oder langjährigen Alkoholkonsum begünstigt werden. Das kolorektale Karzinom wird nach unterschiedlichen Klassifikation in Stadien eingeteilt:

UICC-Stadium	Definition	TNM-System	Dukes
0	Carcinoma in situ	TIS N0 M0	
I	Ia Beschränkung auf Mukosa und Submukosa Ib Infiltration Muscularis propria (nicht darüber hinaus)	T1 N0 M0 T2 N0 M0	A
II	Infiltration aller Wandschichten, Überschreitung der Darmwand	T3 N0 M0 T4 N0 M0	B
III	Regionale Lymphknoten oder Infiltration der Umgebung	Tx N1-2 M0	C
IV	Fernmetastasen	Tx Nx M1	D

Tab. 1: Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms nach der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) und nach dem Tumor/Nodes/Metastases-System (TNM-Klassifikation) aus Herold, G., *Kolorektales Karzinom in „Innere Medizin-Eine vorlesungsorientierte Darstellung“*, Herold, G., Köln,(2007) 441-446

Die einzelnen Stadien weisen unterschiedliche 5-Jahres-Überlebensraten auf. Je höher das Stadium, desto weniger Patienten leben nach 5 Jahren noch. Die folgende Tabelle zeigt die prozentualen Überlebensraten stadienadaptiert.

UICC-Stadium	5-Jahresüberlebensrate Rektumkarzinom	5-Jahresüberlebensrate Kolonkarzinom
I	bis 95 %	bis 95 %
II	bis 85 %	bis 90 %
III	bis 55 %	bis 65 %
IV	bis 5 %	bis 5 %

Tab. 2: Stadienadaptierte 5-Jahresüberlebensraten bei Rektum- und Kolonkarzinomen aus Herold, G., *Kolorektales Karzinom in „Innere Medizin-Eine vorlesungsorientierte Darstellung“*, Herold, G., Köln,(2007) 441-446

Die hämatogene Metastasierung erfolgt, je nach Lage des Karzinoms, in die Leber oder in die Lunge. Die Therapie wird stadiengerecht durchgeführt mit möglichst kurativer Zielsetzung. Wenn der Tumor primär resektabel ist, wird der befallene Darmabschnitt möglichst vollständig entnommen. Wenn dies gelungen ist, schließt sich beim Kolonkarzinom im UICC-Stadium III eine 6-monatige Gabe von 5-Fluorouracil (5-FU) und Folsäure, evtl. in Kombination mit Oxaliplatin, an. Dies verbessert die 5-Jahres-Überlebensrate. Beim Rektumkarzinom im UICC-Stadium II und III führt eine postoperative Radio-/Chemotherapie mit 5-FU zu einer Verminderung von Lokalrezidiven um 50 % und einer um 10 % verbesserten 5-Jahres-Überlebensrate. Bei fortgeschrittenen Rektumkarzinomen, bei denen aufgrund der präoperativen Diagnostik eine R0-Resektion so gut wie unmöglich erscheint, kann manchmal durch eine präoperative Radio-/Chemotherapie eine R0-Resektion ermöglicht werden. Die Operation erfolgt 6-8 Wochen nach Radio-/Chemotherapie. Da in ca. 10-30 % der Fälle nach einer kurativen Resektion in den darauf folgenden zwei Jahren ein lokoregionales Tumorrezidiv auftritt, sind stadienadaptierte Nachsorgeuntersuchungen indiziert. Wenn nur noch eine palliative Therapie möglich ist, werden zur Verbesserung der Lebensqualität des Patienten Chemotherapie, Kryo-, Laser-, Elektrotherapie oder auch endoskopische Operationsverfahren angewandt (38).

1.3 Neue Erkenntnisse in der Strahlentherapie

In allen Sektoren der Krebstherapie wird nach Möglichkeiten geforscht, dem einzelnen Patienten immer individuellere Therapien anzubieten, so auch in der Strahlentherapie. Dazu sucht man Parameter, auf die man Tumore untersuchen kann, die eine genauere Therapieplanung und eine präzisere Aussage über die Prognose des Patienten und das Ansprechen des Tumors auf bestimmte Therapien erlauben. Derzeit basieren Therapieentscheidungen auf Parametern wie dem Stadium nach TNM- oder UICC-Einteilung, Tumolvolumen (71), Tumoroxygenierung (87, 63, 64), Performanzstatus und Lebensqualität des Patienten (23, 71). Bei fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren beispielsweise stellt die Radiotherapie evtl. in Kombination mit Chemotherapie aufgrund der Inoperabilität solcher Tumore die einzige Therapieoption dar (12, 25, 49, 79). Am Institut für Radiotherapie und radiologische Onkologie der Technischen Universität

München (TUM) wurden in einer prospektiven Phase II Studie die zervikalen Lymphknotenlevel I-VI von 50 Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren im Stadium IVA-B ohne Fernmetastasen bilateral mit Ultraschall unter Berücksichtigung von acht Malignitätskriterien vor Beginn einer Therapie untersucht. Jedes vorhandene Malignitätskriterium wie z. B. Begrenzung, Homogenität, Vaskularisierung etc. ergab einen Punkt. Daraus errechnete man den Maximal Malignancy Criteria Count („MMCC“) des Lymphknoten eines Patienten mit den meisten Malignitätskriterien (75). Der „MMCC“ erlaubte nicht nur Aussagen über das Gesamtüberleben der Patienten, sondern lieferte auch bei sekundären Endpunkten wie rezidivfreies Überleben, metastasenfreies Überleben und krankheitsfreies Überleben signifikante prognostische Werte. Je höher der „MMCC“ war, desto schlechter war die Prognose der Patienten (75). Somit scheint der „MMCC“ ein mit relativ einfacher Technik zu ermittelnder Wert zu sein, der bei der Therapieplanung einbezogen werden sollte.

Um die Therapie von Kopf-Hals-Tumoren weiter zu verbessern, nahm man sich in einer anderen Studie der Hypoxie der Tumoren an. Hypoxie in Tumoren ist assoziiert mit einer höheren lokalen Rezidivrate, vermehrt auftretenden Fernmetastasen und beachtlicher Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapie (10, 11, 63, 87, 94). Es scheint deshalb wichtig für die Therapieplanung und die Prognose der Patienten zu sein, das genaue Maß der Minderoxygenierung der Tumore herauszufinden. Dies geschah bisher immer mit einer invasiven, komplizierten Methode durch Messung des Sauerstoffgehalts direkt im Tumor durch Elektroden (20). In dieser Studie wurde die Positronen Emissions Tomographie (PET) verwendet mit (18F) Fluoroazomycinarabinosid (FAZA) als Tracer. Es zeigte sich, dass durch das FAZA-PET gut oxygenierte von hypoxischen Tumorarealen unterschieden werden können (37). Dadurch kann man, wenn es der Allgemeinzustand des Patienten und die anatomischen Gegebenheiten zulassen, evtl. in den minderoxygenierten Arealen eine Dosisescalation bei der Radiotherapie vornehmen und damit unter Umständen die Prognose des Patienten verbessern (37).

Auf der Suche nach weiteren Parametern in der Krebstherapie widmet sich unsere Arbeitsgruppe der Erforschung von Oberflächenantigenen auf Tumore, als mögliche Angriffspunkte für neue Therapien, wie z. B. Hitze-Schock-Proteine.

1.4 Hitze-Schock-Proteine

1.4.1 Hitze-Schock-Proteine in menschlichen Zellen

Stress- oder Hitzeschockproteine (Hsp) wurden zum ersten Mal 1962 in der Speicheldrüse von Drosophilafliegen von Ritossa beschrieben (74). Hsps sind sowohl in eukaryotischen als auch in prokaryotischen Zellen vorhanden. Sie werden anhand ihres Molekulargewichts in verschiedene Familien eingeteilt: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 und Hsp20 (60). Jede Familie von Hsps besteht aus Mitgliedern, die entweder kontinuierlich in der Zelle exprimiert werden, oder deren Expression erhöht wird bei Einwirkung von Stress wie Hitze, oxidativem Stress oder Chemotherapeutika (77). Aber auch physiologische Ereignisse wie Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Zellalterung führen zu einer vermehrten Produktion von Hsps in der Zelle (13). Die Familie der Hsp70 Proteine besteht aus einem durch Stress induzierbaren Hsp70 und einem kontinuierlich exprimierten. Des Weiteren gehören zu dieser Gruppe Hsp75 im Mitochondrium und „Glucose-Regulated Protein“ 78 („GRP“78) im Endoplasmatischen Retikulum (41). Unter normalen Bedingungen überwacht Hsp70 die richtige Faltung von Proteinen, hilft bei der korrekten Zusammenlagerung von Multiprotein-komplexen und assistiert bei Transportvorgängen von Proteinen durch die Zellmembran (82). Wenn Noxen wie Hitze oder Chemotherapeutika auf die Zelle einwirken, wird das stressinduzierte Hsp70 vermehrt exprimiert, greift an verschiedenen Stellen in die Apoptose der Zelle ein und verhindert diese dadurch.

1.4.2 Hitze-Schock-Proteine in Tumorzellen

Hsps findet man nicht nur in normalen Zellen des menschlichen Körpers, sondern auch in verschiedenen Tumoren. So weisen bis zu 50 % der Biopsien von Brust-, Endometrium-, Lungen-, und Prostatakarzinomen und vieler anderer eine erhöhte intrazelluläre Expression von Hsps auf. Hierbei korreliert die erhöhte Konzentration von intrazellulären Hsps in Tumoren in vielen Fällen mit vermehrter Tumorpheriferation, Metastasierung in Lymphknoten, schlechtem Ansprechen auf Chemotherapie und kurzem Überleben der Patienten (40, 16, 13). Diese Beobachtung kann dadurch erklärt werden, dass Hsps in Tumorzellen ähnliche Aufgaben übernehmen wie in normalen

Gewebe. Sie fördern das Tumorwachstum, indem sie der Apoptose und der Alterung von Tumorzellen entgegenwirken, und sie verhindern, dass das Immunsystem die Krebszellen als körperfremd erkennt (61). Man hat herausgefunden, dass Tumorzellen im Gegensatz zu Zellen aus dem dazugehörigen Normalgewebe in Apoptose übergehen, wenn man die Expression von intrazellulärem Hsp70 ausschaltet (26, 44, 65, 95). Dies bietet evtl. einen neuen Weg in der Krebstherapie. Bisher werden Substanzen, die Hsp90 im Zytosol von Tumorzellen inhibieren, in Phase I- und II-Studien getestet (13, 62). Diese Inhibitoren blockieren zwar die Interaktion von Hsp90 mit ihren Client Proteinen, induzieren aber gleichzeitig die Synthese von Mitgliedern der Hsp70 Familie. Die Bedeutung dieser Eigenschaft von Hsp90 Inhibitoren ist noch nicht verstanden. Klar ist bislang, dass für Hsp70 derzeit keine klinisch anwendbaren effektiven Inhibitoren existieren (77).

1.4.3 Hitze-Schock-Proteine auf der Plasmamembran von Tumoren

Hsps kommen nicht nur im Zellinneren vor, sondern sie können auch im extrazellulären Milieu und auf der Plasmamembran gebunden auftreten. Diese auf der Plasmamembran von Tumoren vorhandenen Hsps konnten als Stimuli für das angeborene Immunsystem identifiziert werden (2, 3, 5, 6, 85). Beim Menschen erscheinen Hsps im Serum unter Stressbedingungen wie Entzündungen, bakteriellen und viralen Infektionen und Krebserkrankungen. Der genaue Weg des Transports der Hsps zur Plasmamembran, die Verankerung der Hsps in der Plasmamembran und die Sekretion in den Extrazellularraum ist noch nicht genau bekannt (60). Unsere Gruppe fand heraus, dass es sich bei dem Export von Hsps am ehesten um einen aktiven Transport von Exosomen an die Zelloberfläche handelt (28). Abgesehen von dem Export von Hsps durch Exosomen hat unsere Arbeitsgruppe entdeckt, dass auf der Plasmamembran einer Vielzahl von Tumorgeweben Hsp70 in hohem Maß exprimiert wird (41). Beispiele hierfür sind Mammakarzinome, Prostatakarzinome, Magen- und Lungentumore und Blasten hämatologischer Erkrankungen wie der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) und der Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL) (60). Hierbei ist es sehr wichtig zu erwähnen, dass die zu den Tumoren gehörenden Normalgewebe kein Hsp70 auf der Oberfläche tragen. Auf der Basis dieser Beobachtungen und mit dem Wissen aus anderen Studien, dass auf Tumoroberflächen exprimierte Hsps starke Stimuli für das

Immunsystem sind, wurde der monoklonale Antikörper cmHsp70.1 (cell membrane Hsp70.1, multimmune GmbH) entwickelt, der Hsp70 auf der Membran von Tumoren erkennt. Der Antikörper cmHsp70.1 ist spezifisch für das induzierbare Hsp70 und zeigt keine Kreuzreaktivität mit der konstitutiven Form „Hsc“70 („constitutive expressed Hsp“) (72). Mit diesem Antikörper wurden in dieser Arbeit die später beschriebenen Versuche durchgeführt.

1.5 Die zelluläre und humorale Immunantwort

Man unterscheidet zwischen einer zellulären und humoralen Immunantwort. Erstere wird von Thymus-Zellen (T-Zellen) und Makrophagen vermittelt. Makrophagen, auch Fresszellen genannt, nehmen Mikroorganismen auf und degradieren Proteine in kleinere Bestandteile, in die sogenannten Peptide. Diese Peptide werden als Antigene auf „Major Histocompatibility Complex“-Molekülen („MHC“) der Klasse I und Klasse II auf ihrer Oberfläche präsentiert, die entweder eine CD4- (Cluster of Differentiation) vermittelte T-Helfer (Th1-Zellen) oder eine CD8 vermittelte zytotoxische T Zellantwort induzieren. Es erfolgt eine Stimulation der beiden Immuneffektorzellen, deren Resultat in einer erhöhten Proliferation und zytolytischen Aktivität resultiert. CD8+ T-Zellen töten u. a. körpereigene Zellen, die mit Viren oder anderen Erregern infiziert sind und somit körperfremde Peptide auf ihren „MHC“-Klasse I Molekülen präsentieren. Bevor die CD8+ T-Zellen jedoch an der Oberfläche der Zielzelle ihre mit zytotoxischen Substanzen gefüllten Granula entleeren, müssen sie von Antigen präsentierenden Zellen wie z. B. den Dendritischen Zellen stimuliert werden.

Unter der humoralen Immunantwort versteht man die Entwicklung von Plasmazellen zu „Bone marrow-derived“ B-Zellen (B-Zellen), die nach Antigenkontakt zu Antikörperproduzierenden B-Zellen heranreifen (70). Ein solcher antigenspezifischer Antikörper ist auch der in den Versuchen verwendete Antikörper cmHsp70.1. Der Mechanismus einer zellulären und humoralen Immunantwort ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

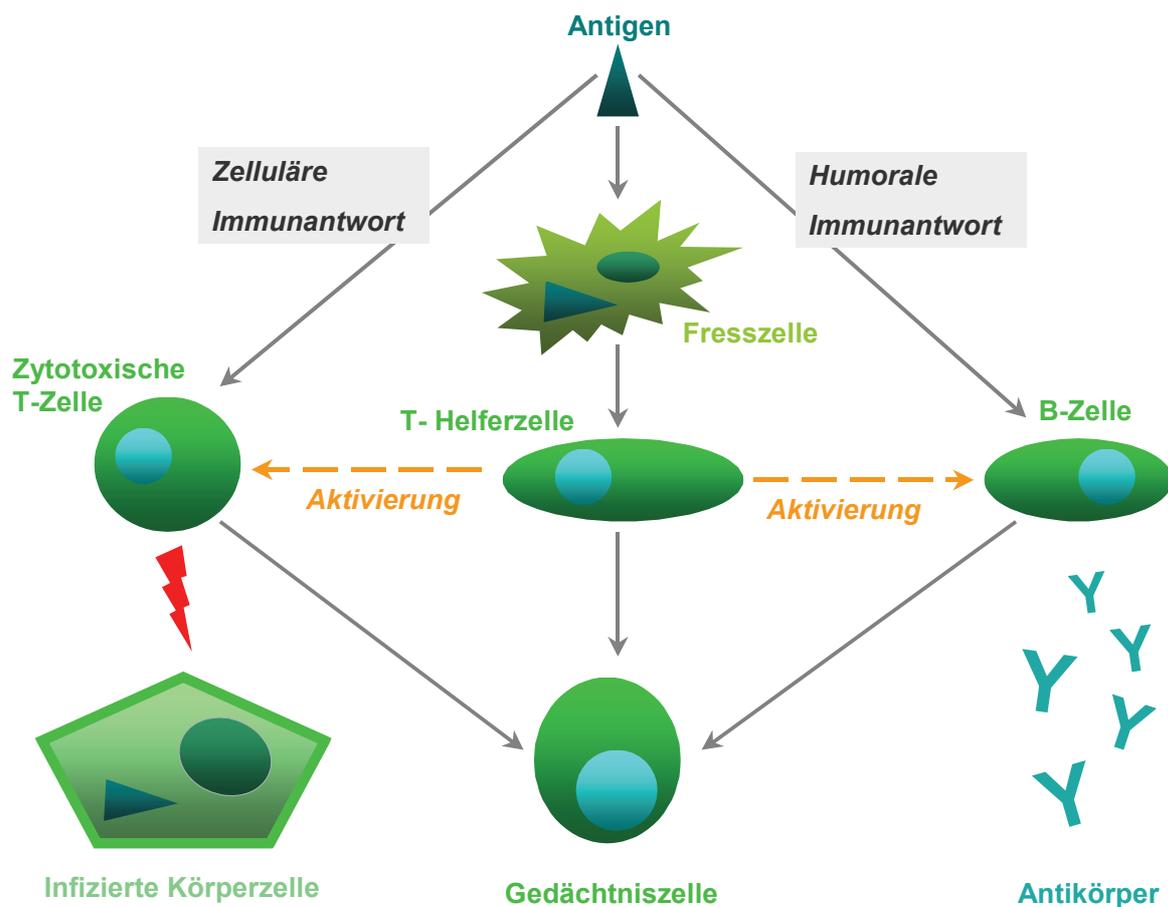


Abb. 1: Die zelluläre und humorale Immunantwort

1.6 Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity („ADCC“)

Für therapeutische Zwecke hergestellte monoklonale Antikörper (mAbs) können auf verschiedene Arten ihre Wirkung gegen Tumore entfalten. Sie können intrazelluläre Signalwege blockieren, die Angiogenese von Tumoren unterbinden, indem sie die Bindung von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) an seinen Rezeptor verhindern oder das Komplementsystem aktivieren und die Complement Dependent Cellular Cytotoxicity („CDC“) auslösen.

Der Hauptmechanismus, durch den Tumorzellen mit Hilfe von mAbs abgetötet werden, scheint aber die Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity („ADCC“) zu sein (39). Hierbei veranlassen antigenspezifische Antikörper Effektorzellen des angeborenen Immunsystems Tumorzellen zu töten (1). Versuche, die sich dieses Mechanismus

bedienen, wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Damit „ADCC“ ablaufen kann, werden drei Komponenten benötigt: erstens müssen Tumorzellen ein spezifisches Antigen auf ihrer Oberfläche tragen, zweitens muss ein Antikörper existieren, der genau an das Antigen der Tumorzellen bindet und drittens müssen Effektorzellen, die „Fc“-Rezeptoren tragen, in ausreichender Anzahl vorhanden sein. Der Antikörper bindet an das Antigen auf der Tumorzelloberfläche. Der „Fc“ (crystallizable fragment)-Teil des Antikörpers bindet an den „Fc“-Rezeptor der Effektorzellen. Dadurch werden die Effektorzellen aktiviert. Das Zusammenspiel der einzelnen Komponenten wird in Abbildung 2 verdeutlicht.

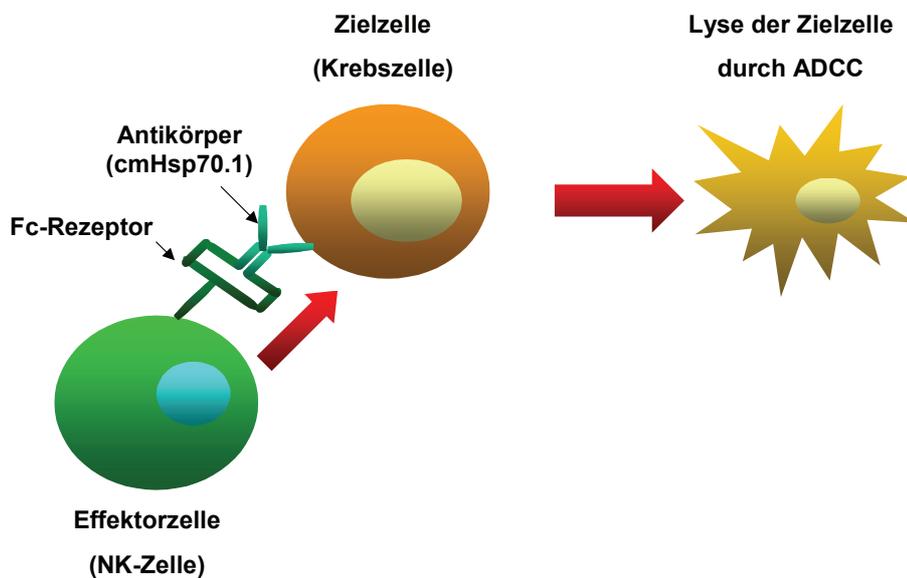


Abb. 2: Schematische Abbildung des „ADCC“

Die Effektorzellen, die „ADCC“ vermitteln, sind natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Monozyten, Makrophagen und polymorphkernige Leukozyten, v. a. Neutrophile und Granulozyten. Alle Effektorzellen müssen einen „Fc“-Rezeptor vom Typ II („Fc“ γ RIIc;CD32c, intermediate affinity) und/oder vom Typ IIIA („Fc“ γ RIIIa;CD16a, low affinity) tragen (22, 53, 51). NK-Zellen töten ihre Zielzellen v. a. durch die Freisetzung zytotoxischer Granula. Dem CD16a Rezeptor kommt hierbei eine sehr wichtige Rolle zu.

Makrophagen internalisieren die mit Antikörper bedeckten Tumorzellen. Sie sind in der Lage Stickstoffmonoxid (NO), reaktive Sauerstoffradikale und verschiedene Proteasen freizusetzen. Zusätzlich dazu können beide Effektorzelltypen Zielzellen über eine Interaktion von Fas/FasLigand (Fas/FasL) abtöten (9). Der exakte Mechanismus wie Neutrophile „ADCC“ vermitteln ist nicht ganz klar. Sie bedienen sich hierbei hauptsächlich des „Fc“ α RI (CD89) Rezeptors. Es ist vorstellbar, dass Neutrophile nach Interaktion mit den Tumorzellen aktivierte Caspasen abgeben (67, 90).

1.7 Problemstellung

Die Aufgabe der im praktischen Teil dieser Arbeit beschriebenen Versuche war es herauszufinden, ob sich der Antikörper cmHsp70.1 (Isotyp IgG1) gegen Hsp70 auf der Oberfläche von Tumorzellen eignet, „ADCC“ zu vermitteln und zu bewirken, dass Immunzellen die Tumorzellen erkennen und gezielt abtöten.

