

Aus dem Institut für Pathophysiologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Modulation der antitumoralen Wirkung der Antikörper catumaxomab und
ertumaxomab durch Glukokortikoide in multizellulären Tumorsphäroiden
der Zelllinien Fadu und Fadu-E593

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Markus Lehr
geboren in Wiesbaden

Mainz, 2025

Dieses Werk steht unter der Lizenz: Namensnennung (CC-BY-4.0)

Wissenschaftlicher
Vorstand:

Univ.-Prof. Dr. H. Schild

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

05.09.2025

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung und Zielsetzung der Arbeit	1
1.1 Krebserkrankung	1
1.2 Zielsetzung der Arbeit	12
2 Literaturdiskussion	13
2.1 Therapie der Krebserkrankung	13
2.1.1 Klassische Therapien	13
2.1.2 Immunologische Therapien	14
2.2 Multizelluläre Tumorsphäroide (MCTS)	28
2.2.1 Unterschiede zwischen multizellulärer Tumor-sphäroidkultur und Monolayerkultur	29
2.2.2 Aufbau von multizellulären Tumorsphäroiden	29
2.2.3 Bedeutung in der Arzneimittelforschung	30
3 Materialien und Methoden	32
3.1 Zellkultur und Zelltechniken	32
3.1.1 Verwendete Zelllinien	32
3.1.2 Medien und Zusätze	32
3.1.3 Spinnerflaschen	32
3.1.4 Kultivierung der Zellen und Medienwechsel	33
3.1.5 Passagieren	33
3.1.6 Anlegen von Kryostocks	34
3.1.7 Auftauen von Zellen aus dem Kryostock	34
3.1.8 Multizelluläre Tumorsphäroide	35
3.1.9 Mykoplasmentest	35
3.1.10 Isolierung von PBMC aus einem Buffy Coat	37
3.1.11 Größenbestimmung der Sphäroide	38
3.1.12 Klonogenitätstest	39
3.1.13 Vitalitätstest	39

3.1.14	Behandlung der Zellen und MCTS mit Antikörpern und Kortikosteroiden.....	40
3.2	Immunhistologie an Sphäroidschnitten.....	41
3.3	Zytokinmessung mittels Cytokine Bead Array von IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6 und IL10	42
4	Ergebnisse	44
4.1	Wachstum von FaDu-MCTS ohne Behandlung.....	44
4.1.1	Sphäroidvolumen vom Zeitpunkt der Initiation bis zum Start des Versuchs	44
4.1.2	Zellzahl der MCTS.....	45
4.2	Behandlung von FaDu-MCTS mit catumaxomab und Dexamethason	46
4.2.1	Volumenentwicklung der MCTS	46
4.2.2	Vitalitätstest der disaggregierten MCTS	48
4.2.3	Klonogenität der disaggregierten MCTS.....	50
4.2.4	Zytokinbestimmungen	52
4.3	Dosis-Wirkungsbeziehung von Prednisolon auf das Wachstum von FaDu-MCTS unter ertumaxomab	55
4.4	Behandlung der FaDu-MCTS mit ertumaxomab und Prednisolon.....	58
4.4.1	Volumenentwicklung der MCTS während der Behandlung	58
4.4.2	Immunhistologische Färbungen der FaDu-Sphäroidschnitte.....	60
4.5	Dosis-Wirkungsbeziehung von ertumaxomab auf das Wachstum von FaDu-E593-MCTS.....	68
4.6	Behandlung der FaDu E593 MCTS mit ertumaxomab und Prednisolon	71
4.6.1	Volumenentwicklung der MCTS während der Behandlung	71
4.6.2	Immunhistologische Färbungen der FaDu E593 Sphäroidschnitte.....	75
4.7	Behandlung von FaDu-E593-Monolayerkulturen mit Prednisolon.....	83
5	Diskussion	84
5.1	Beurteilung des MCTS 3D-Modells in Spinnerflaschen.....	84
5.2	Beurteilung der Sphäroidprozessierung nach Entnahme aus der Spinnerkultur	86
5.3	Wirkungsweise der Immuntherapeutika und Immunsuppressiva.....	87
5.3.1	catumaxomab.....	87

5.3.2	ertumaxomab.....	89
5.3.3	Glukokortikoide.....	92
5.4	Diskussion der Ergebnisse	95
5.4.1	Sphäroidwachstum und Zugabe der PBMC ohne Therapie	95
5.4.2	Therapie der FaDu-Sphäroide mit catumaxomab und Dexamethason	98
5.4.3	Therapie der FaDu- und E593-Sphäroide mit ertumaxomab und Prednisolon	101
5.4.4	Ausblick	105
6	Zusammenfassung	106
7	Literaturverzeichnis	108
8	Anhang	124
8.1	Chemikalien und Reagenzien.....	124
8.1.1	Chemikalien.....	124
8.1.2	Medien und Zusätze	125
8.1.3	Puffer und Lösungen	125
8.1.4	Kits	126
8.2	Geräte	126
8.3	Verbrauchsmaterial	127
8.4	Software	128
8.5	Datentabellen	129

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity
ADEPT	antibody directed enzyme prodrug therapy
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovine serum albumin
CASY	cell counter and analyser system
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
COX	Cyclooxygenase
CSF	colony stimulating factor
CTL	cytotoxic T lymphocyte
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
dpi	dots per inch
EDTA	Ethylendiamintetraacetic acid
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
F(ab)	fragment antigen binding
Fc	fragment crystallizable
FCS	fetal calf serum
HAMA	human anti-mouse antibody
HARA	human anti-rat antibody
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HSP	heat shock protein
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
LSM	leukocyte separating medium

M	molar (mol/l)
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCTS	multicellular tumor spheroid
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	messenger ribonucleic acid
MW	Mittelwert
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NK	natural killer (cell)
NKT	natural killer T (cell)
NSCLC	non small cell lung cancer
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	plating efficiency
pH	potentia hydrogenii
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
SEREX	serological identification of antigens by recombinant expression cloning
TAA	tumor associated antigen
TAM	tumor associated macrophage
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TGF	transforming growth factor
Th	helper T (cell)
TNF	tumor necrosis factor
VEGF	vascular endothelial growth factor
XTT	tetrazolium salt

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klassische Merkmale von Tumorzellen (Hanahan und Weinberg 2011).....	2
Abbildung 2: Aufkommende Merkmale von Tumorzellen und begünstigende Faktoren (Hanahan und Weinberg 2011).....	8
Abbildung 3: Postulierter Trizellkomplex (Seimetz 2011).	22
Abbildung 4: Entstehung von malignem Aszites bei Peritonealkarzinomatose.	23
Abbildung 5: Wirkpotenz und Wirkdauer einiger Glukokortikoide in Bezug auf Hydrokortison (Steroids. 1997).....	27
Abbildung 6: Gradienten von Nährstoffen, Abbauprodukten und Sauerstoff in einem Tumor (a) und einem Tumorsphäroid (b).....	30
Abbildung 7: Volumen der FaDu-Sphäroide in einer 96 Well-Platte und ab Tag 7 in einer Spinnerflasche von der Initiation (Tag d = 0) bis zum Start des Versuchs (d = 14). Es ist jeweils der Mittelwert der acht vermessenen Sphäroide mit der zugehörigen Standardabweichung dargestellt.	45
Abbildung 8: Mittlere Zellzahlen der disaggregierten Sphäroide vom Tag (d) der Initiation (d = 0) bis zum Versuchsstart (d = 14).....	46
Abbildung 9: Volumenprogression der FaDu-MCTS unter der Zugabe von catumaxomab und Dexamethason.....	47
Abbildung 10: XTT-Test ein Tag nach Versuchsbeginn aus disaggregierten Sphäroiden.....	49
Abbildung 11: XTT-Test fünf Tage nach Versuchsbeginn aus disaggregierten Sphäroiden.....	49
Abbildung 12: PE Test aus disaggregierten Sphäroiden an Versuchstag 1.	51
Abbildung 13: PE Test aus disaggregierten Sphäroiden an Versuchstag 5.	52
Abbildung 14: Konzentrationen der verschiedenen Zytokine aus Medienüberständen am ersten Tag des Versuchs.	53
Abbildung 15: Konzentrationen der verschiedenen Zytokine aus Medienüberständen am fünften Tag des Versuchs.	54
Abbildung 16: Konzentrationen der verschiedenen Zytokine aus Medienüberständen am siebten Tag des Versuchs.	54

Abbildung 17: Konzentrationen der verschiedenen Zytokine aus Medienüberständen am zehnten Tag des Versuchs.	55
Abbildung 18: Volumenprogression der FaDu MCTS unter der Zugabe von 10 ng/ml ertumaxomab, und steigender Dosen Prednisolon. Abgesehen von der Kontrolle enthält jeder Ansatz 2 µl Ethanol (EtOH). Für eine genauere Erläuterung der Legende siehe Tabelle 3.....	57
Abbildung 19: Volumenprogression der FaDu MCTS unter der Zugabe von ertumaxomab und Prednisolon. Detaillierte Beschreibung der Legende siehe Tabelle 4.	59
Abbildung 20: HE Übersichtsfärbung der FaDu-Sphäroidschnitte aus allen Ansätzen des Versuchs an Tag 5. Detaillierte Beschreibung der Legende siehe Tabelle 4.	61
Abbildung 21: CD45 Färbung der FaDu-Sphäroidschnitte an Tag 5 des Versuchs zur Darstellung der Leukozyten. Detaillierte Beschreibung der Legende siehe Tabelle 4.	63
Abbildung 22: HER-2 Färbung der FaDu-Sphäroidschnitte an Tag 5 des Versuchs zur Darstellung des Expressionsniveaus in den FaDu-Sphäroiden. Detaillierte Beschreibung der Legende siehe Tabelle 4.	65
Abbildung 23: Ki67 Färbung der FaDu-Sphäroidschnitte an Tag 5 des Versuchs zur Darstellung der Proliferationsaktivität in den FaDu-Sphäroiden. Detaillierte Beschreibung der Legende siehe Tabelle 4.	67
Abbildung 24: Wirkung verschiedener ertumaxomab Dosen (grüne Linien und Symbole) auf das Volumen von HER-2 transfizierten FaDu E593 Sphäroiden. Für detaillierte Angaben zur Legende siehe Tabelle 5.....	69
Abbildung 25: Volumenprogression der FaDu E593 MCTS unter der Zugabe von ertumaxomab und Prednisolon. Für eine ausführlichere Erklärung der Legende siehe Tabelle 7.....	72
Abbildung 26: Volumenprogression der FaDu E593 MCTS unter der Zugabe von ertumaxomab und Prednisolon. Für eine ausführlichere Erklärung der Legende siehe Tabelle 8.....	74

Abbildung 27: HE Färbung der FaDu E593 Sphäroide aus dem Kontrollansatz an verschiedenen Tagen des Versuchs.	76
Abbildung 28: HER2 Färbung der FaDu E593 Sphäroide aus dem Kontrollansatz an verschiedenen Tagen des Versuchs.....	77
Abbildung 29: Ki67 Färbung der FaDu E593 Sphäroide aus dem Kontrollansatz an verschiedenen Tagen des Versuchs.....	78
Abbildung 30: HE Übersichtsfärbung der FaDu E593 Sphäroidschnitte aus allen Ansätzen des Versuchs an Tag 5. Legende siehe Tabelle 7.....	79
Abbildung 31: CD45 Leukozytenfärbung der FaDu E593 Sphäroidschnitte aus allen Ansätzen des Versuchs an Tag 5. Legende siehe Tabelle 7.....	80
Abbildung 32: HER-2 Färbung der FaDu E593 Sphäroidschnitte an Tag 5 des Versuchs zur Darstellung des Expressionsniveaus in den FaDu E593 Sphäroiden. Legende siehe Tabelle 7.....	81
Abbildung 33: Ki67 Färbung der FaDu E593 Sphäroidschnitte an Tag 5 des Versuchs zur Darstellung der Zellproliferation in den FaDu E593 Sphäroiden. Legende siehe Tabelle 7.....	82
Abbildung 34: XTT-Test von Monolayer Zellen nach zwei Tagen Inkubation mit dem Glukokortikoid. Die Ansätze enthalten jeweils FaDu E593 Zellen sowie verschiedene Konzentrationen Prednisolon. Anggegeben ist stets der Mittelwert aus vier Wells und die zugehörige Standardabweichung.	83

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	PCR Ansatz für den Nachweis von Mykoplasmen	36
Tabelle 2:	Zusammensetzung der Versuchsansätze 1 bis 9. In jedem Ansatz befinden sich 200 FaDu MCTS in 20 ml Medium.	47
Tabelle 3:	Zusammensetzung der verschiedenen Ansätze des Versuchs. In jedem Ansatz sind 200 FaDu E593 MCTS in 20 ml Medium.	57
Tabelle 4:	Zusammensetzung der verschiedenen Ansätze des Versuchs. In jedem Ansatz sind 200 FaDu MCTS in 20 ml Medium.	59
Tabelle 5:	Zusammensetzung der Ansätze zur Bestimmung der ertumaxomab Wirkung auf FaDu E593 Sphäroide.	68
Tabelle 6:	Relatives Volumen bezogen auf den Kontrollansatz am Ende des Versuchs (Tag 10).	70
Tabelle 7:	Zusammensetzung der verschiedenen Ansätze des Versuchs. In jedem Ansatz sind 200 FaDu E593 MCTS in 20 ml Medium.	72
Tabelle 8:	Zusammensetzung der verschiedenen Ansätze des Versuchs. In jedem Ansatz sind 200 FaDu E593 MCTS in 20 ml Medium.	74

1 Einleitung und Zielsetzung der Arbeit

1.1 Krebserkrankung

Mit dem Begriff Krebserkrankung werden Krankheitsbilder bezeichnet, die bösartige Gewebeneubildungen (maligne Neoplasien) enthalten. Zusätzlich zu diesen malignen Tumorerkrankungen werden umgangssprachlich auch Hämoblastosen (Erkrankungen des blutbildenden und lymphatischen Systems) wie z. B. Leukämien als Krebs bezeichnet.

Krebserkrankungen gehören in Deutschland zu den häufigsten Todesursachen. Im Jahr 2020 stehen sie mit 23,5 % aller Todesfälle auf Platz 2 hinter den Herz-Kreislauferkrankungen, die mit 34,3 % die Statistik weiterhin anführen. Dabei bleibt jedoch zu beachten, dass in den letzten 30 Jahren der Anteil der an Krebs verstorbenen Personen um beinahe 3 % zugenommen hat (1982 waren 20,7 % der Todesfälle auf eine Krebserkrankung zurückzuführen). Die Sterbefälle aufgrund von Herz-Kreislauferkrankungen sind im gleichen Zeitraum jedoch um mehr als 15 % zurückgegangen (1982 erlagen 52,5 % aller Verstorbenen einer Herz-Kreislauferkrankung) (Bundesamt 2022). Dies zeigt die Notwendigkeit einer Verbesserung der bestehenden Therapie sowie Entwicklung neuer Therapieansätze. Die bisherige klassische Behandlung von Tumoren besteht aus Bestrahlung, Chemotherapie oder Operation, wobei die Methoden auch kombiniert eingesetzt werden können (adjuvant nach der Operation oder neo-adjuvant vor der Operation). Die Problematik der Therapien besteht darin, dass sie ebenfalls erheblich gesundes Gewebe schädigen oder sogar selbst kanzerogen (krebsverursachend) wirken. Mit Hilfe neuer Strategien auf molekularbiologischer und immunologischer Ebene sollen die Behandlungen zielgerichteter auf Tumorzellen wirken ohne umgebendes Gewebe zu schädigen.

Da ein Tumor aus körpereigenen entarteten Zellen entsteht, wird bei der Tumorthherapie versucht, sich die durch die Mutation entstandenen Unterschiede zu gesunden Zellen zunutze zu machen.

Die klassischen Besonderheiten von Tumorzellen nach Hanahan und Weinberg sind in

Abbildung 1 dargestellt und beinhalten folgende Eigenschaften (Hanahan et al. 2011):

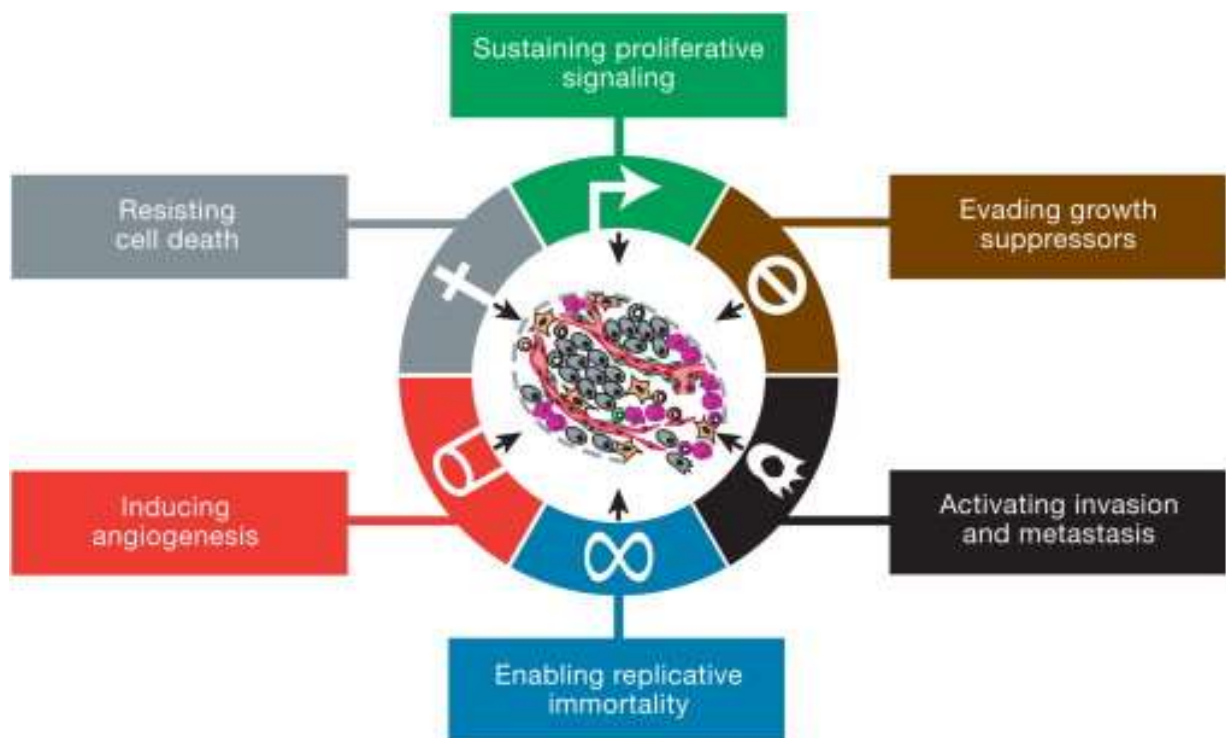


Abbildung 1: Klassische Merkmale von Tumorzellen (Hanahan und Weinberg 2011). **Krebszellen unterscheiden sich von normalen Zellen durch die Aufrechterhaltung proliferativer Signale, das Umgehen von wachstumshemmenden Signalen, die Fähigkeit zur Gewebsinvasion und -metastasierung, replikative Unsterblichkeit, die Induktion der Gefäßneubildung sowie der Resistenz gegenüber apoptotischen Mechanismen.**

Aufrechterhaltung proliferativer Signale (Sustaining proliferative signaling)

Normale, gesunde Zellen unterliegen einer strengen Regulation bezüglich Proliferation und Apoptose. Dies führt zu einer Homöostase, die für die Funktion und den Aufbau der Gewebe unbedingt notwendig ist. Diese Regulation geschieht vorwiegend über Wachstumsfaktoren, die von benachbarten Zellen ausgeschüttet werden (parakrin). Auf der Zelloberfläche befinden sich entsprechende Rezeptoren, die meist über eine nachgeschaltete intrazelluläre Tyrosinkinase das Signal übermitteln (u. a. EGFR Familie bzw. HER-Rezeptoren).

Tumorzellen deregulieren diese Mechanismen auf verschiedene Art und Weise. In einigen Entitäten werden die Rezeptoren für Wachstumsfaktoren überexprimiert, was zu einer Verstärkung des intrazellulären Signals führt. Weiterhin können sie auch selbst Liganden für diese Rezeptoren exprimieren und sich in der Folge selbst stimulieren (autokrine Sekretion). Schließlich besteht die Möglichkeit, durch eine

Mutation des Rezeptors ein intrazelluläres Signal ohne Ligandenbindung zu erzeugen. Gleichmaßen kann das intrazelluläre Signal durch Mutationen der sich anschließenden Kaskaden (u. a. MAPK und PI3K Signalweg) verstärkt werden. Zur genaueren Kontrolle der Signalwege existieren ebenfalls Inhibitoren auf mehreren Ebenen. Durch eine loss of function Mutation dieser Inhibitoren (z. B. PTEN als Inhibitor des PI3K/Akt Signalweges) in Tumorzellen kann eine Verstärkung des Signals entstehen (Jiang et al. 2009).

Aufgrund dieser Mechanismen sind Krebszellen in der Lage, deutlich schneller als normale Zellen zu proliferieren, was zu einem schnellen Tumorstwachstum führt, jedoch ab einer bestimmten Größe des Zellverbands auch zu Limitierungen führt, da die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen nicht mehr in ausreichendem Umfang gewährleistet werden kann.

Umgehen von wachstumshemmenden Signalen (Evading growth suppressors)

Die Regulation des Zellzyklus und der Zellteilung wird nicht nur über positive Wachstumssignale gesteuert. Gleichmaßen existieren Kontrollinstanzen, die den Übergang zwischen bestimmten Phasen des Zellzyklus verhindern können. Diese Proteine werden allgemein als Tumorsuppressoren bezeichnet, da sie die Tumorentstehung durch einen Zellzyklusarrest mit anschließender Reparatur des Genoms oder durch die Einleitung der Apoptose verhindern können. Ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe ist das pRb (Retinoblastom-Protein). Es kontrolliert den Zellzyklus am G1 Checkpoint vor dem Übergang in die S-Phase, in welcher die DNA-Replikation stattfindet. Durch extra- und intrazelluläre Signale werden Schäden an Zelle und DNA festgestellt und eventuell die Proliferation aufgehalten oder die Apoptose eingeleitet (Burkhart et al. 2008). Ein weiterer wichtiger Tumorsuppressor ist das p53-Protein, der "Wächter des Genoms" (Guardian of the genome). Es lässt sich in etwa 50 % aller Tumoren eine Mutation mit Funktionsverlust (loss of function) beobachten. Das p53-Protein reagiert vor allem auf intrazelluläre Signale, die Auskunft über den Zustand der Zelle geben. Es werden Genomschäden detektiert, aber gleichmaßen auch der metabolische Status der Zelle erfasst, sowie wachstumsstimulierende Signale. Bei eventuellen Schäden wird ebenfalls der Zellzyklus angehalten oder bei irreparablen Zustand die Apoptose eingeleitet (Efeyan et al. 2007).

Eine weitere Instanz zur Gewährleistung gesunder und funktionsfähiger Gewebe sind Zell-Zell-Kontakte. Sie kontrollieren die Proliferation der Zellen in einem Verband und verhindern ein übermäßiges Wachstum. Durch Ausbildung von Zellkontakten des zonula adhaerens-Typs wird u. a. das Merlin-Protein (Moesin-Ezrin-Radixin-Like Protein) aktiviert. Dieses Produkt des NF2-Gens (Neurofibromatose 2) sorgt für die Verstärkung der durch Cadherine vermittelten Zell-Zell-Kontakte. Weiterhin führt es durch Kontaktinhibition sowie durch Sequestrierung von Wachstumsfaktorrezeptoren der EGFR-Familie zu einer Kontrolle der Proliferation. Durch diese Funktion wirkt Merlin als Tumorsuppressorprotein und führt bei einer loss of function Mutation zur Ausbildung einer Neurofibromatose 2 (Curto et al. 2007).

Ein weiterer Tumorsuppressor, der Einfluss auf die Kontaktinhibition hat, ist das LKB1-Protein. Es kontrolliert die Polarität der Zelle und unterdrückt das Onkogen c-myc. Durch einen Verlust von LKB1 durch loss of function Mutation wird die Integrität des Epithelgewebes beeinträchtigt und die Epithelzellen werden anfälliger für eine durch myc induzierte Transformation (Partanen et al. 2009).

Resistenz gegenüber apoptotischen Mechanismen (Resisting cell death)

Die Apoptose als programmierter Zelltod ist eine wichtige Funktion des Organismus, um geschädigte oder unerwünschte Zellen aus dem Gewebsverband zu entfernen. So kann eine Tumorentstehung bereits zum Zeitpunkt der ersten entarteten Zelle verhindert werden, indem in dieser die Apoptose ausgelöst wird. Es gibt intra- und extrazelluläre Signale, die den programmierten Zelltod induzieren können. Dazu gehören der Fas Ligand/Fas-Rezeptor Komplex als extrazellulärer Mechanismus und die proapoptotischen Proteine Bax und Bak als intrazelluläre Initiatoren. Letztere sind in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und werden durch Proteine der Bcl-2-Familie inaktiviert. Durch Bindung von BH3 an die Bcl-2-Proteine wird die Inhibition von Bax und Bak aufgehoben. In der Folge destabilisiert sich die äußere mitochondriale Membran und mitochondriale Proteine wie Cytochrom c treten ins Zytosol aus. Dies führt schließlich zur Aktivierung von Caspasen und zur Apoptose der Zelle. Als Auslöser dieser Mechanismen dienen z. B. Schäden an der DNA, welche detektiert werden und über das bereits erwähnte p53- Protein das Apoptoseprogramm aktivieren. Weitere Auslöser können überaktivierte Onkogene wie c-myc sein oder aber ein Fehlen von Überlebenssignalen durch Wachstumsfaktoren der IGF (insulin-like growth factor) Familie (Adams et al. 2007). Krebszellen können durch

Überexpression von Bcl-2-Proteinen, Mutation im p53-Gen oder durch Kurzschließen des Fas/Fas-Ligand-Signalweges die Apoptose umgehen.

Replikative Unsterblichkeit (Replicative immortality)

Als replikative Unsterblichkeit wird die Fähigkeit von Zellen bezeichnet, sich unendlich oft teilen zu können. Normalerweise ist die Anzahl der möglichen Mitosen einer Zelle begrenzt. Durch bestimmte sich wiederholende Abschnitte an den Enden eines Chromosoms wird die Zelle vor einem Genverlust bewahrt. Bei jeder Zellteilung geht aufgrund der Funktionsweise der DNA-Polymerase ein kleiner Teil der DNA am Chromosomenende verloren. Diese Bereiche setzen sich aus sich wiederholenden Sequenzen von jeweils 6 Basenpaaren zusammen (hexanucleotide repeats) und werden als Telomere bezeichnet. Werden die Telomere durch zu häufige Teilungen zu kurz, geht die Zelle entweder in einen Zustand der Seneszenz über (keine weiteren Mitosen) oder es wird alternativ die Apoptose eingeleitet.

Einige Zelltypen, wie embryonale Stammzellen, Zellen der Keimbahn oder aber auch einige Immunzellen, sind in der Lage, diesem Schicksal zu entgehen. Mit Hilfe der Telomerase, einer reversen Transkriptase, sind diese Zellen in der Lage, die verloren gegangenen Nukleotidsequenzen wiederherzustellen. In der Folge verkürzen sich die Telomere dementsprechend nicht, und die Zelle ist in der Lage, sich beliebig oft zu teilen (Blasco 2005). Auch in etwa 90% aller Tumorzellen wird die Telomerase exprimiert, wodurch die gesteigerte Mitoserate und das unkontrollierte Wachstum nicht zu einer Selbstlimitierung durch Telomerverlust führen.

Induktion der Gefäßneubildung (Inducing angiogenesis)

Jeder Organismus und jede Zelle benötigt, um überleben zu können, Nährstoffe und Sauerstoff. Die Versorgung sowie der Abtransport von metabolischen Endprodukten werden beim Menschen durch das Blut gewährleistet. In gesunden Gewebsverbänden fließt es innerhalb von Gefäßen, die den Gas- und Metabolitaustausch ermöglichen, gleichermaßen aber auch ein Austreten des Blutes verhindern.