2 Material

2.1 Zelllinien und Mäuse

- Balb/c Mäuse: Mäusezucht Harlan Winkelmann, Borcheln, Deutschland
- CT26 murine Kolonkarzinomzellen: LGC Promochem GmbH/ATCC, Wesel, Deutschland
- Hybridomzellen (American Type Culture Collection, Manassas, VA20110, USA)

2.2 Verbrauchsmaterialien

- Objektträger: Super Frost Plus Menzel-Gläser (Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland)
- Petrischale: BD Falcon 351029 100 x 15 mm (Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA)
- Zellsieb: BD Falcon Cell Strainer 70 µm Nylon (Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA)
- 50 ml Röhrchen: Falcon 352070 konisches Röhrchen, Polypropylen (Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA)
- Deckgläschen für Neubauerzählkammer: Menzel GmbH & Co. KG (Braunschweig, Deutschland)
- Deckgläschen für Immunhistochemie: Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Zellkulturflasche 25 cm²: Corning Flask 3056 (Corning Inc., NY, USA)
- Zellkulturflasche 75 cm²: Corning Flask 430641 (Corning Inc., NY, USA)
- Zellkulturflasche 162 cm²: Corning Flask 3151 (Corning Inc., NY, USA)
- Zellkulturplatte: BD Falcon 353072 MICROTEST Zellkulturplatte, 96 Vertiefungen, Flachboden (Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA)
- Reagenzienreservoir: Reagent Reservoir Polystyrene 50 ml Corning Inc. Costar 4870 (Corning Inc., NY, USA)
- Fettstift: Dako Cytomation Pen (Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark)
- Paraffin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- Einbettkassetten (Dia Tec, Hallstadt, Deutschland)
- Pinsel (Faber-Castell, Stein, Deutschland)
- Spritzen: 1 ml Syringe Luer-Lok Tip (Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA)
- Kanülen: BD Microlance 3 0,4 mm x 19 mm (Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA)
- Kanülen: BD Microlance 3 0,7 mm x 30 mm (Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA)
- Schere: BC 211 W (Fine Science Tools FST, Heidelberg, Deutschland)
- Pinzette: 8 mm Pinzette (Fine Science Tools FST, Heidelberg, Deutschland)
- Teflonbeschichtete Zellkulturbeutel 15 ml: Vue Life FEP Sterile Cell Culture System (AfC, Gaithersburg, MD, USA)
- Immunoplatte für „ELISA“: NUNC-Immuno Plate 442404 (NUNC A/S, Roskilde, Dänemark)
- 5 ml Reaktionsgefäß: BD Falcon 352058, Rundbodenröhrchen, Polystyrol (Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA)
- 14 ml Reaktionsgefäß: BD Falcon 352057, Rundbodenröhrchen, Polystyrol (Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA)
- 15 ml Reaktionsgefäß: Zentrifugenröhrchen (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz)
- 1 ml serologische Pipette: BD Falcon 357520 (Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA)
- 5 ml serologische Pipette: BD Falcon 357543 (Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA)
- 10 ml serologische Pipette: BD Falcon 357551 (Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA)
- 25 ml serologische Pipette: BD Falcon 357525 (Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA)
- 50 ml serologische Pipette: BD Falcon 356550 (Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA)
- 2 ml Reaktionsgefäß: Safe-Lock Tubes (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

- Pipettenspitzen: ep T.I.P.S. Standard 20-300 μl (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Pipettenspitzen: ep T.I.P.S. Standard 0,5-20 μl (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Pipettenspitzen 1000 μl (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland)
- Pipettenspitzen 200 μl (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland)
- Untersuchungshandschuhe: Powder-Free Sempercare edition (Semperit Technische Produkte Ges.m.b.H., Wien, Österreich)
- Einschlussmittel für die mikroskopische Technik: Eukitt (O. Kindler GmbH & Co., Freiburg, Deutschland)
- Ständer für 2 ml Eppendorf-“Cups“: Reaktionsgefäßständer Micro Test Tube Rack (Narang Medical Limited, New Delhi, India)

2.3 Geräte

- Heizplatte MR 3001 K (Heidolph, Kelheim, Deutschland)
- Sterilbank Hera Safe (Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland)
- Vortex-Schüttler: Vortexgenie 2 (Scientific Industries Inc., NY, USA)
- Waage Ca Kern EW (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland)
- Magnetrührer MR 3001 K (Heidolph, Kelheim, Deutschland)
- Heizschrank Heraeus T 6060 (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland)
- pH-Meter: Mettler Toledo MP 220 pH Meter (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Zentrifuge: Heraeus Multifuge 3 SR+ Centrifuge (Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland)
- Zentrifuge: Heraeus Biofuge pico (Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland)
- Pipettierhilfe: Stripettor (Costar Corning Inc., NY, USA)
- Pipette: Corning Lambda 0,5-10 μl Pipette (Corning Inc., NY, USA)
- Pipette: Corning Lambda 10-100 μl Pipette (Corning Inc., NY, USA)
- Pipette: Corning Lambda 20-200 μl Pipette (Corning Inc., NY, USA)
- Pipette: Corning Lambda 100-1000 μl Pipette (Corning Inc., NY, USA)
- Multikanalpipette (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

- Vakuumpumpe (neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- Eismaschine Scotsman AF 100 (Frimont/Scotsman, Mailand, Italien)
- Kühlschrank Premium frost-free (Liebherr, Biberach, Deutschland)
- ELISA-Reader: Bioreader-3000 PRO (Biosys, Karben, Deutschland)
- Drehvorrichtung: Cell roll Rollersystem (IBS Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland)
- IVC Mäusekäfige (individually vented cages): (Tecni plast, Hohenpeißenberg, Deutschland)
- Einbettstation Histocentre 2 mit Kühlplatte (Shandon Southern Products Ltd., Astmoor, England)
- Mikrotom (Microm HM 400, Walldorf, Deutschland)
- Wasserbad
- Feuchte Kammer (Tupper-Werke GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland)
- Durchflusszytometer „FACS“ Calibur TM (Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA)
- Software CellQuest Pro TM Version 4.2 (Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA)
- Apple Macintosh Computer (Apple Inc., Cupertino, Kalifornien, USA)
- Neubauerzählkammer Neubauer improved (Superior, Marienfeld, Deutschland)
- Inverses Durchlichtmikroskop Axiovert 25 (Zeiss, Jena, Deutschland)
- Brutschrank Heraeus BBD 6220 (Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland)
- Schüttelinkubator IKA KS 260 basic (Mediatech IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland)
- Gewebeverarbeitungssystem Shandon 2LE (Shandon Southern Products Ltd., Astmoor, England)

2.4 Stammlösungen, Puffer, Medien

Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland
EtOH absolut	Merck, Darmstadt, Deutschland
96%iges EtOH	Merck, Darmstadt, Deutschland

70%iges EtOH	Merck, Darmstadt, Deutschland
50%iges EtOH	Merck, Darmstadt, Deutschland
30%iges EtOH	Merck, Darmstadt, Deutschland
Target Retrieval Solution (pH 6,1)	DAKO A/S, Kopenhagen, Dänemark
H ₂ O millipore	Milli-Q Reinstwasseranlage, Millipore Corp., Billerica, MA., USA
Sodium Azid	Tris (hydromethyl)-aminomethan (Merck, Darmstadt, Deutschland) + H ₂ O millipore + HCl 37 % (Merck, Darmstadt, Deutschland) + BRI J 30 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) + sodium azid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) + Wasserstoffperoxid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) + H ₂ O ₂
Tris-Puffer 10 x	Tris (hydromethyl)-aminomethan (Merck, Darmstadt, Deutschland) + H ₂ O millipore + HCl 37 % (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Auto-Puffer 10 x	Tris (hydromethyl)-aminomethan (Merck, Darmstadt, Deutschland) + H ₂ O millipore + HCl 37 % (Merck, Darmstadt, Deutschland) + BRI J 30 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Propodiumiodid (PI)	Merck, Darmstadt, Deutschland
PKH67 Farbstoff	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Diluent C	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
„FACS“-Flow	Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA
„FACS“-Clean	Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA
„FACS“-Rinse	Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA

Coatingpuffer	1,06 g Na ₂ CO ₃ + 840 mg NaHCO ₃ (Merck, Darmstadt, Deutschland) ad 100 ml H ₂ O millipore
Waschpuffer	PBS mit 0,05 % Tween 20 (Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland)
Blockingpuffer	PBS mit 5 % Milchpulver (Töpfer Allgäu GmbH, Dietmannsried, Deutschland)
Farbreagenz	1:1 Mischung aus Color Reagent A stabilized Peroxide Solution + Color Reagent B stabilized chromogen Solution (R&D Systems, Mineapolis, USA)
2 N H ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
4%iges Formalin	PBS + Formaldehyd 37 % Solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Trypsin	Trypsin/EDTA 0,05/0,02 % in PBS (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
PBS	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
FCS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Deutschland
„FACS“-Puffer	PBS mit 10 % FCS
7%ige Essigsäure	100%ige Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) + H ₂ O millipore
RPMI 1640-Medium	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Histopaque 1083	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Interleukin 2	Chiron BV, Amsterdam, Niederlande
Trypanblau 0,1%ige Lösung	Trypanblaulösung + PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

CT26 Medium	500 ml RPMI 1640 Medium (Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) + 25 ml FCS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Deutschland) + 5 ml L-Glutamin (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) + 5 ml Penicillin/Streptomycin (Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) + nicht essentielle Aminosäuren (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Deutschland) + 500 µl β-Merkapto-Ethanol (Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
10%iges BZM-Medium	500 ml RPMI 1640 Medium (Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) + 50 ml FCS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Deutschland) + 5 ml Penicillin/Streptomycin (Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) + 5 ml L-Glutamin (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) + 5 ml Na-Pyruvat (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
TKD	Pulver mit Formel $C_{67}H_{110}N_{20}O_{23}$ (Bachem AG, Bubendorf, Schweiz) + H_2O millipore
DAB-Gebrauchslösung	DAKO A/S, Kopenhagen, Dänemark
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Leitungswasser	
BSA 10 % in PBS	Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe, Deutschland

2.5 Antikörper

2.5.1 Antikörper für die Durchflusszytometrie

B220-PE	Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA
CD11c-PE	Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA
CD11b-PE	Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA
CD205-FITC	Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA
CD25-PE	Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA
CD3-PE	Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA
CD4-FITC	Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA
CD49b-PE	Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA
CD8-APC	Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA
CD8-PE	Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA
cmHsp70.1-FITC	multimmune GmbH, München, Deutschland
Gr1-FITC	Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA
Ha IgG 1-PE	Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA
Isotyp IgG 1 FITC	BENEX Limited, Shannon, Ireland
Ra IgG 2a-APC	Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA
Ra IgG 2a-FITC	Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA
Ra IgG 2a-PE	Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA
Ra IgM-PE	Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA

2.5.2 Antikörper für den „ELISA“

Capture antibody	Goat anti-Maus IgG 1 mg/ml in PBS (Sigma-Aldrich Inc. St. Louis, MO, USA)
Detection antibody	Anti-Maus IgG-POD (DAKO A/S, Kopenhagen, Dänemark)

2.5.3 Antikörper für die Immunhistochemie

Anti-CD3 (OKT-3)	Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA
Anti-CD56	Abcam, Cambridge, UK
Anti-CD94 (HP-3B1)	Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA
Hsp70 7F4	Helmholtz Zentrum, München, Deutschland
cmHsp70.1	Aus Hybridomüberstand
cmHsp70.2	Multimmune Gmbh, München, Deutschland
Isotyp Maus	Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA
Isotyp Ratte	Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA
Rabbit-anti-Maus POD	DAKO A/S, Kopenhagen, Dänemark
Rabbit-anti-Rat	DAKO A/S, Kopenhagen, Dänemark

3 Methoden

3.1 „Fluorescence Activated Cell Sorting“ („FACS“)-Allgemeines

3.1.1 Theoretischer Hintergrund der Immunfluoreszenzanalyse mit Hilfe der Durchflusszytometrie

3.1.2 Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz

Die Durchflusszytometrie ist eine in der modernen Forschung sehr häufig angewandte Methode. Sie ermöglicht die Analyse bestimmter Eigenschaften von Zellen und auch Zellbestandteilen in Suspension. Der Grundstein für die Methode, wie sie heute existiert, wurde bereits 1934 von Moldavan gelegt. Er entwickelte einen Apparat, mit dem er Zellen automatisch zählen konnte. Dieser bestand aus einer Glaskapillare, durch die Erythrozyten und farbmarkierte Hefezellen flossen, und einem Mikroskop, dessen Okular mit einer Photoelektrode gekoppelt war. So konnte er jede einzelne passierende Zelle registrieren (80). Heute ist es möglich, mit der Durchflusszytometrie nicht nur Anzahl und Größe von Zellen zu bestimmen, sondern auch physikalische Eigenschaften wie z. B. Absorption, Streuung und Reflexion von Licht und elektrische und chemische Eigenschaften wie Färbbarkeit, Immunreaktionen und Enzymaktivität. Diese Merkmale können einzeln und in Kombination gemessen werden. Auf diese Weise können durch die Auswertung der Messdaten zelluläre Parameter wie Desoxyribonukleinsäure-Gehalt (DNA-Gehalt), Zelloberflächenproteine, Rezeptorstatus und Membranintegrität analysiert werden (52, 80). Um die Zellparameter bestimmen zu können, die für bestimmte Fragestellungen interessieren, muss man die Zellen meist mit geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorochromen) markieren (80).

Wenn man diese Fluorochrome mit Licht eines bestimmten Wellenlängenbereichs bestrahlt, absorbieren sie Energie aus diesem Licht. Jeder Stoff besitzt sein eigenes spezifisches Absorptionsmaximum. Durch die Aufnahme von Lichtenergie werden Elektronen aus ihrem Grundzustand in einen Anregungszustand angehoben. Die gespeicherte Energie wird von den Elektronen wieder abgegeben, und sie gehen wieder

in ihren ursprünglichen Zustand über. Diese Energieabgabe geschieht zum einen durch Bewegung und freiwerdende Wärme und zum anderen durch Emission von Photonen mit höherer Wellenlänge, als die des anregenden Lichts. Das von den Fluorochromen emittierte Licht hat somit einen geringeren Energiegehalt, als das Licht, mit dem sie angeregt wurden (66). Bei der Markierung von Zellen für die Durchflusszytometrie können entweder direkt Fluoreszenz-markierte oder unmarkierte Antikörper verwendet werden, die gegen Antigene wie z. B. Zelloberflächenrezeptoren, Hormonrezeptoren, aber auch Glycolipide gerichtet sind. Durch diese Methode ist es möglich, unterschiedliche Zellpopulationen in einer heterogenen Suspension gleichzeitig zu charakterisieren. Bei der Durchflusszytometrie können mehrere Fluoreszenzfarbstoffe aufgrund ihrer unterschiedlichen Absorptionsspektren kombiniert werden. Ein Antikörper ist spezifisch für ein bestimmtes Antigen auf der Oberfläche einer Zelle. Nach Permeabilisierung der Zellen ist es möglich, intrazellulär lokalisierte Antigene über Antikörper zu detektieren. Da die Antikörper für unterschiedliche Oberflächenstrukturen mit unterschiedlichen Farbstoffen gekoppelt werden, können gleichzeitig auf ein und derselben Zelle vorhandene, verschiedene Antigene detektiert werden und durch Analyse dieser Eigenschaften der Zelle kann festgestellt werden, um welchen Zellsubtyp es sich handelt (52, 66).

Es gibt zwei Arten der Markierung von Zellen mit Antikörpern, die direkte und die indirekte Methode. Bei der direkten Methode ist bereits der Primärantikörper mit dem Fluoreszenzfarbstoff versehen. Bei der indirekten Färbung bindet ein unkonjugierter Antikörper an das Antigen auf der Zelloberfläche. An diesen Primärantikörper bindet dann der mit dem Farbstoff gekoppelte Sekundärantikörper, der gegen die Spezies des Tieres gerichtet sein muss, aus dem der Primärantikörper gewonnen wurde.

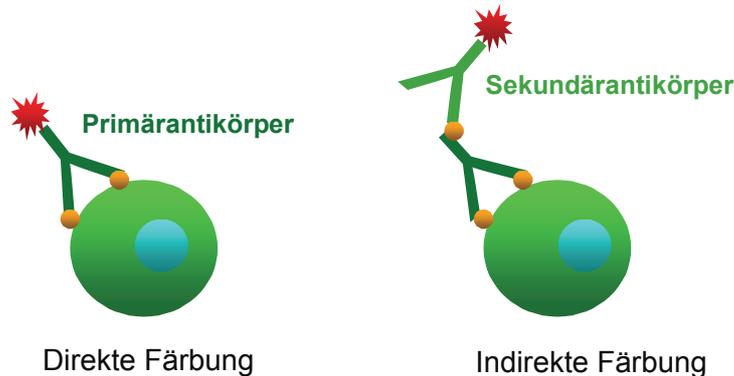


Abb. 3: Markierung von Zellen mit Primär- und Sekundärantikörpern

Welche Methode verwendet wird, hängt z. B. davon ab, welche fluoreszenzmarkierten Antikörper zur Verfügung stehen.

3.1.3 Das Durchflusszytometer

3.1.3.1 Allgemeiner Aufbau und Funktion

Bei einem Durchflusszytometer handelt es sich um einen sehr komplexen Apparat. Im Folgenden sollen die wichtigsten Bestandteile und ihre Funktionen aufgeführt werden. In Abbildung 4 wird schematisch der Aufbau eines laserbasierten Durchflusszytometers dargestellt, wie es auch im praktischen Teil dieser Arbeit verwendet wurde. Das spezielle Flüssigkeitssystem (nicht abgebildet) des Durchflusszytometers besteht aus einer Zuleitung, die mit Trägerflüssigkeit gefüllt ist, und einer Kanüle zur Aufnahme der Zellen aus dem Probenröhrchen. Durch diese Kanüle wird die Zellsuspension aus dem Probenröhrchen gesaugt, und jede einzelne Zelle gelangt zu einem Analysepunkt in der Messküvette. Hier passiert sie einen Laserstrahl, der im rechten Winkel auf die Zelle gerichtet ist. Diesem Vorgang liegt das Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung zugrunde: Die Trägerflüssigkeit fließt laminar durch die Küvette. Von diesem Strom wird die Zellsuspension nach Verlassen der Küvette erfasst. Der Strom der Zellsuspension verengt sich auf das Zentrum der Küvette und wird von wenigen cm/sec auf ca. 7 m/sec

beschleunigt. So wird gewährleistet, dass wirklich jede Zelle einzeln den Analysepunkt an einer definierten Stelle passiert (78), auf die das Laserlicht fokussiert wird.

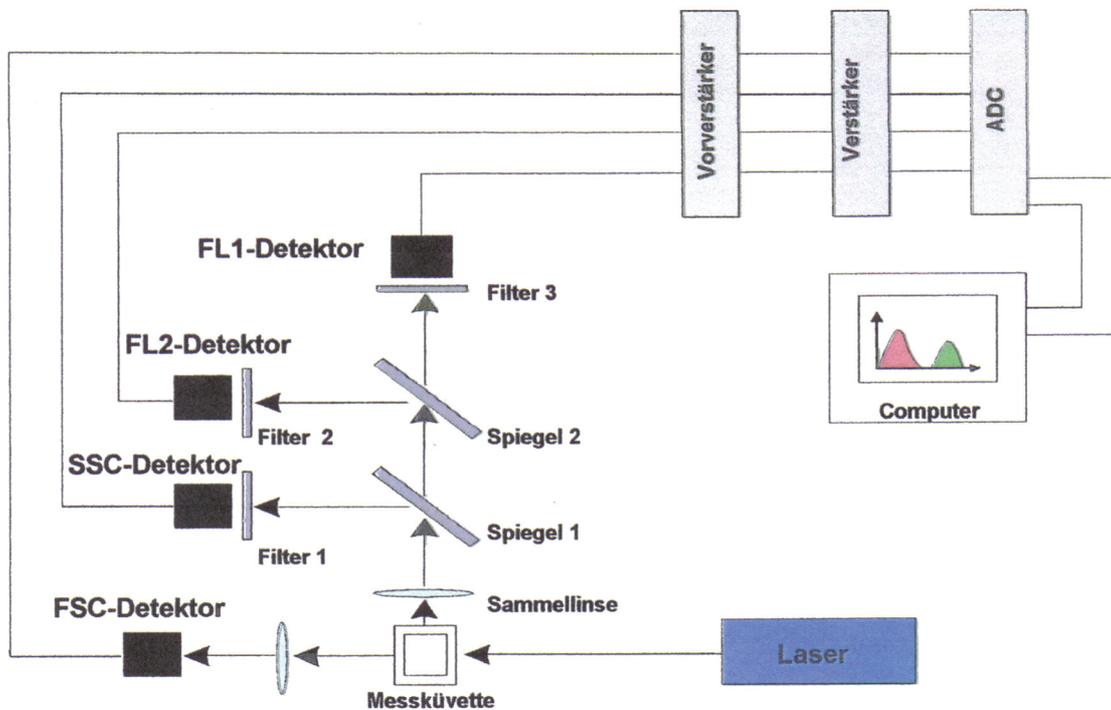


Abb. 4 Schematischer Aufbau eines laserbasierten Durchflusszytometers (Diese Abbildung wurde freundlicher Weise von Frau Christine Schmidbauer zur Verfügung gestellt.)

Wenn der Laser auf die Zelle trifft, entsteht durch Lichtbeugung eine Vorwärtsstreuung (forward scatter, „FSC“) und durch Lichtbrechung und Reflexion eine Seitwärtsstreuung (side scatter, „SSC“) des Laserlichts. Der „SSC“ wird im 90° Winkel zum einfallenden Laserlicht gemessen und ist ein Maß für die Granularität der Zelle. Der „FSC“ ist proportional zur Zelloberfläche und sagt somit etwas über die Größe der Zelle aus. Er wird im 0°-10° Winkel des einfallenden Lichts gemessen.

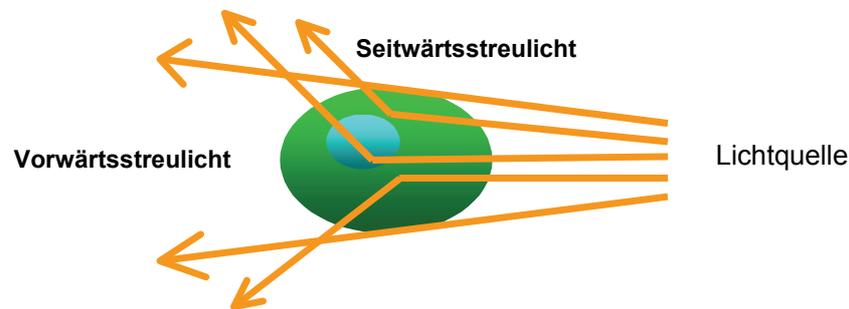


Abb. 5: Vorwärts- und Seitwärtsstreuung des auf eine Zelle treffenden Laserlichts

Im vorangegangenen Kapitel wurde ausführlich beschrieben, wie und warum Zellen für die Durchflusszytometrie mit Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt werden. Die Wellenlänge der Absorptionsmaxima der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sollte möglichst gleich mit der Wellenlänge des anregenden Lichtes sein. Nur so kann eine optimale Anregung der Fluorochrome gewährleistet werden (66). Am meisten werden die Farbstoffe Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Propidiumiodid (PI) verwendet. Auch der in den „FACS“-Analysen verwendete Antikörper cmHsp70.1 ist FITC markiert und wird als Fluoreszenz 2 gemessen. Die beiden Farbstoffe haben ein Exzitationsmaximum von 495 nm. Da die meisten Durchflusszytometer mit einem Argon-Ionen-Laser mit 488 nm ausgestattet sind, lassen sich diese beiden Fluorochrome besonders gut anregen (76). Einige Durchflusszytometer sind zusätzlich mit einem anderen Laser ausgestattet, der z. B. eine Anregungswellenlänge von 635 nm besitzt. Das ermöglicht, dass man auch Fluorochrome mit einem Absorptionsmaximum in diesem Wellenlängenbereich für die Färbung von Zellen verwenden kann.

„SSC“, „FSC“ und Fluoreszenzlicht können getrennt von einander vom Durchflusszytometer gemessen werden. Dies wird durch die strikte Trennung der drei Parameter durch Lichtsammeloptik, Blenden, Strahlteiler, dichroitische Filter, Bandpass- und Kantenfilter ermöglicht. Die Fluoreszenz wird zusätzlich noch in einzelne Farbbereiche aufgesplittet (78). Es gibt zwei verschiedene Arten von Detektoren im Durchflusszytometer, die die ankommenden Lichtsignale auffangen. Die Photodiode ist

wenig lichtempfindlich und dient der Erfassung starker Signale wie z. B. dem Vorwärtsstreulicht. Die „Photomultiplier Tubes“ („PMTs“) sind wesentlich lichtempfindlicher als die Photodiode und können dadurch schwache Signale wie „SSC“ und Fluoreszenz 1-4 (FL 1-4) registrieren. Die von den Detektoren wahrgenommenen Signale müssen in äquivalente elektronische Signale (Spannungspulse) umgeschrieben und verstärkt werden. Dies geschieht mit Hilfe der Detektoren selbst und verschiedener Verstärker („Pre-amplifier“, „Pulse Amplifier“). Dann werden diese elektronischen Signale von einem Analog-Digital-Wandler in digitale Daten verwandelt. Hierbei wird die in Volt registrierte Signalintensität für jede gemessene Eigenschaft in eine entsprechende Kanalzahl (meist von 0 bis 1023) überschrieben. Diese wird dann zur Auswertung am Computer benutzt (78).

3.1.3.2 „FACS“ Calibur TM und CellQuest TM

Für die Versuche, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurde das „FACS“ Calibur TM-Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson TM (BD) verwendet. Es hat einen luftgekühlten Argon-Ionen-Laser mit der Anregungswellenlänge 488 nm. Eine Laserdiode mit der Wellenlänge von 635 nm ist ebenfalls vorhanden und kann optional für Messungen eingesetzt werden. Das „FACS“ Calibur kann 6 Parameter gleichzeitig auf einer Zelle messen. Bei den Parametern handelt es sich um „FSC“, „SSC“, FL1, FL2, FL3 und FL4. Das zu diesem Durchflusszytometer gehörende Computerprogramm zur Messung und Analyse von Ein- und Mehrfarbenproben ist CellQuest TM. Zu dessen Ausführung wird ein Apple Macintosh Computer verwendet.



Abb. 6: Das „FACS“ Calibur TM-Durchflusszytometer

3.1.3.3 Vorbereitung und Optimierung des Durchflusszytometers für die Messung

Datenaufnahmedokument:

Bevor die Probenröhrchen im „FACS“ Calibur TM gemessen werden können, muss mit Hilfe von CellQuest TM eine für den Versuch geeignete Messmaske erstellt werden. So wird sichergestellt, dass alle Parameter auf die beim durchgeführten Versuch Wert gelegt wird, nicht nur vom „FACS“ Calibur TM registriert werden, sondern diese auch an den Computer (PC) weitergeleitet und von diesem übersichtlich und für die Auswertung hilfreich dargestellt werden. Die Messmaske wird nach ihrer Erstellung gespeichert und für jeden folgenden gleich aufgebauten Versuch wieder verwendet.

Für den praktischen Teil dieser Arbeit werden drei verschiedene Messmasken benötigt. Eine für die Färbung der Tumorzellen mit cmHsp70.1-FITC, eine für die Färbung der Milzzellen und eine andere für die Messung des „ADCC“-Versuchs. Diese drei Masken sollen hier nun nacheinander beschrieben werden.

Bei der Messung von Hsp70 auf der Zelloberfläche werden für die Zellen, die mit Isotyp IgG1-FITC (Immunglobulin G1) angefärbt werden und für die Zellen, die mit cmHsp70.1-FITC angefärbt werden, je 4 „Dot Plots“ angelegt (siehe Abb. 7).

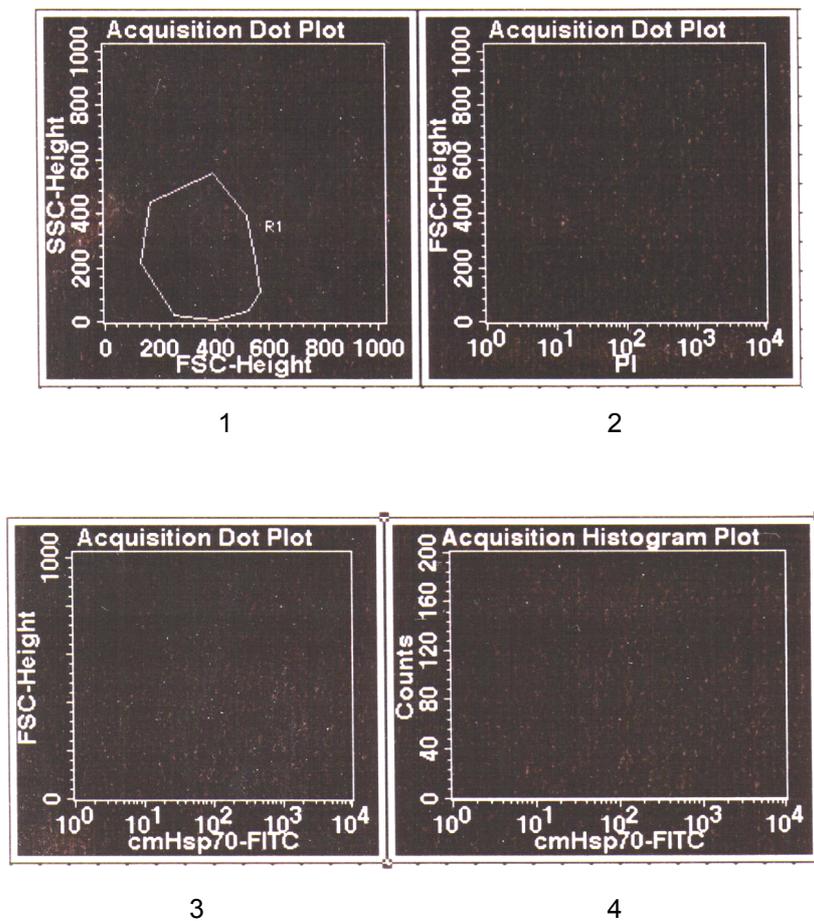


Abb. 7: Messmaske für die Färbung von Tumorzellen mit Isotyp IgG1-FITC und cmHsp70.1-FITC

In „Dot Plot“ Nr. 1 werden die Zellen nach ihrer Größe („FSC-Height“ X-Achse) und ihrer Granularität („SSC-Height“ Y-Achse) abgebildet. Dies ermöglicht auch eine Unterscheidung vitaler Zellen von Zelldebris. Um diese wird das „Gate“ R1 gelegt. Diese Zellen aus R1 werden dann in dem „Dot Plot“ Nr. 2 abgebildet. Hier wird ihre Größe auf der Y-Achse aufgetragen und auf der X-Achse wird gemessen, ob die Zellen Propidiumiodid (PI) enthalten oder nicht. So lässt sich zwischen vitalen Tumorzellen (PI negativ) und toten Tumorzellen (PI positiv) unterscheiden. Um die lebenden Tumorzellen wird nun ein zweites „Gate“ R2 gelegt. Die Schnittmenge der Zellen aus R1 und R2 wird in den verbleibenden 2 „Dot Plots“ aufgetragen. Hier wird auf der X-Achse gezeigt, wieviele Zellen Isotyp IgG1-FITC oder cmHsp70.1-FITC auf der Oberfläche tragen. Auf der Y-Achse wird einmal die Größe und einmal die Anzahl der Zellen aufgetragen.

Für die Färbung der Milzzellen mit verschiedenen Antikörpern werden 2 „Dot Plots“ angelegt (siehe Abb. 8).

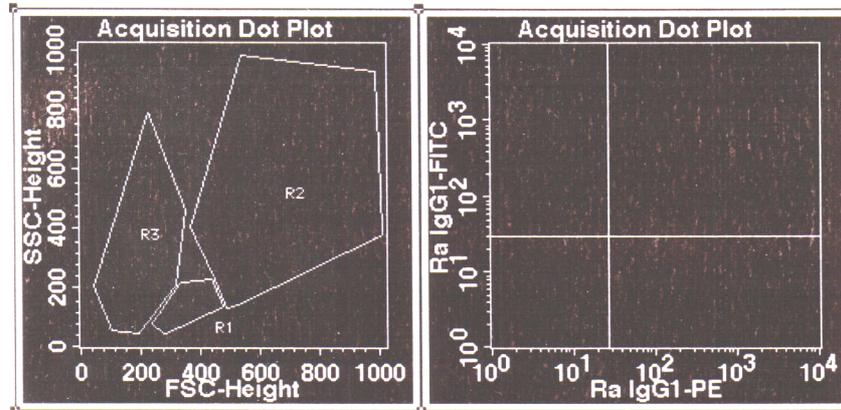


Abb. 8: Messmaske für die Färbung der Milzzellen mit verschiedenen Antikörpern

Auch hier werden im „Dot Plot“ Nr. 1 die Zellen nach ihrer Größe und Granularität aufgetragen. Dies erlaubt die Unterscheidung von drei Zellpopulationen, um die jeweils ein „Gate“ R1-R3 gelegt wird. Aufgrund der charakteristischen Eigenschaften von unterschiedlichen Zellsubpopulationen hinsichtlich ihrer Granularität und Größe können T- und NK-Zellen dem „Gate“ R1 zugeordnet werden. In R2 befinden sich überwiegend Monozyten und Makrophagen und in R3 Zelldebris und zugrunde gegangene Zellen. Im „Dot Plot“ Nr. 2 werden die Fluoreszenzen der Antikörper, mit denen die Zellen im jeweiligen Ansatz angefärbt sind, gegeneinander aufgetragen (hier im Bild die Isotypkontrolle). So kann der Anteil der Zellen, die beide (rechter oberer Quadrant), keines (linker unterer Quadrant) oder nur eines der Antigene (linker oberer und rechter unterer Quadrant), gegen die sich die Antikörper richteten, auf ihrer Oberfläche tragen, ermittelt werden.

Bei der Bestimmung der Daten für die „ADCC“-Versuche benötigt man 4 separate „Dot Plot“ Analysen (siehe Abb. 9).

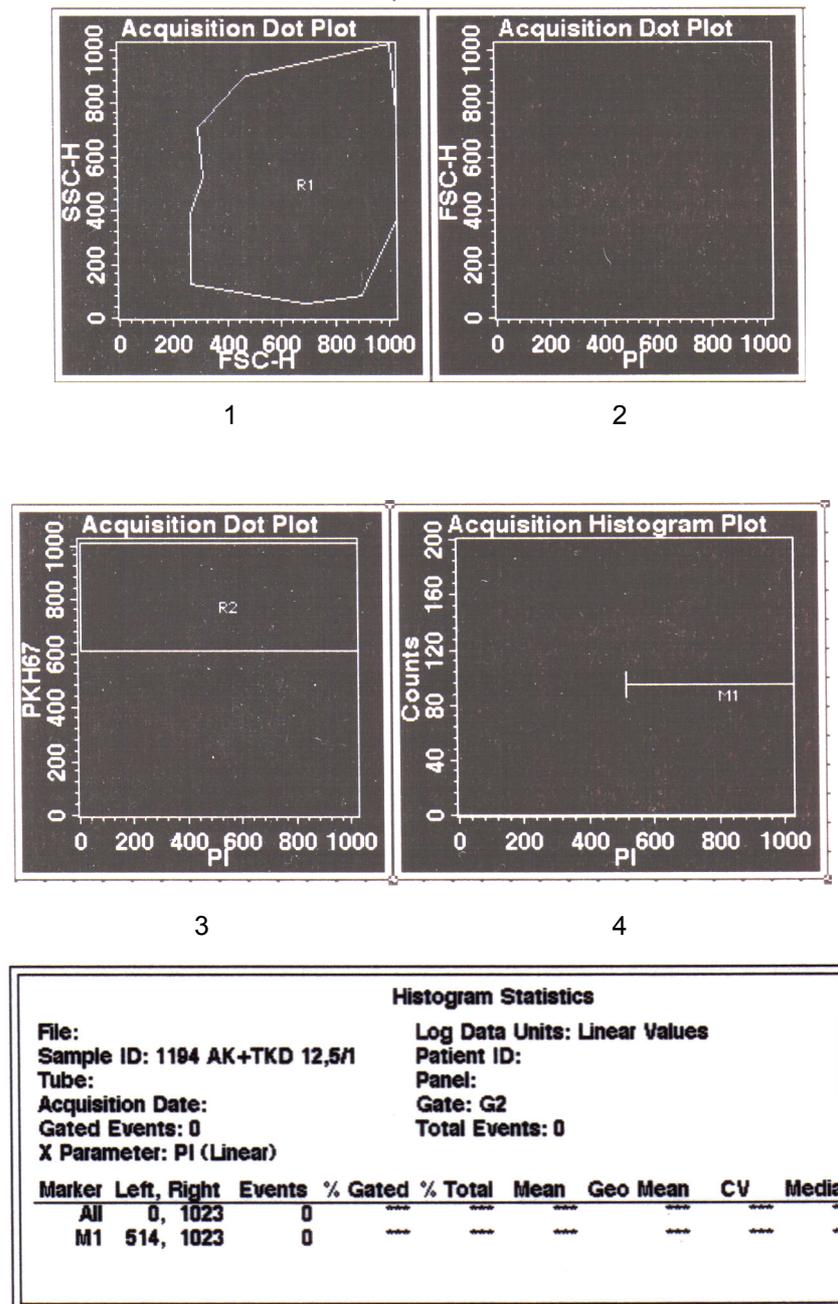


Abb. 9: Messmaske für den „ADCC“-Versuch

Der erste „Dot Plot“ zeigt, wie bei den vorausgegangenen Versuchen auch, die Auftrennung der Zellen nach Größe und Granularität. Um die Zellen, die eine bestimmte Größe und Granularität besitzen, und somit, mit hoher Wahrscheinlichkeit, Tumorzellen sind, wird das „Gate“ R1 gelegt. So kann eine grobe Trennung der Tumorzellen aus der Fülle von Milzzellen stattfinden. Der „Dot Plot“ Nr. 2 zeigt an, wie viele lebendige und tote Zellen sich in R1 befinden (Y-Achse „FSC“ und X-Achse PI). Im „Dot Plot“ Nr. 3

werden die Zellen aus R1 in PKH67 positive Zellen und in PKH67 negative Zellen aufgeteilt und untersucht, wie viele Zellen tot und wie viele vital sind (Y-Achse PKH67, X-Achse PI). Hier wird ein neues „Gate“ R2 um alle PKH67 positiven Zellen gelegt. Der letzte „Dot Plot“ (Nr. 4) dient dazu, die Zellen aus R2, also die PKH67 positiven Zellen, in zwei Zellfraktionen aufzuteilen. Hier wird unterschieden zwischen den lebenden und den toten PKH67 positiven Zellen. Der Marker M1 wird so gewählt, dass unter ihm die toten Zellen liegen. Zusätzlich lässt man sich bei dieser Messung eine Histogrammstatistik anzeigen, die Informationen darüber gibt, wie viele Prozent der Zellen sich in R1, R2 und unter M1 befanden.

Geräteinstellungen (Instrument Settings):

Da die einzelnen Messungen im Rahmen einer Versuchsreihe miteinander vergleichbar sein müssen, muss das Durchflusszytometer vor Beginn der Messungen entsprechend kalibriert werden. Diese Einstellungen werden dann gespeichert und vor jeder neuen Messung aufgerufen. Um wirklich sicher zu gehen, dass die Messungen unter den gleichen Bedingungen ablaufen, werden die Einstellungen für jeden neuen Tag mit einem Kontrollröhrchen überprüft und eventuelle Abweichungen ausgeglichen.

Die Zellpopulation, auf die bei den Versuchen besonderes Augenmerk gelegt wird, muss deutlich in den „Dot Plots“ zu sehen sein. Dementsprechend werden die „FSC“-Verstärkung und die „SSC“-Spannung an den Detektoren und Verstärkern des „FACS“ Calibur TM so gewählt, dass die Zellpopulation gemäß ihrer Streulichteigenschaften im Diagramm auftaucht. Das einfallende Lichtsignal wird also durch die vorgenommenen Einstellungen so verändert, dass sämtliche Zellen einer Population, entsprechend ihrer Größen- und Granularitätsverhältnisse, im „FSC“-“SSC“-“Dot Plot“ richtig registriert und abgebildet werden. In der folgenden Abbildung werden die Geräteinstellungen der drei verschiedenen „FACS“-Messungen gezeigt (siehe Abb. 10).

Param	Detector	Voltage	Amp Gain	Mode
P1	FSC	E-1	9.46	Lin
P2	SSC	401	1.09	Lin
P3	FL1	397	1.00	Log
P4	FL2	436	1.00	Log
P5	FL3	485	1.00	Log
P6	FL2-A		1.00	Lin
P7	FL2-W		1.00	Lin
P7	FL4	669		Log

Four Color DDM Param: FL2

1

Param	Detector	Voltage	Amp Gain	Mode
P1	FSC	E-1	9.60	Lin
P2	SSC	401	1.09	Lin
P3	FL1	340	1.00	Log
P4	FL2	436	1.00	Log
P5	FL3	472	1.00	Log
P6	FL2-A		1.00	Lin
P7	FL2-W		1.00	Lin
P7	FL4	669		Log

Four Color DDM Param: FL2

2

Param	Detector	Voltage	Amp Gain	Mode
P1	FSC	E00	1.96	Lin
P2	SSC	458	1.65	Lin
P3	FL1	562	1.00	Log
P4	FL2	661	1.00	Log
P5	FL3	550	1.00	Log
P6	FL2-A		1.00	Lin
P7	FL2-W		1.00	Lin
P7	FL4	720		Log

Four Color DDM Param: FL2

3

Abb. 10: 1:Geräteeinstellung für die Färbung der Tumorzellen mit cmHsp70.1-FITC und Isotyp IgG1-FITC
 2: Geräteeinstellung für die Färbung der Milzzellen mit verschiedenen Antikörpern
 3: Geräteeinstellung für den „ADCC“-Versuch

Ein anderer Parameter, der vor den Messungen genau festgelegt werden muss, ist der Schwellenwert („Threshold“). Durch ihn wird der kleinste noch auf den Computer übertragene Wert von „FSC“ festgelegt. Mit anderen Worten, durch den „FSC“-Schwellenwert kann festgelegt werden, welche Zellen von der Untersuchung ausgeschlossen werden, da ihre Vorwärtsstreustrahlung zu niedrig ist. Da der „FSC“ das Maß für die Größe der Zellen ist, kann so Zelldebris, der für den Versuch keine relevante Rolle spielt, ausgeschlossen werden. Auf diese Weise wird gewährleistet, dass durch die Berücksichtigung der Schwellenwerte, Zellfragmente oder bestimmte Populationen, die bei der Messung vernachlässigt werden können, von vornherein von

der Registrierung und Analyse ausgeschlossen werden. In Abbildung 11 sind die Einstellungen der Schwellenwerte für die verschiedenen Messungen dargestellt.

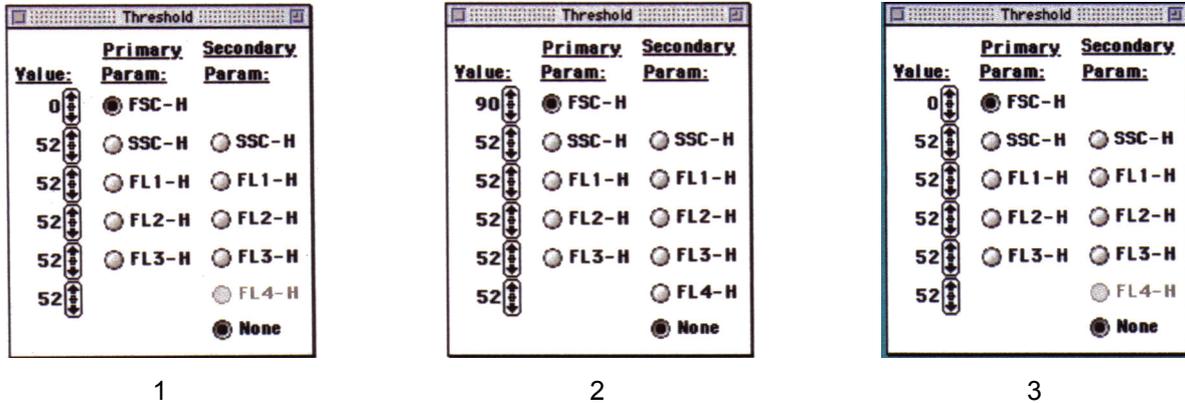


Abb. 11: 1: Einstellungen der Schwellenwerte für die Färbung der Tumorzellen mit cmHsp70.1-FITC und Isotyp IgG1FITC
 2: Einstellungen der Schwellenwerte für die Färbung der Milzzellen mit verschiedenen Antikörpern
 3: Einstellungen der Schwellenwerte für den „ADCC“-Versuch

Wenn für die Durchflusszytometrie Zellen mit verschiedenen Fluorochromen angefärbt sind, kann es passieren, dass sich die verschiedenen Emissionsspektren der Farbstoffe überlappen. Dies könnte zu falsch positiven oder zu falsch negativen Befunden führen, weil dadurch ein bestimmter Detektor nicht mehr klar einem bestimmten Fluorochrom zugeordnet und somit ein Signal von zwei Detektoren wahrgenommen werden kann. Um diesen Vorgang auszuschließen, müssen die für einen bestimmten Detektor ungewollten Signale von der Gesamtheit des von diesem Detektor registrierten Signalen subtrahiert werden. Es bestehen folgende Kompensationsmöglichkeiten: FL1-% FL2 (hier wird das überlappende FL2 Signal, das von FL1-Detektor wahrgenommen wurde subtrahiert) FL2-% FL1, FL3-% FL2, FL2-%FL3, FL4-% FL3, FL3-% FL4. Die folgende Darstellung zeigt die Einstellungen der Kompensation bei den drei verschiedenen Versuchen.

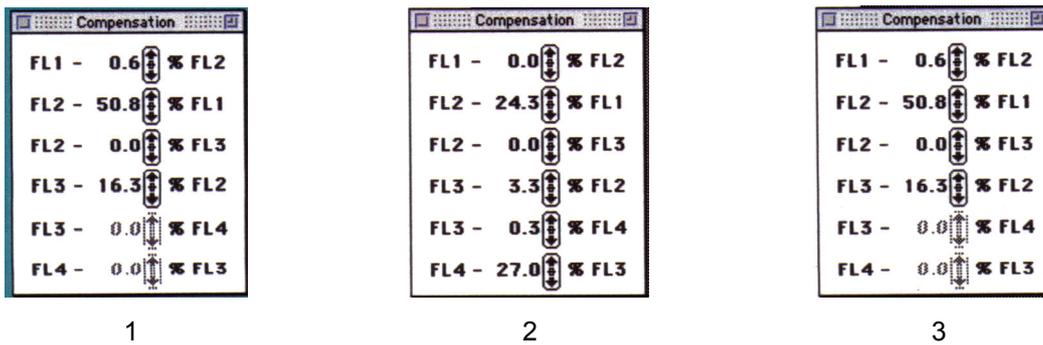


Abb. 12: 1: Einstellungen der Kompensation für die Färbung der Tumorzellen mit cmHsp70.1-FITC und Isotyp IgG1-FITC
 2: Einstellungen der Kompensation für die Färbung der Milzzellen mit verschiedenen Antikörpern
 3: Einstellungen der Kompensation für den „ADCC“-Versuch

Als all diese Einstellungen vorgenommen waren, wurde die zu zählende Gesamtzahl der Zellen festgelegt (siehe Abb. 13).

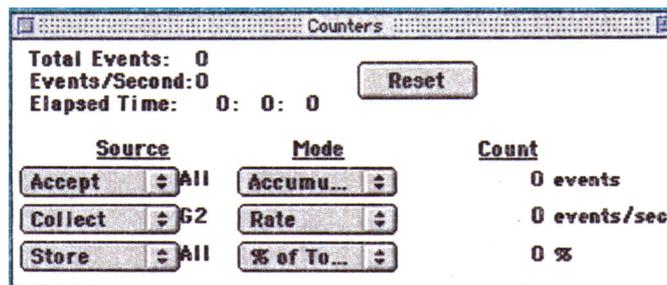


Abb. 13: Schaltfläche für die Festlegung der zu messenden Zellzahl

Auch der Speicherort und die Identität (welche Zellen, welche Antikörper etc.) der jeweiligen Probe wird genau bestimmt. Dies ermöglicht für die spätere Auswertung eine einwandfreie Zuordnung der Messdaten zu den einzelnen Proben.

Die unten stehende Abbildung (Abb. 14) zeigt ein Beispiel einer solchen Schaltfläche des „FACS“ Calibur TM. Rechts oben steht, welcher Kanal, welches Signal messen soll. In diesem Fall P3 = PKH67 und P5 = PI. Bei „Directory“ (links oben) lässt sich der Speicherort der Daten eingeben. Darunter bei „File“ kann den Röhren ein Name, unter dem diese gespeichert werden sollen, gegeben werden. Unter „Sample ID“ kann man noch einmal den Namen des Röhrens, das gerade gemessen wird, eintragen. Und unter der Rubrik „Experiment Components“ werden die nacheinander gemessenen Proben genau benannt. Auf diese Weise kann man beim Messvorgang genau nachvollziehen, welches Röhren gerade gemessen wird.