Um in größeren Verbänden überleben zu können, müssen Tumorzellen dementsprechend imstande sein, die Gefäßneubildung (Angiogenese) zu induzieren. In normalem Gewebe wird diese Funktion ebenso benötigt, z. B. nach Verletzungen oder beim Aufbau der Gebärmutter Schleimhaut während des weiblichen Zyklus. Diese Aktivierung ist stets nur vorübergehend und wird durch Aktivatoren und Inhibitoren reguliert. Hier spielen vor allem VEGF-A (vascular endothelial growth factor-A) als

Hauptaktivator, sowie TSP-1 (thrombospondin-1) als Inhibitor eine Rolle (Hanahan et al. 1996). In Tumorzellen ist die Angiogenese häufig dauerhaft aktiviert. Die Überexpression von VEGF-A wird durch bestimmte Onkogene sowie die Hypoxie der unterversorgten Zellen ausgelöst (Ferrara 2009). Dennoch unterscheiden sich die Tumorgefäße deutlich von Gefäßen in normalem Gewebe. Sie bilden Konvolute aus, der Blutfluss ist nicht immer zielgerichtet und das Endothel ist durchlässig, so dass Mikrohämmorrhagien entstehen können (Nagy et al. 2010). Letztendlich sind die gebildeten Gefäße zwar von minderer Qualität, dennoch sind sie unerlässlich für die Größenzunahme des Tumors. Aus diesem Grund ist vor allem VEGF ein erfolgversprechendes Ziel einiger Tumorthérapien.

Fähigkeit zur Gewebsinvasion und -metastasierung (Activating invasion and metastasis)

Weitere gefährliche Merkmale von malignen Tumoren sind die Invasion von gesundem Gewebe sowie das Ausbilden von Fernmetastasen. Dadurch wird das gezielte Therapieren der Krebszellen schwierig und es kommt häufig auch Jahre später noch zu Rezidiven.

Um Fernmetastasen ausbilden zu können, ist es zunächst notwendig, dass sich die Zelle aus dem ursprünglichen Zellverband löst. Gesunde Zellen weisen in einem Gewebe viele Zell-Zell-Kontakte auf, die v.a. durch Adhäsionsmoleküle der Cadherin-Familie gebildet werden. Der Hauptvertreter E-Cadherin ist in den meisten metastasierenden Tumorzellen verändert oder herunterreguliert, so dass sich keine Adhärenskontakte mehr ausbilden können (Berx et al. 2009). Die Metastasierung ist ein mehrstufiger Prozess, der die Lösung aus dem Zellverband, die Intra- und Extravasation, sowie die anschließende Kolonisierung umfasst. Karzinomzellen unterlaufen dabei eine Transition, die als EMT (epithelial-mesenchymal transition) bezeichnet wird. Durch Verringerung der Zell-Zellkontakte, Aufhebung der Polarisation, Isolation und Umgehen der Anoikis (Apoptose von Zellen ohne Zell-Matrix-Kontakt) wird die Motilität gesteigert und die Zelle zur Emigration fähig (Klymkowsky et al. 2009). Am Ziel angekommen unterläuft die Zelle dann die umgekehrte Transition MET (mesenchymal-epithelial transition), um einen neuen Zellverband, also die Metastase auszubilden (Hugo et al. 2007).

Zusätzlich gibt es zwei weitere Mechanismen der Gewebsinvasion. Bei der "kollektiven Invasion" bewegt sich ein ganzer Verbund an Krebszellen und infiltriert benachbartes

gesundes Gewebe. Diese Krebsentitäten bilden interessanterweise selten Fernmetastasen aus. Weiterhin gibt es eine amöboide Art der Metastasierung, bei der die einzelne Zelle sich durch die extrazelluläre Matrix schlängelt, anstatt sich wie bei der "mesenchymalen" Metastasierung einen Weg zu bahnen (Friedl et al. 2010).

Neu aufkommende Merkmale und begünstigende Faktoren

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen klassischen Merkmalen von Tumoren gibt es zwei weitere Kennzeichen, die von allgemeiner Relevanz erscheinen, jedoch noch weiter untersucht werden müssen. Weiterhin gibt es begünstigende Faktoren bzw. Umstände, die die Veränderung von einer gesunden Zelle hin zu einer Krebszelle fördern. Abbildung 2 zeigt die weiteren Kennzeichen sowie die Umstände, die eine Entartung erst ermöglichen.

Aktuell werden vier weitere Faktoren diskutiert, welche in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen haben jedoch hier nicht weiter ausgeführt werden. Dabei handelt es sich um die Seneszenz der Zellen, die phenotypische Plastizität, die nicht mutationsbedingte epigenetische Reprogrammierung sowie polymorphe Mikrobiome (Hanahan 2022).

Hinzu kommen angeborene Faktoren und Fehler des Immunsystems sowie der Antikörper, welche vor allem bei Tumoren im Kindesalter (v.a. Leukämien) eine Rolle spielen (Abolhassani et al. 2021).

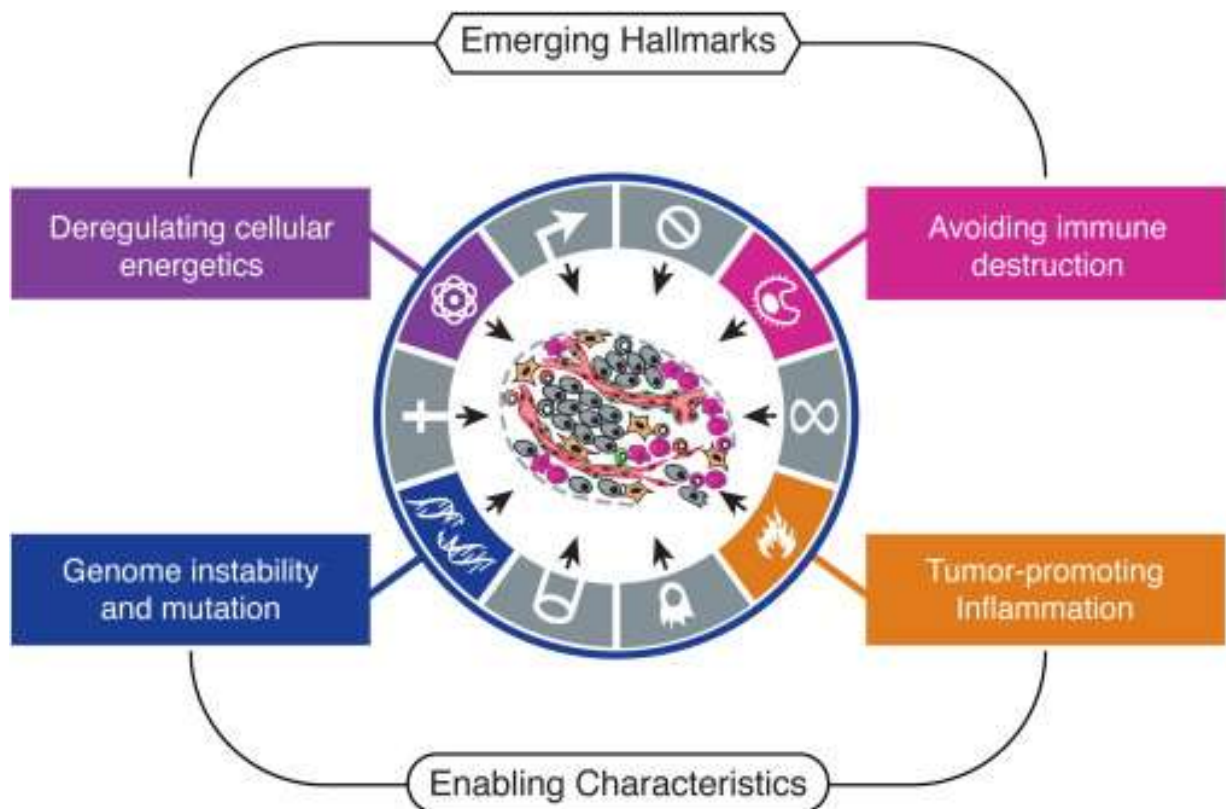


Abbildung 2: Aufkommende Merkmale von Tumorzellen und begünstigende Faktoren (Hanahan und Weinberg 2011). **Zu den weiteren allgemeinen Merkmalen von Tumorzellen gehören die Deregulation des zellulären Energiemetabolismus und die Umgehung der Immunantwort. Begünstigende Faktoren, die die Tumorentstehung möglich machen, sind die genomische Instabilität und Mutation, sowie eine tumorfördernde Inflamationsreaktion.**

Deregulation des zellulären Energiemetabolismus (Deregulating cellular energetics)

Ein neu aufkommendes allgemeines Kennzeichen von Tumorzellen ist die Deregulation des Energiestoffwechsels. In normalem Gewebe wird zur Energiegewinnung hauptsächlich der Weg der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien genutzt. Da dieser jedoch Sauerstoff benötigt, kann die Zelle, sollte nicht genug Sauerstoff verfügbar sein, auf die Substratkettenphosphorylierung im Rahmen der Glykolyse zurückgreifen. Diese Umstellung des Energiestoffwechsels liefert nur einen Bruchteil der Energie, die durch die Metabolisierung im Citratzyklus und anschließender Atmungskette erzeugt wird (2 mol ATP in der Glykolyse im Vergleich zu 36 mol ATP in der Atmungskette je mol Glukose). Dieser Mechanismus wird als Pasteur-Effekt bezeichnet. Ausgelöst wird die Veränderung vor allem durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 α , welcher durch Hypoxie aktiviert wird. In Tumoren ist die Sauerstoffversorgung in der Regel deutlich schlechter als in normalem Gewebe und es kann zusätzlich durch überexprimierte Onkogene oder den Verlust von

Tumorsuppressorgenen zu einer dauerhaften Aktivierung von HIF-1 α kommen (Semenza 2010). Diese auch in Anwesenheit von Sauerstoff verstärkte Substratkettenphosphorylierung ist nach ihrem Entdecker als "Warburg-Effekt" oder auch als "aerobe Glykolyse" bekannt. Wie bereits beschrieben, liefert dieser Weg aus den gleichen Substraten jedoch nur einen Bruchteil der Energie, die durch den Weg der oxidativen Phosphorylierung gewonnen werden kann und erscheint somit als ineffektiv, vor allem bei mitotisch aktiven Zellen. Der Vorteil besteht in der schnelleren Produktion und Bereitstellung von ATP im Vergleich zur oxidativen Phosphorylierung. Zudem ist Energie nicht die einzige Ressource, die bei der Zellteilung benötigt wird. Durch eine erhöhte glykolytische Aktivität werden mehr Intermediärprodukte erzeugt, die wiederum für die Synthese von wichtigen Zellbestandteilen benötigt werden. Dazu gehören Fettsäuren für die Membran, sowie nicht essenzielle Aminosäuren zur Proteinsynthese und Nukleotide für die DNA-Replikation (Vander Heiden et al. 2009). Durch den verstärkten glykolytischen Durchsatz entsteht vermehrt Laktat, welches aus der Zelle freigesetzt wird und potenziell von anderen Zellen mit besserer Sauerstoffversorgung aufgenommen und metabolisiert werden kann. Basierend auf den intrazellulären Veränderungen, die einer gesteigerten Laktatproduktion vorausgehen, lässt sich anhand erhöhter Laktatwerte auf eine erhöhte Malignität des Tumors schließen (Walenta et al. 2004).

Umgehung der Immunantwort (Avoiding immune destruction)

Das Immunsystem spielt in der Tumorabwehr eine wichtige Rolle. Es ist imstande, veränderte Zellen zu erkennen und zu entfernen, bevor sie sich zu einem Tumor entwickeln. Diese Immunüberwachung (immune surveillance) findet permanent statt und wurde von Burnet und Thomas bereits 1957 postuliert. Mittlerweile ist dieser Ansatz erweitert worden, wird als Immunoediting bezeichnet und beschreibt die Interaktion zwischen Krebszellen und Immunsystem im Verlauf der Tumorentstehung. Das Immunoediting besteht aus 3 Phasen, der Elimination (Elimination), dem Gleichgewicht (Equilibrium) und dem Entkommen (Escape). Während der Elimination erkennt das Immunsystem sich entwickelnde Tumorzellen und bekämpft diese vor allem mit Hilfe von NK-Zellen, später kommen zytotoxische T-Zellen hinzu, die antigenspezifisch Tumorzellen angreifen und mit Hilfe von Perforinen und FasL zerstören (Mori et al. 1997; Smyth et al. 2000). Sollte es einigen Krebszellen gelingen, diese Phase zu überstehen, folgt der Übergang in die Gleichgewichtsphase. Es kommt zu einer natürlichen Selektion der Tumorzellen durch das Immunsystem. Durch die

erhöhte Proliferations- und Mutationsrate verändern und vermehren sich die Krebszellen deutlich schneller als normale Zellen, jedoch werden sie in dieser Phase vom Immunsystem in Schach gehalten. Dennoch überleben entartete Zellen, die sich dem Immunsystem entziehen können, die übrigen werden von Abwehrzellen abgetötet. Diese Phase kann sich auf einen Zeitraum von vielen Jahren ausdehnen, bis es dann zum Escape kommt. Haben sich die Tumorzellen durch den Selektionsdruck des Immunsystems soweit entwickelt, dass sie in einer immunkompetenten Umgebung überlebensfähig sind, bildet sich der Tumor aus. Die Mechanismen, um dem Immunsystem zu entgehen, sind dabei vielfältig. Die Krebszellen können hemmende Zytokine wie TGF- β (Transforming Growth Factor β) oder IL-10 freisetzen, um die Leukozyten zu unterdrücken. Ein ähnlicher Effekt wird durch die Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen, vor allem T-Suppressorzellen, erreicht. Weiterhin können Tumorzellen die Antigene auf ihrer Oberfläche reduzieren, hier allen voran die MHC (major histocompatibility complex) Moleküle. Schließlich exprimieren einige Tumorzellen den FasL (Fas Ligand) auf ihrer Oberfläche, der bei Kontakt mit einer Immunzelle für deren Apoptose sorgt (Dunn et al. 2004; Kim et al. 2007).

Begünstigende Faktoren (Enabling Characteristics)

Zusätzlich zu den allgemeinen Kennzeichen von Krebszellen gibt es begünstigende Faktoren, die die maligne Transformation erleichtern. Dazu gehört u. a. die genomische Instabilität und das in der Folge verstärkte Auftreten von Mutationen. In normalem Gewebe werden Gene, die nicht benötigt werden, abgeschaltet. Dies geschieht u. a. über epigenetische Mechanismen wie z. B. die Methylierung der DNA oder Modifizierung von Histonen an entsprechenden Stellen. In Tumorzellen ist zu beobachten, dass die DNA häufig hypomethyliert ist und somit ruhende Gene wieder aktiviert werden. Weiterhin können durch fehlerhafte genetische Prägung (Imprinting) ebenfalls Gene reaktiviert werden (Berdasco et al. 2010). Im Gegenzug lässt sich auch eine Hypermethylierung in den Promotorregionen verschiedener Tumorsuppressorgene beobachten (z. B. im Retinoblastom-Gen), wodurch die entsprechenden Proteine in der Folge vermindert exprimiert werden und Mutationen damit häufiger auftreten (Esteller 2008). Die Überwachung und die Erhaltung der Integrität des Genoms übernehmen bestimmte Wächtergene (Caretakers). Zusätzlich zu dem bereits erwähnten TP53 gehören in diese Gruppe DNA-Reparaturgene, die

DNA-Schäden reparieren und Fehler während der Replikation beseitigen. Mutationen in diesen Genen finden sich in vielen hereditären Krebserkrankungen wie der HNPCC (hereditary non-polyposis colon cancer) oder bei Brustkrebs (Mutation in der BRCA Genfamilie). Da hier bereits von Beginn an ein Allel mutiert ist, führt die Mutation des zweiten Allels zum Funktionsverlust. Generell wird durch den Verlust der Reparaturgene weiteren Mutationen der Weg geebnet.

Die Rolle des Immunsystems bezüglich der Krebsabwehr wurde im Rahmen des Immunoediting bereits dargestellt. Die Folge einer Immunantwort ist ab einem bestimmten Umfang immer eine Entzündungsreaktion. Dabei werden von den Abwehrzellen massiv zytotoxische Substanzen ausgeschüttet, darunter auch ROS (Reactive Oxygen Species). Es wird eine stark mutagene Umgebung geschaffen, die eine maligne Entartung auslösen oder fördern kann. Die Ursache für die Entzündung spielt dabei keine Rolle und ist in den einzelnen Tumorentitäten sehr unterschiedlich. Die Gefahr besteht vor allem bei lang anhaltenden chronischen Entzündungen, wie sie bei Autoimmunerkrankungen oder bestimmten Infektionen auftreten können (Balkwill et al. 2005). Für die Tumorprogression ist hier vor allem das Einwandern von Makrophagen von Bedeutung. Diese können sich dichotom weiterentwickeln in einen M1- oder M2-Typ. Der durch klassische Aktivierung mit Hilfe von IFN- γ oder LPS (Lipopolysaccharid) entstehende M1-Typ trägt zur Abwehr von Infektionen und Tumoren bei. Durch Phagozytose werden Erreger oder neoplastische Zellen aufgenommen und eliminiert, deren Antigene werden an der Oberfläche exprimiert. Diese Zellen verteidigen den Organismus gegen innere und äußere Pathogene. Zur Ausbildung des M2-Typs kommt es durch Stimulation mit IL-4, IL-10 und IL-13 oder durch Kontakt mit Immunkomplexen. Diese Zellen reparieren Schäden im Zellverband, räumen verbleibende Zellbestandteile und Trümmer ab und fördern die Heilung. Weiterhin fördern sie die Angiogenese und hemmen die Immunantwort. Dadurch wirken sie fördernd auf die Tumorentwicklung, da Tumorzellen weniger angegriffen werden und leichter Gefäße ausbilden können. Viele der beobachteten TAMs (tumor associated macrophages) sind vom M2-Typ und akkumulieren sowohl innerhalb des Tumors als auch in der Umgebung. Durch Modifikation extrazellulärer Matrixproteine können sie die Metastasierung unterstützen. Hinzu kommt, dass sie regulatorische T-Zellen rekrutieren und stimulieren, wodurch die adaptive Immunantwort herabgesetzt

wird. Schließlich setzen sie auch Moleküle frei, die direkten positiven Einfluss auf das Tumorwachstum nehmen (z. B. EGF) (Solinas et al. 2009).

Das Immunsystem und die Entzündungsreaktion ist also einerseits ein Abwehrmechanismus des Körpers, kann allerdings paradoxerweise auch fördernd und unterhaltend auf eine Entartung wirken. Letztlich bleibt noch zu erwähnen, dass nicht jede Entzündungsreaktion eine Tumorentwicklung begünstigt. Bei der Psoriasis oder dem atopischen Ekzem steigt die Entartungswahrscheinlichkeit nicht, obwohl eine chronische Entzündungsreaktion abläuft (Nickoloff et al. 2005).

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Als Teil des Forschungsprojektes "Entwicklung eines pharmakologischen Modells zur Prüfung immuntherapeutischer AK mit dreidimensionalen Tumorzellkulturen in vitro" war die Aufgabenstellung dieser Arbeit die Untersuchung der Antikörper catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) und ertumaxomab in Hinblick auf Wechselwirkungen mit den Glukokortikoiden Dexamethason und Prednisolon. Als Testsystem wurden multizelluläre Tumorsphäroide verwendet, welchen ein artifizielles Immunsystem aus Leukozyten zugesetzt wurde.

Primärer Endpunkt der Versuche war das Sphäroidvolumen zu unterschiedlichen Zeitpunkten unter der Therapie mit Antikörpern, Leukozyten, Glukokortikoiden oder einer Kombination der Wirkstoffe.

Weitere Endpunkte waren die Vitalität und Klonogenität der behandelten Tumorzellen, sowie die Freisetzung bestimmter Zytokine, welche für die häufigsten unerwünschten Arzneimittelwirkungen dieser Therapieform verantwortlich sind. Schließlich wurde noch eine qualitative Analyse der Leukozyteninfiltration in die Tumorzellen mit Hilfe von immunhistologischen Färbungen durchgeführt.

Ziel der Untersuchungen war die Beurteilung der Glukokortikoid-Wirkung auf die Wirksamkeit der Antikörper sowie auf die Zytokinausschüttung. Dazu gehörten Versuche zur Dosisfindung genauso wie Untersuchungen an Tumorzellen mit unterschiedlichem HER2-Expressionsniveau.

Letztendlich sollte das Zusammenspiel zwischen Tumorzellen, Leukozyten, Antikörpern und Glukokortikoiden beleuchtet werden, um in späteren in vivo Versuchen die beste Balance zwischen Antikörper-Wirkung und Reduzierung von Nebenwirkungen zu erhalten.

2 Literaturdiskussion

2.1 Therapie der Krebserkrankung

2.1.1 Klassische Therapien

Die bisherige klassische Krebstherapie beruht, wie bereits erwähnt, auf der Entfernung des Tumors durch Operation, der Behandlung durch Bestrahlung und der Applikation von Chemotherapeutika. Durch die Operation kann das Krebsgewebe gezielt entfernt werden, ohne dabei gesundes Gewebe zu sehr zu schädigen. Bei malignen Entartungen, die bereits gesundes Gewebe oder ganze Organe infiltriert haben oder nicht klar abgrenzbar sind, besteht keine Möglichkeit einer erfolgreichen Operation. Gleiches gilt für Tumoren mit multiplen Fernmetastasen.

Mit Hilfe der Strahlentherapie können Tumoren örtlich begrenzt bekämpft werden. Durch die Bestrahlung werden reaktive Sauerstoffspezies aus Sauerstoffmolekülen erzeugt oder direkte DNA-Schäden verursacht, die ab einer gewissen Dosis zum Zelltod führen. Durch die vorherrschende Hypoxie in vielen Tumorgeweben wird die Effektivität der Bestrahlung stark reduziert, bis hin zur völligen Strahlenresistenz bestimmter Tumorentitäten (ohne ausreichende Sauerstoffkonzentrationen können keine reaktiven Sauerstoffspezies erzeugt werden). Weiterhin schädigt die Bestrahlung bei der Passage durch den Körper gesundes Gewebe. Dies kann zu massiven Nebenwirkungen führen. Zusätzlich kann die ionisierende Strahlung auch Mutationen auslösen und somit selbst onkogen wirken.

Die Chemotherapie ist die dritte Säule der klassischen Krebstherapie. Es werden systemisch Medikamente appliziert, die zytostatisch oder zytotoxisch wirken. Die Wirkstoffe greifen an verschiedenen Stellen in den Zellzyklus ein und führen u. a. durch Schädigung der DNA oder des Spindelapparates zur Apoptose der Zelle. Dabei sind vor allem Zellen betroffen, die sich schnell und häufig teilen. Die DNA wird häufiger repliziert und ist dementsprechend anfällig, da sie nicht durch Histone und die Chromatinstruktur geschützt wird. Aufgrund der systemischen Applikation der Chemotherapie werden jedoch auch gesunde Zellen mit hoher Verdopplungsrate geschädigt. Dies führt zu den klassischen Nebenwirkungen der Chemotherapie wie Haarausfall, Magen-Darm-Problemen und Blutbildveränderungen, die letztendlich

therapielimitierend sind. Durch Kombination mehrerer Wirkstoffe, sowie Bestrahlung und Operation, kann die Effektivität und Tolerierbarkeit gesteigert werden.

Durch neue Ansätze vor allem im Bereich der Immuntherapie werden Ansätze verfolgt, die eine gezieltere Bekämpfung der Tumorzellen ermöglichen. Dadurch wird gesundes Gewebe weniger geschädigt und in Kombination mit klassischen Therapien eine bessere Behandlung gewährleistet.

2.1.2 Immunologische Therapien

Um Tumorzellen gezielter therapieren zu können gewinnen immunologische Therapien immer mehr an Bedeutung. Durch Stimulation von Immunzellen und das Auslösen einer zielgerichteten Abwehr gegen bestimmte Tumorzellen können Schäden an normalem Gewebe gering gehalten und die Nebenwirkungen der klassischen Therapien vermindert werden.

2.1.2.1 Allgemeine Immunstimulation

Wie bereits im Rahmen des Immunoediting beschrieben entfernt das Immunsystem häufig entartete Zellen bevor sie sich zu einem Tumor vermehren können. Die Verstärkung dieser natürlichen körpereigenen Abwehr steht im Mittelpunkt der Zytokintherapien. In klinischen Studien werden viele Zytokine bereits in Verbindung mit der Tumorabwehr untersucht, darunter GM-CSF, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18 und IL-21. Bisher zur Therapie zugelassen, wenn auch nur in den USA, sind lediglich IFN- α als adjuvante Therapie bei malignen Melanomen, sowie IL-2 bei metastatischen Melanomen und Nierenzellkarzinomen (Lee et al. 2011). Die Therapie mit IFN- α zeigte in einigen Studien eine Verbesserung des progressionsfreien Überlebens sowie des Gesamtüberlebens (Mocellin et al. 2010). Die Gabe von IFN- α führt zu einer Stimulation und Reifung verschiedener Immunzellen, die für die Tumorabwehr von Bedeutung sind. Weiterhin spielt IFN- α eine wichtige Rolle während des Immunoediting, ein Prozess, in dessen Verlauf sich entscheidet, ob es zur Ausbildung eines Tumors kommt (Dunn et al. 2005).

Die Gabe von hochdosiertem IL-2 als Bolus führte vor allem beim klarzelligen Nierenzellkarzinom bei einigen Patienten zu einer Remission (15 % der Patienten sprachen auf die Therapie an), die im Durchschnitt 54 Monate betrug. Einige

Patienten, die komplett auf die Therapie ansprachen, sind selbst 10 Jahre nach der Therapie noch tumorfrei und können als geheilt angesehen werden (Atkins et al. 2004). Die Wirkung von Interleukin-2 als T-Zell-Wachstumsfaktor besteht vor allem in der Stimulation der TH1-Population und Steigerung der zytotoxischen Aktivität u. a. gegen Tumorzellen.

2.1.2.2 Aktive Immunisierung

Bei einer Reihe von Infektionskrankheiten ist die Impfung heutzutage ein bewährtes Mittel zur Prävention. Im Bereich der Tumorthherapie werden verschiedene Ansätze zur Vakzinierung verfolgt. Als Antigene werden z. B. Peptide oder Proteine verwendet, die auf Tumorzellen überexprimiert werden, wie HER2/neu (Disis et al. 2009) oder MUC-1 (Kroemer et al. 2013). Durch die chemische Verbindung mit Adjuvanzen sollen die Peptide vom Immunsystem erkannt werden und eine spezifische Abwehr des Tumors bewirken. Alternativ werden Impfstoffe aus rekombinanten Vektoren entwickelt, um eine Immunantwort zu erzeugen (Marshall et al. 2000). Weiterhin wird versucht mit autologen oder allogenen Tumorzellen zu impfen, die nach Entnahme z. B. mit GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) retroviral transduziert werden, um die Immunantwort zu verstärken (Luiten et al. 2005).

Schließlich gibt es noch Vakzine, die aus modifizierten Immunzellen (vor allem antigenpräsentierenden Zellen) bestehen. Bei dieser Therapie gegen Prostatakrebs werden PBMC und vor allem dendritische Zellen des Patienten entnommen und mit einem Fusionsprotein inkubiert. Dadurch werden die Zellen spezifisch gegen die prostataspezifische saure Phosphatase (PAP) gerichtet und anschließend dem Patienten reinfundiert. Ein Impfstoff dieser Gruppe ist Sipuleucel-T und das bisher einzige Vakzin mit einer Zulassung (nur in den Vereinigten Staaten von Amerika).