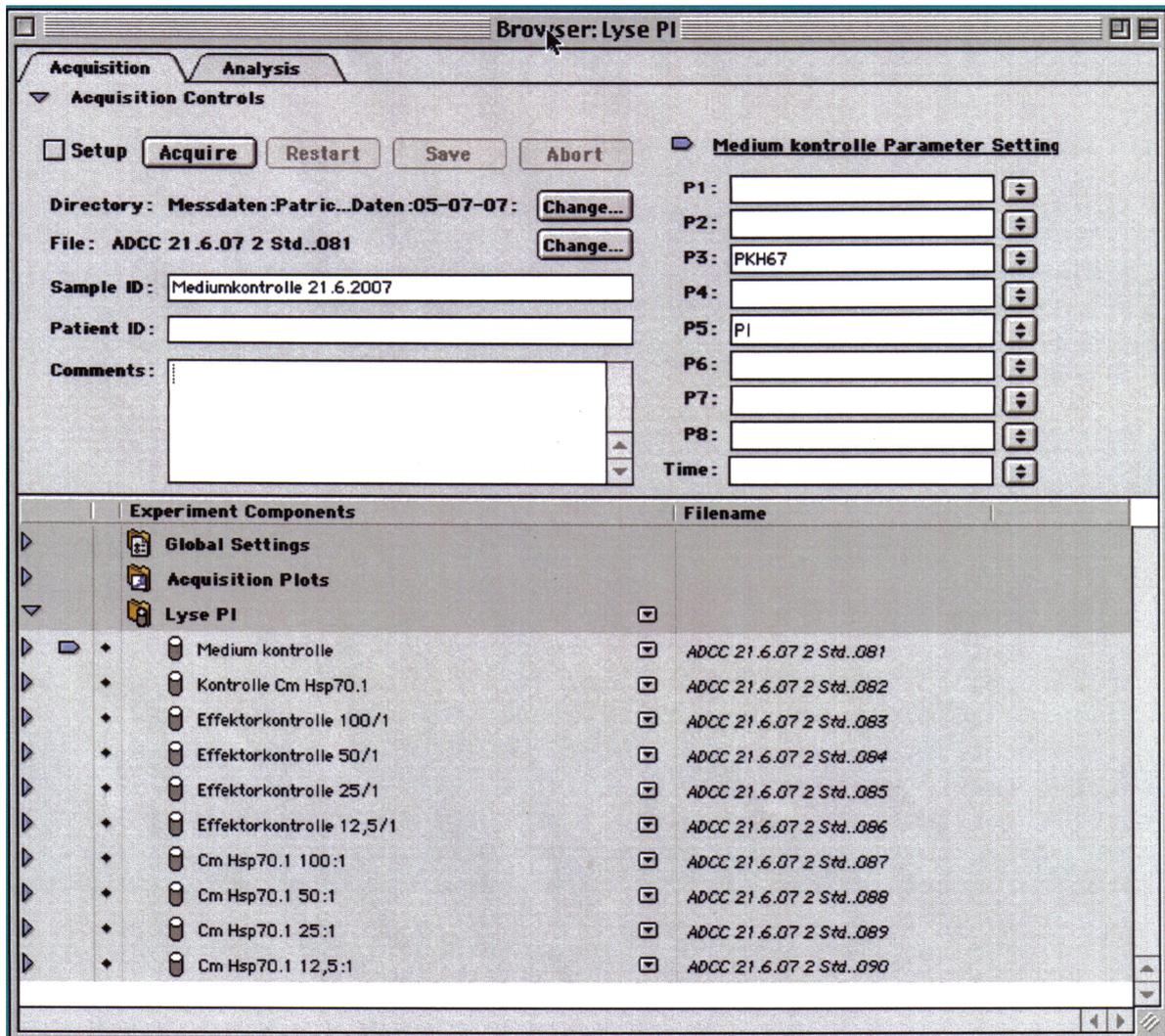
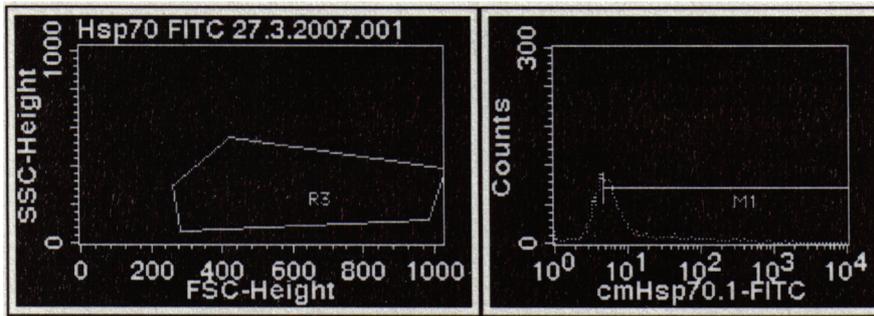


Abb. 14: Beispiel einer Schaltfläche des „FACS“ Calibur TM

3.1.3.4 Auswertung der erhobenen Daten

Wie im Falle der Datenmessung wird auch für die Auswertung ein Datenanalyse-dokument für jedes Experiment einer Art erstellt, als allgemeine Vorlage gespeichert und für jeden Versuch wieder verwendet.

Die Auswertemaske des „ADCC“-Versuches besteht aus 6 „Dot Plots“ und 2 Histogrammstatistiken (siehe Abb. 15).



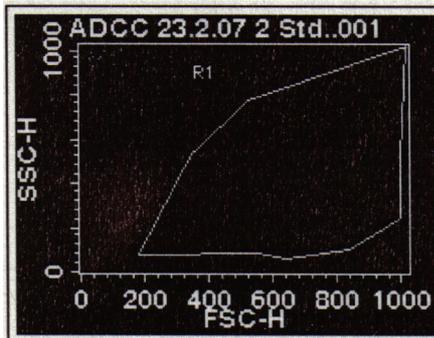
1

2

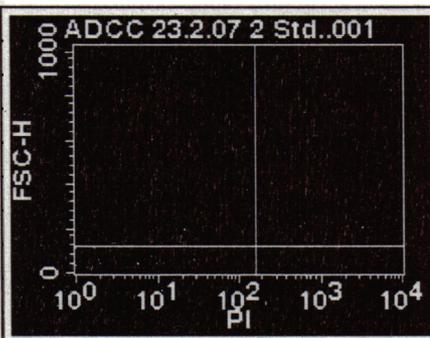
Histogram Statistics

File: Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: Patient ID:
 Tube: Panel:
 Acquisition Date: Gate: G3
 Gated Events: 0 Total Events: 0
 X Parameter:

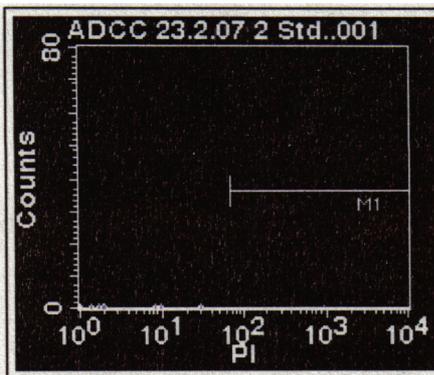
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CY	Median	Peak
All	0, 1023	1	100.00	0.01	5.28	5.28	***	5.28	
M1	169, 1023	1	100.00	0.01	5.28	5.28	***	5.28	



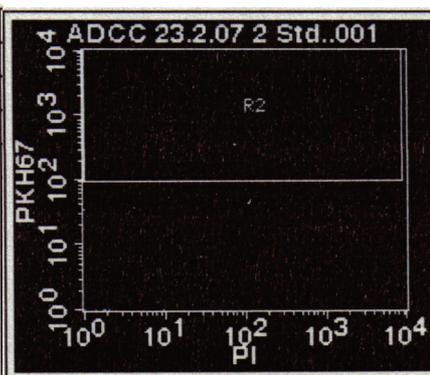
3



4



5



6

Histogram Statistics									
File: ADCC 23.2.07 2 Std..001					Log Data Units: Linear Values				
Sample ID: CT 26					Patient ID:				
Tube: Medium kontrolle					Panel: Lyse PI				
Acquisition Date: 23-Feb-07					Gate: G4				
Gated Events: 9					Total Events: 9081				
X Parameter: PI(Log)									
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak
All	1, 9910	9	100.00	0.10	6.12	2.99	146.34	1.84	
M1	68, 9910	0	0.00	0.00	***	***	***	***	*

Abb. 15: Auswertemaske des „ADCC“-Versuchs

In den „Dot Plots“ Nr. 1 und 2 werden die Daten der Färbung der CT26 Zellen mit cmHsp70.1-FITC abgebildet. Im ersten Plot werden die Zellen nach Größe und Granularität aufgetragen und das „Gate“ R3 um die Tumorzellen gelegt. Im „Dot Plot“ Nr. 2 werden die Kurven der Zellen, die unspezifisch mit Isotyp IgG 1-FITC angefärbt sind, und der Zellen, die spezifisch cmHsp70.1-FITC auf ihrer Oberfläche gebunden haben, aufgetragen. Dann wird ein Marker M1 so gelegt, dass alle cmHsp70.1-FITC positiven Zellen unter ihm liegen. Den Anteil dieser Zellen kann man dann in der Histogrammstatistik in Prozent genau ablesen.

Die anderen 4 „Dot Plots“ Nr. 3-6 dienen der Auswertung der im „ADCC“-Versuch gewonnenen Daten. Sie werden genauso angelegt, wie die „Dot Plots“ in der Messmaske (siehe Abb. 9). Der Marker M1 wird anhand der Kontrollproben, die nur Tumorzellen in Medium und Tumorzellen in Hybridomüberstand enthalten, so eingestellt, dass unter Berücksichtigung dieses Markers nur tote Zellen, die durch die Effektorzellen getötet worden sind, für die Analyse gewertet werden. In Abbildung 16 ist die Einstellung des Markers M1 schematisch dargestellt.

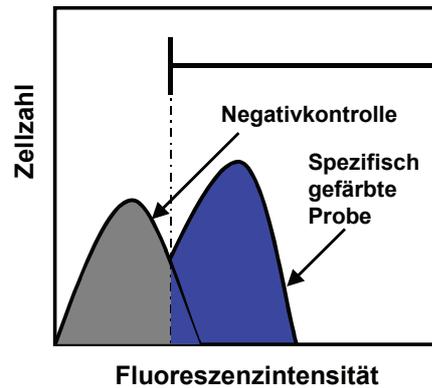


Abb. 16: Schematische Darstellung der Einstellung des Markers M1

Eine Histogrammstatistik zu „Dot Plot“ Nr. 6 zeigt den prozentualen Anteil der Zellen, die sich unter M1 befinden, an. Der Prozentsatz toter Zellen, die bei den Proben mit Effektorzellen, Tumorzellen und Medium unter dem Marker M1 liegen, werden von den Werten der Proben mit Effektorzellen, Tumorzellen und Antikörperüberstand abgezogen. So kann der Prozentsatz an Tumorzellen, der durch das Zusammenspiel von Antikörperüberstand und Effektorzellen mehr getötet wird, als wenn die Tumorzellen nur den Effektorzellen ohne den Antikörper ausgesetzt sind, ermittelt werden.

Die Auswertemaske des Versuches bei dem die Mausmilzzellen mit verschiedenen Antikörpern angefärbt werden, entspricht genau der Messmaske (siehe Abb. 8) und wird hier nicht noch einmal gesondert abgebildet. Bei jeder Probe, die gemessen wird, wird ermittelt wie viele Prozent der gemessenen Zellen sich in den 4 Quadranten des „Dot Plot“ 2 (siehe Abb. 8) befinden und somit lässt sich feststellen wie viele Zellen keines, eines oder alle Antigene gegen die sich die in den Ansätzen verwendeten Antikörper (siehe Tab. 3) richten auf ihrer Oberfläche tragen. Die Bindung der verschiedenen Antikörper auf der Oberfläche der Zellen lässt Rückschlüsse zu, aus welchen verschiedenen Zellgruppen die Gesamtheit der aus der Milz gewonnenen Immunzellen besteht.

3.2 „ADCC“-Analyse für die Durchflusszytometrie

3.2.1 Zellzählung



Abb. 17: Oberer linker Quadrant einer Neubauerzählkammer (Blick durchs Mikroskop)

Alle Zellen im praktischen Teil dieser Arbeit werden auf die gleiche Weise gezählt. Es wird dazu Trypanblau, die Neubauerzählkammer und ein inverses Durchlichtmikroskop verwendet. Bei Trypanblau handelt es sich um einen Farbstoff, der selektiv in tote Zellen mit durchlässiger Zellmembran eindringt. Die Neubauerzählkammer besteht aus neun großen Quadraten, wobei jedes Quadrat $0,1 \mu\text{l}$ Zellsuspension fasst. Es wird ein Deckgläschen auf die Neubauerzählkammer gelegt und so lange hin und herbewegt, bis es dort anhaftet. Dann werden $50 \mu\text{l}$ der mit Trypanblau in einem bestimmten Verhältnis (z. B. 1:1) verdünnten Zellsuspension mit einer Pipette zwischen Deckgläschen und Zählkammer gespritzt. Man zählt dann die 4 Eckquadranten aus und bildet den Mittelwert aus den vier einzeln ausgezählten Quadranten. Um nun die Zellzahl, die in 1 ml Suspension enthalten ist, zu ermitteln, muss man den Mittelwert mit dem Verdünnungsfaktor (F) und dem Kammervolumenfaktor 10^4 (Umrechnung von $0,1 \mu\text{l}$ auf 1 ml) multiplizieren.

Die Formel lautet also: $\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert der 4 Quadranten} \times 10^4 \times F$

3.2.2 Kultivierung der CT26 Zellen

Die Kultivierung der Zelllinie CT26 erfolgt bei 37 °C und 5 % Kohlendioxid (CO₂) und gesättigtem Wasserdampf in B-Zell-Medium (BZM) mit 5 % fötalem Kälberserum (FCS) in 75 cm² Zellkulturflaschen. Zur Aussaat werden 2 Mio. Zellen in eine Flasche gebracht. Um diese adhärennten Zellen zu passagieren oder für Versuche in Röhrchen zu überführen, wird zunächst das Zellkulturmedium abpipettiert und die Zellen mit 10 ml Phosphate Buffered Saline (PBS) gespült. Nach Entfernen des PBS werden 4 ml einer Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung zu den Zellen gegeben, worauf ein einminütiger Inkubationsschritt bei 37 °C folgt. Im Anschluss werden in die Zellkulturflasche 5-10 ml BZM gegeben. In diesem werden die Zellen nach Ablösen mittels Zellschaber in Suspension gebracht und dann gezählt.

3.2.3 Gewinnung von Hybridomüberstand

Bei den Hybridomzellen handelt es sich um eine Fusion von Maus B-Zellen, die die Fähigkeit besitzen, Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen zu produzieren und der unsterblichen Maus-Myelomzelllinie p3-ns/1-ag4-1, die der Hybridomzelllinie die Eigenschaft verleihen, sich unendlich zu teilen. Die Mäuse, von denen die B-Zellen stammen, werden mit dem Antigen (Hsp70 Peptid) immunisiert, gegen das sich der gewünschte Antikörper richten soll. Aus den bei der Fusion entstandenen Zellen werden die ausgewählt, die einen Antikörper gegen den Zelloberflächenmarker Hsp70 produzieren. Dieser Antikörper wird cmHsp70.1 genannt.

Die Hybridomzellen geben den Antikörper in das Zellkulturmedium ab, in dem sie kultiviert werden, und dieser Antikörper kann entweder direkt oder nach Aufreinigung verwendet werden. Um immer die gleichen Bedingungen und somit möglichst die gleichen Antikörperkonzentrationen im Medium für die Versuche zu erlangen, werden die Zellen immer auf die gleiche Weise kultiviert. Es werden jeweils 5 Mio. Zellen in eine T 162 Flasche mit 50 ml 10%igem BZM gegeben und für 3-4 Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ und gesättigtem Wasserdampf belassen, bevor der Überstand abgenommen und frisch am gleichen Tag für einen Versuch verwendet wird.

3.2.4 Vorbereitung der CT26 „Targetzellen“

3.2.4.1 Hsp70 „FACS“ von CT26

Der Antikörper im Hybridomüberstand bindet an Hsp70 auf der Zelloberfläche von Tumorzellen. Als interne Kontrolle wird bei jedem Versuch durch „FACS“-Analyse überprüft, wie viele CT26 Zellen Hsp70 auf ihrer Oberfläche präsentieren.

Dazu werden 200.000 CT26 Zellen in ein 15 ml Falcongefäß aus Polystyrol überführt und das „Tube“ bis zur 14 ml-Marke mit PBS aufgefüllt, um die Zellen vom Medium zu befreien. Dann werden die Zellen bei 1500 rotations per minute (rpm)/5 min/4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird abgeschüttet und das „Zellpellet“ aufgelockert, indem das „Tube“ mehrmals über ein Gitter gestreift wird. Anschließend werden 2 ml „FACS“-Puffer mit 10 % FCS in das Falcongefäß gegeben und mit einer 5 ml Pipette suspendiert, um die Zellen gleichmäßig in Suspension zu verteilen. Die Suspension wird dann zu gleichen Volumina auf zwei 2 ml Eppendorf-„Cups“ verteilt (1 ml/Eppendorf-„Cup“). Die beiden „Cups“ werden bei 2000 rpm/5 min/4 °C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes mit einer Vakuumpumpe wird das „Pellet“ wieder über ein Gitter zur Auflockerung gestreift, um zu gewährleisten, dass der Antikörper an alle Zellen des „Pellets“ binden kann. Dann werden in das eine „Cup“ 5 µl Isotyp IgG 1-FITC Antikörper und in das andere „Cup“ 2 µl cmHsp70.1-FITC markiert (Stocklösung 5 mg/ml, Verdünnung 1:5 mit PBS) Antikörper gegeben. Die beiden Eppendorf-„Cups“ werden dann auf Eis für 30 min im Dunklen inkubiert. Die Inkubation muss auf Eis stattfinden, um eine Internalisierung des gebundenen Antikörpers und damit ein falsch negatives Ergebnis zu verhindern. Die Dunkelheit soll außerdem die Fluorochrome vor Ausbleichen durch Licht schützen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird, nach Aufmischen des „Pellets“ auf einem Gitter, 1 ml „FACS“-Puffer mit 10 % FCS in jedes „Cup“ gegeben, um freien Antikörper, der nicht an Zellen gebunden hat, wegzuwaschen. Dann werden die Eppendorf-„Cups“ bei 2000 rpm/5 min/4 °C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes werden die „Pellets“ ein letztes Mal aufgelockert, in je 300 µl 10%igen „FACS“-Puffer aufgenommen und in je ein „FACS“-Röhrchen überführt. Dann erfolgt die Messung der beiden Proben im „FACS“-Gerät nach Zugabe von 1 µl Propidiumiodid (PI)/100 µl Suspension (Konzentration der Stocklösung 100 µg/ml). Hierbei handelt es sich um einen Farbstoff, der nur von toten Zellen aufgenommen wird.

PI gelangt durch die geschädigte Zellmembran in das Innere der Zelle und interagiert dort mit der DNA. PI besitzt ein breites Emissionsspektrum und kann deshalb sowohl mit dem FL2- als auch dem FL3-Detektor des „FACS“ Calibur TM gemessen werden. Die Zugabe von PI in die zu messenden Probenröhrchen erfolgt immer knapp vor der Messung, da PI auf einige Zellen toxisch wirken kann und nach längerer Inkubation auch von lebenden Zellen aufgenommen werden könnte.

3.2.4.2 Färbung der „Targetzellen“ CT26 mit PKH67

Um die „Targetzellen“ später bei der „FACS“-Messung von den Effektorzellen unterscheiden zu können, wird die Zellmembran der CT26 Zellen mit dem Farbstoff PKH67 angefärbt.

Hierzu werden 2 Mio. „Targetzellen“ in ein 15 ml Falconröhrchen aus Polystyrol aufgenommen und zweimal mit PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS nach dem zweiten Waschschrift, wird das „Pellet“ in 200 µl Diluent C aufgenommen. In ein anderes 15 ml Falconröhrchen aus Polystyrol werden ebenfalls 200 µl Diluent C gegeben. In dieses Falconröhrchen wird dann 1,5 µl PKH67 Stocklösung (10⁻³Molar (M)) gegeben. Der so verdünnte Farbstoff wird nun in das Falcongefäß mit der Zellsuspension überführt und für 10 min bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln auf den Schüttelinkubator gestellt. Um dann die Farbaufnahme in die Zellen zu stoppen, werden 400 µl FCS in das Falconröhrchen gegeben. Nach 2 min werden 8 ml 10%iges BZM in das Falconröhrchen zugefügt und dieses bei 1200 rpm/7 min/4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend verworfen, das „Zellpellet“ wird mit 10 ml 10%igem BZM aufgefüllt und auf gleiche Weise zentrifugiert. Die Zellen werden dann in 8 ml Medium aufgenommen und in einer 1:1 Verdünnung nach der Anfärbung mit 0,1%iger Trypanblaulösung in der Neubauerzählkammer unter dem Mikroskop gezählt.

Dann wird die Zellsuspension auf zwei 15 ml Falcongefäße aus Polystyrol aufgeteilt, um im einen Röhrchen die Zellen in Medium und im anderen Röhrchen die Zellen in Hybridomüberstand aufnehmen zu können. Die Anzahl der Zellen richtet sich hierbei nach den im Versuch gemessenen Proben. Pro Probe benötigt man 20.000 Zellen in 200 µl Medium oder in 200 µl Hybridomüberstand.

Die zwei Falcongefäße werden bei 1200 rpm/7 min/RT zentrifugiert, der Überstand wird verworfen, und es wird in beiden Röhrchen das Verhältnis 20.000 Zellen/200 µl Medium bzw. Hybridomüberstand eingestellt.

3.2.5 Vorbereitung der Effektorzellen aus Mäusemilzen

3.2.5.1 Gewinnung der Effektorzellen durch Auftrennung nach ihrer Dichte (Ficollierung)

Es wird, je nach Bedarf, unterschiedlich vielen Mäusen die Milz entnommen. Im Durchschnitt können aus einer Milz ca. 51 Mio. Zellen gewonnen werden. Die folgende Tabelle zeigt die genaue Anzahl der verwendeten Milzen und die genaue Zahl der daraus gewonnenen Zellen. Es wurden beispielhaft einige Versuche für die Tabelle ausgesucht.

Versuch	Anzahl der Milzen	Anzahl der gewonnenen Zellen
1	1	45 Mio.
2	1	74,7 Mio.
3	1	41 Mio.
4	2	95 Mio.
5	2	82 Mio.
6	3	145 Mio.
7	3	189 Mio.

Tab. 1: Anzahl der aus Mäusemilzen gewonnenen Effektorzellen

Nachdem die Milzen aus den Mäusen entnommen sind, werden 10 ml Medium in eine Petrischale vorgelegt und die Mäusemilzen in dieser Schale zwischen 2 Objektträgern zerquetscht. Daraufhin werden die Zellen in dem Medium mit einer 5 ml Pipette weiter vereinzelt und über ein 70 µm Zellsieb in ein 50 ml Falcongefäß überführt. Anschließend werden die Petrischale und die Objektträger mit jeweils 5 ml Medium zweimal gewaschen und das Medium in das 50 ml Falcongefäß gegeben. Dann folgt die Zentrifugation bei 1200 rpm/10 min/RT. Der Überstand wird verworfen und das „Zellpellet“ in 3 ml Medium resuspendiert. Es wird 1 ml Histopaque (Dichte $\rho = 1,083$ Gram (g)/ml) in ein „FACS“-Röhrchen vorgelegt. Auf dieses werden nun die 3 ml

Zellsuspension mit einer 5 ml Pipette langsam pipettiert, wobei die Phasenschicht zwischen Medium und Histopaque erhalten bleiben muss. Dann wird das „FACS“-Röhrchen bei 2000 rpm/20 min/RT zentrifugiert, wobei die Bremse der Zentrifuge deaktiviert wird, um eine Wiedervermischung der über Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten Schichten durch abruptes Abstoppen der Zentrifuge zu verhindern.

So wird die Suspension nach der unterschiedlichen Dichte ihrer Bestandteile aufgetrennt und die Leukozyten, die für die Versuche benötigt werden, von den übrigen Suspensionsbestandteilen separiert. In Abbildung 18 sieht man eine schematische Darstellung der Situation vor und nach Zentrifugation des „FACS“-Röhrchens.

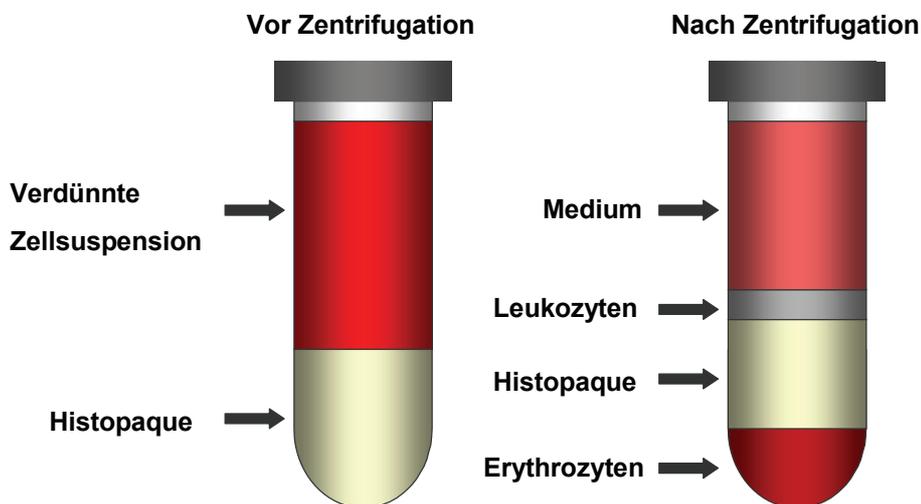


Abb. 18: Isolierung von Leukozyten aus dem Milzzellgemisch mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation

Nach der Zentrifugation wird die Leukozytenschicht vorsichtig mit einer 5 ml Pipette abgesaugt und in ein 50 ml Falcongefäß überführt, das bis zur 50 ml Marke mit RPMI-Medium (Roswell Park Memorial Institute-Medium) aufgefüllt und bei 1800 rpm/10 min/RT zentrifugiert wird. Der Überstand wird verworfen und das „Pellet“ in 50 ml RPMI-Medium aufgenommen. Dann werden die Zellen mit 7%iger Essigsäure in der Neubauerzählkammer unter dem Mikroskop gezählt. Die Essigsäure wird bei der Zellzählung benutzt, um eventuell noch in der Suspension vorhandene Erythrozyten zum Platzen zu bringen und sie so nicht mitzuzählen, da im Versuch nur die Leukozyten benötigt werden.