Die (vor allem durch die COVID19-Pandemie bekannt gewordene) neue Klasse der mRNA Impfstoffe erscheint hier aktuell ebenfalls vielversprechende Ergebnisse zu liefern. Vorteile sind hier die starke Flexibilität und insgesamt geringe unerwünschte Wirkungen (Zhang et al. 2023).

2.1.2.3 Passive Immunisierung

Als passive Immunisierung wird die Gabe von Antikörpern bezeichnet, die das körpereigene Immunsystem gezielt gegen die zu behandelnde Krankheit richtet. Bei Krebserkrankungen müssen Ziele für die Antikörper gefunden werden, die

ausschließlich auf Tumorzellen vorkommen oder dort überexprimiert werden, so dass normale Zellen unter der Therapie keinen Schaden nehmen.

2.1.2.3.1 Tumor-assoziierte Antigene

Diese sogenannten Tumor-assoziierten Antigene (TAA) können in mehrere Gruppen eingeteilt werden:

Differenzierungsantigene

Diese Antigene sind gewebsspezifisch für das Ursprungsgewebe eines Tumors. Sie können auch in normalem Gewebe desselben Ursprungs auftreten und werden im Tumor dann gleichermaßen exprimiert. Als Beispiel kann hier das Enzym Tyrosinase angeführt werden, welches in malignen Melanomen vorkommt und auch in normalen Melanozyten an der Melanin-Produktion beteiligt ist (Brichard et al. 1993).

Überexprimierte Antigene

Diese Gruppe von Antigenen umfasst Proteine, die in normalem Gewebe gleichermaßen vorkommen, jedoch im Tumorgewebe überexprimiert werden. Es handelt sich hierbei häufig um Oberflächenmoleküle, z. B. schützende Proteine wie Mucin-1, Wachstumsfaktorrezeptoren wie HER2/neu oder Zelladhäsionsmoleküle wie EpCAM.

Tumor-Hoden-Antigene

Tumor-Hoden-Antigene werden lediglich in Spermatozyten exprimiert. In anderen Zellen ist das entsprechende Gen stillgelegt. In vielen Tumorentitäten werden diese Gene allerdings reaktiviert und das Antigen exprimiert. Dazu zählen u. a. Blasen- und Brustkrebs, sowie einige gastrointestinale Tumoren und das hepatozelluläre Karzinom. Tumor-Hoden-Antigene sind gute therapeutische Ziele für Antikörper, da die Keimzellen, in denen sie normalerweise vorkommen, keine MHC-Proteine (major histocompatibility complex) exprimieren und somit von Immunzellen ignoriert werden. Ein Beispiel für diese Gruppe ist NY-ESO-1 (Gnjatic et al. 2006).

Mutationsantigene

Häufig durch Punktmutationen hervorgerufen, sind diese Antigene meist strukturell verändert und patientenspezifisch. Da die Mutation zufällig an jedem Basenpaar

auftreten kann, tritt dieselbe Mutation fast nie bei mehreren Patienten auf, es sei denn, es betrifft ein Protein, welches durch die Mutation die Krebsentstehung bedingt, wie zum Beispiel das Protoonkogen Ras (Wolfel et al. 1995).

Virale Onkoproteine

Zellen, die mit onkogenen Viren wie HPV infiziert sind, exprimieren auf der Oberfläche Antigene, welche in normalen Zellen nicht vorkommen. Diese bieten ein gutes Ziel für Immuntherapien, da lediglich infizierte Zellen angegriffen werden (Ressing et al. 1995).

2.1.2.3.2 Identifikation tumorassoziierter Antigene

Es gibt drei vorherrschende Verfahren zur Identifikation von TAA (Gunawardana et al. 2007):

SEREX - serological identification of antigens by recombinant expression cloning

Bei diesem Verfahren wird zunächst RNA aus Tumorbiopsien isoliert. Im Anschluss werden daraus cDNA-Expressionsbibliotheken erstellt. Diese werden benutzt, um mithilfe von Bakteriophagenvektoren E.coli-Bakterien zu transfizieren. Diese exprimieren die entsprechenden rekombinanten Proteine, welche auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Im weiteren Verlauf werden die entstandenen Protein-Plaques mit autologem Serum inkubiert, um festzustellen, an welche Proteine die Serum-Antikörper des Patienten binden. Im letzten Schritt wird die cDNA der immunogenen Proteine sequenziert (Sahin et al. 1995).

Mit dieser Methode wurden bereits über 2000 TAA identifiziert, darunter u. a. die Hodenkrebs-Antigene NY-ESO-1 und CAGE-1 (Chen et al. 1997; Park et al. 2003).

SERPA - Serological proteome analysis

Das Verfahren beruht auf einer 2D-Gelelektrophorese (2-dimensional). Dabei werden die Proteine im ersten Schritt nach ihrem isoelektrischen Punkt getrennt. Im Anschluss erfolgt die Trennung nach der Molekülmasse.

Jeder Ansatz besteht dabei aus drei identischen 2D-Gelelektrophoresen, die in der Folge unterschiedlich behandelt werden. Aus zwei Gelen werden die Proteine auf eine Nitrozellulose oder eine PVDF-Membran übertragen. Diese werden nun mit

Patientenserum resp. Kontrollserum eines gesunden Probanden inkubiert. Die Bindungen an die Proteine werden verglichen und jene Stellen identifiziert, an die entweder ausschließlich oder deutlich mehr Antikörper aus dem Serum des Tumorpatienten binden. Diese Stellen werden nun aus dem dritten Gel extrahiert, welches mit Coomassie-Blau eingefärbt wurde, um die Proteine durch Edman-Abbau oder Massenspektrometrie zu sequenzieren (Klade et al. 2001).

Protein microarrays

Ein Protein-Microarray zur Detektion von Proteinen ist dem ELISA-Verfahren (enzyme-linked immunosorbent assay) recht ähnlich, der Maßstab ist jedoch kleiner. Auf einem geeigneten Untergrund wie z. B. einem Objektträger aus Glas oder einer Mikrotiterplatte werden die zu testenden Proteine immobilisiert. Dabei bleiben die meisten Bindungsstellen zugänglich, gleichermaßen findet keine Denaturierung statt. Anschließend werden Detektionsantikörper hinzugegeben, welche mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert sind. Die Lichtemissionen werden per Fluoreszenzspektroskopie erfasst. Alternativ kann die Markierung und Detektion auch über Radioisotope erfolgen (MacBeath et al. 2000).

Das Erstellen der microarrays kann maschinell erfolgen und es können sehr viele verschiedene Proben auf engstem Raum analysiert werden. Der Material- und Zeitaufwand ist damit deutlich geringer als bei den meisten anderen Methoden.

Zur Identifikation neuer TAA ist vor allem der "unbiased" Ansatz interessant, bei dem im Gegensatz zum "biased" Ansatz unbekannte Proteine verwendet werden. Zunächst wird wie bei der SEREX Methode eine cDNA Bibliothek aus mRNA erstellt, welche aus Tumorgewebe extrahiert wird. Die cDNA wird über einen Vektor in eine T7-Phage eingebracht, welche dann in vitro vermehrt wird (in vitro packaging). Die Phagen werden anschließend in mehreren Durchgängen via Biopanning selektiert und vermehrt, so dass Phagen aussortiert werden, welche auf das Kontrollserum von gesunden Probanden reagieren und Phagen, welche vom Serum von Tumorpatienten gebunden werden, angereichert werden. Nun wird das Phagen-Protein-microarray erstellt und mit Patientenserum inkubiert. Die darin enthaltenen Antikörper wurden zuvor mit dem fluoreszierenden Farbstoff Cy5(rot) markiert. Weiterhin werden mit Cy3(grün) markierte Antikörper hinzugegeben, welche gegen das Kapsid-Protein gerichtet sind. Proteine mit antigener Wirkung leuchten bei der Detektion gelb, negative Spots leuchten grün (Loch et al. 2007).

Mit der Durchführung eines Ansatzes mit Serum von Prostatakrebs Patienten konnten 186 Antigene identifiziert werden, hierunter 22 Proteine, welche bei der Unterscheidung zwischen Krebspatienten und Gesunden genauer waren als das bisher verwendete PSA (prostate specific antigen) (Wang et al. 2005).

2.1.2.3.3 Antikörper

Antikörper sind im gesunden Organismus ein Teil der humoralen Immunabwehr. Sie besitzen ein F(ab) (antigen binding) Fragment zur Bindung an das jeweilige Antigen und ein Fc (crystallizable) Fragment, an welches akzessorische Zellen binden können. Dadurch können Antikörper durch Bindung an Erreger oder Tumorzellen diese für die anderen Abwehrzellen markieren und somit sichtbar machen. Durch Bindung an die Fc-Region können die markierten Ziele phagozytiert oder durch andere Mechanismen abgetötet werden.

Monoklonale Antikörper

In der Tumorthherapie werden monoklonale Antikörper verwendet. Sie entstammen einem einzelnen Plasmazellklon und sind somit alle identisch und spezifisch für dasselbe Antigen. Es ist somit möglich, mit Hilfe eines TAA als Antigen, Antikörper herzustellen, die gezielt gegen einen Tumor gerichtet sind.

Die Antikörper haben dabei verschiedene Wirkungsmechanismen, welche auch in Kombination vorkommen können.

Falls das Antigen ein Rezeptor ist, können durch Bindung des Antikörpers intrazelluläre Signalwege inhibiert oder der Rezeptor blockiert werden, so dass keine Liganden mehr binden können (z. B. ist dies die Wirkungsweise von Trastuzumab und Pertuzumab am HER2-Rezeptor). Weiterhin kann eine gezielte Immunantwort durch Rekrutierung von Makrophagen und NK-Zellen über den Fcγ-Rezeptor ausgelöst werden, wodurch der Tumor bekämpft wird (Wirkmechanismus von catumaxomab und ertumaxomab).

Als Ziele für die Antikörper können je nach Erkrankung auch andere Antigene dienen, z. B. Zytokine wie TNF- α bei rheumatoiden Erkrankungen (infliximab) oder Gefäßwachstumsfaktoren wie VEGF (bevacizumab).

Weiterhin besteht die Möglichkeit Antikörper zu nutzen, um gezielt zytotoxische Therapeutika ausschließlich in Tumornähe zu aktivieren. Diese als ADEPT (antibody-directed enzyme prodrug therapy) bezeichnete Methode basiert auf Antikörpern,

welche gegen ein Tumorantigen gerichtet und gleichzeitig mit einem Enzym gekoppelt sind. Im ersten Schritt werden die Antikörper verabreicht, welche durch die Bindungsspezifität im Tumor akkumulieren. Im zweiten Schritt werden nicht-toxische Prodrugs (Medikamentenvorstufen) zytotoxischer Substanzen appliziert. Diese werden durch das Enzym an den Antikörpern aktiviert und das zytotoxische Therapeutikum sammelt sich ausschließlich im Tumor an. Gesundes Gewebe wird dadurch geschont und Tumorzellen, welche das Antigen nicht exprimieren, sich aber in räumlicher Nähe befinden, werden ebenfalls bekämpft (Bagshawe 2006).

Bis heute erhielten 149 monoklonale Antikörper eine Zulassung als Arzneimittel in Deutschland (Paul Ehrlich Institut 2023).

Die in den Versuchen verwendeten Antikörper catumaxomab und ertumaxomab werden mit Hilfe der Hybridoma- bzw. Quadroma-Technologie hergestellt. Dabei werden zunächst durch Vakzinierung mit dem gewünschten Antigen Plasma-Zellen erzeugt, welche die entsprechenden Antikörper produzieren. Diese werden mit Plasmazellen einer Myelom-Zelllinie fusioniert. Das daraus entstehende Hybridom sezerniert nun den gewünschten Antikörper und ist durch die Fusion unsterblich, es geht also nicht wie normale Plasmazellen nach einer gewissen Zeit in die Apoptose über. Werden zwei dieser Hybridome erneut fusioniert, ist es möglich, Antikörper zu erzeugen, welche für zwei Antigene spezifisch sind. Da die Paarung der Ketten jedoch zufällig erfolgt, müssen die erwünschten Antikörper durch einen Reinigungsschritt isoliert werden (Kohler et al. 1975; Lindhofer et al. 1995).

Die Nomenklatur der Antikörper erfolgt nach den Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation (WHO). Die Namen setzen sich wie folgt zusammen: Präfix, Substamm A, Substamm B und Suffix (World Health Organization (WHO) 2011). Anhand der verwendeten Antikörper catumaxomab und ertumaxomab soll die Namensgebung verdeutlicht werden:

- ca/er - das Präfix kann willkürlich gewählt werden, in diesem Beispiel ist es an die Antigene angelehnt (EpCAM bzw. HER2)
- tu(m) - Der Substamm A bezeichnet die Art des Ziels, in diesem Fall sind es Tumoren
- axo - Der Substamm B beschreibt die Spezies, aus welcher der Antikörper hervorgeht, im Beispiel ist es ein Hybrid aus Ratte und Maus

mab - Das Suffix steht für monoclonal antibody und ist somit für alle Antikörperpräparate gleich

Bispezifische trifunktionale Antikörper

Wie bereits erwähnt, ist es z. B. mit Hilfe der Quadroma-Technologie möglich, Antikörper zu synthetisieren, welche zwei Bindungsspezifitäten aufweisen. Dies wird genutzt, um zusätzliche Abwehrzellen anzulocken und somit die Immunreaktion gegen das eigentliche Antigen zu verstärken. Als zweite Bindungsspezifität kann z. B. das CD3-Molekül verwendet werden, da es ausschließlich auf T-Zellen exprimiert wird. Dies hat zur Folge, dass T-Zellen zusätzlich zu Makrophagen und NK-Zellen (welche durch die Fcγ-Region rekrutiert werden) in der Tumorregion akkumulieren können. Durch die Interaktion der Immunzellen untereinander kann die Abwehrreaktion gegen den Tumor gesteigert werden.

Für diese spezielle Wirkungsweise wird ein Trizellkomplex postuliert, bestehend aus Tumorzelle, akzessorischer Abwehrzelle und T-Zelle mit dem Antikörper als Verbindungsglied (Abbildung 3).

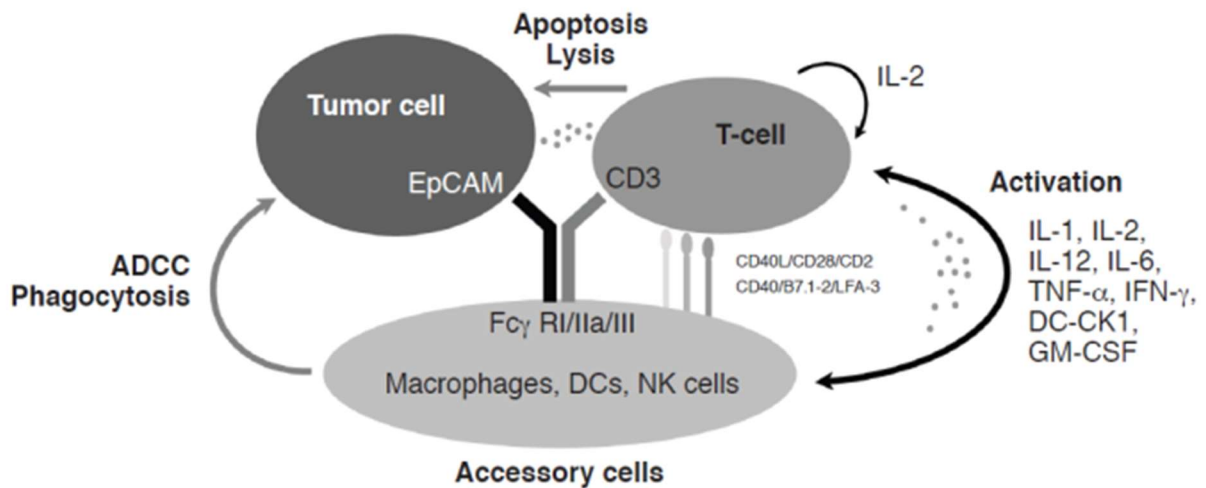


Abbildung 3: Postulierter Trizellkomplex (Seimetz 2011). **Der Antikörper bindet gleichzeitig Tumorzelle, akzessorische Zelle und T-Zelle. Sowohl die akzessorischen Zellen wie auch die T-Zellen können die Tumorzelle angreifen und den Effekt durch wechselseitige kostimulatorische Signale verstärken.**

Die wechselseitige Aktivierung der Immunzellen findet durch die Ausschüttung bestimmter Zytokine statt. Durch die Sekretion ins Blut ist die Stimulation vieler Abwehrzellen möglich, doch gleichermaßen ist sie weniger gezielt. Die gesteigerte Aktivierung des Immunsystems ist ein essenzieller Wirkmechanismus monoklonaler Antikörper, doch gleichermaßen führt diese massive Zytokinausschüttung auch zu den typischen Nebenwirkungen, welche im nächsten Kapitel weiter ausgeführt werden.

Als therapeutisches Ziel für catumaxomab wurde die Behandlung von malignem Aszites bei einer Peritonealkarzinomatose in Folge von EpCAM positiven Primärtumoren festgesetzt. Patienten mit diesem Krankheitsbild in Folge von Metastasen leiden stark unter den häufig massiven Flüssigkeitsansammlungen in der Bauchhöhle und abgesehen von Diuretika und der wiederholten Parazentese existierten keine adäquaten Therapien. Verursacht wird der Aszites durch eingewanderte Tumorzellen, welche für eine Permeabilitätssteigerung der Kapillaren verantwortlich sind. Weiterhin kommt es zu einem Lymphstau und zu einer Neovaskularisation durch die Tumorzellen. Dadurch ist der Plasmafluss in die Bauchhöhle hinein gesteigert und der Abfluss wird gleichermaßen behindert (Abbildung 4).

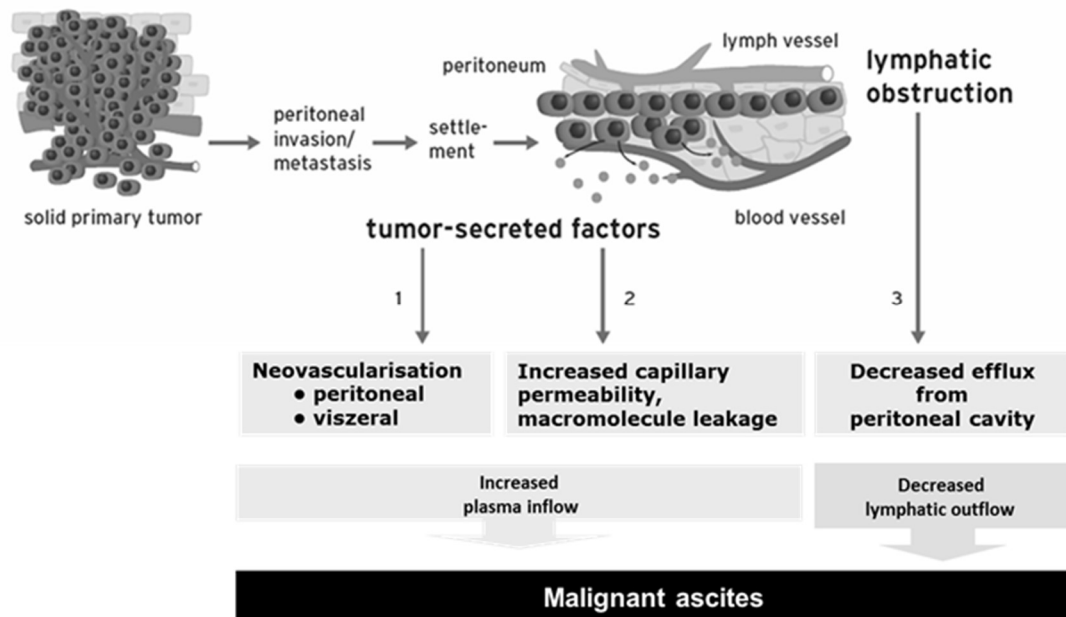


Abbildung 4: Entstehung von malignem Aszites bei Peritonealkarzinomatose. **Durch Metastasen im Peritoneum kommt es zu einer Permeabilitätssteigerung der Kapillaren, zum Lymphstau sowie zur Neubildung von Gefäßen, wodurch der Eintritt von Plasma in die Bauchhöhle begünstigt und der Abfluss behindert wird (Seimetz 2011).**

Unter dieser Prämisse wurden verschiedene klinische Studien durchgeführt, deren positive Ergebnisse schließlich 2009 zu einer Zulassung von catumaxomab zur Behandlung des malignen Aszites führten. In einer Phase II/III Studie wurde die Gabe von catumaxomab in Kombination mit Parazentese verglichen mit einer alleinigen Parazentese-Behandlung (Heiss et al. 2010). Der primäre Endpunkt war das punktionsfreie Überleben der Patienten. Der Antikörper wurde dabei im Abstand von 3-4 Tagen intraperitoneal verabreicht. Die Dosis wurde jedes Mal gesteigert bis zu einem Maximum von 150 µg bei der vierten und letzten Gabe an Tag 10. Das punktionsfreie Überleben in der catumaxomab-Gruppe war dabei signifikant länger (Median 46 Tage) als in der Kontrollgruppe (Median 11 Tage) (hazard ratio = 0,254: $p < 0,0001$). Weitere Studien folgten, welche verschiedene Tumorentitäten umfassten u. a. epitheliale gastrointestinale Tumoren, wie auch Ovarialkarzinome oder nicht-kleinzellige Lungentumoren (Seimetz 2011).

Die Wirkungsweise von ertumaxomab entspricht der von catumaxomab mit dem einzigen Unterschied, dass das Zielantigen nicht EpCAM, sondern das HER2 Molekül ist. Dementsprechend soll ertumaxomab vor allem bei Brustkrebs eingesetzt werden, da diese häufig HER2 stark überexprimieren. Ein Teil der präklinischen Untersuchungen an Zellkulturen und Tumorsphäroiden (kugelförmige Aggregate von

Tumorzellen) wurden in der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Weiterhin wurde eine Phase 1 Studie zur Dosisfindung durchgeführt, in welcher 100 µg ertumaxomab als maximal tolerierbare Einzeldosis identifiziert wurde (Kiewe et al. 2006). Dabei traten die typischen Nebenwirkungen einer Antikörpertherapie auf, die im Folgenden näher erläutert werden.

2.1.2.4 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen in der Krebstherapie

2.1.2.4.1 Klassische Therapien

Wie bei nahezu allen Arzneimitteln treten auch in der Krebstherapie unerwünschte Arzneimittelwirkungen auf. Sie sind in der Regel häufiger und auch schwerwiegender als bei den meisten anderen Medikamenten, da Chemotherapeutika zum Ziel haben Tumorzellen zu zerstören. Dabei unterscheiden sie jedoch nicht zwischen Tumorzellen und gesunden Zellen. Die beste Wirkung haben Zytostatika auf Zellen, die sich häufig teilen. Dementsprechend sind die häufigsten Nebenwirkungen in proliferativen Geweben zu finden. Neben Übelkeit und Erbrechen gehören Haarausfall, Schleimhautentzündungen sowie Blutbildveränderungen dazu. Die Einteilung wird gemäß der Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) des amerikanischen Gesundheitsinstituts (NIH) vorgenommen (National Institutes of Health 2010). Dabei werden 5 Grade unterschieden wobei Grad 1 und 2 milde und reversible Symptome umfassen und Grad 5 den Tod des Patienten bedeutet. Die Ausprägung von unerwünschten Arzneimittelwirkungen kann somit dosislimitierend für das Chemotherapeutikum sein. Hier spielt vor allem das blutbildende System eine Schlüsselrolle. Das Knochenmark gehört zu den stark proliferativen Geweben und durch die entstehende Myelosuppression wird sowohl die Blutbildung als auch die Infektabwehr massiv beeinträchtigt. Dadurch kann es vermehrt zu Blutungen kommen und selbst banale Infekte können nicht mehr beherrscht werden. Weiterhin können auch nicht reversible Schäden entstehen wie z. B. Unfruchtbarkeit oder die bei Anthrazyklinen häufig beobachteten Herzmuskelschäden, welche zu Herzrhythmusstörungen und Herzinsuffizienz führen können (Minotti et al. 2004). Aufgrund der Wirkungsmechanismen der meisten Zytostatika, welche auf Schädigung der DNA beruhen, wirken diese gleichermaßen mutagen. Somit sind fast alle Chemotherapeutika kanzerogen und können als Spätfolge Zweittumoren verursachen.

Gleiches gilt für die Strahlentherapie, da die verwendete Strahlung vor allem in hohen Dosen DNA-Schäden bewirkt und Mutationen auslösen kann. Außerdem kann umliegendes Gewebe nicht vollständig vor der Bestrahlung geschützt werden, Gewebe, welches auf dem Weg der Strahlung in den Körper hinein und aus dem Körper hinaus liegt, ist unweigerlich betroffen, wenn auch mit geringerer Dosis als das im Fokus liegende Tumorgewebe. Häufige Nebenwirkungen sind hier Entzündungen der jeweiligen Gewebe, vor allem der Schleimhäute. Die Einteilung der Nebenwirkungen findet nach den gleichen Kriterien wie die der Chemotherapeutika statt und betrifft lediglich das bestrahlte Gebiet, nicht den ganzen Organismus.

Die meisten Nebenwirkungen werden symptomatisch behandelt, Antiemetika werden gegen Übelkeit und Erbrechen eingesetzt, Opiate gegen auftretende Schmerzen, die sowohl vom Tumor selbst als auch durch die Therapie entstehen können. Anderen zu erwartenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen wie Blutbildveränderungen oder Kardiotoxizität wird präventiv entgegengewirkt durch die Gabe von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren oder Kardioprotektiva (Cvetkovic et al. 2005).

2.1.2.4.2 Therapie mit monoklonalen Antikörpern

Auch in der Therapie mit Antikörpern ist mit unerwünschten Arzneimittelwirkungen zu rechnen. Da die Wirkungsweise sich jedoch von den Wirkmechanismen der Zytostatika unterscheidet, gilt dies gleichermaßen für das Nebenwirkungsprofil. Bei den verwendeten Antikörpern catumaxomab und ertumaxomab steht die Immunstimulation als Mechanismus im Vordergrund. Als Folge dessen sind Nebenwirkungen zu beobachten, welche auf die massive Ausschüttung von Zytokinen zurückzuführen sind. In einer Phase 1 Studie zur Dosisfindung von ertumaxomab von Kiewe et al. (2006) waren die häufigsten leichten Nebenwirkungen Fieber (94 %), Schüttelfrost (47 %), Kopfschmerzen (35 %), Übelkeit (29 %) und Erbrechen (29%). Diese waren nach Beendigung der Therapie komplett reversibel und werden gemäß der CTCAE mit Grad 1 bzw. Grad 2 kategorisiert. Schwerwiegendere Nebenwirkungen der Grade 3 und 4 traten ebenfalls auf, darunter Lymphozytopenie (76 %) und Leberenzymerrhöhung (47 %), welche jedoch ebenfalls reversibel waren. Abgesehen von der Immunstimulation bewirken Antikörper wie trastuzumab und ertumaxomab durch die Bindung an das HER2-Antigen eine Blockade der intrazellulären Signalkaskade, wodurch es vor allem in Herzmuskelzellen zu unerwünschten Effekten kommt. Das Risiko eine Herzinsuffizienz zu entwickeln, ist gemäß einer Metaanalyse

verschiedener Studien bei alleiniger Gabe von trastuzumab um 3-7 % erhöht. In Kombination mit anderen Chemotherapeutika v.a. Anthrazyklinen steigt die Wahrscheinlichkeit auf bis zu 27 % an (Seidman et al. 2002). Ebenfalls zu beachten sind bereits vorhandene Herzerkrankungen des jeweiligen Patienten, die sich verschlechtern können. Allerdings scheint die Verminderung der Ejektionsfraktion reversibel zu sein, die Herzfunktion verbessert sich nach Absetzen der Therapie wieder (van Hasselt et al. 2011). Wie bei vielen anderen körperfremden Substanzen können auch Überempfindlichkeitsreaktionen ausgelöst werden, welche sich meistens bereits kurze Zeit nach der Applikation manifestieren und denen entsprechend vorgebeugt werden sollte (Baldo 2013).