Hierauf werden die Zellen bei 1500 rpm/10 min/RT zentrifugiert. Danach werden sie für die unterschiedlichen Versuchsansätze verschieden weiter verarbeitet.

a) „Frische Effektorzellen“

Diese Zellen werden sofort am Tag ihrer Gewinnung für einen Versuch verwendet.

b) „24 Stunden (h) Effektorzellen“

Diese Zellen werden in teflonbeschichtete, CO₂ durchlässige Beutel überführt (5 Mio. Zellen/ml) und über Nacht bei 37 °C/4 % CO₂/gesättigter Wasserdampf auf einer Drehvorrichtung in den Brutschrank gegeben. Die Drehvorrichtung wird benötigt, um die Milzzellen gleichmäßig mit Medium zu versorgen.

c) „Stimulierte Effektorzellen“

Um zu sehen, ob man die Effektorzellen zu einer effektiveren Tötung von Tumorzellen anregen kann, werden sie mit zwei verschiedenen Substanzen stimuliert.

Ein Teil der Zellen wird mit humanem Interleukin 2 (IL2) stimuliert und ein anderer mit IL2 und TKD (Aminosäuresequenz T K D N N L L G R F E L S (450-463)). Untersuchungen der Hsp70 Sequenz TKD zeigten, dass das Peptid vom C-terminalen Ende der Substrat bindenden Domäne von Hsp70 ähnlich stimulierende Wirkung auf NK-Zellen hat, wie das gesamte Hsp70 Protein oder die isolierte C-terminale Domäne (8, 58) Tumorzellen präsentieren die TKD Sequenz auf ihrer Zelloberfläche.

Für die Stimulation werden zumeist 2 bis 3 Milzen nach der oben beschriebenen Methode verarbeitet. Die Zellzahl wird auf die Konzentration von 5 Mio. Zellen/ml Medium eingestellt und dann wird die Suspension in teflonbeschichtete Beutel aufgeteilt. Diese Beutel besitzen ein Fassungsvermögen von maximal 15 ml. Die Anzahl der Beutel ist abhängig von der Ausbeute an Effektorzellen aus den Mäusemilzen.

Die Menge der IL2 Lösung (Konzentration 30.000 Units (U)/ml) wird so gewählt, dass in den Beuteln eine Konzentration von 100 U IL2/ml herrscht. Von der TKD-Lösung (Konzentration 1 mg/ml) wird soviel in die Beutel gegeben, dass eine Endkonzentration von 2 µg TKD/ml erreicht ist.

Die Beutel werden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigtem Wasserdampf auf der Drehvorrichtung befestigt und für 2-3 Tage dort inkubiert.

3.2.6 Einstellen der richtigen Konzentration der Effektorzellen

Von den in a) bis c) beschriebenen Effektorzellen werden immer jeweils 10 Mio. Zellen in 500 μ l Medium und in einem parallelen Ansatz jeweils 10 Mio. Zellen in 500 μ l Hybridomüberstand aufgenommen und in ein 2 ml Eppendorf-„Cup“ überführt. Dies entspricht einer Zellkonzentration von 2 Mio./100 μ l. Da bei jeder Probe, die im „FACS“-Gerät gemessen wird, 20.000 CT26 „Targetzellen“ eingesetzt werden, entspricht dies einem Effektorzellen/Targetzellen Verhältnis (E/T Ratio) von 100/1. Um verschiedene E/T Verhältnisse messen zu können, wird mit dieser Anfangskonzentration nun eine Titrationsreihe angelegt, bis die niedrigste erwünschte Zellkonzentration erreicht ist. Hier sind die einzelnen Stufen der Titrationsreihe und die daraus resultierende E/T Ratio aufgezeigt.

Konzentration der Effektorzellen	E/T Ratio
2 Mio./100 μ l	100/1
1 Mio./100 μ l	50/
500.000/100 μ l	25/1
250.000/100 μ l	12,5/1
125.000/100 μ l	6,25/1
62.500/100 μ l	3,125/1
31.250/100 μ l	1,56/1
15.625/100 μ l	0,78/1
7812,5/100 μ l	0,39/1
3906,25/100 μ l	0,195/1

Tab. 2: Titrationsreihe der Effektorzellen

3.2.7 Durchflusszytometrie („FACS“-Analyse)

3.2.7.1 Erstellen der Proben für die „FACS“-Messung

Um zeigen zu können, dass es der Antikörper gegen Hsp70 auf der Oberfläche der CT26 Zellen den Effektorzellen aus der Mäusemilz erleichtert, die Tumorzellen zu

erkennen und abzutöten, werden verschiedene Kontrollen und Ansätze mit dem „FACS“-Gerät gemessen.

Um zu sehen, wie viele Zellen während der Inkubationszeit ohne den Einfluss weiterer Faktoren sterben, wird ein „FACS“-Röhrchen mit 20.000 „Targetzellen“ in 400 µl Medium belegt. Ob der Antikörper ohne die Effektorzellen alleine einen Einfluss auf das Sterben der Zellen hat, wird untersucht, indem ein Röhrchen mit 20.000 „Targetzellen“ in 400 µl Hybridomüberstand belegt wird. Den Einfluss der Effektoren auf die Tumorzellen ohne Antikörper wird in den zahlreichen Kontrollen geprüft, die aus 20.000 „Targetzellen“ in 200 µl Medium, 100 µl Medium und 100 µl Medium mit „Targetzellen“ in den unterschiedlichen Konzentrationen aus der oben beschriebenen Titrationsreihe bestehen.

Um herauszufinden, ob durch Antikörpergabe die Effektorzellen mehr Tumorzellen töten, als es die Effektorzellen ohne Antikörper tun, werden Röhrchen mit 20.000 „Targetzellen“ in 200 µl Überstand, 100 µl Überstand und 100 µl Überstand mit Effektorzellen in den unterschiedlichen Konzentrationen, wie sie auch schon bei den Kontrollen verwendet werden, belegt.

Nachdem alle „FACS“-Röhrchen mit den jeweiligen Komponenten gefüllt sind, werden sie für 2 oder 4 Stunden in den Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigtem Wasserdampf gestellt.

3.2.7.2 Messung der Proben im „FACS“-Gerät

Nach Ablauf der Inkubationszeit, werden die Proben aus dem Brutschrank genommen und im „FACS“-Gerät gemessen. Bevor die Messung der einzelnen Röhrchen durchgeführt wird, wird in jedes 4 µl PI (Stocklösung 100 µg/ml) gegeben. Da die CT26 Zellen mit dem PKH67 Farbstoff angefärbt worden sind, kann das „FACS“-Gerät zwischen den Zielzellen und den Effektorzellen unterscheiden. Durch die Gabe von PI kann der Anteil der toten Zellen an den PKH67 positiven Zellen ermittelt werden.

3.2.8 Färbung der Milzzellen für die „FACS“-Analyse

Um herauszufinden, aus welchen Gruppen von Immunzellen sich die Effektorzellen zusammensetzen, werden die Milzzellen mit verschiedenen Antikörpern angefärbt. Dies erlaubt eine Typisierung der Zellen durch das „FACS“-Gerät.

Auf diese Weise werden unstimulierte frische, mit IL2 und mit IL2 + TKD stimulierte Zellen untersucht.

Für jede Probe, die im „FACS“-Gerät gemessen werden soll, werden je 0,5 Mio. Milzzellen in ein „FACS“-Röhrchen pipettiert. Dann wird in jedes Röhrchen 1 ml „FACS“-Puffer gegeben und die Proben werden bei 1500 rpm/5 min/4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen und das „Zellpellet“ in 100 µl „FACS“-Puffer aufgenommen. Die Proben werden für 30 min auf Eis inkubiert. Dies geschieht, um unspezifische Bindungen durch das im „FACS“-Puffer enthaltene FCS zu blocken. Dann werden die Antikörper in die Röhrchen gegeben, und es folgt eine zweite Inkubation für 30 min auf Eis im Dunkeln. Um eine Aufnahme der Oberflächenantigene in das Innere der Zelle zu verhindern, findet die Inkubation auf Eis statt. Damit die Fluoreszenzfarbstoffe nicht vorzeitig angeregt werden, werden die Proben ins Dunkle gestellt. Nach Ablauf der 30 min wird in jeden Behälter 1 ml „FACS“-Puffer gegeben. Es schließt sich ein Zentrifugationsschritt (1500 rpm/5 min/4 °C) an, um die Antikörper, die nicht an die Zellen gebunden haben, wegzuwaschen. Dann wird der Überstand abgegossen. Die „Zellpellets“ werden in 0,5 ml „FACS“-Puffer aufgenommen und im „FACS“ Calibur TM gemessen.

Die Tabelle zeigt die verwendeten Antikörper, die benötigte Menge an Antikörper pro 0,5 Mio. Zellen und für welche Zelltypen die verschiedenen Marker stehen.

Ansatz	Antikörper	Menge/0,5 Mio. Zellen	Durch Antikörper gefärbte Zelltypen
1	Ra IgG 2a-FITC	0,5 µg	Isokontrolle
	Ra IgG 2a-APC	0,5 µg	Isokontrolle
	Ha IgG1-PE	0,5 µg	Isokontrolle
2	Ra IgG 2a-FITC	0,5 µg	Isokontrolle
	Ra IgG 2a-PE	0,5 µg	Isokontrolle
3	Ra IgM-PE	0,5 µg	Isokontrolle
4	CD4-FITC	0,5 µg	T-Helferzelle
	CD3-PE	0,5 µg	Zytotoxische T-Zelle
	CD8-APC	0,5 µg	T-Zellen allgemein
5	CD 205-FITC	0,5 µg	Dendritische Zellen
	CD 11c-PE	0,5 µg	Dendritische Zellen
6	Gr1-FITC	0,5 µg	Granulozyten
	B 220-PE	0,5 µg	B-Zellen
7	CD 11b-PE	0,125 µg	Makrophagen
8	CD 4-FITC	0,5 µg	Aktivierte T-Zellen
	CD 25-PE	0,5 µg	Aktivierte T-Zellen
9	CD 49b-PE	0,5 µg	NK-Zellen
10	CD4-FITC	0,5 µg	T-Helferzelle
	CD8-PE	0,5 µg	T-Zellen allgemein

Tab. 3: Zur Färbung der Milzzellen verwendete Antikörper

3.3 Enzyme Linked Immunosorbent Assay („ELISA“) zur Bestimmung des Antikörpergehalts im Hybridomüberstand

3.3.1 Herstellung der Verdünnungsreihen

3.3.1.1 Herstellung der Standardverdünnungsreihe

Der cmHsp70.1 Antikörper liegt in einer Konzentration von 7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ vor. Er wird in zwei Schritten so mit 10%igem BZM verdünnt, dass eine Endkonzentration von 500 ng/ml erreicht wird. Dies entspricht der höchsten Konzentration des Antikörpers in der Standardreihe. Mit dieser Konzentration als Ausgangspunkt wird eine Titrationsreihe angelegt, bis eine Konzentration von 7,8125 ng/ml erreicht ist. Den Endpunkt der Titrationsreihe bildet reines 10%iges BZM.

3.3.1.2 Herstellung der Verdünnungsreihe des Hybridomüberstandes

Es werden 20 μl des Hybridomüberstandes in 180 μl 2-fach destilliertes Wasser aufgenommen. Dies entspricht der höchsten unbekanntes Konzentration. Diese wird in einer Titrationsreihe siebenmal um jeweils den Faktor 1:4 weiterverdünnt. Die sich daraus ergebenden Verdünnungsfaktoren sind in Abbildung 19 dargestellt.

3.3.2 Durchführung

Zur Beschichtung der Immunplatte wird eine Mischung aus „Coating-Puffer“ (0,1 Molares Natriumcarbonat (Na_2CO_3) und 0,1 Molares Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) pH 9.5) und „Capture-Antibody“ (anti-Maus IgG) im Verhältnis 1:1000 hergestellt und 100 μl pro „Well“ in die Immunplatte pipettiert. Die Platte wird über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wird die Platte einmal mit 300 μl Waschpuffer (PBS mit 0,05 % Tween 20) und zweimal mit 200 μl Waschpuffer pro „Well“ gereinigt. Der Waschpuffer wird jeweils 1 min in den „Wells“ belassen. Zur Verhinderung unspezifischer Bindungen wird anschließend 200 μl „Blocking-Puffer“ (PBS mit 5 % Milchpulver) in jedes „Well“ gegeben und die Platte wird für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Stunde schließt sich ein zweiter Waschschrift (wie oben beschrieben) an. Nun werden je 100 μl der zu messenden

Proben in 2 „Wells“ der Platte gegeben. Das heißt, zwei „Wells“ werden mit der gleichen Konzentration cmHsp70.1 aus der Standardreihe und je zwei „Wells“ mit der gleichen Konzentration aus der Hybridomüberstandverdünnungsreihe, belegt.

Die Belegung der Platte soll folgende schematische Darstellung verdeutlichen:

Standard Überstand

500 ng/ml	500 ng/ml	Verdünnungsfaktor 1:10	Verdünnungsfaktor 1:10								
250 ng/ml	250 ng/ml	1:40	1:40								
125 ng/ml	125 ng/ml	1:160	1:160								
62,5 ng/ml	62,5 ng/ml	1:640	1:640								
31,25 ng/ml	31,25 ng/ml	1:2560	1:2560								
15,6 ng/ml	15,6 ng/ml	1:10240	1:10240								
7,8 ng/ml	7,8 ng/ml	1:40960	1:40960								
0 ng/ml	0 ng/ml	1:163840	1:163840								

Abb. 19: Belegung der „ELISA“-Platte

Die Platte wird anschließend bei RT eine Stunde inkubiert. Hierauf werden die „Wells“ zweimal mit 300 µl und dreimal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. Der Puffer verbleibt jeweils 1 min in den „Wells“. Zur Detektion des Hsp70 wird dann „Blocking-Puffer“ und „Detection-Antibody“ (anti-Maus IgG-Peroxidase (POD)) im Verhältnis 1:1000 gemischt und von dieser Mischung werden je 100 µl in jedes „Well“ pipettiert. Die Platte wird bei RT 1 Stunde inkubiert. Anschließend werden die „Wells“ der Platte zweimal mit je 300 µl und fünfmal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen. Als letzter Schritt wird für die POD-Farbreaktion in jedes „Well“ 100 µl Farbreaenz (Substratpuffer + Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung (1 % in Dimethylsulfoximid (DMSO)) + Wasserstoffperoxidlösung (H₂O₂)-Lösung (30%ig)) pipettiert und die Platte für 30 min bei RT ins Dunkle gestellt. Die

Reaktion wird abgestoppt, indem 50 µl 2Molare Schwefelsäure (H₂SO₄) in jedes „Well“ gegeben wird. Die Platte wird bei 450 nm im „ELISA-Reader“ vermessen.

3.3.3 Auswertung der erhobenen Daten

Aus den bekannten Konzentrationen an Antikörper der Standardreihe und der im „ELISA-Reader“ ermittelten dazugehörigen optischen Dichte, wird ein Diagramm angelegt. Hierbei werden die bekannten Konzentrationen der Verdünnungsreihe in ng/ml auf der y-Achse und die optische Dichte auf der x-Achse aufgetragen. Über diese Punkte wird eine Standardkurve mit der Formel $y = 346,88x^3 - 524,34x^2 + 442,32x + 5,9319$ gelegt. Hierbei ergibt sich für diese Kurve ein Fehlerindikator $R^2 = 0,9998$. Dies bedeutet, dass die durch die Standardreihe ermittelten Werte mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,98 % auf der Standardkurve liegen. Die Erstellung der Standardkurve und die Ermittlung ihrer genauen Formel ermöglicht das Errechnen der im Überstand vorhandenen Antikörperkonzentration bei bekannter optischer Dichte der einzelnen Verdünnungen unter Berücksichtigung des jeweiligen Verdünnungsfaktors. Die Standardkurve und die Konzentration des Antikörpers im Überstand werden im Ergebnisteil präsentiert.

3.4 Immunhistochemie von Paraffin-Schnitten

3.4.1 Gewinnung der Tumore aus Balb/c Mäusen

Für den Versuch werden 8-10 Wochen alte weibliche balb/c Mäuse verwendet, um ihnen Tumorzellen zu spritzen und die Mäuse dann nach einem bestimmten Protokoll mit Antikörperüberstand, der auch in den in vitro Versuchen verwendet wird, zu behandeln. Auf diese Weise möchte man überprüfen, ob der Antikörper im Überstand Einfluss auf das Tumorstadium in der Maus hat. Aber es soll nicht nur die Größe der Tumore in den unterschiedlich behandelten Mäusen untersucht werden, sondern es interessiert auch, ob sich Immunzellen in den Tumoren der unterschiedlich behandelten Mäusegruppen nachweisen lassen. Deshalb werden die Tumorschnitte angefertigt.

Es wird eine CT26 Zellsuspension mit 1 Mio. Zellen/ml in 10%igem BZM hergestellt. Von dieser Suspension wird jeder Maus an Tag 0 des Versuches 50 µl intraperitoneal

gespritzt. Das entspricht 50.000 Tumorzellen. Die Mäuse werden in verschiedene Gruppen aufgeteilt. Manche werden als Kontrolle, wie schnell der Tumor in einer bestimmten Zeitspanne wächst, dreimal mit 10%igem BZM behandelt. Anderen wird ein-, zwei- bzw. dreimal Antikörperüberstand verabreicht. So kann beobachtet werden, welche Effekte der Antikörper auf das Tumorstadium hat, abhängig von der Zahl der Behandlungszyklen. Den Mäusen wird jeweils an Tag 2, 4 und 6 des Versuches 500 µl Antikörperüberstand oder 500 µl Medium gespritzt. Dann wird bis Tag 14 gewartet, die Mäuse getötet und der Tumor entnommen. Die Tumore werden dann in PBS gewaschen und mindestens 7 Tage in 4%igem Formalin vor der Weiterverarbeitung fixiert. Diese Arbeitsschritte bis zu der Gewinnung der Tumoren, wurden von Kollegen aus unserer Arbeitsgruppe ausgeführt.

Nach Ablauf dieser Zeit werden die Tumore in Einbettkassetten eingeschlossen und in 70 % Ethanol (EtOH) gegeben. Dann werden die Einbettkassetten in das Gewebeverarbeitungssystem Shandon 2LE eingesetzt. Dort werden die Tumore innerhalb von drei Tagen durch eine aufsteigende Ethanolreihe mit anschließender Xyloolbehandlung dehydriert und anschließend in flüssiges Paraffin überführt.

Danach werden die Tumore an der Einbettstation Histocentre 2 in Paraffin eingebettet und anschließend durch eine Kühlplatte bei einer Temperatur von -10 °C ausgehärtet. Die Blöcke werden sorgfältig beschriftet, um eine genaue Zuordnung der Tumore zur richtigen Maus zu gewährleisten.

Diese Paraffinblöcke werden dann auf einer Kühlplatte (-5 °C) abgekühlt, um das Paraffin nochmals zu härten und das Schneiden der Blöcke zu erleichtern. Anschließend werden sie in das Mikrotom eingespannt, und es werden 7 nm dicke Schnitte angefertigt. Diese werden vorsichtig mit einem feuchten Pinsel von der Mikrotomklinge gelöst und in ein Wasserbad aus destilliertem Wasser, das auf 45-50 °C vorgeheizt worden ist, überführt. Man lässt die Schnitte zu ihrer „Entfaltung“ kurz auf dem Wasser schwimmen und anschließend werden sie auf Objektträger aufgezo-gen. Die Objektträger werden anschließend für ein bis zwei Stunden bei 60 °C in den Ofen gegeben, um das Paraffin abzuschmelzen und das Gewebe auf den Objektträgern „festzubacken“.

3.4.2 Schnitte und Antikörper

Es werden Schnitte (7 nm Dicke) von den oben beschriebenen vier verschiedenen Mäusegruppen gefärbt. Von den Tumoren der Mäuse, die dreimal BZM, und von denjenigen, die einmal cmHsp70.1 erhalten hatten, werden 6 Schnitte angefärbt. Von den Tumoren der anderen Mäuse stellt man 7 Schnitte her.

Folgende Tabelle zeigt, welche Schnitte mit welchen Antikörpern angefärbt werden, bei den Mäusen, die mit BZM, einmal mit cmHsp70.1 und zweimal mit cmHsp70.1 behandelt worden sind.

Schnitt	Primärantikörper	Sekundärantikörper
1	Anti-CD3 (T-Zellmarker)	Rabbit-anti-Maus POD
2	Anti-CD56 (NK-Zellmarker)	Rabbit-anti-Maus POD
3	Anti-CD94 (NK-Zellmarker)	Rabbit-anti-Maus POD
4	Hsp70 7F4	Rabbit-anti-Rat
5	cmHsp70.1 SN	Rabbit-anti-Maus POD
6	CmHsp70.2	Rabbit-anti-Maus POD
7	Iso Maus	Rabbit-anti-Maus POD

Tab. 4: Antikörper zur Färbung der Schnitte von Tumoren aus Mäusen, die mit BZM oder ein- bzw. zweimal mit cmHSP70.1 behandelt wurden

Die 7 Schnitte der Mäuse, denen dreimal cmHsp70.1 gespritzt worden ist, werden jeweils folgendermaßen angefärbt.

Schnitt	Primärantikörper	Sekundärantikörper
1	Iso Ratte	Rabbit-anti-Rat
2	Iso Maus	Rabbit-anti-Maus POD
3	Anti-CD3 (T-Zellmarker)	Rabbit-anti-Maus POD
4	Anti-CD56 (NK-Zellmarker)	Rabbit-anti-Maus POD
5	Anti-CD94 (NK-Zellmarker)	Rabbit-anti-Maus POD
6	Hsp70 7F4	Rabbit-anti-Rat
7	cmHsp70.1 Überstand	Rabbit-anti-Maus POD

Tab. 5: Antikörper zur Färbung der Schnitte von Tumoren aus Mäusen, die dreimal mit cmHSP70.1 behandelt wurden

3.4.3 Durchführung

Alle Schnitte werden für 30 Minuten nacheinander in zwei Behälter mit Xylol getaucht, um das Paraffin aus den Schnitten zu lösen.

Darauf folgen 2 Gefäße mit absolutem EtOH für jeweils 10 Minuten. Es folgt eine absteigende Alkoholreihe, deren Schritte jeweils 5 min dauern und die folgende Konzentrationen an EtOH enthalten: 1 x 96%iges EtOH, 1 x 70%iges EtOH und 1 x 50%iges EtOH. Hierdurch wird erreicht, dass die Tumore in wässrige Lösung gelangen und die Antikörper, die sich ebenfalls in wässriger Lösung befinden, gut aufnehmen können.

Anschließend werden die Schnitte noch für 2 min in destilliertes Wasser getaucht. Während dieser Prozedur, wird „Target Retrieval Solution“ mit einem pH von 6,1 angesetzt und im Wasserbad erhitzt. Bei den Schnitten, die mit Iso Ratte-Antikörper, mit Hsp70 7F4, mit cmHsp70.1 Überstand, mit cmHsp70.2 und Iso Maus-Antikörper angefärbt werden sollen, wird um den Tumor eine Fettstiftmarkierung gezeichnet, damit die Substanzen, die auf den Tumor gegeben werden, auch an Ort und Stelle verbleiben und nicht auf dem Objektträger verlaufen. Danach wird auf jeden Schnitt für 30 min „Natrium-Azid“ (Na-Azid) gegeben und die Schnitte werden in eine Feuchte Kammer gelegt. Das „Na-Azid“ dient der Inaktivierung der intrazellulären Peroxidase. Dann wird für 10 min Tris-Puffer, um das „Na-Azid“ wegzuwaschen, und für 5 min Auto-Puffer, um das Gewebe aufnahmefähiger für die Antikörper zu machen, auf die Schnitte gegeben. Um unspezifische Bindungen zu blocken, werden die Schnitte für 30 min mit Bovinem Serumalbumin (BSA) 10 % in PBS benetzt. Als letzter Schritt werden die Primärantikörper auf die Schnitte gegeben. Die Schnitte werden über Nacht bei 4 °C in der Feuchten Kammer belassen.