Die Behandlung der reduzierten Herzfunktion beinhaltet die klassischen Medikamente, die bei Herzinsuffizienz zum Einsatz kommen. Weiterhin ist eine engmaschige Kontrolle der Herzfunktion mittels Echokardiografie notwendig, um auf eventuelle Verschlechterungen reagieren zu können. Die Zytokinfreisetzung wird mit Hilfe einer Prämedikation therapiert, welche nach Empfehlung der EMA (European Medicines Agency) für catumaxomab aus NSAR (nicht steroidalen Antirheumatika) oder anderen Antipyretika wie Paracetamol bestehen sollte (European Medicines Agency 2009). Die Überempfindlichkeitsreaktionen können mit Antihistaminika prophylaktisch behandelt werden, weiterhin wird z. B. für rituximab als weitere Prämedikation die Gabe von Glukokortikoiden empfohlen (Roche Pharma AG 2011). Auch in einer Studie zur intravenösen Behandlung von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) mit catumaxomab kamen Glukokortikoide als Prämedikation zum Einsatz (Sebastian et al. 2007).

Generell werden Kortikosteroide in der medizinischen Praxis häufig eingesetzt, um Immunreaktionen, die dem Körper schaden, unter Kontrolle zu bringen. Durch die Inhibition der Zytokinexpression kann somit dem Zytokin-Freisetzungssyndrom (Cytokine release syndrome CRS), also der massiven Ausschüttung von Zytokinen, begegnet werden. Die Nebenwirkungen sollten dementsprechend milder ausfallen. Doch gleichermaßen ist zu beachten, dass es sich bei der Immunstimulation auch gleichzeitig um den primären Wirkmechanismus von catumaxomab und ertumaxomab handelt. Durch zu starke Unterdrückung der Immunantwort durch Reduktion der Zytokinexpression kann die Wirkung der Therapie herabgesetzt werden. Aus diesem Grund sollte die Dosierung und die Art des verwendeten Glukokortikoids sorgfältig überlegt werden. Es gibt eine Reihe von Glukokortikoiden, die sich jeweils in

Wirkstärke und -dauer unterscheiden. Die Wirkpotenz wird dabei an der von endogenem Hydrokortison gemessen, welche auf den Wert 1 festgelegt ist. Einige häufig verwendete Glukokortikoide sind in Abbildung 5 dargestellt.

Corticosteroid Comparison Chart

	Equivalent Glucocorticoid Dose (mg)	Potency relative to Hydrocortisone		Half-Life	
		Anti- Inflammatory	Mineral- Corticoid	Plasma (minutes)	Duration of Action (hours)
<i>Short Acting</i>					
Hydrocortisone (Cortef, Cortisol)	20	1	1	90	8-12
Cortisone Acetate	25	0.8	0.8	30	8-12
<i>Intermediate Acting</i>					
Prednisone	5	4	0.8	60	12-36
Prednisolone	5	4	0.8	200	12-36
Triamcinolone	4	5	0	300	12-36
Methylprednisolone	4	5	0.5	180	12-36
<i>Long Acting</i>					
Dexamethasone	0.75	30	0	200	36-54
Betamethasone	.6	30	0	300	36-54
<i>Mineralocorticoid</i>					
Fludrocortisone	0	15	150	240	24-36
Aldosterone	0	0	400 +	20	--

Reference: Adrenal Cortical Steroids. In Drug Facts and Comparisons. 5th ed. St. Louis, Facts and Comparisons, Inc.:122-128, 1997

Commonly Prescribed Replacement Steroid Equivalents

Prednisone	Cortisone	Dexamethasone	Hydrocortisone (Cortef)
5 mg	= 25 mg	= 0.75 mg	= 20 mg

Abbildung 5: Wirkpotenz und Wirkdauer einiger Glukokortikoide in Bezug auf Hydrokortison (Steroids. 1997)

In der vorliegenden Arbeit wurden präklinische Untersuchungen zu den Interaktionen zwischen trifunktionalen Antikörpern und Glukokortikoiden durchgeführt. Als Testumgebung dienten dabei vor allem dreidimensionale Tumorzellkulturen, welche als Tumorsphäroide bezeichnet werden und nun näher beschrieben werden.

2.2 Multizelluläre Tumorsphäroide (MCTS)

Die ersten Versuche an dreidimensional wachsenden Zellaggregaten liegen bereits 70 Jahre zurück und wurden an amphibischen Embryonen und später an Hühnerembryozellen durchgeführt (Holtfreter 1944; Moscona et al. 1952). Einige Jahre später wurden dann erste Versuche mit malignen Tumorzellen aus einer Mäuse Melanomlinie durchgeführt (Moscona 1957). In der Folge wurden humane Zelllinien eingesetzt und die dreidimensionalen Zellkulturen wurden in der Strahlenforschung verwendet (Sutherland et al. 1970). Während dieser Zeit etablierte sich auch der Begriff der "multizellulären Tumorsphäroide" (multicellular tumor spheroides: MCTS). Die Bezeichnungen „Sphäroid“ und „MCTS“ werden nachfolgend synonym verwendet. Eine detaillierte Zusammenfassung der Ursprünge von dreidimensionalen Zellkulturen ist nachzulesen bei Mueller-Klieser (Mueller-Klieser 1987).

In der Folge fanden Tumorsphäroide in immer mehr Bereichen Anwendung, darunter Untersuchungen in der Phototherapie, Hyperthermie und Chemotherapie. Weiterhin ist es möglich durch Kokultivierung anderer Zellen, wie Endothelzellen oder Fibroblasten, die in vivo Situation besser nachzustellen. Die Kokultivierung mit PBMC wird in der Immuntherapie eingesetzt, um z. B., wie in der vorliegenden Arbeit, die Wirkung von Antikörpern zu untersuchen, welche in vitro ein artifizielles Immunsystem benötigen, um ihre volle Wirksamkeit zu entfalten. Eine aktuelle Zusammenfassung über die Herstellung und den Einsatz von MCTS ist nachzulesen bei Hirschhaeuser und Kollegen (Hirschhaeuser et al. 2010).

Alle dreidimensionalen Zellkulturmodelle können als Zwischenstufe angesehen werden, die den Übergang von der Monolayer-Zellkultur zum Tierexperiment bildet. Es können somit mehr und akkuratere Daten in vitro gesammelt werden, wodurch die Experimente an Versuchstieren reduziert oder im besten Falle komplett ausgelassen werden können. Diese bessere Abbildung der in vivo Situation basiert auf mehreren entscheidenden Unterschieden der Tumorsphäroide im Vergleich zur Monolayer-Kultur.

2.2.1 Unterschiede zwischen multizellulärer Tumorsphäroidkultur und Monolayerkultur

In der klassischen Zellkultur werden Zellen in Petrischalen oder Zellkulturflaschen ausgesät und vermehren sich in der Folge zu einem Zellrasen. Dabei haftet jede Zelle am Boden des Gefäßes. Die Ausbreitung findet horizontal statt. Der sich entwickelnde Zellrasen bleibt primär auf zwei Dimensionen beschränkt. Bei der Generierung von Tumorsphäroiden wird den Zellen die Adhäsionsmöglichkeit an einem artifiziellen Untergrund verwehrt. Die Zellen können nur noch Kontakte untereinander ausbilden, weshalb sich nach einiger Zeit bei bestimmten Zelllinien dreidimensionale Zellaggregate entwickeln können. Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Adhäsion spielen eine wichtige Rolle für das Überleben der Zelle und die Expression von Zelladhäsionsmolekülen kann sich in Sphäroiden deutlich von der in Monolayerkultur unterscheiden (Santini et al. 2000). Ab einem Durchmesser von etwa 500 µm entwickelt sich im Zentrum der Zellaggregate eine sekundäre Nekrose, da die Zufuhr von Nährstoffen und Sauerstoff, sowie die Abfuhr von Stoffwechselendprodukten nicht mehr gewährleistet werden kann. Bei manchen Zelllinien scheint Sauerstoffmangel alleine bereits für die Nekrose verantwortlich zu sein, meistens ist dieser Effekt wohl multifaktoriell bedingt (Mueller-Klieser et al. 1986; Mueller-Klieser 1997). Damit ähneln Tumorsphäroide Mikrometastasen oder auch kleinen, avaskulären Mikroregionen eines in vivo Tumors.

2.2.2 Aufbau von multizellulären Tumorsphäroiden

Ein Sphäroid kann ab einer Größe von ca. 500 µm allgemein in 3 Regionen unterteilt werden. Der äußere Bereich besteht aus einem Ring von vitalen, proliferativen Zellen und hat eine Breite von ungefähr 100-300 µm. Die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie die Entsorgung von Stoffwechselendprodukten sind in dieser Schicht durch das Nährmedium ausreichend. Darunter folgt eine Schicht mit ruhenden Zellen, welche sich in der G₀-Phase des Zellzyklus befinden und keine proliferative Aktivität aufweisen. Die innerste Schicht schließlich besteht, wie bereits erwähnt, aus apoptotischen/nekrotischen Zellen, deren Distanz zum Nährmedium zu groß ist, um an die für das Überleben notwendigen Nährstoffe und Sauerstoff zu gelangen. Diese Diffusionsgradienten entstehen einerseits durch die sphärische Struktur, welche die

Distanz zwischen Zentrum und Medium vergrößert, andererseits aber auch durch die starken Zell-Zell-Kontakte, welche die Diffusion zusätzlich erschweren (Kunz-Schughart et al. 2004).

Die Möglichkeiten der Herstellung von Tumorsphäroiden sind vielfältig, basieren jedoch fast immer auf dem gleichen Prinzip, dem Verweigern der Adhäsion an einem Untergrund. Einen Überblick über die verschiedenen Methoden zur Sphäroidgenerierung bieten Hirschhaeuser und Kollegen (Hirschhaeuser et al. 2010).

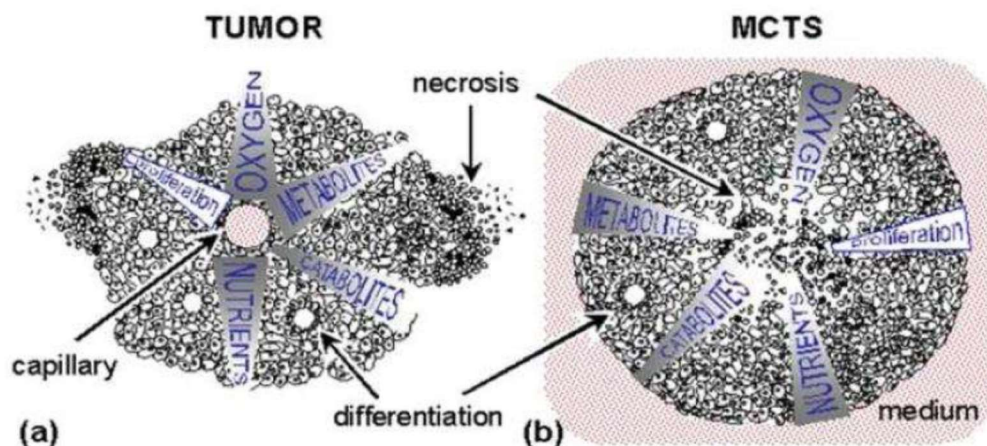


Abbildung 6: Gradienten von Nährstoffen, Abbauprodukten und Sauerstoff in einem Tumor (a) und einem Tumorsphäroid (b).

In vivo Tumoren werden durch Kapillargefäße versorgt, je größer die Entfernung zum Gefäß ist, desto schlechter wird die Versorgungslage. Der Stoffaustausch bei MCTS in vitro findet mit dem Nährmedium statt, weshalb die Versorgungslage im Zentrum am schlechtesten ist (Kunz-Schughart et al. 2004).

2.2.3 Bedeutung in der Arzneimittelforschung

Durch die beschriebenen Merkmale der Sphäroide ist diese Form der 3D-Zellkultur auch in der Arzneimittelforschung beliebt, da die Wirkung der Medikamente bereits besser eingeschätzt werden kann als bei Versuchen in der Monolayerkultur. Die Resistenz gegen Chemotherapeutika kann in Sphäroiden stärker ausgeprägt sein, da verantwortliche Proteine wie z. B. Bcl-2 überexprimiert werden. Dadurch steigt in Ovarialkarzinomzelllinien die Resistenz gegen Doxorubicin. Weiterhin können andere Mechanismen wie die multizelluläre Resistenz zum Tragen kommen, welche in vivo ebenfalls existieren (Desoize et al. 1998; Perche et al. 2012). Zusätzlich kann die Penetrationsfähigkeit der Therapeutika getestet werden, da sie nicht zu allen

Zellschichten gleichermaßen Zugang haben, sondern erst die äußeren Schichten des Sphäroids passieren müssen, um alle Zellen zu erreichen (Ma et al. 2012).

Auch in der Strahlentherapie wird bereits seit 1970 mit Sphäroiden geforscht (Sutherland et al. 1970). Hier reagierten Tumorzellen aus Sphäroiden oft resistenter auf Bestrahlung als Zellen aus der Monolayerkultur, was auf Zell-Zell-Kontakte, vor allem Gap junctions, aber auch auf veränderte Genexpression, Zellform und Chromatinstruktur zurückgeführt wird (Olive et al. 1994).

Neue Therapien, wie z. B. Kombinationen aus Radio- und Chemotherapie, werden ebenfalls an Sphäroiden getestet. Dabei wird versucht Hochdurchsatzmodelle zur Steigerung der Effizienz zu etablieren (Kunz-Schughart et al. 2004; Senavirathna et al. 2013; Vinci et al. 2012).

Durch die Möglichkeit der Kokultivierung von Tumorsphäroiden und anderen Zellen, wie Fibroblasten oder allen voran Leukozyten, können tumorspezifische Antikörpertherapien getestet werden, welche in vitro ein artifizielles Immunsystem benötigen, um ihre volle Wirkung zu entfalten. In der vorliegenden Arbeit wurde ein solches Testsystem in Form von Spinnerkulturen verwendet, welchen eine Leukozytensuspension hinzugefügt wurde, um verschiedene Wirkstoffe wie Antikörper und Glukokortikoide, sowie deren Wechselwirkungen zu untersuchen.

3 Materialien und Methoden

3.1 Zellkultur und Zelltechniken

3.1.1 Verwendete Zelllinien

Es wurden FaDu-Zellen verwendet, da diese sowohl EpCAM als auch HER2/neu auf ihrer Oberfläche exprimieren. Für die Behandlung mit catumaxomab und ertumaxomab sind diese Antigene essenziell, da die beiden trifunktionalen Antikörper jeweils für EpCAM bzw. HER2/neu spezifisch sind.

Die FaDu-Zelllinie entstammt dem Hypopharynx-Karzinom eines Hindu-Patienten und wurde 1968 entnommen und etabliert. Die Zellen wurden uns freundlicherweise von Prof. Baumann von der TU Dresden zur Verfügung gestellt.

Da die Wildtyp FaDu-Linie nur wenig HER2/neu exprimiert, wurde sie stabil mit HER2/neu-kodierenden Vektoren transfiziert. Diese FaDu E593-Zelllinie wurden uns freundlicherweise von EUFETS AG, Idar-Oberstein, für die Versuche überlassen.

3.1.2 Medien und Zusätze

Die FaDu Zellen werden in DMEM Nährmedium mit Glukose (4,5 g/l) und L-Glutamin (4 mM) kultiviert. Diesem Grundmedium werden 10 % fetales Kälberserum (FCS), 10 mM HEPES Puffer, 1 % nicht essenzielle Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat, 1 % Penicillin und Streptomycin, 1 % Amphotericin B, sowie für FaDu E593 5 mg/ml G-418 Selektionsantibiotikum hinzugefügt.

3.1.3 Spinnerflaschen

Die Kultivierung der Sphäroide erfolgt in sogenannten Spinnerflaschen. Diese sind aus Glas und am oberen Deckel ist ein Glasstab angebracht, an dessen Ende ein Rührmagnet befestigt ist. Auf einer Magnetrührplatte dreht der Magnet in der Flasche bei 150 U/min. Die Nährlösung im System ist somit in ständiger Bewegung und gewährleistet eine konstante Versorgung der Sphäroide mit Sauerstoff und Nährstoffen. Um ein mögliches Anhaften der Sphäroide am Flaschenboden zu verhindern, werden die Spinnerflaschen je nach Nutzungshäufigkeit in regelmäßigen

Abständen silikonisiert. Es wird eine Silikonlösung (Sigma) verwendet, um die Flaschen zu beschichten. Dafür wird etwa ein Fünftel des Flaschenvolumens hineingegeben und geschwenkt. Anschließend wird die Silikonlösung abgegossen und die Flaschen bei 100 °C im Trockenschrank 100 min getrocknet. Da Silikon auch zytotoxisch wirkt, müssen die Flaschen dreimal 30 min mit Aqua dest. Durchgespült und gewässert werden.

Nach Versuchsende müssen die Spinnerflaschen aufbereitet werden, um später erneut eingesetzt werden zu können. Zuerst werden alle Sphäroide sowie das Medium entfernt und die Flaschen mit Isopropanol ausgespült. Als Nächstes wird etwas RBS neutral Spüllösung (Roth) hineingegeben und die Flasche komplett mit Leitungswasser aufgefüllt. Nach Inkubation über Nacht folgt der Waschgang in der Spülmaschine. Um Spülmittelrückstände vollständig zu entfernen, werden die Flaschen danach 24 h in Aqua dest. Gewässert. Nachdem sie getrocknet sind, werden sie autoklaviert und im Trockenschrank bei 100 °C erneut getrocknet.

3.1.4 Kultivierung der Zellen und Medienwechsel

Die Kultivierung erfolgt in einem Inkubator, welcher eine wasserdampfgesättigte Atmosphäre mit 5 % CO₂ und 37 °C erzeugt. Alle zwei bis drei Tage wird das verbrauchte Nährmedium abgegossen und mit einer sterilen Pipette wird neues hinzugegeben.

3.1.5 Passagieren

Nach einigen Tagen in Kultur bedeckt ein konfluenter Zellrasen den Boden der Kulturflasche. Die Zellen müssen abgelöst und ein Teil in eine neue Zellkulturflasche überführt werden. Dieser Vorgang wird als Passagieren bezeichnet. Die Zellen befinden sich dann entsprechend der Häufigkeit dieses Vorgangs in einer bestimmten Passage.

Beim Passagieren wird zuerst unter der Sterilbank das Medium abgegossen. Anschließend wird je nach Größe der Zellkulturflasche ein bestimmtes Volumen Hank's Puffer auf die Zellen gegeben (z. B. 4 ml bei einer 75 cm² Flasche). Dies neutralisiert zum einen den pH Wert (vorher <7 durch die 5 %ige CO₂-Atmosphäre) und bindet zum anderen zweiwertige Ionen (z. B. Ca²⁺). Dadurch wird ein optimales

Milieu für die folgende Trypsinisierung geschaffen und die Fähigkeit der Zellen am Boden anzuhaften wird reduziert (für diesen Vorgang sind zweiwertige Ionen wichtig). Im nächsten Schritt wird ein Trypsin/EDTA Gemisch in die Flasche gegeben, um die Zellen vom Boden zu lösen. Die Inkubationszeit beträgt bei FaDu-Zellen etwa 4 min bei 37 °C im Inkubator. Danach werden die Zellen durch leichtes Klopfen vom Boden gelöst. Die Trypsin Reaktion muss im Anschluss abgestoppt werden, da durch das Enzym auch die Zellen geschädigt werden können. Dies geschieht durch Zugabe von Nährmedium im Verhältnis 5:1 zum Volumen des Trypsins. Durch die hohe Proteinkonzentration im Medium wird das Trypsin abgesättigt und die Reaktion gestoppt. Anschließend wird 1 ml Zellsuspension zu 9 ml Medium in eine neue Zellkulturflasche gegeben, um ein Teilungsverhältnis von 1:10 zu erreichen.

3.1.6 Anlegen von Kryostocks

Es werden Kryostocks angelegt, um die Zellen zu ersetzen, die in ihrer Passage bereits zu weit fortgeschritten sind (Kultivierung etwa bis Passage 20). Zuerst werden die Zellen abgelöst und mit Hilfe des CASY® Zellzähl-Gerätes die Zellkonzentration in der Suspension bestimmt. Nun wird die Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert, damit sich die Zellen am Boden als Pellet sammeln (188 x g, 10 min, 4 °C). Der Überstand aus Trypsin und Medium wird verworfen und das Pellet so in Kulturmedium +10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert, dass sich eine Konzentration von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml ergibt. Das zugesetzte DMSO verhindert die Bildung von Eiskristallen, die die Zellen beim Einfrieren zerstören würden. Nun wird 1 ml der Zellsuspension in ein Kryoröhrchen gegeben. Mit Hilfe einer Einfrierbox werden die Röhrchen langsam auf -80 °C gekühlt (1 °C pro Minute). Abschließend werden die Kryoröhrchen bei -190 °C in flüssigem Stickstoff gelagert, um bei Bedarf wieder aufgetaut zu werden.

3.1.7 Auftauen von Zellen aus dem Kryostock

Zuerst wird in ein 15 ml Reaktionsgefäß 10 ml Medium gegeben. Das Kryoröhrchen wird aus dem Stickstofftank entnommen und in einem Wasserbad (37 °C) aufgetaut. Die Zellsuspension wird nun rasch in das Reaktionsgefäß mit Medium überführt und bei 188 x g für 10 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Als nächstes wird der

Überstand entfernt und das Pellet in 10 ml Medium resuspendiert. Die Suspension wird dann auf zwei Zellkulturflaschen aufgeteilt (25 cm² und 5 ml pro Flasche). An den folgenden zwei Tagen muss jeweils das Nährmedium gewechselt werden. Die Zellen starten mit Passage 0.

3.1.8 Multizelluläre Tumorsphäroide

Für die Initiierung von multizellulären Tumorsphäroiden werden zuerst 96 Well-Platten mit 1,5 %iger Agarose beschichtet, um das Anhaften der Zellen am Plattenboden zu verhindern. Durch die Zugabe der Agarose bildet sich ein Meniskus mit einer Senke in jedem Well, in der sich die Zellen sammeln können. Die Agarose wird in PBS gelöst und autoklaviert. Anschließend wird in jedes Well 50 µl der warmen, flüssigen Agarose gegeben, welche beim Erkalten aushärtet. Im nächsten Schritt werden die Zellen mit Hank's-Lösung und Trypsin abgelöst und mit Hilfe des CASY® Zellzählgerätes gezählt. Die Zellkonzentration der Suspension wird auf $3,3 \times 10^4$ /ml eingestellt und davon 150 µl (5×10^3 Zellen) in jedes Well pipettiert. Die Zellen werden vier Tage in den Platten im Brutschrank inkubiert, bis sich in jedem Well ein kompakter Sphäroid gebildet hat. Im Anschluss werden die Sphäroide mit Hilfe einer Pasteurpipette aus den Wells entnommen und mit insgesamt 300 ml Medium in eine große Spinnerflasche überführt, in der sie für weitere vier Tage im Brutschrank inkubieren. Zu Beginn des Versuchs werden die Sphäroide in kleine Spinnerflaschen überführt (200 Sphäroide/Flasche), das Gesamtvolumen beträgt 20 ml.

3.1.9 Mykoplasmentest

Alle Zelllinien, die in Kultur gehalten werden, müssen regelmäßig alle drei bis sechs Monate auf Mykoplasmen getestet werden, um eine nicht sichtbare Kontamination auszuschließen. Aus einer zu mindestens 90 % konfluenten Zellkulturflasche wird etwa 100 µl Medienüberstand entnommen. Es folgt eine fünfminütige Inaktivierung bei 100 °C mit anschließender Zentrifugation (15000 x g, 5 s).

Tabelle 1: PCR Ansatz für den Nachweis von Mykoplasmen

	Probe 1fach	Positiv-Kontrolle 1fach	Negativ-Kontrolle 1fach
PCR grade Water	15,3 µl	15,3 µl	15,3 µl
10x PCR-Puffer	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
Primer/ Nucleotide	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
Interne Kontrolle	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
zusammen pipettieren (=Master Mix) und mittels Kreisschüttler mischen			
Taq Polymerase (5U/µl)	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl
Master Mix mit Taq (= 23 µl) in 0,2 ml Reaktionsgefäße vorlegen			
Kulturüberstand	2,0 µl	-	-
Positiv-Kontrolle	-	2,0 µl	-
PCR grade Water	-	-	2,0 µl
Gesamtvolumen		25 µl	

Ablauf der PCR:

94 °C	2 min	Dauer abhängig von verwendeter Polymerase
94 °C	30 s	40 Zyklen
55 °C	30 s	
72 °C	30 s	
4 °C		

Mit Hilfe der PCR wird ein Teil der 16S rRNA der Mykoplasmen amplifiziert (Größe ca. 270 bp). Im nächsten Schritt wird eine 1,5 %ige Agaroselösung mit 50 ml 0,5x TBE-Puffer hergestellt. Diese Lösung wird lauwarm in die Gelform gegossen und nach dem Aushärten in die Elektrophoresekammer gebracht. Dort wird das Gel mit Laufpuffer überschichtet. In die erste Kammer wird 4 µl Ladder gegeben, in die anderen Kammern kommen ein Gemisch aus jeweils 5 µl Probe und 1 µl Ladepuffer. Bei einer Spannung von 100 V läuft das Gel 15-20 min. Anschließend wird das Gel in ein Ethidiumbromid

Bad gelegt (200 µl in 400 ml Aqua dest.), in dem es 5 min verweilt. Es folgt die Entfernung überschüssigen Ethidiumbromids in einem dreiminütigem Bad in destilliertem Wasser. Im letzten Schritt wird das Gel unter UV-Licht gebracht und fotografiert. Bei Mykoplasmenbefall sind Banden zwischen 265 und 278 bp sichtbar, die interne Kontrolle zeigt eine Bande bei 191 bp.

3.1.10 Isolierung von PBMC aus einem Buffy Coat

Die Wirkung der trifunktionalen Antikörper wird durch Effektorzellen des Immunsystems vermittelt. Diese PBMC (peripheral blood mononuclear cells) werden aus Buffy Coats von gesunden humanen Blutspendern extrahiert. Diese werden uns freundlicherweise von der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz zur Verfügung gestellt.

Zuerst wird das Blut 1:4 mit PBS gemischt. In acht 50 ml Reaktionsgefäßen wird jeweils 25 ml LSM 1077 (Lymphozyten Separationsmedium, PAA) vorgelegt und langsam mit dem verdünnten Blut überschichtet. Im Anschluss wird 25 min mit 1200 x g bei RT zentrifugiert. Dabei wird das Prinzip der Dichtezentrifugation ausgenutzt. Das LSM enthält ein hydrophiles Polymer mit einem Molekulargewicht von 400 kD. Die Lösung hat eine Dichte von 1,077 g/ml. Erythrozyten ($D = 1,1 \text{ g/ml}$) und Granulozyten ($D = 1,09 \text{ g/ml}$) sammeln sich als Pellet am Boden, darüber befindet sich das LSM und in der obersten Phase ist das Plasma ($D = 1,03 \text{ g/ml}$). Zwischen LSM und der Plasmaphase ist ein weißer Ring zu sehen, der die PBMC ($D = 1,06 \text{ g/ml}$) enthält. Die weiße Phase wird nun abpipetiert (10-12 ml pro Reaktionsgefäß) und die Zellen aus vier Reaktionsgefäßen in einem neuen 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Die beiden neuen Gefäße werden nun 10 min mit 300 x g bei RT zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand abgegossen und die Pellets aus PBMC in jeweils 5 ml PBS resuspendiert und in einem 15 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Es folgt eine weitere Zentrifugation für 10 min mit 200 x g bei RT. Der Überstand wird erneut verworfen und das Pellet in 10 ml Medium resuspendiert. Im nächsten Schritt werden 100 µl Zellsuspension entnommen und 1:10 mit 1 %iger Essigsäure verdünnt. Das Gemisch wird 5 min inkubiert, wobei durch die Essigsäure verbleibende Erythrozyten und Granulozyten lysiert werden.

Im Anschluss werden die PBMC in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Die Kammer besitzt eine Tiefe von 0,1 mm, ein großes Eckquadrat hat eine Fläche von 1 mm². Es werden jeweils zwei gegenüberliegende große Eckquadrate ausgezählt und das Ergebnis gemittelt. Bei einer Abweichung von mehr als 10 % wird ein 3. Quadrat ausgezählt.

Anschließend wird die Zellzahl berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Anzahl Zellen} * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Volumenumrechnungsfaktor} (10^4)}{\text{Summe der Großquadrate}}$$

3.1.11 Größenbestimmung der Sphäroide

Ein wichtiger Parameter in allen Versuchen ist der Durchmesser bzw. das Volumen der Sphäroide. Die Spinnerflaschen werden mit einem handelsüblichen Flachbett Scanner mit einer Abtastrate von 1200 dpi eingescannt. Um unnötigen Hintergrund und Bildgröße so gering wie möglich zu halten, wird ein großer Teil des Scanfildes abgedunkelt, nur der Bereich um die Spinnerflasche bleibt frei. Die Sphäroide werden innerhalb der Flasche randständig und in einer Ebene platziert, um Überlagerungen mit dem Magnetrührstab sowie unter den Sphäroiden selbst zu vermeiden. Anschließend wird das entstandene Bild mit Hilfe der Software Photoshop bearbeitet. Zuerst wird ein binäres Bild des Scans erstellt. Dabei werden die Sphäroide durch die Tonwertkorrektur betont und vom Hintergrund abgehoben. Es muss darauf geachtet werden, dass diese immer gleich bleibt, damit sich die Größe der MCTS nicht artifiziell verändert. Nun wird manuell verbleibender Hintergrund (vor allem der Magnetrührstab) unter Benutzung der Deckfunktion und des Pinsels entfernt. Im bearbeiteten Bild verbleiben die Sphäroide als schwarze Kreisflächen. Als nächstes wird die Anzahl der Pixel eines jeden Sphäroids ausgezählt. Dies geschieht mit Hilfe der Software ImageJ 1.4, welche kostenfrei erhältlich ist. Schließlich wird der Durchmesser aus der Pixelzahl errechnet, unter der Prämisse, dass die Sphäroide eine perfekte Kugel bilden. Die Ergebnisse werden gemittelt und als Volumenkurve gegen die Zeit aufgetragen. Die Berechnung des Sphäroidvolumens erfolgt anhand der Volumenformel für eine Kugel aus dem Radius.

Volumenberechnung der Sphäroide aus dem Radius: $V = 4\pi \frac{r^3}{3}$

3.1.12 Klonogenitätstest

Bei diesem Klonogenitätstest wird überprüft, wie viele der eingesetzten Zellen noch teilungsfähig sind. Dies wird auch als Plattierungseffizienz (PE - plating efficiency) bezeichnet. Zu Beginn werden aus jedem Ansatz jeweils fünf Sphäroide entnommen und in ein separates Reaktionsgefäß gegeben. Überschüssiges Medium wird abpipettiert, danach werden die Sphäroide mit 400 µl Hank's-Lösung gewaschen. Der Überstand wird erneut abgezogen, anschließend werden die Sphäroide in den Reaktionsgefäßen mit jeweils 100 µl Trypsin für 4 min inkubiert. Dies führt zur Disaggregation und muss nach Ablauf der Zeit mit 900 µl Medium abgestoppt werden, um die Zellen nicht zu schädigen. Nun wird 100 µl Zellsuspension entnommen und im CASY® Zellzähler die Zellzahl bestimmt. Dann werden in je drei Petrischalen mit 21 cm² Fläche 1000 und 2000 Zellen in 4 ml Kulturmedium gegeben. Man geht davon aus, dass dauerhafte Teilungsfähigkeit besteht, wenn eine Zelle mindestens sechs Mitose-Zyklen durchgemacht hat. Die Inkubationszeit des Tests umfasst demnach mindestens sechs Verdopplungsphasen, im Fall von FaDu also sieben Tage. Am Ende der Inkubationsphase wird das Medium abgesaugt und in jede Petrischale werden 2,5 ml 0,3 % Methylenblau-Lösung gegeben, die nach 30 min Inkubationszeit die entstandenen Zellkolonien färben. Zuletzt wird die Farblösung abgesaugt und die Petrischalen mit offenem Deckel zum Trocknen ausgelegt. Die Auszählung der Kolonien geschieht digital. Dazu werden die Petrischalen mit einem Flachbettscanner bei 1200 dpi eingescannt. Anschließend werden die Kolonien mit Hilfe der Tonwertkorrektur in Photoshop hervorgehoben und der Scan in ein binäres Bild umgewandelt. Verbleibender Hintergrund und Artefakte werden manuell mit der Pinselfunktion entfernt. Schließlich werden die Kolonien mit der ImageJ 1.4 Software ausgezählt, wobei vorher eine Kalibrierung stattfindet. Dabei wird die Pixelzahl einer Kolonie bestimmt, indem die Anzahl der Kolonien mit 50 Zellen oder mehr manuell unter dem Mikroskop ausgezählt und im Anschluss die Pixelzahl als Untergrenze bestimmt wird, bei der genauso viele Kolonien entstehen.

3.1.13 Vitalitätstest

Bei diesem Test wird die Stoffwechselaktivität der Zellen und somit ihre Vitalität gemessen. Die Sphäroide werden wie beim Koloniebildungstest entnommen und disaggregiert. Anschließend wird die Zellzahl bestimmt. Nun werden die Zellen 6 min

bei 188 x g zentrifugiert und nachfolgend der Medienüberstand verworfen. Es folgt die Resuspension in Medium ohne Phenolrot, damit die später stattfindende Extinktionsmessung nicht verfälscht wird. In einer 96 Well-Platte werden in 4fach Bestimmung jeweils 25.000 Zellen in einem Volumen von 200 µl pro Well ausgesät. Es folgt eine Inkubation im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre über Nacht. Im Anschluss wird in jedes Well 40 µl XTT Reagenz pipettiert, welches von stoffwechselaktiven Zellen in ein Chromophor umgesetzt wird. Nach 4 h Inkubationszeit wird im Photometer die Extinktion bei 450 nm bestimmt. Zusätzlich findet eine Messung bei 655 nm statt, welche die Hintergrundextinktion von Medium und Well-Platte repräsentiert. Die Höhe der Differenz der Extinktionen im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle ist ein Maß für die Vitalität der Zellen.

3.1.14 Behandlung der Zellen und MCTS mit Antikörpern und Kortikosteroiden

Für die Versuche werden zwei Antikörper und zwei verschiedene Kortikosteroide verwendet. Zunächst werden jeweils 200 Sphäroide aus einer großen Spinnerflasche in eine kleine Spinnerflasche mit 18 ml Medium überführt. Es folgt die Isolation der PBMC aus dem Buffy Coat. Jedem Ansatz werden 1×10^6 Zellen/ml PBMC hinzugefügt. Ausgenommen sind die Ansätze mit der Glukokortikoid-Konzentrationsreihe sowie der Kontrollansatz, welcher lediglich die Sphäroide in Medium enthält. Im nächsten Schritt werden je nach Ansatz variabel die jeweilige Konzentration an Antikörper und Glukokortikoiden hinzugefügt, welche vorher in Medium gelöst und verdünnt werden. Es kommen zwei verschiedene Glukokortikoide zum Einsatz. Zum einen wird in Kombination mit catumaxomab Dexamethason in Form von Fortecortin® aus einer Injektionsampulle mit 4 mg/ml verwendet. Zum anderen wird ertumaxomab in Kombination mit reinem Prednisolon-Pulver, welches vorher abgewogen und in Medium gelöst wird, verwendet. Abschließend werden die Ansätze mit Medium aufgefüllt, bis das Gesamtvolumen von 20 ml pro Flasche erreicht ist. Am Tag des Versuchsbeginns wird der Kontrollansatz repräsentativ für alle Ansätze zur Größenbestimmung eingescannt und ausgewertet. Am folgenden Tag werden zusätzlich zur Größenbestimmung aus jedem Ansatz zehn Sphäroide entnommen, um einerseits den Klonogenitäts- und XTT-Test durchzuführen und

andererseits um fünf Sphäroide zu asservieren. Diese werden später histologisch untersucht. Dieses Procedere wiederholt sich an Tag 5 und schließlich erneut am Ende des Versuchs. An jedem zweiten Tage wird die Größenbestimmung durchgeführt. Es findet während der Versuchszeit kein Medienwechsel statt und auch die PBMC werden nicht erneuert. Insgesamt werden die Eingriffe in das System so gering wie möglich gehalten, lediglich an den Entnahmetagen werden die Spinnerflaschen geöffnet, da die Größenbestimmung nicht invasiv ist.

3.2 Immunhistologie an Sphäroidschnitten

An Tag 1, Tag 5 und am Ende des Versuches werden jeweils fünf Sphäroide aus jedem Ansatz entnommen, um sie histologisch zu untersuchen. Dazu werden sie nach der Entnahme aus der Flasche mit Hilfe von flüssigem Stickstoff kryo-konserviert und anschließend bei -80 °C bis zur weiteren Behandlung gelagert.

Im nächsten Schritt werden aus den Sphäroiden in einem Kryotom bei -20 °C Schnitte von 10 µm Dicke angefertigt, ohne dabei die Kühlkette zu unterbrechen. Dazu wird jeweils ein Sphäroid im Fixierungsmedium Tissue Tek eingebettet und geschnitten. Mehrere parallele mediane Schnitte werden auf einen Objektträger aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend werden sie bis zur Färbung bei -20 °C gelagert.

Unmittelbar vor Beginn der Färbung werden die Schnitte zunächst für 5 min in -20 °C kaltem Aceton fixiert und im Anschluss etwa 5 min luftgetrocknet. Die Schnitte auf dem Objektträger werden mit dem PapPen umrandet, um abgegrenzte Reaktionsflächen zu generieren. Die Schnitte werden 5 min in PBS rehydriert und in der Folge mit 3 % BSA in PBS geblockt, um Bindungsstellen abzusättigen, die eventuell Kreuzreaktionen mit dem Primärantikörper hervorrufen können. Nach zweimaligem Waschen in PBS folgt die Inkubation mit 15 µl verdünntem Primärantikörper pro Spot (anti-HER2, anti-CD45 oder anti-Ki67) für 1 h in der feuchten Kammer. Die Verdünnungen werden mit PBS hergestellt (anti-HER2 1:500, anti-CD45 1:200 oder anti-Ki67 1:50). Es wird stets eine Negativkontrolle mitgeführt, die lediglich mit PBS behandelt wird. Es werden zwei Waschphasen in PBS angeschlossen, danach werden die Schnitte mit 3%igem Wasserstoffperoxid für 10 min inkubiert. Im Anschluss werden die Schnitte erneut dreimal 2 min mit PBS gewaschen. Nun wird jeder Spot für 30 min mit 15 µl Dako EnVision anti-mouse Sekundärantikörper inkubiert. Es folgt nach zwei

Waschvorgängen die Applikation des Chromogens DAB⁺ bis eine sichtbare Färbung eintritt (Dauer bis zu 30 min). Als nächstes werden die Schnitte kurz in PBS und in destilliertes Wasser getaucht, bevor sich die Hämalaun-Reihe anschließt. Diese beginnt mit 2,5 – 3 min Inkubation in Hämalaun und anschließend 5 min Bläuen in Leitungswasser. Nach kurzem Waschen in destilliertem Wasser werden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Es beginnt jeweils mit 70 % Isopropanol, und wird dann in 80 % und 90 % Isopropanol fortgesetzt. Als nächstes werden die Schnitte in 100 % Isopropanol umgesetzt und verbleiben dort 5 min. Abschließend folgen drei Phasen zu jeweils 5 min in Xylol, bevor die Objektträger mittels Roti Histokitt II mit einem Deckglas versehen werden. Nach 24 h Trocknung bei Raumtemperatur ist die Färbung und die Fixierung abgeschlossen.

Die Schnitte werden nun noch fotografiert und bearbeitet. Dazu werden die Objektträger in ein Mikroskop eingespannt, wobei am Ende des Strahlenganges eine Kamera montiert ist. Zunächst wird ein Weißabgleich durchgeführt, um Farben und Kontraste originalgetreu abzubilden. Die Belichtungszeit wird angepasst (etwa 40-80 ms), um eine gute Bildqualität zu erreichen. Schließlich werden die entstandenen Bilder mit der Photoshop Software auf den Schnitt zentriert, außerdem werden Artefakte und verbleibender Hintergrund manuell entfernt.

3.3 Zytokinmessung mittels Cytokine Bead Array von IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6 und IL10

Die Messungen wurden freundlicherweise von der EUFETS GmbH, Idar-Oberstein, mit dem Human Th1/Th2 Cytokine Kit II (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) durchgeführt.

Zur Gewinnung der Proben werden zunächst aus jedem Ansatz 200 μ l Medienüberstand entnommen. Dieser wird zentrifugiert, damit sich verbleibende Zellen und Zelltrümmer am Boden sammeln (188 x g, 5 min, RT). Aus dem Überstand werden jeweils zwei Aliquots mit 75 μ l erstellt und bei -80 °C bis zur Messung gelagert.

Mit Hilfe eines Cytokine Bead Arrays wurden die Proben durchflusszytometrisch gemessen. Dabei wird ein Zytokin-Detektionsgemisch verwendet, welches einen Primärantikörper enthält, der an die Zytokine bindet. Zur Farbgebung wird ein mit

Phycoerythrin (PE) konjugierter Sekundärantikörper benutzt, der an den Primärantikörper bindet. Anschließend folgt die Extinktionsmessung im Durchflusszytometer. Anhand einer vorher erstellten Standardgeraden können die Zytokin-Konzentrationen bestimmt werden. Der Messbereich liegt zwischen 20 pg/ml und 5000 pg/ml.

4 Ergebnisse

4.1 Wachstum von FaDu-MCTS ohne Behandlung

4.1.1 Sphäroidvolumen vom Zeitpunkt der Initiation bis zum Start des Versuchs

Bei der Initiation werden jeweils 1×10^4 Zellen/Well in eine mit Agarose beschichtete 96 Well-Platte gegeben. Nach zwei Tagen haben sich die Zellen zu MCTS aggregiert und es wird erstmals der Durchmesser bestimmt. Dazu werden jeweils acht Sphäroide entnommen und digital vermessen. Es findet gleichermaßen eine herkömmliche Größenbestimmung unter dem Mikroskop statt, bei welcher der Durchmesser manuell anhand einer Skala bestimmt wird und anschließend eine Umrechnung in Millimeter stattfindet. Anschließend erfolgt die Berechnung des Volumens aus dem Durchmesser unter der Annahme, dass die Sphäroide eine annähernd perfekte Kugelform haben. Die beiden Messmethoden zeigen nach dem Transfer in die Spinnerflasche fast keine Unterschiede, so dass alle weiteren Größenbestimmungen ausschließlich digital erfolgen (Abbildung 7 **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). An Tag 7 werden die Sphäroide in eine große Spinnerflasche umgesetzt, wobei die Messung unter dem Mikroskop vor dem Transfer, die digitale Messung jedoch nach dem Wechsel in die Spinnerkultur erfolgt. Dadurch ist die Diskrepanz zu erklären, da die Sphäroide in der Spinnerflasche bereits die Form einer Kugel einnehmen, während in der 96 Well-Platte eine elliptische Form besteht. Die MCTS werden weitere sieben Tage inkubiert, um die Bedingungen für alle Sphäroide so konstant wie möglich zu halten. In diesem Zeitraum verzeichnen die MCTS bis Tag 14 eine kontinuierliche Zunahme des Volumens bis auf 253 % des Ausgangswertes.

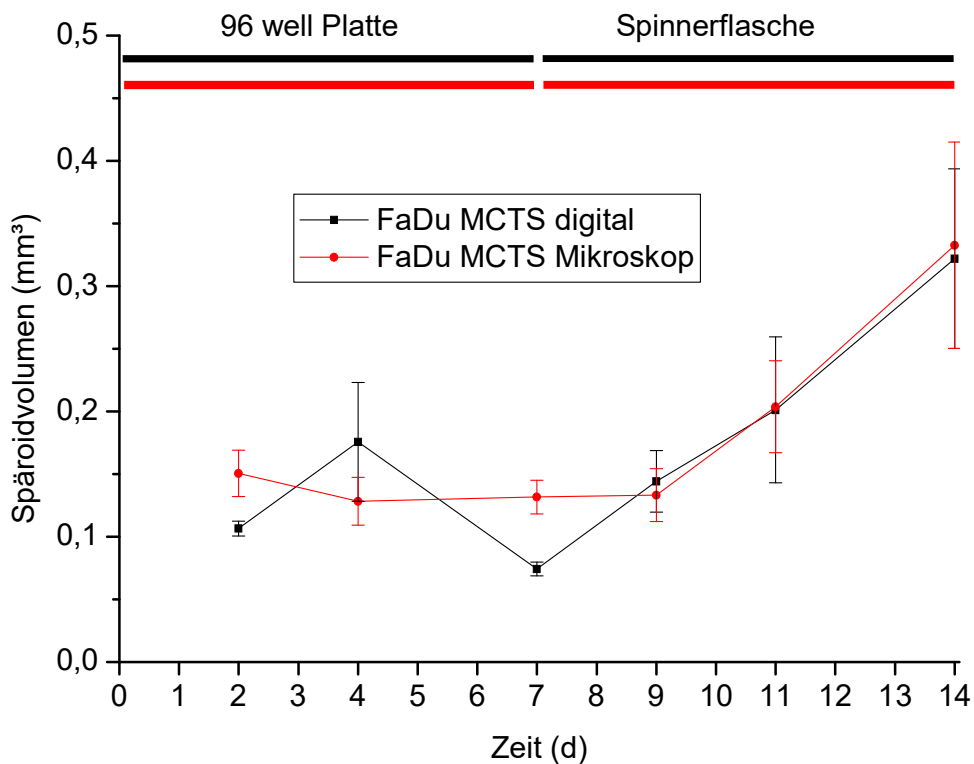


Abbildung 7: Volumen der FaDu-Sphäroide in einer 96 Well-Platte und ab Tag 7 in einer Spinnerflasche von der Initiation (Tag d = 0) bis zum Start des Versuchs (d = 14). Es ist jeweils der Mittelwert der acht vermessenen Sphäroide mit der zugehörigen Standardabweichung dargestellt.

4.1.2 Zellzahl der MCTS

Bei der Initiation wird jedes Well mit 1×10^4 FaDu-Zellen bestückt. In den folgenden 14 Tagen werden die Sphäroide parallel zur Größenbestimmung disaggregiert und die Zellzahl bestimmt. Bis zum siebten Tag in der Well-Platte nimmt die Zellzahl nur um etwa 10 % zu. Erst nach dem Umsetzen in die Spinnerkultur beginnen die Zellen sich verstärkt zu teilen. Nach weiteren sieben Tagen hat sich die Zellzahl im Vergleich zum Initiationstag mehr als verdreifacht, was auf die bessere Versorgungslage in der Spinnerflasche zurückzuführen ist. Nach sieben Tagen ist die Zellzahl auf 110 % angestiegen, nach weiteren sieben Tagen auf 334 % des ausgesäten Ausgangswertes (Abbildung 8 **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

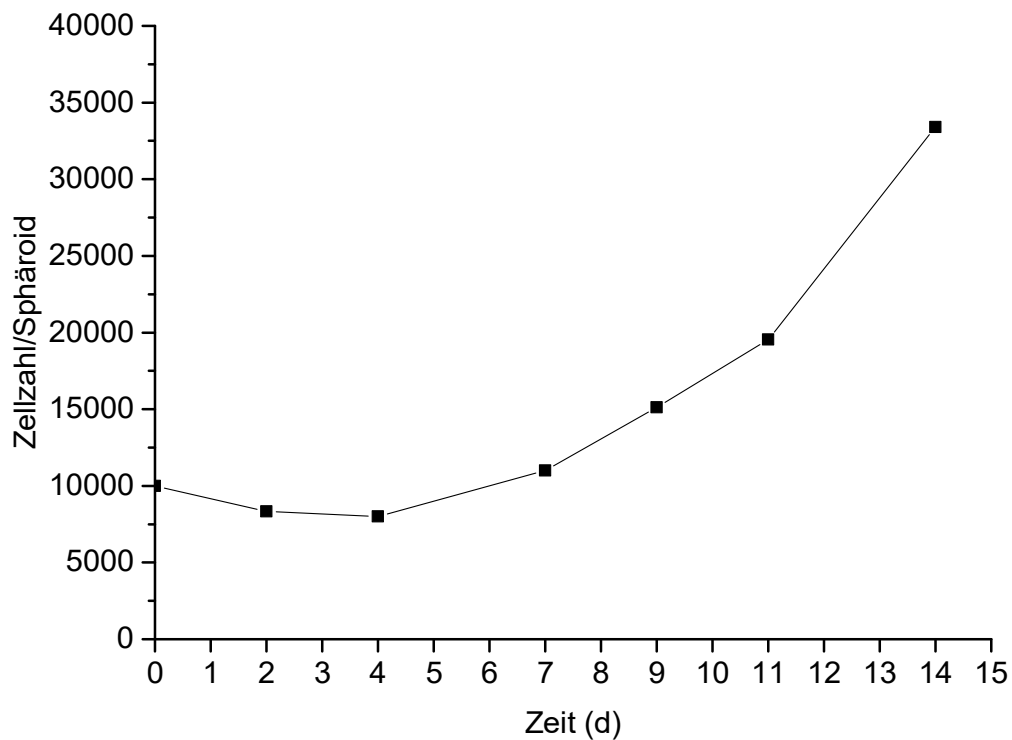


Abbildung 8: Mittlere Zellzahlen der disaggregierten Sphäroide vom Tag (d) der Initiation (d = 0) bis zum Versuchsstart (d = 14). Es werden jeweils acht Sphäroide disaggregiert und der Mittelwert der Zellzahlen bestimmt.

4.2 Behandlung von FaDu-MCTS mit catumaxomab und Dexamethason

4.2.1 Volumenentwicklung der MCTS

Im Anschluss an die Initiationsphase von 14 Tagen werden jeweils 200 FaDu-Sphäroide in kleine Spinnerflaschen mit einem Gesamtvolumen von 20 ml überführt. Der Versuch startet durch die Zugabe der verschiedenen Testsubstanzen. Dieser Zeitpunkt wird als Tag 0 definiert. Die detaillierte Zusammensetzung der Ansätze zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Versuchsansätze 1 bis 9. In jedem Ansatz befinden sich 200 FaDu MCTS in 20 ml Medium.

Nr.	PBMC (Z/ml)	Antikörper catumaxomab (ng/ml)	Glukokortikoid Dexamethason ($\mu\text{g/ml}$)	Abkürzung
1.1	---	---	---	FaDu Kontrolle
1.2	---	---	0,1	+0,1 Dexa
1.3	---	---	1,0	+1 Dexa
1.4	---	---	10,0	+10 Dexa
1.5	1×10^6	---	---	+PBMC
1.6	1×10^6	2,5	---	+2,5 catu
1.7	1×10^6	2,5	0,1	+2,5c + 0,1D
1.8	1×10^6	2,5	1,0	+2,5c + 1D
1.9	1×10^6	2,5	10,0	+2,5c + 10D

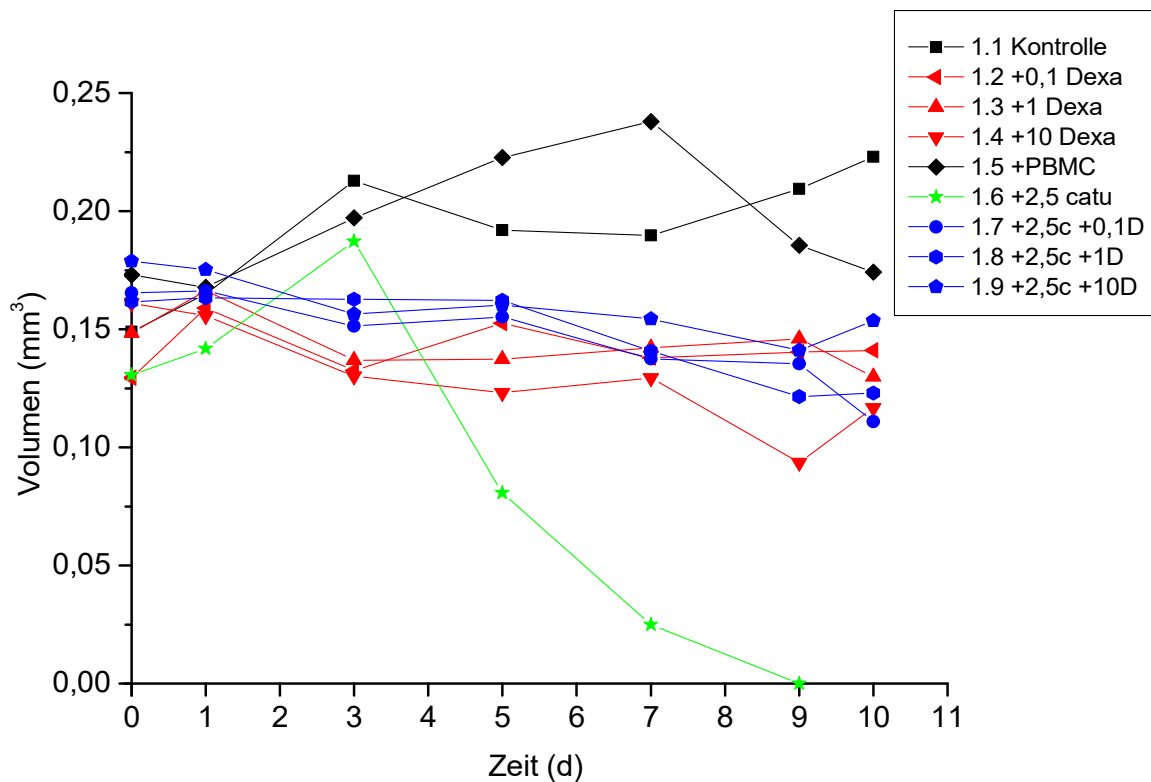


Abbildung 9: Volumenprogression der FaDu-MCTS unter der Zugabe von catumaxomab und Dexamethason. Für nähere Erklärungen zur Legende siehe Tabelle 2.

Die Volumenentwicklung der Sphäroide während der zehn Versuchstage zeigt Abbildung 9. Bereits die Zugabe von 0,1 µg/ml Dexamethason (Ansatz 1.2) zeigt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (schwarzes Quadrat) ein um 37 % niedrigeres Volumen an Tag 10 des Versuchs. Die Zugabe von 10 µg/ml (Ansatz 1.4) führte sogar zu einem 48 % kleinerem Sphäroid.

Der Ansatz 1.5 mit den PBMC alleine erfährt fast keine Reduktion des Sphäroidvolumens im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Während die mit PBMC und 2,5 ng/ml catumaxomab (Ansatz 1.6) behandelte Kultur nach neun Tagen keine MCTS mehr enthält, bewirkt die Zugabe von 0,1 µg/ml Dexamethason (Ansatz 1.7) bereits eine vollständige Inhibition der catumaxomab Wirkung. Im Vergleich zur Kontrolle an Tag 10 beträgt das Volumen 50 %. Eine Steigerung der Dexamethason-Konzentration hat keinen weiteren Einfluss auf die Volumenentwicklung oder die Antikörperwirkung (Ansätze 8 und 9).