Die Schnitte, die mit den Antikörpern Iso Maus, anti-CD3, anti-CD 56 und anti-CD 94 angefärbt werden sollen, werden für 30 min in 98 °C heißem Puffer gekocht. Danach lässt man sie 3 min abkühlen und taucht sie für 5 min in destilliertes Wasser. Hierauf wird die Fettstiftmarkierung angebracht, und die Schnitte werden genauso wie die anderen Schnitte mit den verschiedenen oben genannten Lösungen, beginnend mit Na-Azid und endend mit BSA 10 %, in PBS behandelt und anschließend werden die Primärantikörper auf die Schnitte gegeben. Auch diese Schnitte werden über Nacht bei 4 °C in der Feuchten Kammer belassen.

Am nächsten Tag werden alle Schnitte für 20 min in Auto-Puffer zum Abwaschen der Primärantikörper getaucht, dann werden die Sekundärantikörper auf die Schnitte gegeben und es folgt eine Inkubationszeit von 2 Stunden bei RT in der Feuchten Kammer. Hierauf werden die Schnitte wieder für 20 min in Auto-Puffer gegeben, um die Sekundärantikörper abzuwaschen. Anschließend wird für 5 min in der Feuchten Kammer im Dunkeln Diaminobenzidin (DAB)-Gebrauchslösung auf die Schnitte gegeben. Die DAB-Lösung färbt die Sekundärantikörper an. Dann werden die Schnitte zuerst für 5 min mit Leitungswasser und dann für 5 min mit destilliertem Wasser überspült. Der Kalk im Leitungswasser fixiert die Farben. Danach wird für 30 sec Hämatoxylin in der Feuchten Kammer auf die Schnitte pipettiert, das dann mit warmem Leitungswasser 10 min lang abgewaschen wird. Das Hämatoxylin färbt die Zellkerne an und der Kalk im Leitungswasser fixiert das Hämatoxylin auf den Schnitten. Hierauf folgt eine aufsteigende Alkoholreihe, deren Schritte jeweils 5 min dauern und bei der folgende EtOH Konzentrationen verwendet werden: 1 x 30%iges EtOH, 1 x 50%iges EtOH, 1 x 70%iges EtOH, 2 x 96%iges EtOH und zuletzt 2 x 100%iges EtOH. Zum Schluss werden die Schnitte noch zweimal für 10 min in Xylol getaucht. Diese aufsteigende Alkoholreihe dient dazu, das Wasser aus den Schnitten zu entfernen. Nachdem die Schnitte getrocknet sind, wird jeder Schnitt mit einem Deckgläschen, unter Verwendung von Eukitt, versehen

3.5 Statistische Auswertung

Die im „ADCC“-Versuch gewonnenen Daten werden alle in einer Microsoft Excel-Tabelle gesammelt und mit Hilfe dieses Programms ausgewertet. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz der Ergebnisse wird der t-Test herangezogen.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse des „ELISA“ des Hybridomüberstandes

Im Methodenteil unter Punkt 3.3.3. wurde bereits beschrieben, wie die hier dargestellte Kurve erstellt wurde.

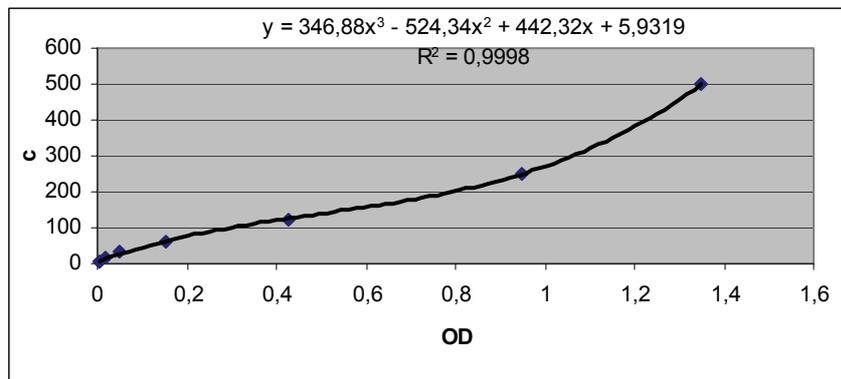


Abb. 20: Standardkurve zur Ermittlung der Konzentration an cmHsp70.1 im Überstand

Mit Hilfe dieser Kurve, die aus den Werten der Standardreihe erstellt wurde, kann man nun die Antikörperkonzentration im Überstand ermitteln. Hierzu benötigt man die optische Dichte, die Formel der Kurve und den Verdünnungsfaktor. Im Weiteren wird eine optische Dichte einer bestimmten Verdünnung des Überstandes beispielhaft herausgegriffen und die Rechnung vorgeführt.

Im „ELISA-Reader“ wurde bei der Verdünnung 1:640 des Überstandes eine optische Dichte von 0,94813 gemessen. Wenn man diesen Wert in die Formel $y = 346,88x^3 - 524,34x^2 + 442,32x + 5,9319$ einsetzt, erhält man eine Konzentration von 249,605 ng/ml. Da es sich hierbei um die Verdünnung 1:640 handelt, muss dieser Wert mit 640 multipliziert werden, und man erhält eine Konzentration von 159747 ng/ml. Wenn man dieses Ergebnis noch in $\mu\text{g/ml}$ umrechnet, erhält man eine Endkonzentration von 159,747 $\mu\text{g/ml}$ Antikörper im Überstand.

4.2 Ergebnisse des „ADCC“-Versuchs

Bei diesem Versuch sollte die immunzellvermittelte Lyse von Tumorzellen untersucht werden. Immunzellen können körperfremde Zellen auf verschiedene Arten abtöten. Hier wird die Antikörper-vermittelte Lyse von Tumorzellen durch Zellen des angeborenen Immunsystems untersucht. Als Zielzellen wurden in diesem Experiment murine Kolonkarzinomzellen CT26 verwendet, als Effektorzellen wurden murine Milzzellen eingesetzt. CT26 Tumorzellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie Hsp70 auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Gegen dieses Antigen richtet sich der von uns hergestellte Maus monoklonale Antikörper cmHsp70.1. In der ersten Versuchsreihe wurde untersucht, ob die Zugabe des Antikörpers cmHsp70.1 zu einer erhöhten Tumorzellyse führt. In einem Kontrollansatz wurden Tumorzellen nur mit Milzzellen inkubiert.

Vor jedem Versuch wurde kontrolliert, ob Hsp70 von den Tumorzellen auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Hierfür werden CT26 Tumorzellen sowohl mit dem Isotyp IgG 1- FITC Antikörper angefärbt, um die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Tumorzellen zu ermitteln, und mit dem Antikörper cmHsp70.1-FITC angefärbt, um die spezifische Bindung von diesem Antikörper an Hsp70 auf der Zelloberfläche zu ermitteln. Nachdem der Anteil der Hsp70 Membran-positiven Zellen ermittelt ist, werden die Tumorzellen als Zielzellen für das „ADCC“ Experiment eingesetzt.

Im Durchschnitt wurde bei 45 % der im „FACS“ analysierten CT26 Zellen eine Bindung des Hsp70.1 Antikörpers auf ihrer Zelloberfläche festgestellt. Die folgende Tabelle zeigt beispielhaft die Ergebnisse aus fünf Einzelexperimenten.

Versuch	Anteil Hsp70 positiver Zellen
1	41,36 %
2	38,42 %
3	42,52 %
4	36,52 %
5	46,87 %

Tab. 6: *Prozentsatz der Kolonkarzinomzellen CT26 aus der Maus, die Hsp70 auf der Oberfläche exprimieren*

In der ersten „ADCC“ Versuchsreihe wurden Milzzellen verwendet, die frisch aus der Maus isoliert wurden. Sie wurden in verschiedenen Effektorzellen/Zielzellen-Verhältnissen (E:T Ratio) bei den Versuchen eingesetzt. Typischerweise wurden E:T Verhältnisse von 100/1 bis 12,5/1 eingesetzt. Die Inkubationszeiten der Effektor und Zielzellen variierten zwischen 2 und 4 Stunden.

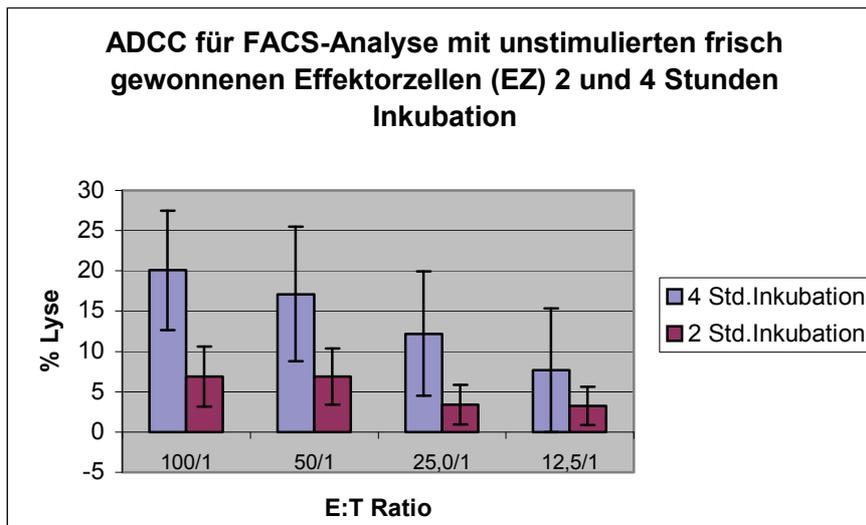


Abb. 21: Ergebnisse des „ADCC“ mit unstimulierten frisch gewonnenen Effektorzellen nach einer 2- und 4-stündigen Inkubationsphase

Die Abbildung zeigt, wie viel Prozent der Tumorzellen durch das Zusammenspiel des Antikörpers mit den Immunzellen mehr getötet wurden, als ohne die Zugabe des Antikörpers unspezifisch getötet wurden (Y-Achse: % Lyse). Man sieht einen Hinweis darauf, dass die Effektivität der Lyse der Tumorzellen proportional zur Inkubationszeit und zur Höhe des E:T Verhältnisses ist. Bei einer 4 Stunden Inkubation werden wesentlich mehr Tumorzellen abgetötet, als bei einer 2 Stunden Inkubation. Die Lyse ist auch abhängig vom E:T Verhältnis. Je mehr Effektoren in einem Experiment eingesetzt werden, desto höher ist die Tumorzelllyse. Bei einer 4-stündigen Inkubation und einem E:T Verhältnis von 100/1 werden Spitzenwerte von 20 % zusätzlicher Lyse von Zellen durch das Zusammenwirken des Antikörpers und der Immunzellen erreicht. Der Wert der 4 Stunden Inkubation und dem E:T Verhältnis 50/1 zeigt im t-Test eine statistische Signifikanz (n=5, p=0,05).

Um zu überprüfen, wieviele Tumorzellen durch die Milzzellen nach Zugabe des Antikörpers in kleineren E:T Verhältnissen getötet werden, wurden in einem nächsten

Experiment die Effektorzellen weiter verdünnt, so dass man die E:T Verhältnisse 12,5/1 bis 0,19/1 erhielt. Es wurden hierzu frisch isolierte (blaue Balken) und einen Tag nach Isolation gewonnene Milzzellen (violette Balken) verwendet. Die Inkubationsphase der Effektor-, Zielzellen und Antikörper in dieser Versuchsreihe betrug 2 Stunden.

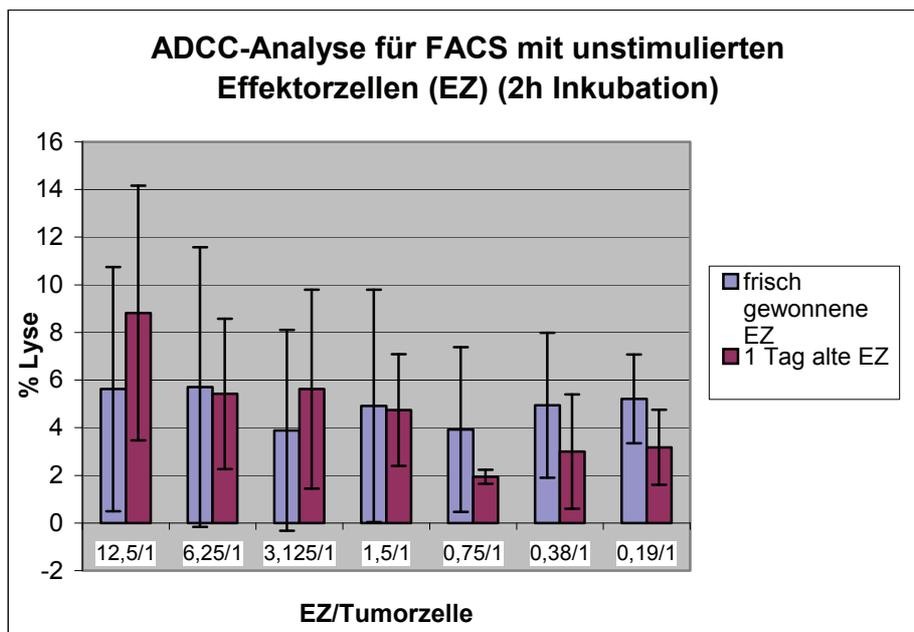


Abb. 22: Ergebnisse der „ADCC“-Analyse mit unstimulierten Effektorzellen (EZ) (2h Inkubationsphase)

Hier wurde deutlich, dass frisch isolierte Effektorzellen und 1 Tag alte Effektorzellen ähnliche Lysen von Hsp70 positiven Tumorzellen erzeugen. In jedem Fall erzeugte die Zugabe des Hsp70-spezifischen Antiköpers eine erhöhte lytische Aktivität der Tumorzellen, als Milzzellen ohne die Zugabe von Antikörper, selbst bei niedrigen E:T Verhältnissen. In dieser Versuchsreihe ließ sich keine klare Linearität der E:T Verhältnisse und der Lyse in % feststellen.

Nun stellte sich die Frage, ob es möglich ist, die Effektivität der Milzzellen im Bezug auf die Tötung von Tumorzellen im Zusammenspiel mit dem Antikörper, weiter zu steigern. Hierfür wurden die Effektorzellen 2-3 Tage mit Interleukin 2 (IL2) oder mit IL2 plus TKD, einem Hsp70 Peptid, stimuliert. Bei TKD handelt es sich um ein Peptid vom C-terminalen Ende der Substrat bindenden Domäne von Hsp70. Durch die Zugabe von TKD werden NK-Zellen dazu befähigt, sich noch effektiver gegen Tumore, die Hsp70 auf ihrer Oberfläche tragen, zu richten und die Tumorzellen abzutöten (28).

Wie die nächste Abbildung zeigt, war bei den mit IL2 stimulierten Zellen eine Inkubationszeit von 2 Stunden und ein E:T Verhältnis von 12,5/1 ausreichend, um ca. 17 % mehr getötete Zellen zu erhalten, als bei der zugehörigen Kontrolle ohne Antikörper. Dies entspricht einer zusätzlichen prozentualen Lyse, wie sie durch frisch gewonnene Milzzellen bei einem E:T Verhältnis von 50/1 und 4 Stunden Inkubation erreicht wird (siehe Abb. 21). Einen Tag alte unstimulierte Effektorzellen bewirkten bei der 12,5/1 E:T und 2 Stunden Inkubation nur eine zusätzliche Lyse von ca. 8,8 %.

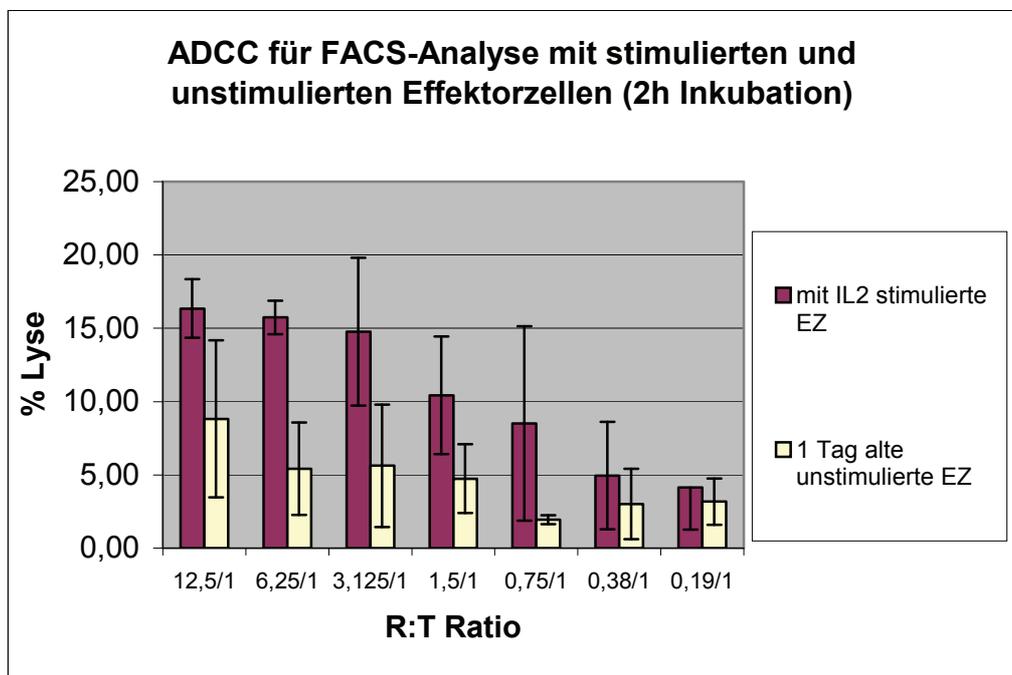


Abb. 23: Ergebnisse des „ADCC“ mit IL2-stimulierten und unstimulierten Effektorzellen (2h Inkubation)

Die Leistungsfähigkeit der Effektorzellen ließ sich im Bereich von E:T von 12,5/1 bis 3,125/1 noch weiter steigern, indem man sie nicht nur mit IL2 sondern gleichzeitig mit dem Hsp70-Peptid TKD stimulierte. Die Ergebnisse dieses Experiments zeigt folgende Abbildung.

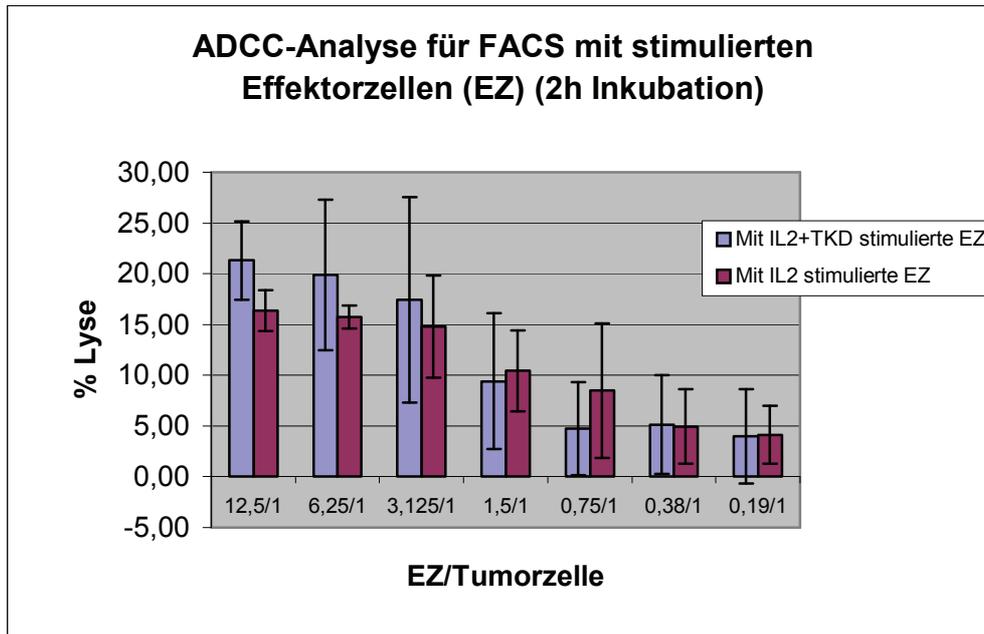


Abb. 24: Ergebnisse der „ADCC“-Analyse mit stimulierten Effektorzellen (2h Inkubation)

Hier sieht man, dass die doppelt stimulierten Zellen in der Lage sind, knapp über 20 % zusätzliche Lyse durch die Antikörperzugabe zu erreichen. Was ungefähr der zusätzlichen durch den Antikörper erreichten Lyse von unstimulierten Milzzellen in einem E:T Verhältnis von 100/1 und einer Inkubationszeit von 4 Stunden (doppelt so lang, wie bei den stimulierten Zellen) entspricht. Die ersten drei Werte der mit IL2 plus TKD stimulierten Zellen in dieser Abbildung zeigten im t-Test statistische Signifikanz ($n=5$, $p_1=0,04$, $p_2=0,02$, $p_3=0,02$).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Versuche einen Hinweis darauf geben, dass die Effektorzellen durch Zugabe des Antikörpers wesentlich effektiver die Tumorzellen erkennen und töten können, als ohne den Antikörper. Weiterhin konnte man beobachten, dass stimulierte Effektorzellen bereits bei kürzerer Inkubationszeit und niedrigeren Effektorzellen/Tumorzellen-Verhältnissen, eine ähnliche Leistung erbringen konnten, wie unstimulierte Effektoren bei längerer Inkubationszeit und höheren Effektorzellen/Tumorzellen-Verhältnissen.

Die aus den Milzen gewonnenen Effektorzellen wurden mit verschiedenen Antikörpern angefärbt und durch das „FACS“-Gerät analysiert, wie schon oben beschrieben (siehe Tab. 3). Hierdurch konnte man sich ein genaueres Bild machen, um welche

Immunzellen es sich handelt. Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse der „FACS“-Analyse der Milzzellen:

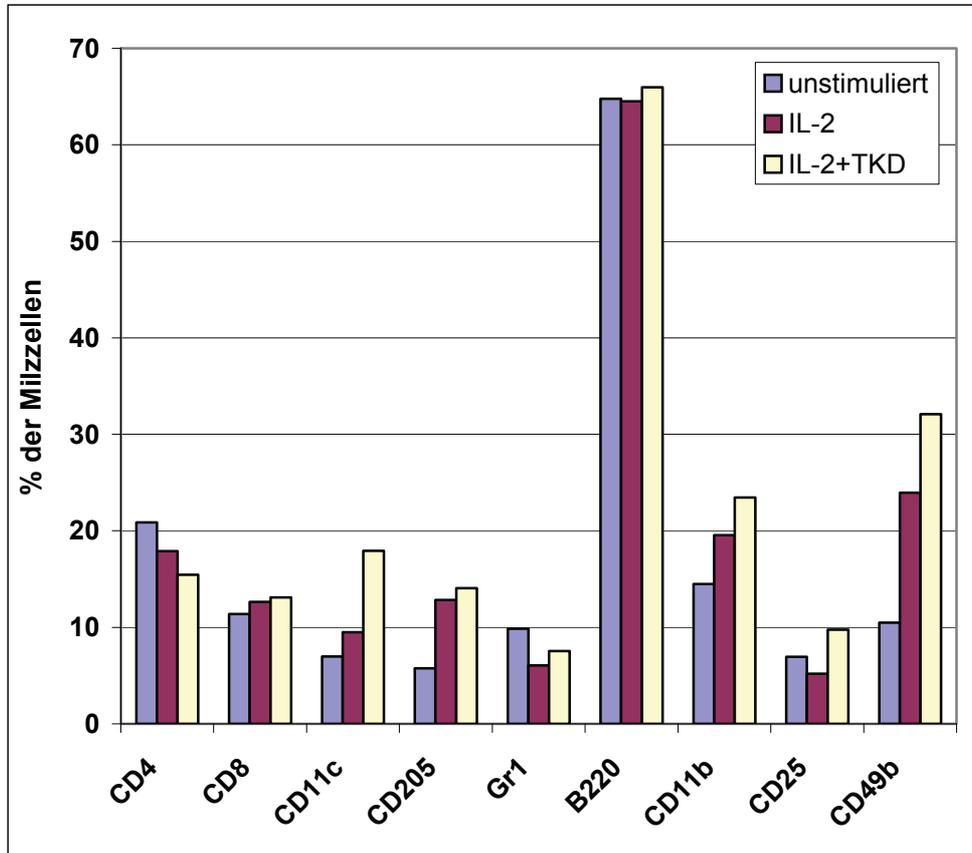


Abb. 25: Aufspaltung der Milzzellen in verschiedene Zellpopulationen

Es wird deutlich, dass die B-Zellen (B220 positiv) sowohl bei den unstimulierten als auch bei den stimulierten Milzzellen den größten Anteil ausmachen, nämlich über 60 %. Des Weiteren fällt auf, dass sich in der Population der nicht stimulierten Milzzellen ca. halb so viele NK-Zellen (CD49b positiv) befinden, wie in der Gruppe der mit IL2 stimulierten Zellen. Bei den mit IL2 und TKD stimulierten Zellen fand man sogar fast dreimal so viele NK-Zellen wie bei den unstimulierten Milzzellen. Ähnlich verhält es sich bei der Zahl der dendritischen Zellen (CD11c positiv). Auch hier sind in der Gruppe der IL2 und TKD stimulierten Zellen fast doppelt so viele vorhanden, wie in der Population der nicht stimulierten Zellen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass IL2 und die Kombination von IL2 und TKD die NK-Zellen, die in der Milz vorhanden sind, zur Proliferation anregen.