4.2.2 Vitalitätstest der disaggregierten MCTS

Am ersten und fünften Tag des Versuchs werden jeweils Vitalitätstests aus jedem Ansatz durchgeführt. Die gemessenen Extinktionen zeigen Abbildung 10 und Abbildung 11. Daraus lässt sich erkennen, dass einen Tag nach Versuchsbeginn noch keine Wirkung von catumaxomab oder Dexamethason zu beobachten ist. Fast alle Ansätze sind auf einem ähnlichen Niveau, lediglich Ansatz 1.8 fällt etwas ab. Die Standardabweichung des Durchschnitts aller übrigen Mittelwerte der gemessenen Extinktionen beträgt 11 %. Die Standardabweichungen der Extinktionen der einzelnen Ansätze variieren zwischen 4 % und 35 %. An Tag 5 lässt sich erkennen, dass Dexamethason (Ansätze 2-4) an sich bereits einen Einfluss auf die Vitalität der Zellen hat, wobei sich eine Dosisabhängigkeit erkennen lässt (Reduktion um 51 % - 74 %). Weiterhin fällt die catumaxomab Wirkung auf (Ansatz 1.6), welche die Vitalität der eingesetzten Zellen um 95 % reduziert. Die kombinierten Ansätze aus PBMC, Antikörper und Glukokortikoid zeigen eine Senkung der Vitalität um 71 % unter 1 µg Dexamethason (Ansatz 1.8) und 84 % unter 10 µg/ml Dexamethason (Ansatz 1.9).

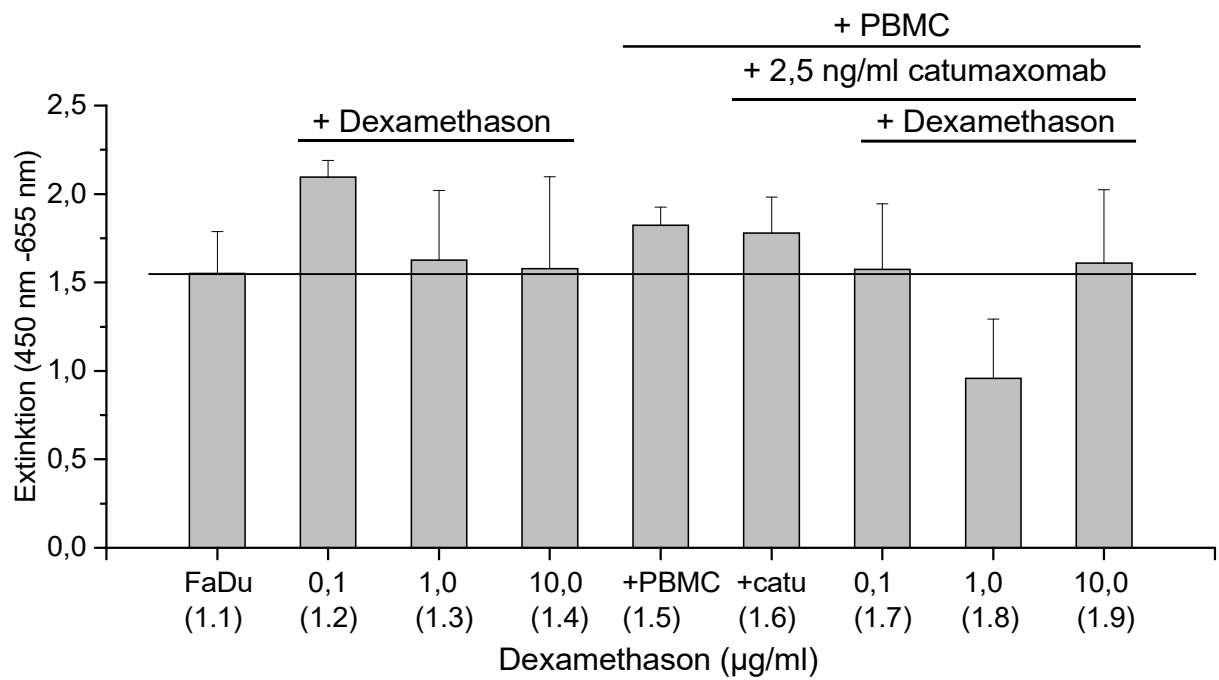


Abbildung 10: XTT-Test ein Tag nach Versuchsbeginn aus disaggregierten Sphäroiden. **Angegeben ist jeweils der Mittelwert aus vier Wells mit zugehöriger Standardabweichung.**

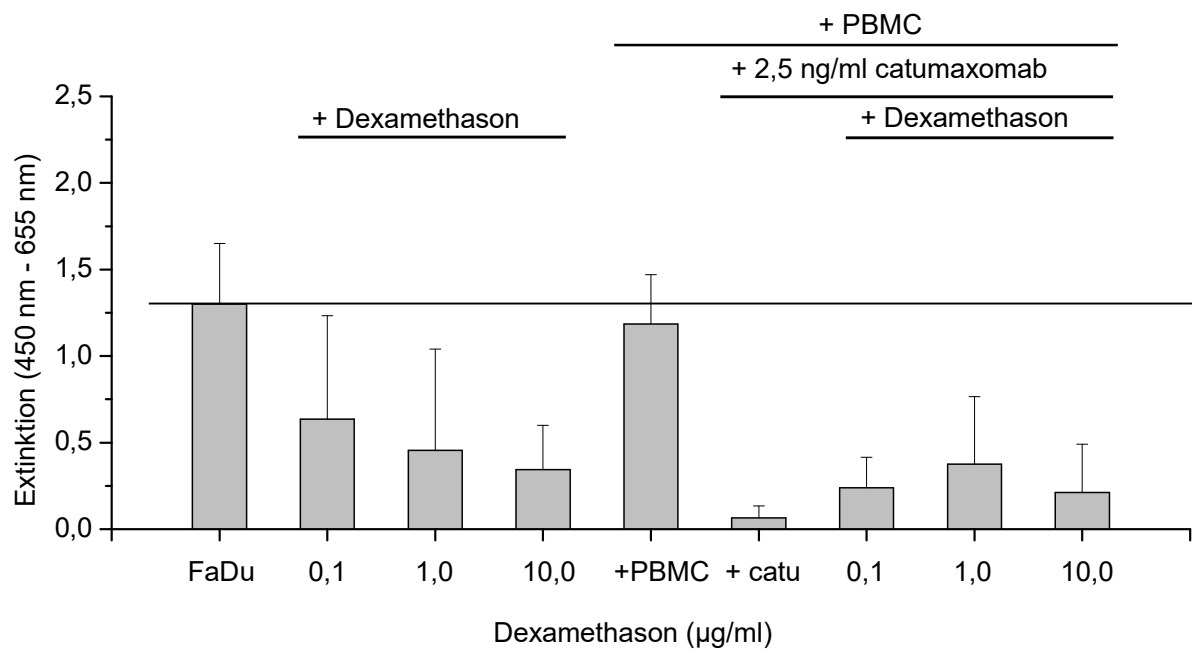


Abbildung 11: XTT-Test fünf Tage nach Versuchsbeginn aus disaggregierten Sphäroiden. **Angegeben ist jeweils der Mittelwert aus vier Wells mit zugehöriger Standardabweichung.**

4.2.3 Klonogenität der disaggregierten MCTS

Zusammen mit den XTT-Tests werden ebenfalls Klonogenitätstests am ersten, fünften sowie am zehnten Tag des Versuchs durchgeführt. Am zehnten und letzten Versuchstag werden Zellen aus dem Medienüberstand jedes Ansatzes verwendet, an den anderen Tagen jeweils Zellen aus disaggregierten Sphäroiden.

Das Ergebnis der Koloniebildung aus den Medienüberständen von Tag 10 wird hier nicht gezeigt, da sich aus den eingesetzten Zellen in keinem Ansatz eine Kolonie mit 50 oder mehr Zellen gebildet hat. Die Ergebnisse der anderen beiden Tage sind in Abbildung 12 **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** und Abbildung 13 dargestellt.

An Tag 1 des Versuchs unterscheidet sich die Plattierungseffizienz der einzelnen Ansätze noch wenig. Angegeben ist die relative Plattierungseffizienz bezogen auf den Kontrollansatz (100%). Die Standardabweichung des Durchschnitts aller Mittelwerte (ausgenommen Ansatz 1.8, dieser fällt etwas ab) beträgt 12 %. Innerhalb eines Ansatzes sind hohe Varianzen zu beobachten. An Tag 5 zeigen die Kulturen mit MCTS und Glukokortikoid eine relative Plattierungseffizienz zwischen 2 % (10 µg Dexamethason) und 19 % (1 µg Dexamethason) bezogen auf die Kontrollkultur. Im Ansatz 1.5 mit PBMC ohne Antikörperstimulation befindet sich die höchste Anzahl an teilungsfähigen Zellen (122 % verglichen mit der Kontrolle). In dem mit catumaxomab behandelten Ansatz 1.6 können 18 % weniger teilungsfähige Zellen im Vergleich zur Kontrollkultur gefunden werden. Durch die kombinierte Behandlung mit Antikörper und Glukokortikoid befinden sich in den zugehörigen Kulturen zwischen 98 % (Ansatz 1.7 und 1.9) und 95 % weniger teilungsfähige Tumorzellen.

Die Disaggregation setzt die Zellen bereits großem Stress aus und führt vor allem bei niedrigen Zellzahlen (1000 bzw. 2000 ausgesäte Zellen zur Ermittlung der Plattierungseffizienz) zu artifiziellen Verfälschungen, da durch den Prozess bereits Zellen apoptotisch werden. Dies muss bei der Interpretation berücksichtigt werden und steht nicht in Zusammenhang mit der angewandten Therapie.

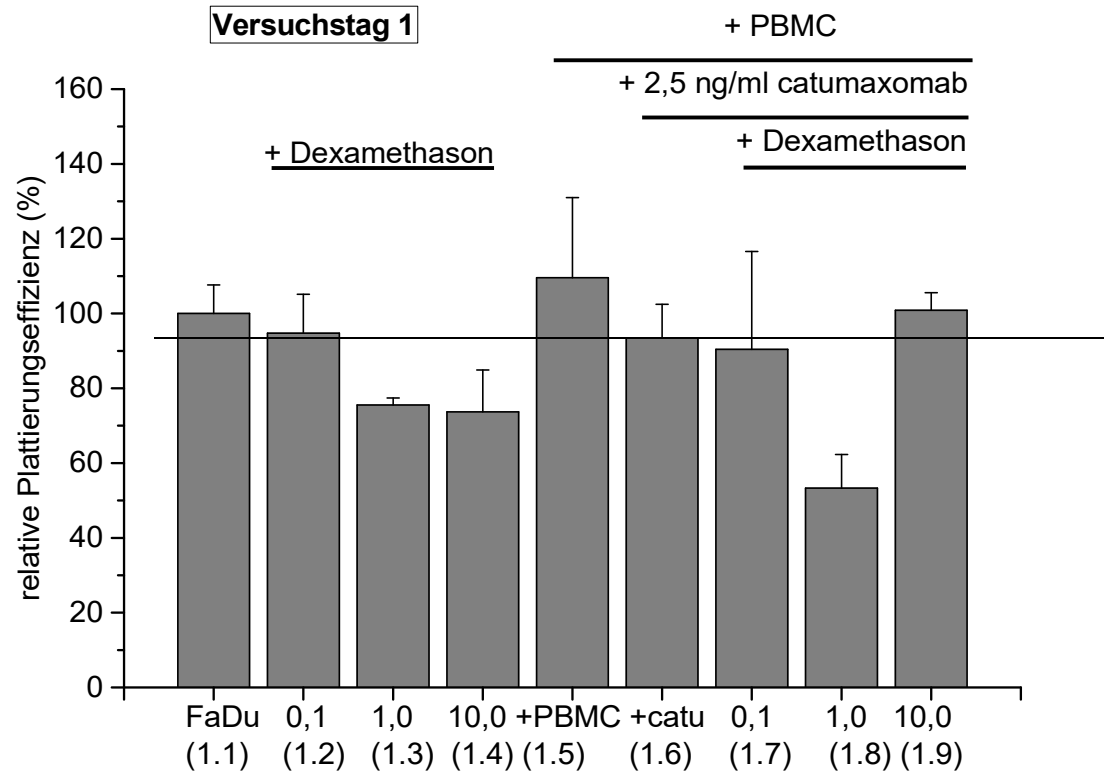


Abbildung 12: PE Test aus disaggregierten Sphäroiden an Versuchstag 1. **Es wurden in dreifacher Bestimmung jeweils 2x10³ Zellen ausgesät und nach sieben Tagen Inkubation die Kolonien digital ausgezählt. Angegeben ist die relative Plattierungseffizienz bezogen auf den Kontrollansatz (100%). MW=Mittelwert aus drei Ansätzen mit der angegebenen Zellzahl (MW 2000 entspricht 2000 ausgesäten Zellen) und zugehörigen Standardabweichung.**

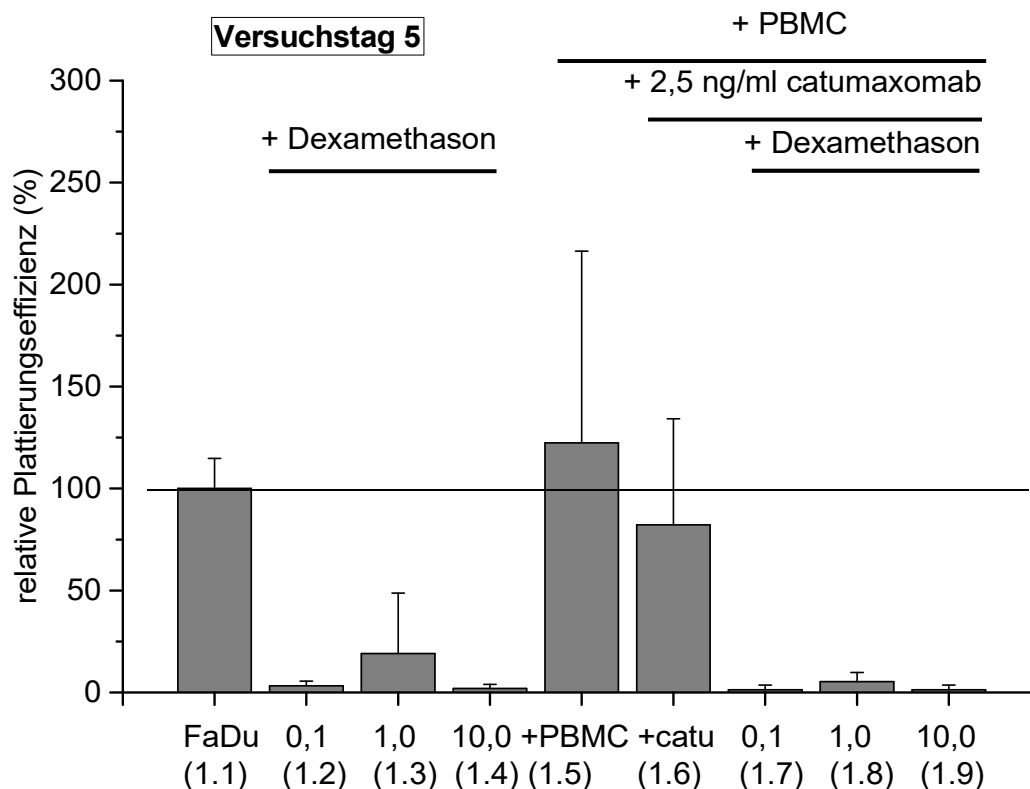


Abbildung 13: PE Test aus disaggregierten Sphäroiden an Versuchstag 5. **Es wurden in dreifacher Bestimmung jeweils 2x10³ Zellen ausgesät und nach sieben Tagen Inkubation die Kolonien digital ausgezählt. Angegeben ist die relative Plattierungseffizienz bezogen auf den Kontrollansatz (100%). MW=Mittelwert aus drei Ansätzen mit der angegebenen Zellzahl und zugehörigen Standardabweichung.**

4.2.4 Zytokinbestimmungen

Am ersten, fünften, siebten sowie zehnten Tag des Versuchs werden Medienüberstände entnommen und die darin enthaltenen Zytokine bestimmt. Dabei werden jeweils die Konzentrationen von IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ und TNF- α gemessen. Die Messungen sind in **Abbildung 14 Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** bis Abbildung 17 dargestellt.

Es zeigt sich bereits an Tag 1 eine Zytokinfreisetzung vor allem von IFN- γ und IL-6, ausgelöst durch die Zugabe von catumaxomab. Doch auch die unstimulierten PBMC und die FaDu-Zellen an sich sind imstande bestimmte Zytokine zu sezernieren, wenn auch in deutlich geringerem Maße. Durch die Zugabe von Dexamethason zum Ansatz mit PBMC und catumaxomab (Ansätze 1.7-1.9) wird die Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren deutlich (IL-6) reduziert beziehungsweise sogar

dosisabhängig vermindert (IFN- γ), wobei die IFN- γ Werte noch deutlich über dem Niveau des PBMC-Kontrollansatzes liegen. Die IL-6 Konzentrationen werden durch Dexamethason auf unter die Hälfte des Kontrollansatzes mit PBMC gesenkt.

Bis zu Tag 5 des Versuchs ist weiterhin durch catumaxomab ausgelöst ein massiver Anstieg von IL-6 und IFN- γ bis zu einem Maximalwert von 5217 pg/ml respektive 2578 pg/ml zu beobachten (Ansatz 1.6). In den anderen Ansätzen sinkt bis zu Tag 10 die Konzentration aller Zytokine bis unter die Nachweisgrenze, lediglich die Kontrollansätze (Ansätze 1.1 und 1.5) sowie die Ansätze mit niedrigen Glukokortikoiddosen (Ansatz 1.7) weisen noch niedrige Konzentrationen an IL-6 auf. Im Kontrollansatz mit PBMC und catumaxomab (Ansatz 1.6) sinkt die IFN- γ Konzentration bis zum Versuchsende stetig bis fast zur Nachweisgrenze, die IL-6 Konzentration bleibt auf hohem Niveau (4750 pg/ml).

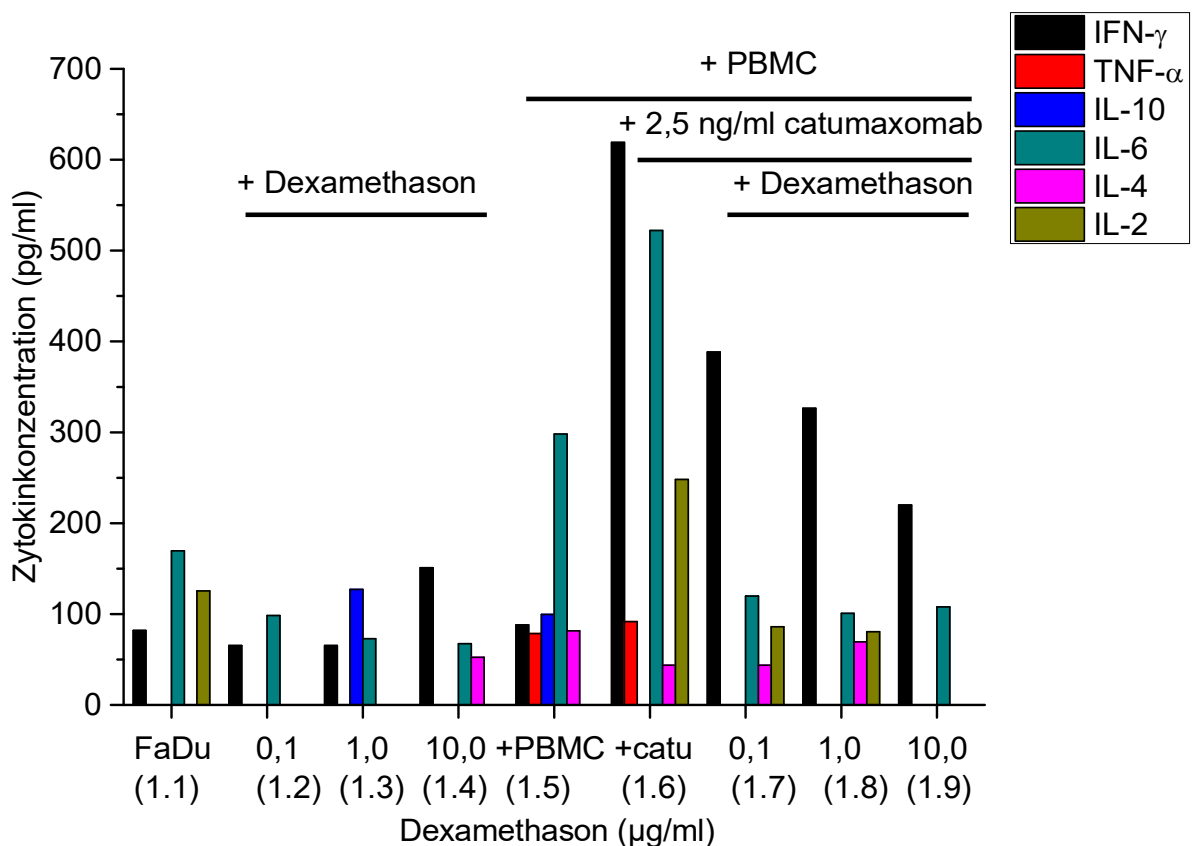


Abbildung 14: Konzentrationen der verschiedenen Zytokine aus Medienüberständen am ersten Tag des Versuchs.

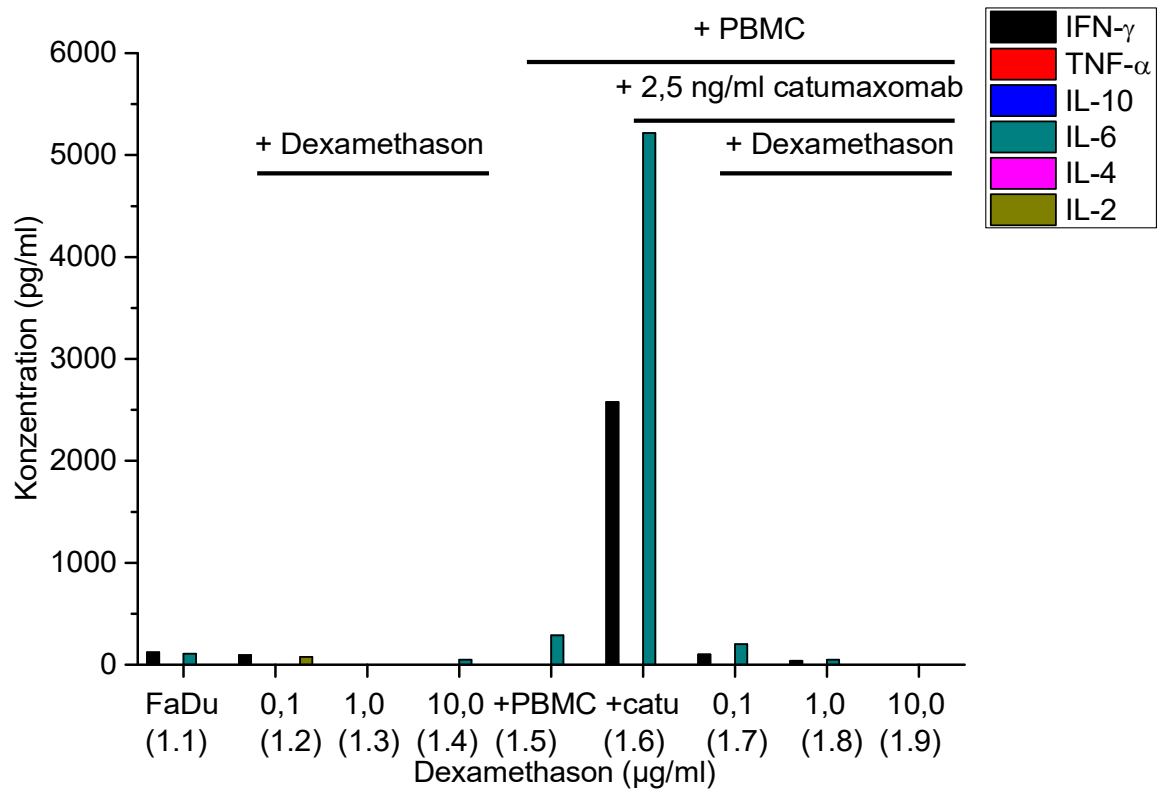


Abbildung 15: Konzentrationen der verschiedenen Zytokine aus Medienüberständen am fünften Tag des Versuchs.

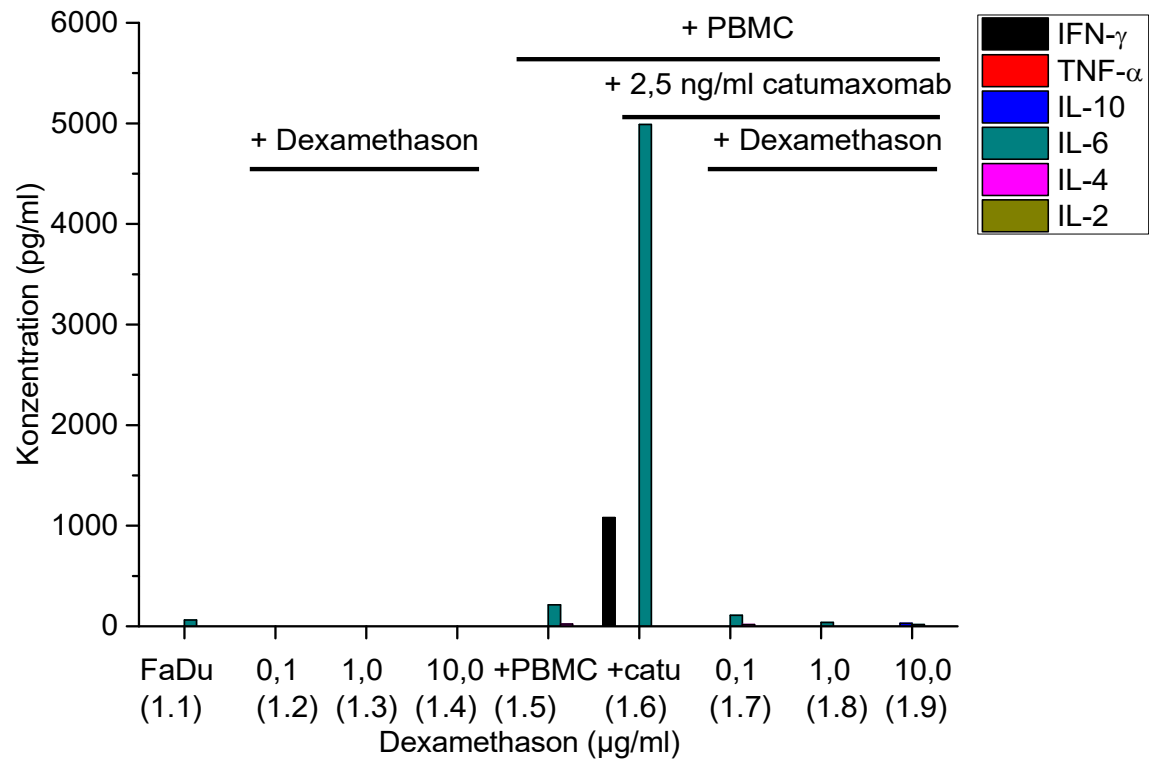


Abbildung 16: Konzentrationen der verschiedenen Zytokine aus Medienüberständen am siebten Tag des Versuchs.

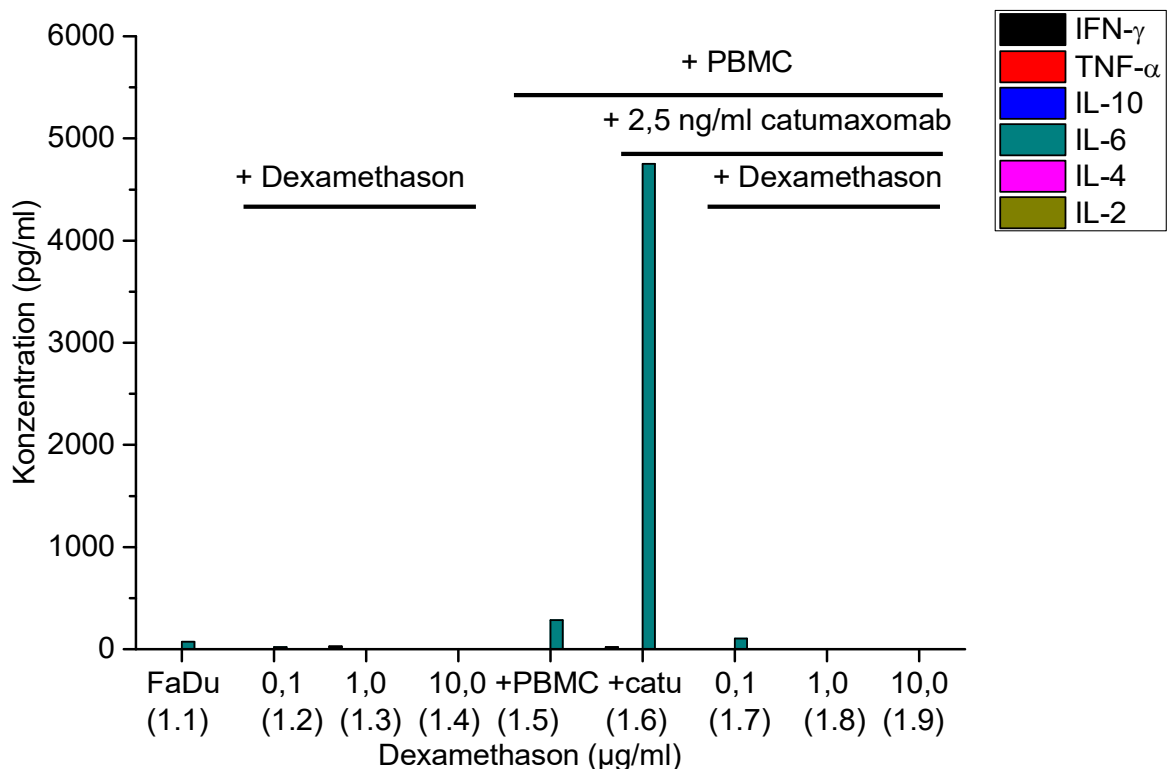


Abbildung 17: Konzentrationen der verschiedenen Zytokine aus Medienüberständen am zehnten Tag des Versuchs.

4.3 Dosis-Wirkungsbeziehung von Prednisolon auf das Wachstum von FaDu-MCTS unter ertumaxomab

Die Initiationsphase wurde bei allen folgenden Versuchen von 14 Tagen auf acht Tage reduziert, wobei die Zellen zunächst vier Tage in den mit Agarose beschichteten Well Platten inkubieren. Anschließend werden die aggregierten MCTS für vier Tage in einer großen Spinnerflasche kultiviert. Die Verkürzung der Initiationsphase soll gewährleisten, dass sich die unbehandelte Kultur bis zum Ende des Versuchs im Wachstum befindet. Auf diese Weise sollen zu erwartende Einflüsse auf das Wachstum durch Antikörper und Glukokortikoide besser sichtbar gemacht werden, indem die behandelten Kulturen im Wachstum stagnieren oder schrumpfen.

Um bei den sich anschließenden Versuchen adäquate Prednisolon Dosen einsetzen zu können, wird zunächst eine Dosisescalation des Glukokortikoids vorangestellt.

Dabei wird in den Ansätzen bei steigender Prednisolon-Konzentration jeweils die gleiche ertumaxomab Dosis verwendet.

Durch die Verwendung von reinem Prednisolon kommt als Lösungsmittel zusätzlich Ethanol (EtOH) zum Einsatz. Um auszuschließen, dass bereits das Lösungsmittel einen Einfluss auf die Sphäroide hat, werden jedem Ansatz ohne Glukokortikoid 2 µl Ethanol hinzugefügt, sowie eine Kultur angefertigt, die lediglich 200 Sphäroide in 20 ml Medium enthält. Diese wird als zusätzliche Kontrolle mitgeführt. Die detaillierte Zusammensetzung der Ansätze zeigt Tabelle 3.

Tabelle 3: Zusammensetzung der verschiedenen Ansätze des Versuchs. In jedem Ansatz sind 200 FaDu E593 MCTS in 20 ml Medium.

Nr.	PBMC (Z/ml)	Antikörper ertumaxomab (ng/ml)	Glukokortikoid Prednisolon (µg/ml)	Abkürzung
2.1	---	---	---	Kontrolle
2.2	---	---	---	Kontrolle + EtOH
2.3	1x10 ⁶	---	---	+PBMC + EtOH
2.4	1x10 ⁶	10,0	---	+10 ertu + EtOH
2.5	1x10 ⁶	10,0	0,1	+10e + 0,1P
2.6	1x10 ⁶	10,0	0,3	+10e + 0,3P
2.7	1x10 ⁶	10,0	0,9	+10e + 0,9P
2.8	1x10 ⁶	10,0	1,2	+10e + 1,2P
2.9	1x10 ⁶	10,0	2,4	+10e + 2,4P

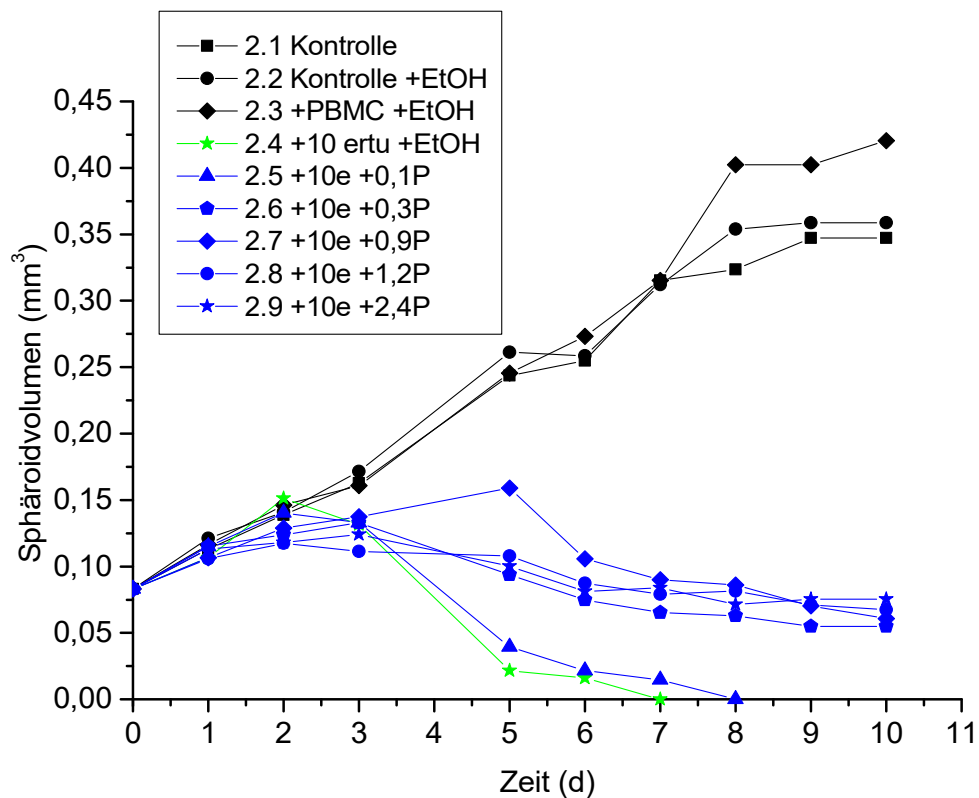


Abbildung 18: Volumenprogression der FaDu MCTS unter der Zugabe von 10 ng/ml ertumaxomab, und steigender Dosen Prednisolon. Abgesehen von der Kontrolle enthält jeder Ansatz 2 µl Ethanol (EtOH). Für eine genauere Erläuterung der Legende siehe Tabelle 3

Es zeigt sich, dass Ethanol als Lösungsmittel für Prednisolon in der verwendeten Konzentration keinen Einfluss auf das exponentielle Wachstum bis etwa Tag 8 der MCTS hat (Ansatz 2.2). Durch die Behandlung mit ertumaxomab sind nach sieben Tagen alle Sphäroide lysiert. Das Hinzufügen von 0,1 µg/ml Prednisolon (Ansatz 2.5) verzögert die Wirkung des Antikörpers um einen Tag. Werden die Glukokortikoid-Konzentrationen gesteigert, führt dies zu einer deutlichen Volumenreduktion von 78 % (höchste Prednisolon-Konzentration von 2,4 µg/ml, Ansatz 2.9) bis 84 % (0,3 µg/ml Prednisolon, Ansatz 2.6) im Vergleich zur Kontrollkultur. Eine vollständige Auflösung der MCTS wird unter den höheren Prednisolondosierungen (Ansätze 2.6-2.9) jedoch bis zum Versuchsende an Tag 10 nicht erreicht. Die Volumenprogression der Sphäroide ist in Abbildung 18 dargestellt.

4.4 Behandlung der FaDu-MCTS mit ertumaxomab und Prednisolon

4.4.1 Volumenentwicklung der MCTS während der Behandlung

Die Prednisolon-Konzentrationen wurden so gewählt, dass sie etwa den Konzentrationen im Blut eines Patienten während der Therapie mit dem Glukokortikoid entsprechen (ca. 300 ng/ml). Weiterhin wurde eine niedrigere Konzentration gewählt (0,1 µg/ml), sowie eine deutlich höhere Maximaldosis (1,2 µg/ml). Im vorigen Versuch konnte bei weiterer Dosisescalation kein Einfluss auf die Volumenprogression beobachtet werden. Es werden jeweils 200 FaDu-Sphäroide in kleine Spinnerflaschen mit einem Gesamtvolumen von 20 ml überführt. Die detaillierte Zusammensetzung der Ansätze zeigt Tabelle 4.

Tabelle 4: Zusammensetzung der verschiedenen Ansätze des Versuchs. In jedem Ansatz sind 200 FaDu MCTS in 20 ml Medium.

Nr.	PBMC (Z/ml)	Antikörper ertumaxomab (ng/ml)	Glukokortikoid Prednisolon (µg/ml)	Abkürzung
3.1	---	---	---	Kontrolle
3.2	---	---	0,1	+0,1 Pred
3.3	---	---	0,3	+0,3 Pred
3.4	---	---	1,2	+1,2 Pred
3.5	1x10 ⁶	---	---	+PBMC
3.6	1x10 ⁶	10,0	---	+10 ertu
3.7	1x10 ⁶	10,0	0,1	+10e + 0,1P
3.8	1x10 ⁶	10,0	0,3	+10e + 0,3P
3.9	1x10 ⁶	10,0	1,2	+10e + 1,2P

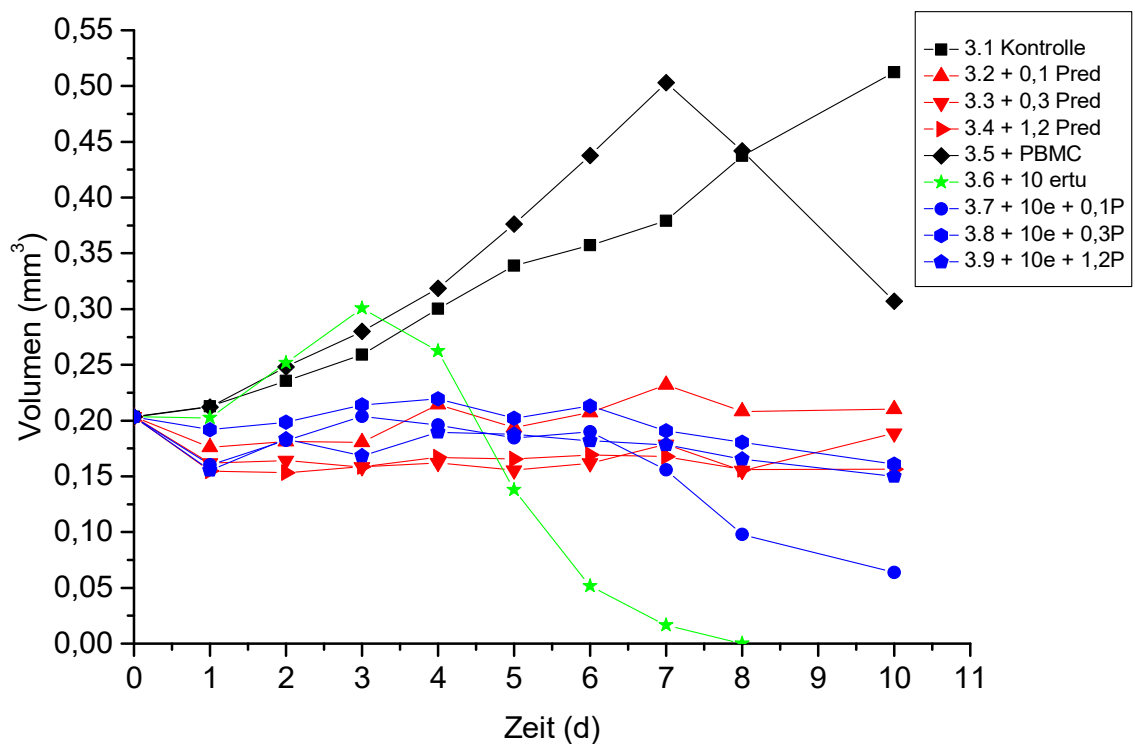


Abbildung 19: Volumenprogression der FaDu MCTS unter der Zugabe von ertumaxomab und Prednisolon. Detaillierte Beschreibung der Legende siehe Tabelle 4.

Die Volumenentwicklung der Sphäroide während der zehn Versuchstage zeigt Abbildung 19**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden..** Bereits die Zugabe von 0,1 µg/ml Prednisolon (Ansatz 3.2) zeigt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (schwarzes Quadrat, Ansatz 3.1) eine Volumenreduktion um 59 % an Tag 10 des Versuchs. Die Zugabe von 1,2 µg/ml (Ansatz 3.4) bewirkte sogar eine Volumenreduktion um 69 %.

Der Ansatz mit den PBMC (Ansatz 3.5) erfährt zunächst keine Reduktion des Sphäroidvolumens im Vergleich zur Kontrolle. Ab Tag 7 ist eine deutliche Reduktion des Sphäroidvolumens zu beobachten. Zu vermuten ist hier kein direkter Effekt der PBMC. Wahrscheinlicher ist ein Mangel an Nährstoffen aufgrund der Größe der Sphäroide und zusätzlich PBMC in der Suspension.

Während die mit PBMC und 10 ng/ml ertumaxomab behandelte Kultur (Ansatz 3.6) nach acht Tagen keine MCTS mehr enthält, bewirkt die Zugabe von 0,1 µg/ml Prednisolon (Ansatz 3.7) eine Verzögerung der Antikörperwirkung um etwa vier Tage. Die Volumenreduktion an Tag 10 des Versuchs beträgt 88 % verglichen mit dem Kontrollansatz am selben Tag. Eine Inhibition der ertumaxomab Wirkung kann bei den höheren Glukokortikoid Dosen beobachtet werden, wobei die Volumenreduktion in den Kombinationsansätzen 69 % (Ansatz 3.8 mit 10 ng/ml ertumaxomab und 0,3 µg/ml Prednisolon) respektive 71 % (Ansatz 3.9 mit 10 ng/ml ertumaxomab und 1,2 µg/ml Prednisolon) beträgt.

4.4.2 Immunhistologische Färbungen der FaDu-Sphäroidschnitte

Am fünften Versuchstag werden aus jedem Ansatz Sphäroide entnommen und histologisch aufbereitet. Dieser Zeitpunkt wird in allen Versuchen gewählt, um zu gewährleisten, dass einerseits die Effekte von Antikörper und Glukokortikoid bereits sichtbar sind, andererseits aber in jedem Ansatz noch adäquate MCTS zur Untersuchung enthalten sind (hierbei ist sowohl die Anzahl als auch die Größe relevant). Es werden jeweils Medianschnitte der Sphäroide angefertigt und zunächst zur Übersicht mit Hämalaun und Eosin angefärbt (Abbildung 20**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Hier können bereits die Größenverhältnisse sowie der typische Aufbau eines Sphäroids beobachtet werden. Dazu gehört eine zentrale Nekrose mit abgestorbenen Zellen und ein vitaler Randsaum mit proliferierenden

Zellen. Die Nekrose ist vor allem in der mit PBMC versetzten Kultur (Ansatz 3.5) sehr ausgeprägt. Der Kontrollansatz (Ansatz 3.1) weist den gleichmäßigsten Randsaum auf. Durch die Zugabe von ertumaxomab und PBMC (Ansatz 3.6) wird die Struktur beeinträchtigt. Das Sphäroid ist kleiner als die in anderen Kulturen und der Rand ist unscharf begrenzt und weniger deutlich von der Nekrose abzugrenzen.

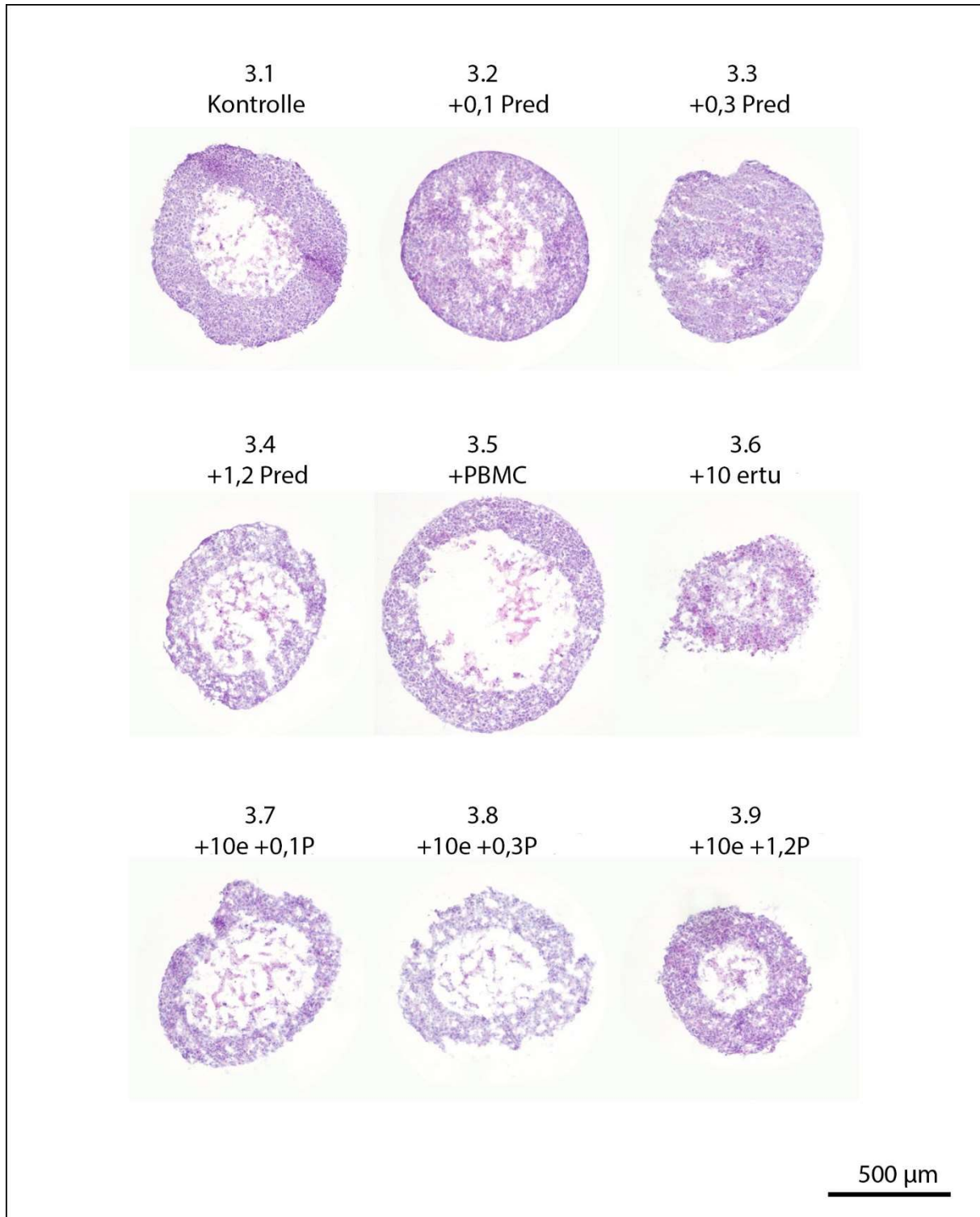


Abbildung 20: HE Übersichtsfärbung der FaDu-Sphäroidschnitte aus allen Ansätzen des Versuchs an Tag 5. Detaillierte Beschreibung der Legende siehe Tabelle 4.

Um die Wirkung von ertumaxomab und den Einfluss des Prednisolons im Sphäroid genauer zu untersuchen, wird eine CD45-Färbung durchgeführt, die eingewanderte Leukozyten in den Sphäroiden durch Braunfärbung sichtbar macht (Abbildung 21**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Es zeigt sich eine massive Infiltration in dem mit Antikörper stimulierten Kontrollansatz (Ansatz 3.6). Dort sind ubiquitär Leukozyten zu finden. Weiterhin reduziert sich die Einwanderung bei steigender Glukokortikoiddosis (Ansätze 3.7-3.9), der vitale Randsaum wird dicker und die zentrale Nekrose kleiner.

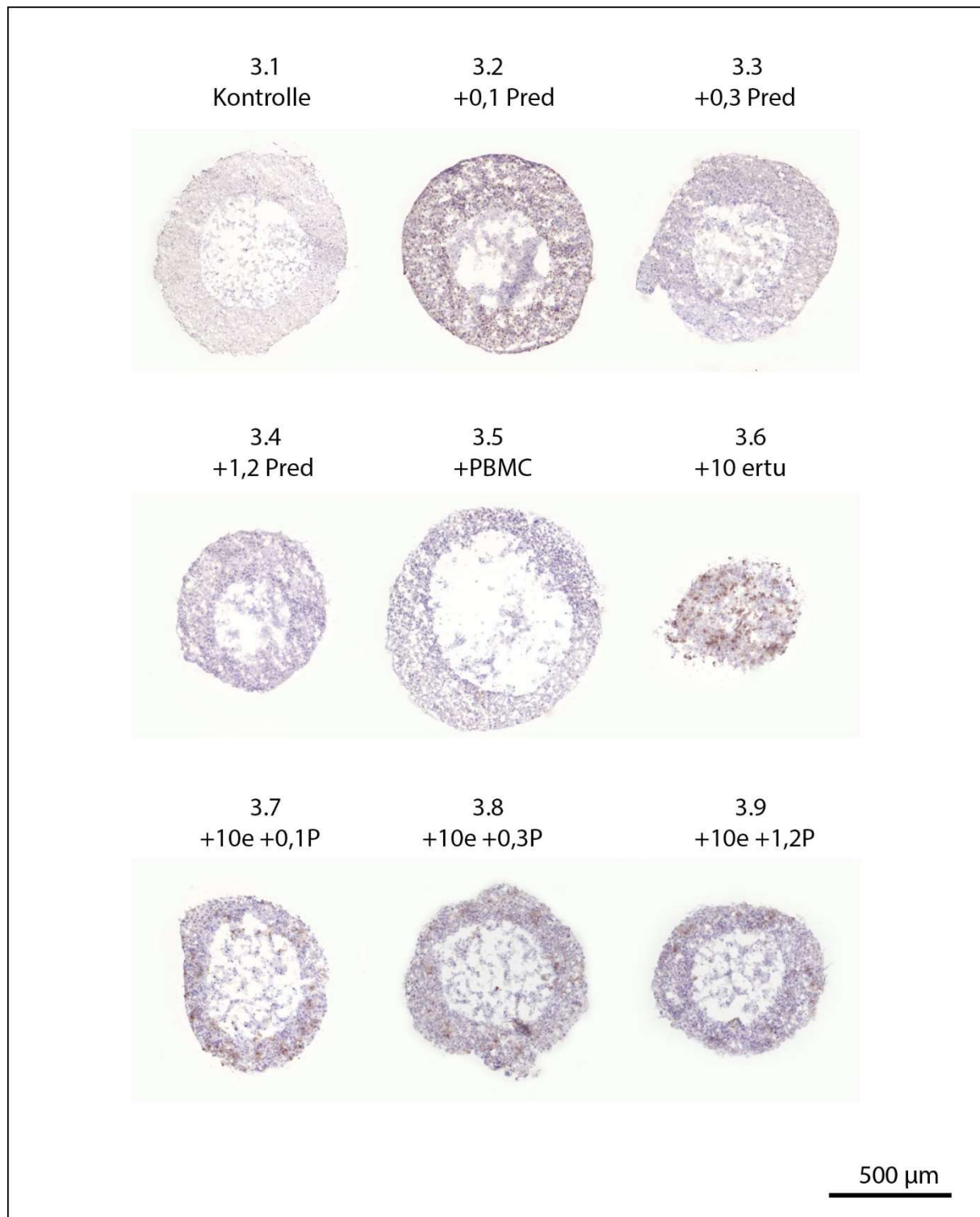


Abbildung 21: CD45 Färbung der FaDu-Sphäroidschnitte an Tag 5 des Versuchs zur Darstellung der Leukozyten. Detaillierte Beschreibung der Legende siehe Tabelle 4.

Um das HER2 Expressionsniveau der FaDu-Zellen mit den in späteren Versuchen verwendeten HER2 transfizierten FaDu E593 Zellen vergleichen zu können, wird eine

immunhistologische HER2 Färbung durchgeführt. Es fällt auf, dass die HER2 positiven Zellen in den Außenschichten der Sphäroide lokalisiert sind, wobei in den mit Antikörper versetzten Ansätzen (Ansätze 3.6-3.9) weniger HER2 positive Zellen zu finden sind. Dieser Effekt wird durch steigende Prednisolon Dosen moduliert, weshalb bei höheren Dosen wieder mehr Zellen zu finden sind (Ansatz 3.9). Die angefärbten Medianschnitte zeigt Abbildung 22.

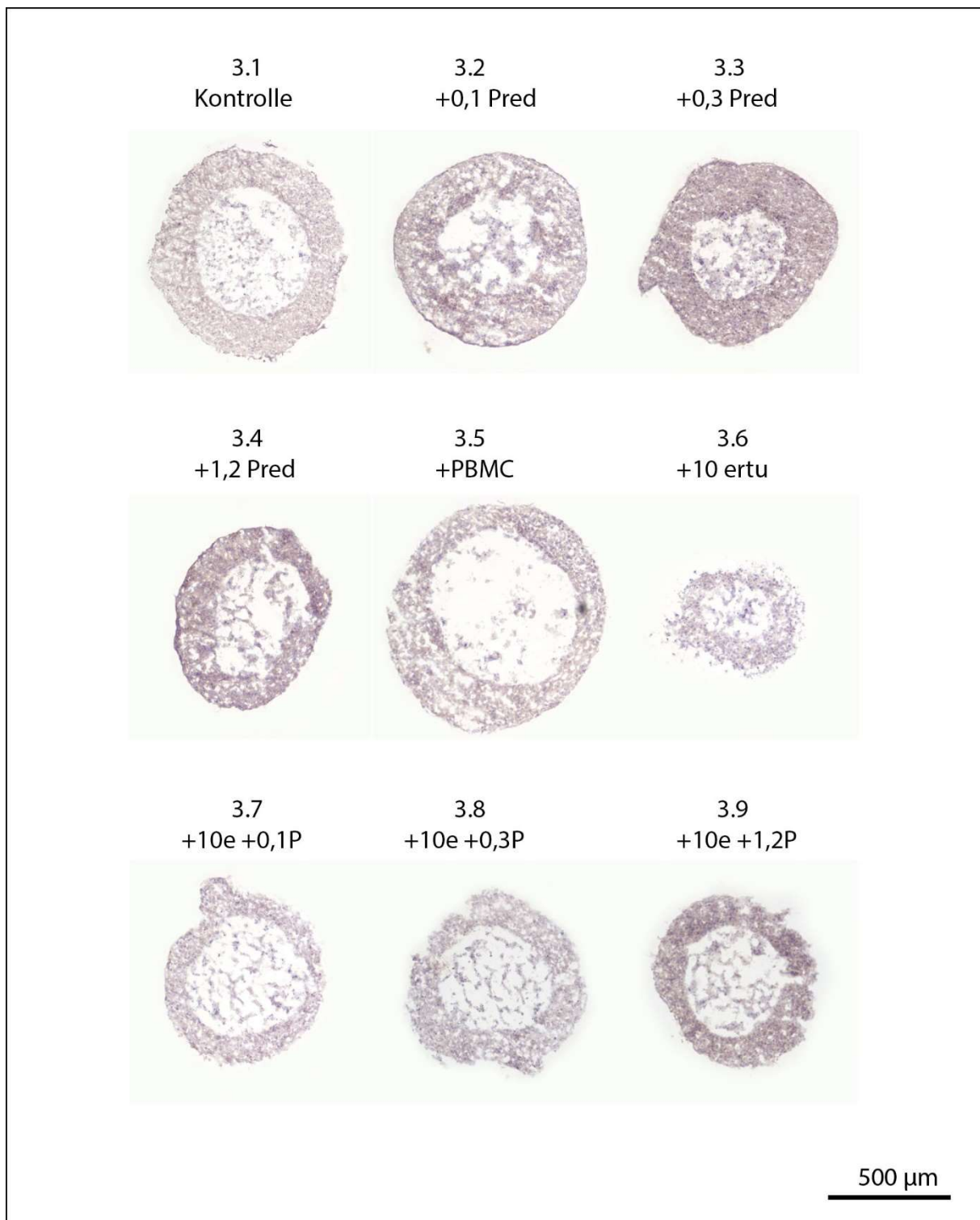


Abbildung 22: HER-2 Färbung der FaDu-Sphäroidschnitte an Tag 5 des Versuchs zur Darstellung des Expressionsniveaus in den FaDu-Sphäroiden. Detaillierte Beschreibung der Legende siehe Tabelle 4.