Diese NK-Zellen schütten wiederum apoptotisch wirkende Enzyme wie z. B. Granzym B aus, die die dendritischen Zellen zur Vermehrung anregen.

4.3 Ergebnisse der Anfärbung der Tumorschnitte

Für die Immunhistochemie wurden Tumore aus Mäusen verwendet, die nach dem beschriebenen Protokoll mit cmHsp70.1 im Hybridomüberstand behandelt wurden. Zunächst wurden den Mäusen 50.000 CT26 Zellen intraperitoneal gespritzt. Dann wurden sie in 4 verschiedene Gruppen aufgeteilt. Den Mäusen in der Kontrollgruppe wurden im Abstand von 2 Tagen dreimal 500 µl BZM verabreicht. Die Mäuse in den anderen 3 Gruppen erhielten ein- bis dreimal 500 µl Antikörperüberstand. An Tag 14 wurden die Mäuse getötet und die Tumore entnommen, in Paraffin eingebettet und mit den oben genau beschriebenen Antikörpern angefärbt. Leider war es nicht möglich, eine quantitative Auswertung zu erstellen, da nur einige exemplarische Schnitte aus Tumoren von jeder Gruppe angefärbt wurden. So konnte nicht untersucht werden, ob sich in den Tumoren aus den Mäusen, die am häufigsten mit Antikörperüberstand behandelt wurden, und in denen beispielsweise der Kontrollgruppe unterschiedlich viele Immunzellen nachweisen ließen. In jedem Fall konnten in den exemplarischen Schnitten Immunzellen in den Tumoren angefärbt werden, was einen Hinweis darauf gibt, dass diese aktiv in die Tumore einwandern und direkt an den Tumorzellen ihre Wirkung entfalten. Das Bild zeigt Beispiele von Tumorschnitten, die mit Antikörpern gegen verschiedene Zelloberflächenantigene angefärbt sind. Im linken oberen Bild ist ein Tumorschnitt, der zur Kontrolle der unspezifischen Bindung mit Isotyp Maus-Antikörper angefärbt wurde, abgebildet. Rechts daneben befindet sich ein Schnitt, der mit Anti CD56-Antikörper angefärbt wurde. Bei den hier bräunlich angefärbten Zellen handelt es sich also demnach um NK-Zellen, ebenso wie im Bild links unten. Auf diesem sieht man einen Schnitt, der mit einem Antikörper angefärbt wurde, der sich gegen den NK-Zell-Marker CD94 richtet. Im Bild rechts unten handelt es sich um einen Schnitt, der mit dem Antikörper Anti-CD3 angefärbt wurde. Bei den dort sichtbaren Zellen handelt es sich also um T-Zellen.

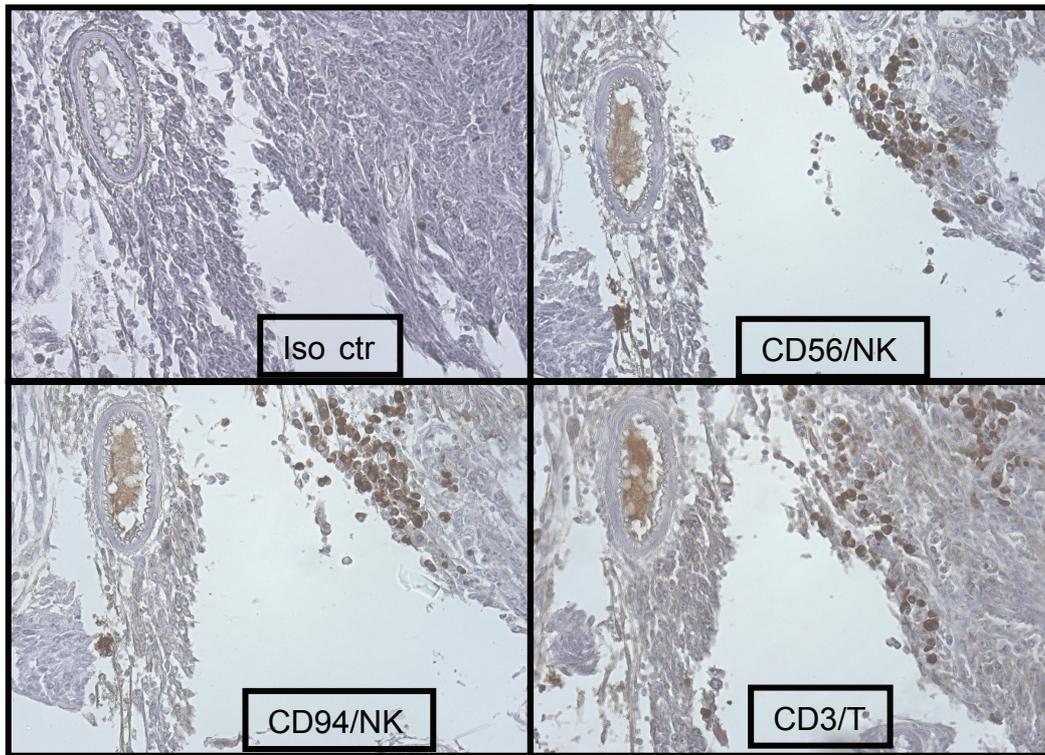


Abb. 26: Bilder der mit verschiedenen Antikörpern angefärbten Schnitte von Tumoren aus der Maus

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Versuchsergebnisse

Die in dieser Arbeit durchgeführten „ADCC“-Versuche geben einen Anhalt dafür, dass Immunzellen durch die Zugabe des cmHsp70.1 Antikörpers, der an das Antigen Hsp70 auf der Tumorzelloberfläche bindet, die Tumorzellen leichter erkennen und effektiver abtöten. In den oben beschriebenen Versuchen konnte ich bei durchschnittlich 45 % der Kolonkarzinomzellen aus der Maus eine Hsp70 Membran-Positivität nachweisen. Die aus den Mäusen gewonnenen Milzzellen enthalten B-Zellen, NK-Zellen, T-Zellen und Antigen präsentierende Zellen. Durch die Zugabe des Antikörpers wurden bei einem Verhältnis von 100 Immunzellen zu 1 Tumorzelle und einer Inkubationszeit von 4 Stunden bis zu 20 % mehr Tumorzellen durch die Immunzellen getötet, als dies ohne den Antikörper der Fall war. Durch die Titration der Effektorzellen wurden unterschiedliche Verhältnisse von Immunzellen zu Tumorzellen hergestellt, und es zeigte sich, dass bei niedrigeren E:T-Verhältnissen weniger Tumorzellen zusätzlich durch die Zugabe des Antikörpers getötet wurden. Auch die Länge der Inkubationszeit spielte eine nicht unwesentliche Rolle. So wurden durch unstimulierte Immunzellen in 4 Stunden wesentlich mehr Tumorzellen nach Antikörperzugabe zusätzlich getötet, als nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden. Nach Stimulation der Immunzellen mit IL2 und IL2 plus TKD waren kleinere E:T-Verhältnisse z. B. 12,5:1 und eine Inkubationszeit von 2 Stunden ausreichend, um ebenfalls 20 % mehr Lyse der Tumorzellen durch die Milzzellen nach Zugabe des Antikörpers zu erhalten. Dies zeigt, dass diese Substanzen hervorragend geeignet sind, die Effektorzellen aus der Milz zu stimulieren, Tumorzellen noch effektiver abzutöten. Einen Hinweis dafür, dass die Immunzellen tatsächlich in die Tumoren wandern und diese am Wachstum hindern, liefert die Immunhistochemie der Schnitte von Tumoren aus Mäusen, die mit dem cmHsp70.1 Antikörper behandelt wurden.

5.2 Vergleich zwischen cmHsp70.1 und klinisch erprobten Antikörpern

Monoklonale Antikörper werden seit vielen Jahren bereits erfolgreich in der Therapie von verschiedenen Krebserkrankungen eingesetzt. Trastuzumab (Herceptin) ist beispielsweise ein Antikörper, der sich gegen den transmembranösen Tyrosinkinase-Rezeptor Her-2/Erb-2/Neu (human epidermal growth factor receptor 2) richtet. Her-2/Erb-2/Neu hat auch die Fähigkeit Calmodulin zu binden. Dieser Rezeptor wird auf 25-30 % der Mamma-Karzinome und anderen Karzinomen wie Ovarialkarzinom, Magenkarzinom und Neuroblastom exprimiert (51, 47). Her-2/Erb-2/Neu übermittelt Signale in die Tumorzelle, die ihr Wachstum fördern und ihr Überleben verlängern. Die Expression des Rezeptors geht einher mit einer schlechten Prognose für die Patienten. Man nimmt an, dass die Wirkung von Trastuzumab hauptsächlich über „ADCC“ vermittelt wird (14). Wichtige Effektorzellen sind dabei CD16+ NK-Zellen und Makrophagen (83). Ein weiteres Beispiel für häufig im klinischen Alltag eingesetzte monoklonale Antikörper ist Rituximab, der sich gegen das CD20 Antigen richtet, das auf B Zellymphomen überexprimiert ist. Auch dieser Antikörper vermittelt seine Wirkung v. a. über „ADCC“ (15). Rituximab wird in Kombination mit Polychemotherapie als Erstlinientherapie bei follikulären Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) und diffus großzelligen NHL eingesetzt. Er spielt außerdem eine wichtige Rolle in der Erhaltungstherapie nach erfolgreicher Induktionschemotherapie bei einem Rezidiv des follikulären B-NHL. Bei Mantelzellymphomen gilt Rituximab als Standardtherapie (92, 93). In Kombination mit Chemotherapeutika kann Rituximab das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben bei Chronisch Lymphatischer Leukämie und Burkitt Lymphomen verlängern (55).

Beide genannten Antikörper haben gegenüber dem Hsp70 spezifischen Antikörper cmHSP70.1 zwei entscheidende Nachteile. Erstens werden die Antigene, gegen die sie sich richten, auch auf Normalgewebe exprimiert, bei Trastuzumab z. B. auf Zellen des Herzens, was in diesem Fall zu kardiotoxischen Nebenwirkungen führen kann (45). Eine Membranexpression von Hsp70 wurde bisher nur auf Tumorzellen aber nicht auf korrespondierenden Normalgewebe nachgewiesen (60). Dies bedeutet, dass Hsp70 ein tumorspezifisches Antigen ist und dass durch den therapeutischen Einsatz von

cmHsp70.1 sehr wahrscheinlich weniger Schädigung von körpereigenem Normalgewebe erwartet wird.

Einen Hinweis darauf, dass Therapien, die sich gegen Hsp70 als Antigen auf Tumoroberflächen richten, nebenwirkungsarm sind und das Hsp70 einen starken Stimulus für das Immunsystem darstellt, lieferte eine klinische Phase I-Studie mit Patienten mit therapierefraktären, metastasierten kolorektalen- und nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen. Diesen Patienten wurden durch Lymphozyten entnommen, die ex vivo mit IL2 und TKD stimuliert wurden, und dann den Patienten wieder infundiert wurden. Die Infusion der auf diese Weise gegen Hsp70 aktivierten autologen NK-Zellen wurde bis zu sechsmal wiederholt und von allen Patienten sehr gut vertragen. Bei 4 Patienten wurde sukzessive die Dosis erhöht. 10 von 12 Patienten zeigten ein immunologisches Ansprechen in vitro, die mit einer erhöhten zytolytischen Aktivität der NK-Zellen gegen Hsp70+ Tumorzellen einhergeht. 2 von 5 Patienten, die mehr als 4 Zyklen erhielten, zeigten sogar ein klinisches Ansprechen. Dieses Ergebnis war in der klinischen Phase I Studie nicht erwartet, da bei allen Patienten während ihrer letzten Chemotherapie die Krankheit progredient war (48).

Ein zweiter Vorteil des Hsp70 spezifischen Antikörpers im Vergleich zu Rituximab und Trastuzumab ist die Tatsache, dass Hsp70 auf sehr vielen unterschiedlichen Tumorarten exprimiert ist, wohingegen die Antigene von Rituximab und Trastuzumab nur auf wesentlich weniger Tumorentitäten exprimiert sind. Rituximab wird v. a. bei hämatologischen Erkrankungen eingesetzt (92, 93) und Trastuzumab hauptsächlich bei den oben genannten Tumorerkrankungen. Hsp70 hingegen wurde bislang auf verschiedenen Tumoren des Gastrointestinaltrakts, auf Pankreas- und Leberkarzinomen, Mamma- und Prostatakarzinomen, Kopf- und Halstumoren, Lungenkarzinomen (32, 57) und Blasten von AML und ALL nachgewiesen (60, 69). CmHsp70.1 könnte also in einem breiten Spektrum von Tumorerkrankungen therapeutische Verwendung finden.

5.3 Mögliche Einsatzgebiete von cmHsp70.1 in der Tumorthherapie

Monoklonale Antikörper werden in der Tumorthherapie derzeit als Mono- und Kombinationstherapien mit Strahlen- und Chemotherapie eingesetzt. Um

herauszufinden, ob sich Therapieansätze, die sich gegen das Hsp70 Antigen richten, dazu eignen, sie mit den etablierten Tumortherapieverfahren zu kombinieren, wurden die Auswirkungen von Strahlentherapie und verschiedenen Substanzen, die in der Tumortherapie eingesetzt werden, auf die Expression von Hsp70 auf der Tumoroberfläche und im Zytosol von Tumorzellen untersucht.

Es zeigte sich, dass gamma-Strahlung (1x10 Gy oder fraktioniert 5x2 Gy) die Hsp70 Membranexpression auf Kolon- und Pankreas-Karzinomen, die initial wenig Hsp70 auf der Zelloberfläche aufwiesen, erhöhte (30, 33). Wie bisher unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen, sind Hsp70 positive Tumore widerstandsfähiger gegenüber Chemo- und Strahlentherapie, als ihre Hsp70 negativen Korrelate. Durch die Expression von Hsp70 wird die Membran der Tumore stabiler (69). Dies könnte zu einem Nichtansprechen auf derzeitige Therapieformen führen. Aber die Hochregulation von Hsp70 auf der Tumoroberfläche könnte auch eine Chance in der Therapie solcher Tumore bieten, da Hsp70 auf der Membran als Bindungsstelle von cmHsp70.1 und damit als Angriffspunkt für das Immunsystem fungieren kann. Somit hätte man eventuell eine Therapiemöglichkeit von strahlenresistenten Tumoren.

Ein ähnlicher Effekt wurde beobachtet, als man humane Kolonkarzinomzellen, die alle Hsp70 auf ihrer Zelloberfläche exprimierten (56), mit verschiedenen Dosen von Cyklooxygenase1/2-Hemmern wie Aspirin und Cyklooxygenase2-Hemmern wie Celecoxib und Rofecoxib behandelte. Hier stieg ebenfalls die Expression von Hsp70 durch die Tumorzellen und dies bietet wiederum die Möglichkeit, cmHsp70.1 zur Therapie einzusetzen (29). Diese Substanzklasse kommt in der Tumortherapie häufig zum Einsatz, um chronische Entzündungen bei Tumorpatienten, die einen negativen Effekt auf ihre Prognose hätten, zu verhindern. Ein klinischer Benefit durch eine dauerhafte Gabe von Nichtsteroidalen Antirheumatika konnte beim kolorektalen- (35, 91), Magen- (24), Ösophagus- (17), und Mammakarzinom (43) nachgewiesen werden.

Bei der Behandlung der humanen Leukämiezelllinie K562 mit den Antimetaboliten Cytarabin, Ifosfamid, Carboplatin, Doxorubicin und Fludarabin (7, 21) und mit den Mitose-Hemmern Vincristin und Paclitaxel (34) in nicht-tödlichen Dosen fand man heraus, dass nur Vincristin und Paclitaxel Hsp70 auf der Zelloberfläche und im Zytosol erhöhten (31). Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass einige Substanzen, die in der Tumortherapie eingesetzt werden, und die gamma-Strahlung die Expression von Hsp70

auf der Tumoroberfläche erhöhen, was eine gute Grundlage für eine Kombination dieser Therapien mit dem Einsatz von cmHsp70.1 darstellt.

Es gibt Hinweise darauf, dass sich die Verwendung von cmHsp70.1 besonders bei metastasierten Tumoren anbieten würde. In einer Studie wurden in Mäusen Tumore und ihre Metastasen hinsichtlich ihrer Hsp70 Expression untersucht. Es zeigte sich, dass Metastasen mehr Hsp70 auf ihrer Oberfläche aufwiesen als der Primärtumor (59, 88). Der Grund dafür könnte sein, dass Hsp70 auf der Zelloberfläche die Tumore dazu befähigt, leichter zu metastasieren. Die Tumorzellen werden wahrscheinlich durch die Expression von Hsp70 widerstandsfähiger gegenüber den verschiedenen Milieus, die sie auf ihrem Metastasierungsweg durchschreiten müssen. Diese Annahme wird unterstützt durch eine Studie, die eine mögliche Korrelation zwischen Hsp70 Expression auf Tumorzellen, Gesamtüberleben und Metastasierungsweg bei insgesamt 150 Patienten mit Kolon- und Rektumkarzinomen, Magen- und Plattenepithelkarzinomen der Lunge untersuchte. Es zeigte sich, dass Patienten mit Hsp70 positiven Rektum- und Lungenkarzinomen ein schlechteres Gesamtüberleben zeigten, als Patienten mit Hsp70 negativen Tumoren der gleichen Entität. Die Hsp70 positiven Tumorzellen sind möglicherweise eher befähigt, Metastasen zu bilden. Im Gegensatz dazu wiesen Patienten mit Hsp70 positiven Kolon- und Magenkarzinomen ein besseres Gesamtüberleben auf, als Patienten mit Hsp70 negativen Tumoren (69). Ein Erklärungsversuch dieser Tatsache ist der unterschiedliche Metastasierungsweg der Tumore. Es wird angenommen, dass Kolon- und Magenkarzinome eine bessere Prognose haben, wenn sie Hsp70 positiv sind, weil diese Tumore hauptsächlich in die Leber metastasieren (46). Die in der Leber vorhandenen NK-Zellen könnten Tumorzellen möglicherweise besser erkennen und abtöten, die Hsp70 auf der Oberfläche tragen, als Tumorzellen die Hsp70 negativ sind (97). So haben Hsp70 positive Tumore, die in die Leber metastasieren, weniger Chancen, sich weiter auszubreiten. Rektum- und Lungenkarzinome metastasieren fast nie in die Leber, und so fällt bei diesen Tumoren die Filterfunktion der Leber weg. Die durch Hsp70 auf der Oberfläche widerstandsfähiger gemachten Zellen können sich entsprechend unserer Hypothese deshalb besser im Körper ausbreiten. In einer solchen Situation könnte cmHsp70.1 zum Einsatz kommen und es peripheren Immunzellen erleichtern, die Tumorzellen zu erkennen und abzutöten.

5.4 Probleme der Therapie mit monoklonalen Antikörpern

Genauso wie jede Therapie in der Medizin birgt auch die Therapie mit monoklonalen Antikörpern klinische Nebenwirkungen. Einige limitierende Faktoren der Therapie konnten bereits durch Weiterentwicklung der Antikörper überwunden werden. Für andere Probleme wird bereits nach Lösungen gesucht. Die ersten Antikörper, die in der Krebsforschung Patienten verabreicht wurden, stammten aus der Maus. Dies rief starke allergische Reaktionen gegen den aus der Maus stammenden Teil der Antikörper hervor. Diese unerwünschte Nebenwirkung der Antikörper konnte umgangen werden, indem das „Fc“-Teil des Antikörpers aus der Maus mit einem humanen „Fc“-Teil ausgetauscht wurde (36). Ein anderes Problem der Therapie ist, dass Tumore die Fähigkeit besitzen, auf verschiedene Arten die Wirksamkeit von monoklonalen Antikörpern zu vermindern. Man weiß z. B., dass Leukämiezellen die Expression von „MHC“ I-Molekülen auf ihrer Oberfläche nach unten regulieren, um der durch T-Zellen vermittelten Immunantwort zu entkommen (18).

Aber Krebszellen sind nicht nur in der Lage, die Oberflächenexpression von „MHC“ I-Molekülen zu drosseln, sondern sie können auch die durch NK-Zellen vermittelte Immunantwort unterdrücken. 38 % aller Mamma-Karzinome exprimieren z. B. „HLA“-G (Human Leukocyte Antigen-G) (50). Dieses nicht-klassische „HLA“ Molekül kommt normalerweise nur während einer Schwangerschaft auf trophoblastischen Zellen vor und verhindert, dass die Mutter eine Immunreaktion gegen den semiallogenen Fetus ausbildet. „HLA“-G interagiert mit „ILT“-2, „ILT“-4 („Immunoglobulin-like transcript“), „KIR“2DL4 („Killer cell immunoglobulin-like receptor“ 2DL4) und CD8. Diese Rezeptoren finden sich auf Monozyten, Makrophagen, NK-Zellen und CD8+ T-Lymphozyten (68, 4). Durch Interaktion von „HLA“-G und diesen Rezeptoren wird die Aktivität der Zellen gehemmt und der Tumor damit vor einer Immunantwort geschützt. „HLA“-G verhindert auch die transendotheliale Wanderung von NK-Zellen (19).

Ein weiterer Faktor, der den Erfolg von monoklonalen Antikörpern in der Krebstherapie mindern kann, ist die Tatsache, dass die Zahl an immunkompetenten Effektorzellen im peripheren Blut bei Krebspatienten manchmal herabgesetzt ist. Einige Patienten mit Her-2/Erb-2/Neu positiven Magenkarzinomen zeigten aus diesem Grund ein vermindertes Ansprechen auf die Therapie mit Herceptin (47). Dieses Problem könnte

umgangen werden, indem man versucht Immunzellen außerhalb des Körpers zu vermehren und bei Bedarf zurückzufundieren.

Das Ansprechen eines Patienten auf die Therapie mit monoklonalen Antikörpern hängt auch von der Beschaffenheit der „Fc“-Rezeptoren auf seinen Immunzellen ab, die an das „Fc“-Teil des Antikörpers binden. Einige Gene, die für „Fc“-Rezeptoren kodieren, weisen Polymorphismen auf. Dies bewirkt, dass sich die Rezeptoren in ihrer Fähigkeit IgGs zu binden und damit „ADCC“ zu vermitteln, unterscheiden. So waren z. B. in der Therapie von follikulären Lymphomen mit Rituximab (96) die „Fc“ γ RIIIa 158v/v und „Fc“ γ RIIa 131 his/his Genotypen der „Fc“-Rezeptoren assoziiert mit gutem Ansprechen und Progressionsfreiheit. Das V (valine) Allel des „Fc“ γ RIIIa hatte eine größere Affinität für IgG1 und IgG3 als das F (Phenylalanin) Allel und übermittelte „ADCC“ effektiver.

Aufgrund der oben erläuterten Erkenntnisse ist man bemüht, Wege zu finden, die Therapie mit monoklonalen Antikörpern weiter zu optimieren. Der Erfolg der Therapie ist eng verknüpft mit der Konzentration der Zielantigene auf den Tumorzellen (73, 98). Um die Bindung von Antikörpern an die begrenzt vorhandenen Oberflächenantigene zu verbessern, könnte man einen Pool von Antikörpern verwenden, die sich gegen verschiedene Epitope des Antigens richten. Dies wurde schon in vitro und in vivo im Mausmodell erfolgreich mit einem Pool aus Antikörpern, die sich alle gegen Epitope von Her-2/Erb-2/Neu richteten, untersucht. Die Verabreichung der verschiedenen Antikörper war effektiver als die Gabe eines einzelnen (86). Ein weiterer Ansatz, den Therapieerfolg mit monoklonalen Antikörpern zu steigern, wäre die Blockade des inhibitorisch wirkenden „Fc“ γ RIIb-Rezeptors. Es wird vermutet, dass die verabreichten Antikörper an diesen Rezeptor auf den Immunzellen binden und ihre Wirkung damit selbst herunterregulieren (89, 42).

Durch Stimulation von Immunzellen mit IL2, wie es auch im praktischen Teil dieser Arbeit geschehen ist, kann die Effektivität der Effektorzellen gesteigert werden. Dies konnte auch bei in vitro und in vivo „ADCC“-Versuchen mit Mamma-Karzinomen und Herceptin beobachtet werden (14, 84).

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob sich der Antikörper cmHsp70.1 eignet, um „ADCC“ auszulösen. Dazu wurden Immunzellen aus Mäusemilzen in verschiedenen Konzentrationen, Hsp70 positive Kolonkarzinomzellen aus der Maus und der monoklonale Antikörper cmHsp70.1 verwendet. Dieser bindet an das Hsp70 auf der Oberfläche der Tumorzellen. Sein „Fc“-Teil kann dann von den „Fc“-Rezeptoren auf den Immunzellen erkannt und gebunden werden, und die Immunzellen können die Tumorzellen abtöten. Die im praktischen Teil dieser Arbeit durchgeführten Versuche geben einen Hinweis darauf, dass Immunzellen unter Anwesenheit von cmHsp70.1 die Tumorzellen leichter erkennen und effektiver töten können, als ohne den Antikörper. Die Leistung der Immunzellen ließ sich noch steigern, indem man sie mit IL2 oder mit IL2 plus TKD stimulierte.

Auch die in vivo im Mausmodell bereits durchgeführten Versuche unserer Arbeitsgruppe mit cmHsp70.1 (hier nicht veröffentlichte Daten) zeigen, dass cmHsp70.1 geeignet ist, Immunzellen zur gezielten Tötung von Tumorzellen anzuregen und damit das Tumorwachstum einzudämmen.

Ein entscheidender Vorteil von cmHsp70.1 gegenüber anderen monoklonalen Antikörpern ist, dass das Antigen, gegen das er sich richtet, nur auf Tumoren und bisher nicht auf Normalgewebe gefunden wurde. Er könnte in der Therapie vieler verschiedener Tumorentitäten zum Einsatz kommen, da Hsp70 von sehr vielen Tumoren auf der Oberfläche exprimiert wird. Dadurch, dass die gamma-Strahlung und Substanzen, die häufig in der Tumorthherapie eingesetzt werden, eine Hochregulation von Hsp70 auf der Tumoroberfläche bewirken, wäre eine Kombination von bereits etablierten Methoden mit dem cmHsp70.1 Antikörper sehr gut denkbar.

Die Tatsache, dass Metastasen von Hsp70 positiven Tumoren mehr Hsp70 auf der Oberfläche tragen, könnte einen entscheidenden Vorteil in der Behandlung von metastasierten Tumorstadien bringen. Hier könnte verstärkt cmHsp70.1 zusätzlich zu den üblichen Therapieoptionen eingesetzt werden.

Insgesamt stellt dieser Antikörper einen vielversprechenden Ansatz in der Tumorthherapie dar.

7 Literaturverzeichnis

1. Ahmad, A., Menezes, J.: Antibody-dependent cellular cytotoxicity in HIV infections. *FASEB J* 10 (1999) 258-266
2. Arnold-Schild, D., Hanau, D., Spehner, D., Schmid, C., Rammensee, H.G., de la Salle, H., Schild, H.: Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *J. Immunol.* 162 (1999) 3757-3760
3. Basu, S., Binder, R.J., Ramalingam, T., Srivastava, P.K.: CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* 14 (2001) 303-313
4. Biassoni, R., Cantoni, C., Pende, D., Sivori, S., Parolini, S., Vitale, M., Bottino, C., Moretta, A.: Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol Rev* 181 (2001) 203-214
5. Binder, R.J., Han, D.K., Srivastava, P.K.: CD91: a receptor for heat shock protein gp96. *Nat. Immunol.* 1 (2000) 151-155
6. Binder, R.J., Vatner, R., Srivastava, P.: The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. *Tissue Antigens* 64 (2004) 442-451
7. Botzler, C., Kis, K., Issels, R., Multhoff, G.: A comparison of the effects of ifosfamide vs. mafosfamide treatment on intracellular glutathione levels and immunological functions of immunocompetent lymphocyte subsets. *Exp Hematol* 25 (1997) 338-344
8. Botzler, C., Li, G., Issels, R.D., Multhoff, G.: Definition of extracellular localized epitopes of Hsp70 involved in an NK immune response. *Cell Stress Chaperones* 3 (1998) 6-11

9. Boyle, J.J.: Human macrophages kill human mesangial cells by Fas-L-induced apoptosis when triggered by antibody via CD16. *Clin Exp Immunol* 137 (2004) 529-537
10. Brizel, D.M., Dodge, R.K., Clough, R.W., Dewhirst, M.W.: Oxygenation of head and neck cancer: Changes during radiotherapy and impact on treatment outcome. *Radiother Oncol* 53 (1999) 113-117
11. Brizel, D.M., Sibley, G.S., Prosnitz, L.R., Scher, R.L., Dewhirst, M.W.: Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 38 (1997) 285-289
12. Budach, V., Stuschke, M., Budach, W., Baumann, M., Geismar, D., Grabenbauer, G., Lammert, I., Jahnke, K., Stueben, G., Herrmann, T., Bamberg, M., Wust, P., Hinkelbein, W., Wernecke, K.D.: Hyperfractionated accelerated chemoradiation with concurrent fluorouracilmitomycin is more effective than dose-escalated hyperfractionated accelerated radiation therapy alone in locally advanced head and neck cancer: final results of the radiotherapy cooperative clinical trials group of the German Cancer Society 95-06 Prospective Randomized Trial. *J Clin Oncol* 23 (2005)1125–1135
13. Calderwood, S.K., Khaleque, M.A., Sawyer, D.B., Ciocca, D.R.: Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem. Sci.* 31 (2006) 164-172
14. Carson, W.E., Parihar, R., Lindemann, M.J., Personeni, N., Dierksheide, J., Meropol, N.J., Baselga, J., Caligiuri, M.A.: Interleukin-2 enhances the natural killer cell response to Herceptin-coated Her2/neu-positive breast cancer cells. *Eur J Immunol* 31 (2001) 3016-3025
15. Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., Watier, H.: Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* 99 (2002) 754-758

16. Ciocca, D.R., Calderwood, S.K.: Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 10 (2005) 86-103
17. Corley, D.A., Kerlikowske, K., Verma, R., Buffler, P.: Protective association of aspirin/NSAIDs and esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology* 124 (2003) 47-56
18. Demanet, C., Mulder, A., Deneys, V., Worsham, M.J., Maes, P., Claas, F.H., Ferrone, S.: Down-regulation of HLA-A and HLA-Bw6, but not HLA-Bw4, allospecificities in leukemic cells: an escape mechanism from CTL and NK attack? *Blood* 103 (2004) 3122-3130
19. Dorling, A., Monk, N.J., Lechler, R.I.: HLA-G inhibits the transendothelial migration of human NK cells. *Eur J Immunol* 30 (2000) 586-593
20. Dunst, J., Stadler, P., Becker, A., Lautenschläger, C., Pelz, T., Hänsgen, G., Molls, M., Kuhnt, T.: Tumor volume and tumor hypoxia in head and neck cancers. The amount of the hypoxic volume is important. *Strahlenther Onkol* 179 (2003) 521-526
21. Eissner, G., Multhoff, G., Gerbitz, A., Kirchner, S., Bauer, S., Haffner, S., Sondermann, D., Andreesen, R., Holler, E.: Fludarabine induces apoptosis, activation, and allogenicity in human endothelial and epithelial cells: protective effect of defibrotide. *Blood* 100 (2002) 334-340
22. Ernst, L.K., Metes, D., Herberman, R.B., Morel, P.A.: Allelic polymorphisms in the FcγRIIc gene can influence its function on normal human natural killer cells. *J Mol Med* 80 (2002) 248-257
23. Fang, F.M., Liu, Y.T., Tang, Y., Wang, C.J., Ko, S.F.: Quality of life as a survival predictor for patients with advanced head and neck carcinoma treated with radiotherapy. *Cancer* 100 (2004) 425-432

24. Farrow, D.C., Vaughan, T.L., Hansten, P.D., Stanford, J.L., Risch, H.A., Gammon, M.D., Chow, W.H., Dubrow, R., Ahsan, H., Mayne, S.T., Schoenberg, J.B., West, A.B., Rotterdam, H., Fraumeni, J.F. Jr., Blot, W.J.: Use of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of esophageal and gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev* 7 (1998) 97-102
25. Fu, K.K., Pajak, T.F., Trotti, A., Jones, C.U., Spencer, S.A., Phillips, T.L., Garden, A.S., Ridge, J.A., Cooper, J.S., Ang, K.K.: A Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) phase III randomized study to compare hyperfractionation and two variants of accelerated fractionation to standard fractionation radiotherapy for head and neck squamous squamous cell carcinomas: first report of RTOG 9003. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 48 (2000) 7-16
26. Gabai, V.L., Meriin, A.B., Yaglom, J.A., Wei, J.Y., Mosser, D.D., Sherman, M.Y.: Suppression of stress kinase JNK is involved in HSP72-mediated protection of myogenic cells from transient energy deprivation. HSP72 alleviates the stress-induced inhibition of JNK dephosphorylation. *J.Biol.Chem.* 275 (2000) 38088-38094
27. Garcia, M., Jemal, A., Ward, E.M., Center, M.M., Hao, Y., Siegel, R.L., Thun, M.J.: *Global Cancer Facts & Figures 2007*. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2007
28. Gastpar, R., Gehrman, M., Bausero, M.A., Asea, A., Gross, C., Schroeder, J.A., Multhoff, G.: Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res* 65 (2005) 5238-5247
29. Gehrman, M., Brunner, M., Pfister, K., Reichle, A., Kremmer, E., Multhoff, G.: Differential up-regulation of cytosolic and membrane-bound heat shock protein70 in tumor cells by anti-inflammatory drugs. *Clin Cancer Res* 10 (2004) 3354-3364
30. Gehrman, M., Marienhagen, J., Eichholtz-Wirth, H., Fritz, E., Ellwart, J., Jaattela, M., Zilch, T., Multhoff, G.: Dual function of membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70), Bag-4, and Hsp40: protection against radiation-induced effects and target structure for natural killer cells. *Cell Death Differ* 12 (2005a) 38-51

31. Gehrmann, M., Pfister, K., Hutzler, P., Gastpar, R., Margulis, B., Multhoff, G.: Effects of antineoplastic agents on cytoplasmic and membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70) levels. *Biol Chem* 383 (2002) 1715-1725
32. Gehrmann, M., Schmetzer, H., Eissner, G., Haferlach, T., Hiddemann, W., Multhoff, G.: Membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70) in acute myeloid leukemia: a tumor specific recognition structure for the cytolytic activity of autologous NK cells. *Haematologica* 88 (2003) 474-476
33. Gehrmann, M., Schonberger, J., Zilch, T., Rossbacher, L., Thonigs, G., Eilles, C., Multhoff, G.: Retinoid- and sodium-butyrate-induced decrease in heat shock protein 70 membrane-positive tumor cells is associated with reduced sensitivity to natural killer cell lysis, growth delay, and altered growth morphology. *Cell Stress Chaperones* 10 (2005b) 136-146
34. Gidding, C.E., Kellie, S.J., Kamps, W.A., de Graaf, S.S.: Vincristine revisited. *Crit Rev Oncol Hematol* 29 (1999) 267-287
35. Giovannucci, E., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Ascherio, A., Willet, W.C.: Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. *Ann Intern Med* 121 (1994) 241-246
36. Glennie, M.J., van de Winkel, J.G.: Renaissance of cancer therapeutic antibodies. *Drug Discov Today* 8 (2003) 503-510
37. Grosu, A.L., Souvatzoglou, M., Röper, B., Dobritz, M., Wiedenmann, N., Jacob, V., Wester, H.J., Reischl, G., Machulla, H.J., Schwaiger, M., Molls, M., Piert, M.: Hypoxia imaging with FAZA-PET and theoretical considerations with regard to dose painting for individualization of radiotherapy in patients with head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 69 (2007) 541-551
38. Herold, G.: Kolorektales Karzinom in „Innere Medizin-Eine vorlesungsorientierte Darstellung“. Herold, G., Köln (2007) 441-446

39. Iannello, A., Ahmad, A.: Role of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the efficacy of therapeutic anti-cancer monoclonal antibodies. *Cancer Metastasis Rev* 24 (2005) 487-499
40. Jäättelä, M.: Escaping cell death: Survival proteins in cancer (Review). *Exp. Cell Res.* 248 (1999) 30-43
41. Jäättelä, M.: Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann. Med.* 31 (1999) 261-271
42. Jacobs, S.A., Foon, K.A.: Monoclonal antibody therapy of leukemias and lymphomas. *Expert Opin Biol Ther* 5 (2005) 1225-1243
43. Johnson, T.W., Anderson, K.E., Lazovich, D., Folsom, A.R.: Association of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drug use with breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 11 (2002) 1586-1591
44. Kaur, J., Ralhan, R.: Induction of apoptosis by abrogation of HSP70 expression in human oral cancer cells. *Int. J. Cancer* 85 (2000) 1-5
45. Keefe, D.L.: Trastuzumab-associated cardiotoxicity. *Cancer* 95 (2002) 1592-1600
46. Koch, M., Weitz, J., Kienle, P., Benner, A., Willeke, F., Lehnert, T., Herfarth, C., von Knebel Doeberitz, M.: Comparative analysis of tumor cell dissemination in mesenteric, central, and peripheral venous blood in patients with colorectal cancer. *Arch Surg* 136 (2001) 85-89
47. Kono, K., Takahashi, A., Ichihara, F., Sugai, H., Fujii, H., Matsumoto, Y.: Impaired antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by herceptin in patients with gastric cancer. *Cancer Res* 62 (2002) 5813-5817
48. Krause, S.W., Gastpar, R., Andreesen, R., Gross, C., Ullrich, H., Thonigs, G., Pfister, K., Multhoff, G.: Treatment of colon and lung cancer patients with ex vivo heat shock protein 70-peptide-activated, autologous natural killer cells: a clinical phase I trial. *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 3699-3707

49. Kumar, S., Pandey, M., Lal, P., Rastogi, N., Maria Das, K.J., Dimri, K.: Concomitant boost radiotherapy with concurrent weekly cisplatin in advanced head and neck cancers: a phase II trial. *Radiother Oncol* 75 (2005)186–192
50. Lefebvre, S., Antoine, M., Uzan, S., McMaster, M., Dausset, J., Carosella, E.D., Paul, P.: Specific activation of the non-classical class I histocompatibility HLA-G antigen and expression of the ILT2 inhibitory receptor in human breast cancer. *J Pathol* 196 (2002) 266-274
51. Li, H., Sanchez-Torres, J., Del Carpio, A., Salas, V., Villalobo, A.: The ErbB2/Neu/HER2 receptor is a new calmodulinbinding protein. *Biochem J* 381 (2004) 257-266
52. Melamed, M.R., Mullaney, P.F., Shapiro, H.M.: An historical review of the development of flow cytometers and sorters. *Flow Cytometry And Sorting*, Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L., Wiley-Liss, Inc. New York, 1990, second edition, 1-9
53. Metes, D., Gambotto, A.A., Nellis, J., Ruscin, A., Stewart-Akers, A.M., Morel, P.A., Rao, A.S.: Identification of the CD32/FcγRIIc-Q13/STP13 polymorphism using an allele-specific restriction enzyme digestion assay. *J Immunol Methods* 258 (2001) 85-95
54. Morel, P.A., Ernst, L.K., Metes, D.: Functional CD32 molecules on human NK cells. *Leuk Lymphoma* 35 (1999) 47-56
55. Multhoff, G., Astner, S.T.: Role of the immune system in cancer development and therapeutic implications. In press.
56. Multhoff, G., Botzler, C., Jennen, L., Schmidt, J., Ellwart, J., Issels, R.: Heat shock protein 72 on tumor cells: a recognition structure for natural killer cells. *J Immunol* 158 (1997) 4341-4350

57. Multhoff, G., Botzler, C., Wiesnet, M., Muller, E., Meier, T., Wilmanns, W., Issels, R.D.: A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *Int J Cancer* 61 (1995) 272-279
58. Multhoff, G., Mizzen, L., Winchester, C.C., Milner, C.M., Wenk, S., Eissner, G., Kampinga, H.H., Laumbacher, B., Johnson, J.: Heat shock protein 70 (Hsp70) stimulates proliferation and cytolytic activity of natural killer cells. *Exp Hematol* 27 (1999) 1627-1636
59. Multhoff, G., Pfister, K., Botzler, C., Jordan, A., Scholz, R., Schmetzer, H., Burgstahler, R., Hiddemann, W.: Adoptive transfer of human natural killer cells in mice with severe combined immunodeficiency inhibits growth of Hsp70-expressing tumors. *Int J Cancer* 88 (2000) 791-797
60. Multhoff, G.: Heat shock protein 70 (Hsp70): Membrane location, export and immunological relevance. *Methods* 43 (2007) 229-237
61. Nanbu, K., Konishi, I., Mandai, M., Kuroda, H., Hamid, A.A., Komatsu, T., Mori, T.: Prognostic significance of heat shock proteins Hsp70 and Hsp90 in endometrial carcinomas. *Cancer Detect. Prev.* 22 (1998) 549-555
62. Neckers, L., Ivy, S.P.: Heat shock protein 90. *Curr. Opin. Oncol.* 15 (2003) 419-424
63. Nordmark, M., Bentzen, S.M., Rudat, V., Brizel, D., Lartigau, E., Stadler, P., Becker, A., Adam, M., Molls, M., Dunst, J., Terris, D.J., Overgaard, J.: Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiother Oncol* 77 (2005) 18-24
64. Nordmark, M., Overgaard, J.: Tumor hypoxia is independent of hemoglobin and prognostic for loco-regional tumor control after primary radiotherapy in advanced head and neck cancer. *Acta Oncol* 43 (2004) 396-403
65. Nylandsted, J., Brand, K. & Jäättelä, M.: Heat shock protein 70 is required for the survival of cancer cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 926 (2000) 122-125

66. Ormerod, M.G.: Flow Cytometry. A practical approach, Oxford University Press, Oxford (1994) second edition, 280 Seiten
67. Otten, M.A., Rudolph, E., Dechant, M., Tuk, C.W., Reijmers, R.M., Beelen, R.H., van de Winkel, J.G., van Egmond, M.: Immature neutrophils mediate tumor cell killing via IgA but not IgG Fc receptors. *J Immunol* 174 (2005) 5472-5480
68. Papamichail, M., Perez, S.A., Gritzapis, A.D., Baxevanis, C.N.: Natural killer lymphocyte: biology, development, and function. *Cancer Immunol Immunother* 53 (2003) 176-186
69. Pfister, K., Radons, J., Busch, R., Tidball, J.G., Pfeifer, M., Freitag, L., Feldmann, H.J., Milani, V., Issels, R., Multhoff, G.: Patient survival by Hsp70 membrane phenotype: association with different routes of metastasis. *Cancer* 110 (4) (2007) 926-935
70. Piper, W., Adaptive Immunität in „Innere Medizin“, Piper, W., Springer Medizin Verlag, Heidelberg (2007) 715-717
71. Plataniotis, G.A., Theofanopoulou, M.E., Kalogera-Fountzila, A., Haritanti, A., Ciuleanu, E., Ghilezan, N., Zamboglou, N., Dimitriadis, A., Sofroniadis, I., Fountzilas, G.: Prognostic impact of tumor volumetry in patients with locally advanced head-and-neck carcinoma (non-nasopharyngeal) treated by radiotherapy alone or combined radiochemotherapy in a randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 59 (2004) 1018-1026
72. Pockley, A.G., Georgiades, A., Thulin, T., de Faire, U., Frostegard, J.: Serum heat shock protein 70 levels predict the development of atherosclerosis in subjects with established hypertension. *Hypertension* 42 (2003) 235-238
73. Ravetch, J.V., Bolland, S.: IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 19 (2001) 275-290
74. Ritossa, P.: Problems of prophylactic vaccinations of infants. *Riv. 1st Sieroter. Ital.* 37 (1962) 79-108

75. Röper, B., Nüse, N., Busch, R., Zimmermann, F.B., Nährig, J., Molls, M.: Tissue characterization of locoregionally advanced head-and-neck squamous cell carcinoma (HNSCC) using quantified ultrasonography: A prospective phase II study on prognostic relevance. *Radiother Oncol* 85 (2007) 48-57
76. Sack, U., Rothe, G., Barlage, S., Kabelitz, D., Kleine, T.O., Lun, A., Renz, H., Ruf, A. und Schmitz, G.: Flow cytometry in clinical diagnostics. Position paper of the working group flow cytometry and quantitative microscopy of the german society for clinical chemistry and the german society for laboratory medicine. *J.Lab.Med.*, 24 (2000) 277-297
77. Schmitt, E., Gehrman, M., Brunte, M., Multhoff, G., Garrido, C.: Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol* 81 (2007)15-27
78. Schmitz, G., Rothe, G.: *Durchflusszytometrie in der klinischen Diagnostik*. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Germany (1994), 559 Seiten
79. Semrau, R., Mueller, R.P., Stuetzer, H., Staar, S., Schroeder, U., Guntinas-Lichius, O., Kocher, M., Eich, H.T., Dietz, A., Flentje, M., Rudat, V., Volling, P., Schroeder, M., Eckel, H.E.: Efficacy of intensified hyperfractionated and accelerated radiotherapy and concurrent chemotherapy with carboplatin and 5-fluorouracil: updated results of a randomized multicentric trial in advanced head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 64 (2006)1308-16
80. Shapiro, H.M.: *Practical Flow Cytometry*, Wiley-Liss, Inc., New York (1995) third edition, 542 Seiten
81. Sherman, M., Multhoff, G.: Heat shock proteins in cancer. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1113 (2007) 192-201
82. Shi, Y., Thomas, J.O.: The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol. Cell. Biol.* 12 (1992) 2186-2192

83. Sliwkowski, M.X., Lofgren, J.A., Lewis, G.D., Hotaling, T.E., Fendly, B.M., Fox, J.A.: Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol* 26 (1999) 60-70
84. Sondel, P.M., Hank, J.A.: Combination therapy with interleukin-2 and anti-tumor monoclonal antibodies. *Cancer J Sci Am* 3 (1997) 121-127
85. Sondermann, H., Becker, T., Mayhew, M., Wieland, F., Hartl, F.U.: Characterization of a receptor for heat shock protein 70 on macrophages and monocytes. *Biol. Chem.* 381 (2000) 1165-1174
86. Spiridon, C.I., Ghetie, M.A., Uhr, J., Marches, R., Li, J.L., Shen, G.L., Vitetta, E.S.: Targeting multiple Her-2 epitopes with monoclonal antibodies results in improved antigrowth activity of a human breast cancer cell line in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 8 (2002) 1720-1730
87. Stadler, P., Becker, A., Feldmann, H.J., Hänsgen, G., Dunst, J., Würschmidt, F., Molls, M.: Influence of the hypoxic subvolume on the survival of patients with head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 44 (1999) 749-754
88. Stangl, S., Wortmann, A., Guertler, U., Multhoff, G.: Control of metastasized pancreatic carcinomas in SCID/beige mice with human IL-2/TKD-activated NK cells. *J Immunol* 176 (2006) 6270-6276
89. Stefanescu, R.N., Olfieriev, M., Liu, Y., Pricop, L.: Inhibitory Fc gamma receptors: from gene to disease. *J Clin Immunol* 24 (2004) 315-326
90. Stockmeyer, B., Beyer, T., Neuhuber, W., Repp, R., Kalden, J.R., Valerius, T., Herrmann, M.: Polymorphonuclear granulocytes induce antibody-dependent apoptosis in human breast cancer cells. *J Immunol* 171 (2003) 5124-5129
91. Thun, M.J., Namboodiri, M.M., Heath, C.W.Jr.: Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med* 325 (1991) 1593-1596

92. Tobinai, K., Watanabe, T., Ogura, M., Morishima, Y., Ogawa, Y., Ishizawa, K., Minami, H., Utsunomiya, A., Taniwaki, M., Terauchi, T., Nawano, S., Matsusako, M., Matsuno, Y., Nakamura, S., Mori, S., Ohashi, Y., Hayashi, M., Seriu, T., Hotta, T.: Phase II study of oral fludarabine phosphate in relapsed indolent B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 24 (2006) 174-180
93. Tobinai, K.: 4. Antibody therapy for malignant lymphoma. *Intern Med* 46 (2007) 99-100
94. Vaupel, P.: Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin Radiat Oncol* 14 (2004) 198-206
95. Wei, Y.Q., Zhao, X., Kariya, Y., Teshigawara, K., Uchida, A.: Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by abrogation of heat-shock protein (Hsp) 70 expression in tumor cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 40 (1995) 73-78
96. Weng, W.K., Levy, R.: Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 21 (2003) 3940-3947
97. Wiltrout, R.H.: Regulation and antimetastatic functions of liver-associated natural killer cells. *Immunol Rev* 174 (2000) 63-76
98. Xia, M.Q., Hale, G., Lively, M.R., Ferguson, M.A., Campbell, D., Packman, L., Waldmann, H.: Structure of the CAMPATH-1 antigen, a glycosyl-phosphatidylinositol-anchored glycoprotein, which is an exceptionally good target for complement lysis. *Biochem J* 293 (1993) 633-640