Zur Beurteilung der Proliferation wird eine immunhistologische Färbung des Ki67 Antigens in den Sphäroidschnitten durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 23 dargestellt. Es zeigt sich

der Einfluss von Prednisolon auf die Proliferationsaktivität der Zellen. Es ist deutlich zu sehen, dass bei steigender Glukokortikoid-Konzentration die Proliferation der Zellen im Sphäroid im Vergleich zur Kontrolle abnimmt (Ansätze 3.2-3.4). Durch Behandlung mit ertumaxomab werden fast alle FaDu-Zellen des Sphäroids zerstört beziehungsweise so beeinflusst, dass beinahe keine Proliferation mehr stattfindet (Ansatz 3.6). Sehr deutlich ist der Unterschied im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, der PBMC zugesetzt wurden (Ansatz 3.5). Die Kombination aus Antikörper und Glukokortikoid führt ebenfalls zu einer Reduzierung der Proliferationsaktivität im Randsaum, wobei die Proliferation bei Steigerung der Glukokortikoiddosis stärker gehemmt wird (Ansätze 3.7-3.9).

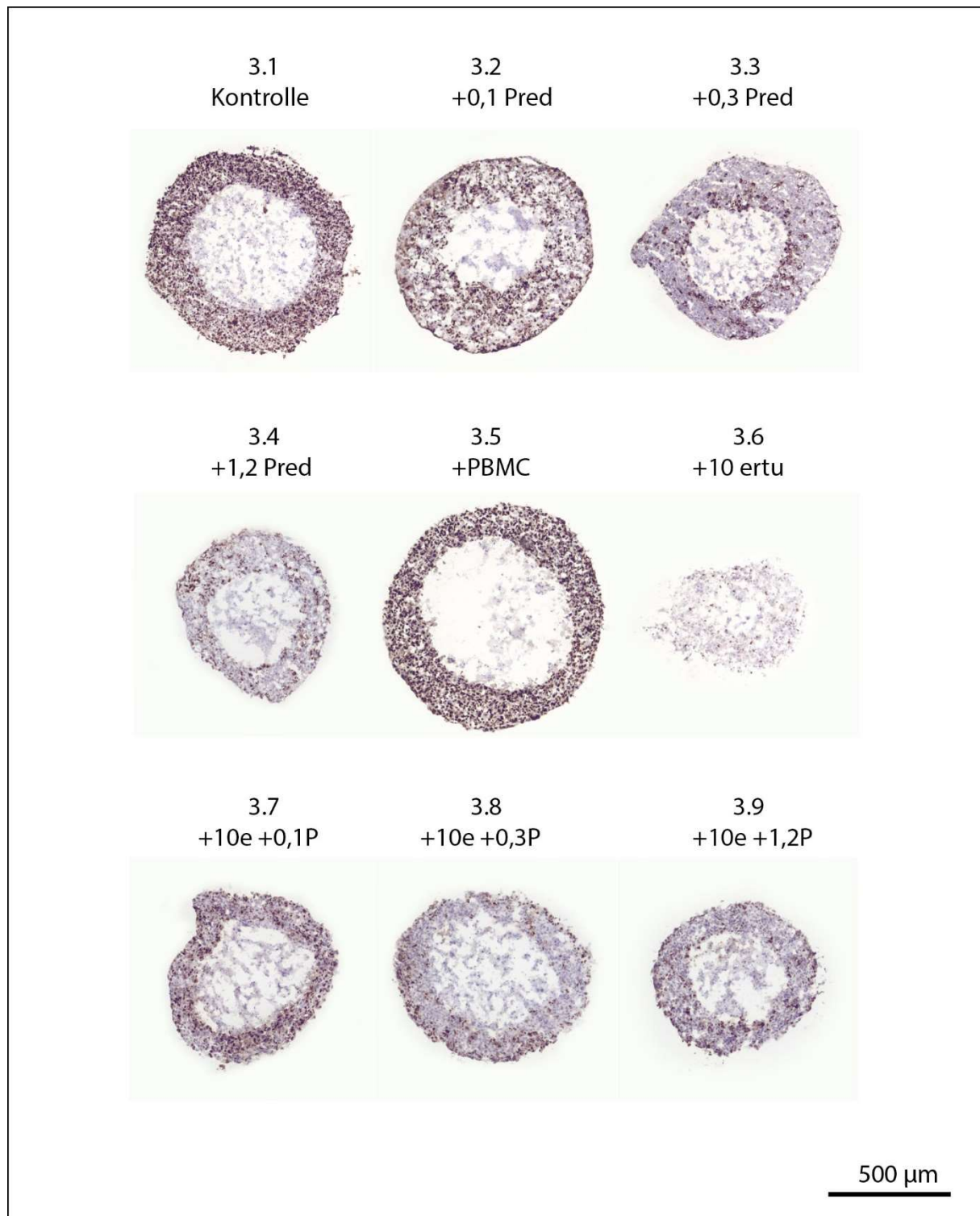


Abbildung 23: Ki67 Färbung der FaDu-Sphäroidschnitte an Tag 5 des Versuchs zur Darstellung der Proliferationsaktivität in den FaDu-Sphäroiden. Detaillierte Beschreibung der Legende siehe Tabelle 4.

4.5 Dosis-Wirkungsbeziehung von ertumaxomab auf das Wachstum von FaDu-E593-MCTS

Im weiteren Verlauf sollen die Wechselwirkungen von ertumaxomab und Prednisolon an FaDu und FaDu E593 Sphäroiden untersucht werden. Aus diesem Grund wird zunächst die Wirkung von ertumaxomab an den mit HER-2 transfizierten FaDu E593 Zellen untersucht. Es soll eine Antikörperdosis gefunden werden, die etwa dem Effekt von 10 ng/ml ertumaxomab auf Wildtyp FaDu-Sphäroide (ohne HER-2 Transfektion) entspricht. Es werden Konzentrationen von 0,25 ng/ml bis 10 ng/ml verwendet. Die verwendeten Konzentrationen zeigt Tabelle 5.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Ansätze zur Bestimmung der ertumaxomab Wirkung auf FaDu E593 Sphäroide.

Nr.	PBMC (Z/ml)	Antikörper ertumaxomab (ng/ml)	Abkürzung
4.1	---	---	Kontrolle
4.2	1×10^6	---	+PBMC
4.3	1×10^6	0,25	+0,25
4.4	1×10^6	0,5	+0,5
4.5	1×10^6	1,0	+1,0
4.6	1×10^6	2,5	+2,5
4.7	1×10^6	5,0	+5,0
4.8	1×10^6	10,0	+10,0

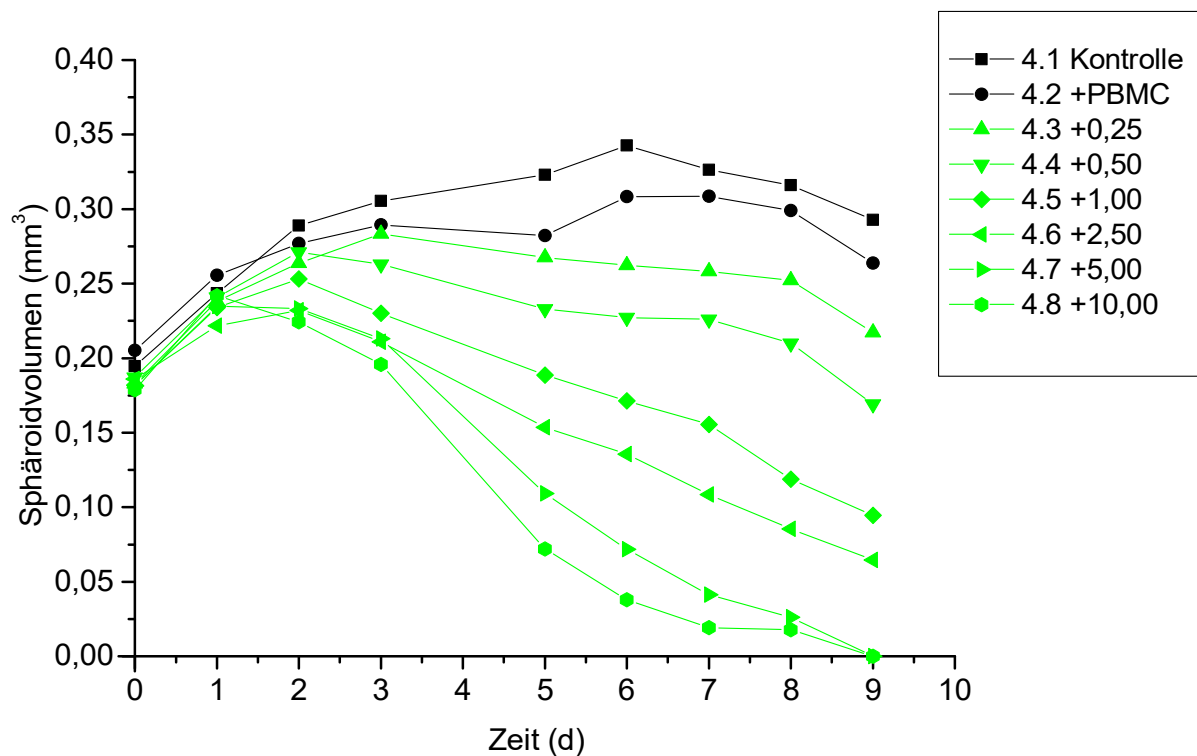


Abbildung 24: Wirkung verschiedener ertumaxomab Dosen (grüne Linien und Symbole) auf das Volumen von HER-2 transfizierten FaDu E593 Sphäroiden. Für detaillierte Angaben zur Legende siehe Tabelle 5.

Der Versuch zeigt eine dosisabhängige Reduktion des Sphäroidvolumens bis hin zur vollständigen Auflösung der MCTS. Bei den höchsten verwendeten Dosen von 5 ng/ml und 10 ng/ml ertumaxomab sind an Tag 9 nach Versuchsstart alle Sphäroide zerstört. Die Volumenprogression ist in Abbildung 24 dargestellt, die relativen Sphäroidvolumina bei Versuchsende zeigt Tabelle 6.

Tabelle 6: Relatives Volumen bezogen auf den Kontrollansatz am Ende des Versuchs (Tag 10).

Ansatz	Abkürzung	Relatives Volumen an Tag 10
4.1	Kontrolle	100 %
4.2	+PBMC	90 %
4.3	+0,25	74 %
4.4	+0,5	58 %
4.5	+1,0	32 %
4.6	+2,5	22 %
4.7	+5,0	aufgelöst
4.8	+10,0	aufgelöst

4.6 Behandlung der FaDu E593 MCTS mit ertumaxomab und Prednisolon

4.6.1 Volumenentwicklung der MCTS während der Behandlung

Im folgenden Versuch werden die Ansätze analog zum Versuch in Kap.3.4 hergestellt, um eine bestmögliche Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erreichen. Die Prednisolon-Konzentrationen entsprechen denen des anderen Versuchs, die ertumaxomab Dosis wird auf 5 ng/ml reduziert, da in diesem Fall die mit HER-2 transfizierten FaDu E593 Sphäroide untersucht werden. In der bereits durchgeführten Untersuchung zur Wirkung von ertumaxomab auf FaDu E593 (Kap.3.5) ergab sich, dass eine Halbierung der Dosis des Antikörpers bei den transfizierten Zellen die gleiche Wirkung erzielt, wie die volle Dosis (10ng/ml) beim FaDu Wildtyp. Die detaillierte Zusammensetzung der Ansätze ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Zusammensetzung der verschiedenen Ansätze des Versuchs. In jedem Ansatz sind 200 FaDu E593 MCTS in 20 ml Medium.

Nr.	PBMC (Z/ml)	Antikörper ertumaxomab (ng/ml)	Glukokortikoid Prednisolon (µg/ml)	Abkürzung
5.1	---	---	---	Kontrolle
5.2	---	---	0,1	+0,1 Pred
5.3	---	---	0,3	+0,3 Pred
5.4	---	---	1,2	+1,2 Pred
5.5	1x10 ⁶	---	---	+PBMC
5.6	1x10 ⁶	5,0	---	+10 ertu
5.7	1x10 ⁶	5,0	0,1	+5e +0,1P
5.8	1x10 ⁶	5,0	0,3	+5e +0,3P
5.9	1x10 ⁶	5,0	1,2	+5e +1,2P

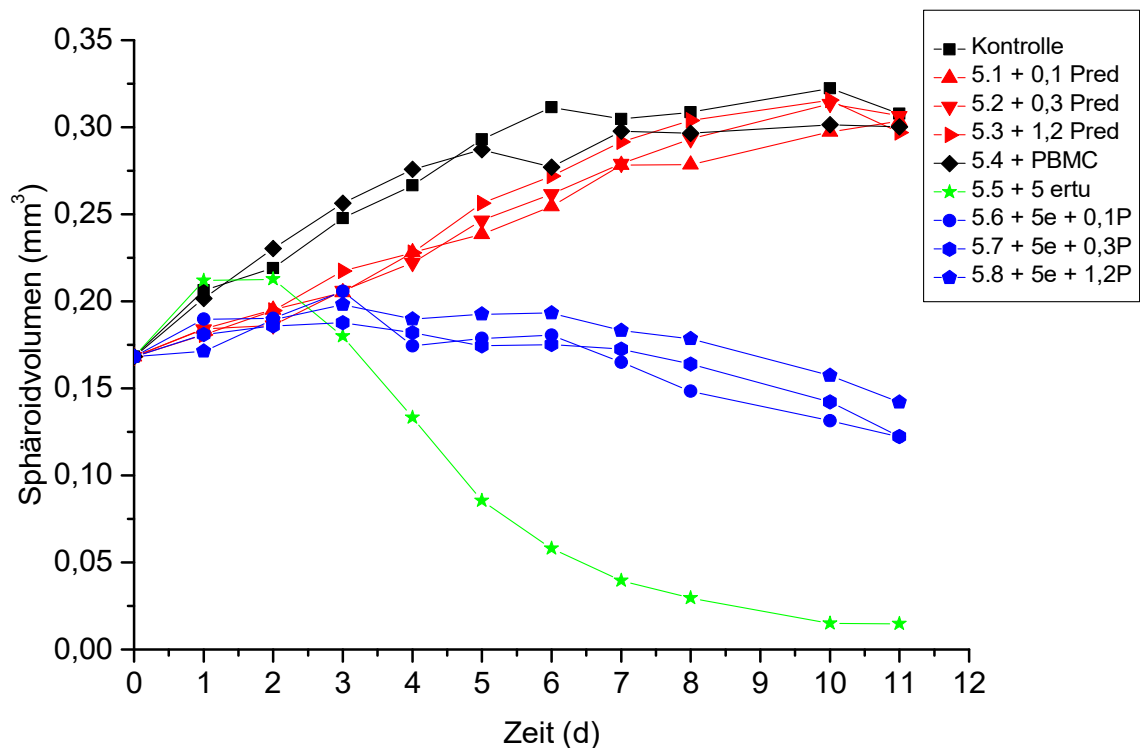


Abbildung 25: Volumenprogression der FaDu E593 MCTS unter der Zugabe von ertumaxomab und Prednisolon. Für eine ausführlichere Erklärung der Legende siehe Tabelle 7.

Die Volumenentwicklung der Sphäroide während der elf Versuchstage zeigt Abbildung 25. Die Zugabe von 0,1 µg/ml Prednisolon (Ansatz 5.2) zeigt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (schwarzes Quadrat, Ansatz 5.1) eine Volumenreduktion um 15 % an Tag 4 des Versuchs. Die Zugabe höherer Konzentrationen bewirkte keine weitere Volumenreduktion (Ansätze 5.2-5.4). Weiterhin reduzierte sich der Volumenunterschied zwischen dem Kontrollansatz und den Kulturen mit zugegebenen Glukokortikoiden bis zum Ende des Versuchs stetig. Das Volumen der mit Prednisolon behandelten Sphäroide entspricht an Tag 11 dem Volumen der unbehandelten MCTS. Der Ansatz mit den zugesetzten PBMC (Ansatz 5.5) erfährt fast keine Reduktion des Sphäroidvolumens im Vergleich zur Kontrolle. Es ist zu beobachten, dass beide Ansätze ab dem 6. Tag jedoch keine Volumenzunahme der MCTS mehr erfahren. Die ausschließlich mit Antikörper behandelten Sphäroide (Ansatz 5.6) haben bis zum Ende des Versuchs eine deutliche Volumenreduktion erfahren (95 % im Vergleich zur Kontrolle an Tag 11), wurden jedoch nicht komplett zerstört.

Durch Zugabe des Prednisolons wird die Volumenreduktion vermindert, im Vergleich zur Kontrolle hat das Volumen an Tag 11 aber noch um 54 %-60 % abgenommen (Ansätze 5.7-5.9). Die Konzentration des Glukokortikoids spielt dabei offenbar eine untergeordnete Rolle.

Der Versuch wird zur Verifizierung mit gleicher Anordnung erneut durchgeführt. In der ersten Durchführung zeigten sich inkongruente Ergebnisse zu den bereits zuvor erfolgten Versuchen (keine vollständige Lyse der Sphäroide unter ertumaxomab, fehlender Unterschied des Wachstums unter Prednisolon im Vergleich zur Kontrolle). Die Volumenentwicklung der Sphäroide während der zehn Versuchstage zeigt Abbildung 26.

Die Zugabe von Prednisolon (Ansätze 6.2-6.4) bewirkt diesmal eine Volumenreduktion von 36 %-47 % am Ende des Versuchs an Tag 10. Die Konzentration des Glukokortikoids spielt dabei weiterhin eine untergeordnete Rolle.

Die nur mit ertumaxomab behandelte Kultur (Ansatz 6.6) enthält nach sechs Tagen bereits keine MCTS mehr. Durch die Zugabe des Glukokortikoids in geringer Dosis (0,1 µg/ml, Ansatz 6.7) wird die Antikörperwirkung (bei einer Konzentration von 5ng/ml) um etwa fünf Tage verzögert. Höhere Dosen bewirken eine leicht stärkere Inhibition des Antikörpers, die Volumenreduktion an Tag 10 beträgt 68 %-81 %. Eine Glukokortikoid Dosisabhängigkeit kann nicht beobachtet werden.

Tabelle 8: Zusammensetzung der verschiedenen Ansätze des Versuchs. In jedem Ansatz sind 200 FaDu E593 MCTS in 20 ml Medium.

Nr.	PBMC (Z/ml)	Antikörper ertumaxomab (ng/ml)	Glukokortikoid Prednisolon (µg/ml)	Abkürzung
6.1	---	---	---	Kontrolle
6.2	---	---	0,1	+0,1 Pred
6.3	---	---	0,3	+0,3 Pred
6.4	---	---	1,2	+1,2 Pred
6.5	1x10 ⁶	---	---	+PBMC
6.6	1x10 ⁶	5,0	---	+10 ertu
6.7	1x10 ⁶	5,0	0,1	+5e +0,1P
6.8	1x10 ⁶	5,0	0,3	+5e +0,3P
6.9	1x10 ⁶	5,0	1,2	+5e +1,2P

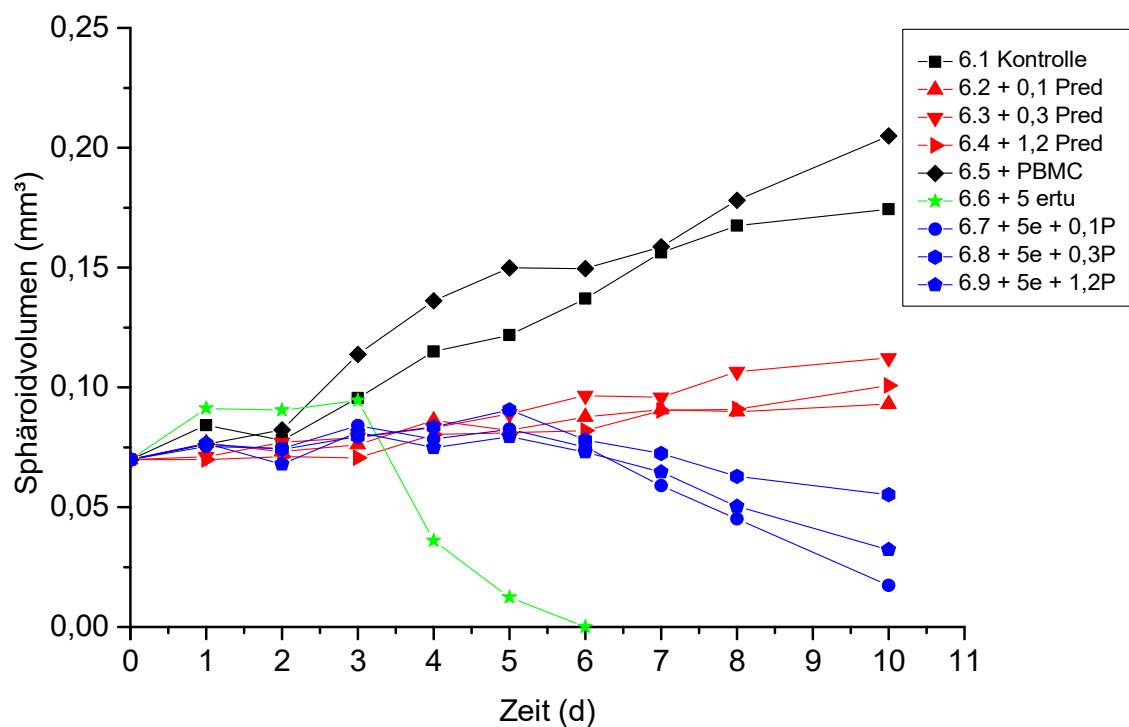


Abbildung 26: Volumenprogression der FaDu E593 MCTS unter der Zugabe von ertumaxomab und Prednisolon. Für eine ausführlichere Erklärung der Legende siehe Tabelle 8.

4.6.2 Immunhistologische Färbungen der FaDu E593 Sphäroidschnitte

Zunächst wird eine HE Übersichtsfärbung des Kontrollansatzes an verschiedenen Versuchstagen durchgeführt (Abbildung 27). Es ist zu beobachten, dass sich im Verlauf innerhalb des Sphäroids die zentrale Nekrose ausbildet und die Zellen vor allem in der Randschicht lokalisiert sind.

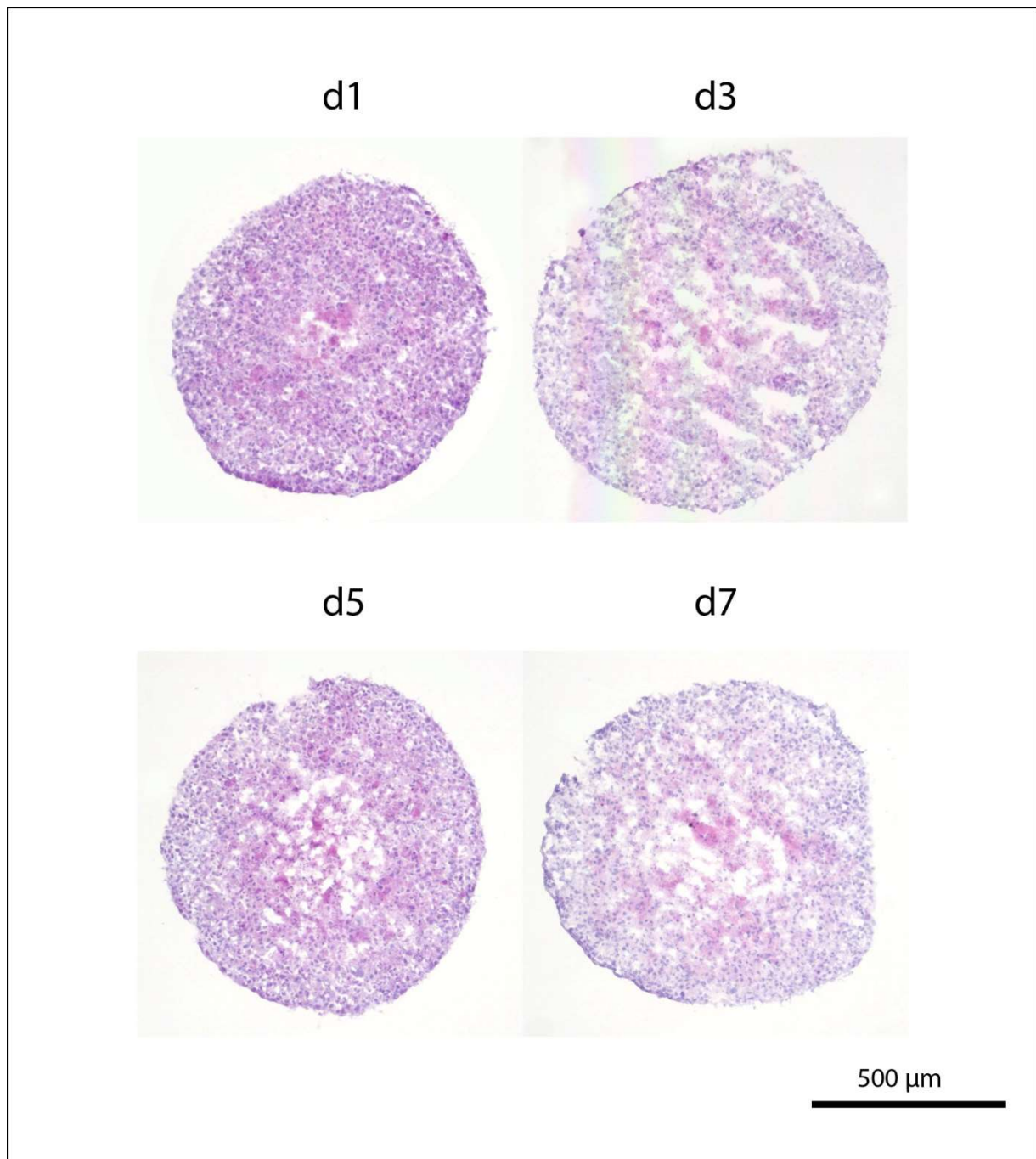


Abbildung 27: HE Färbung der FaDu E593 Sphäroide aus dem Kontrollansatz an verschiedenen Tagen des Versuchs.

Zur Darstellung der HER2 Expression der FaDu E593 MCTS werden Sphäroidschnitte des Kontrollansatzes an verschiedenen Tagen des Versuchs angefertigt (Abbildung 28). Im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 22) ist eine deutlich gesteigerte Expression des HER2 Oberflächenproteins (braun) zu sehen.

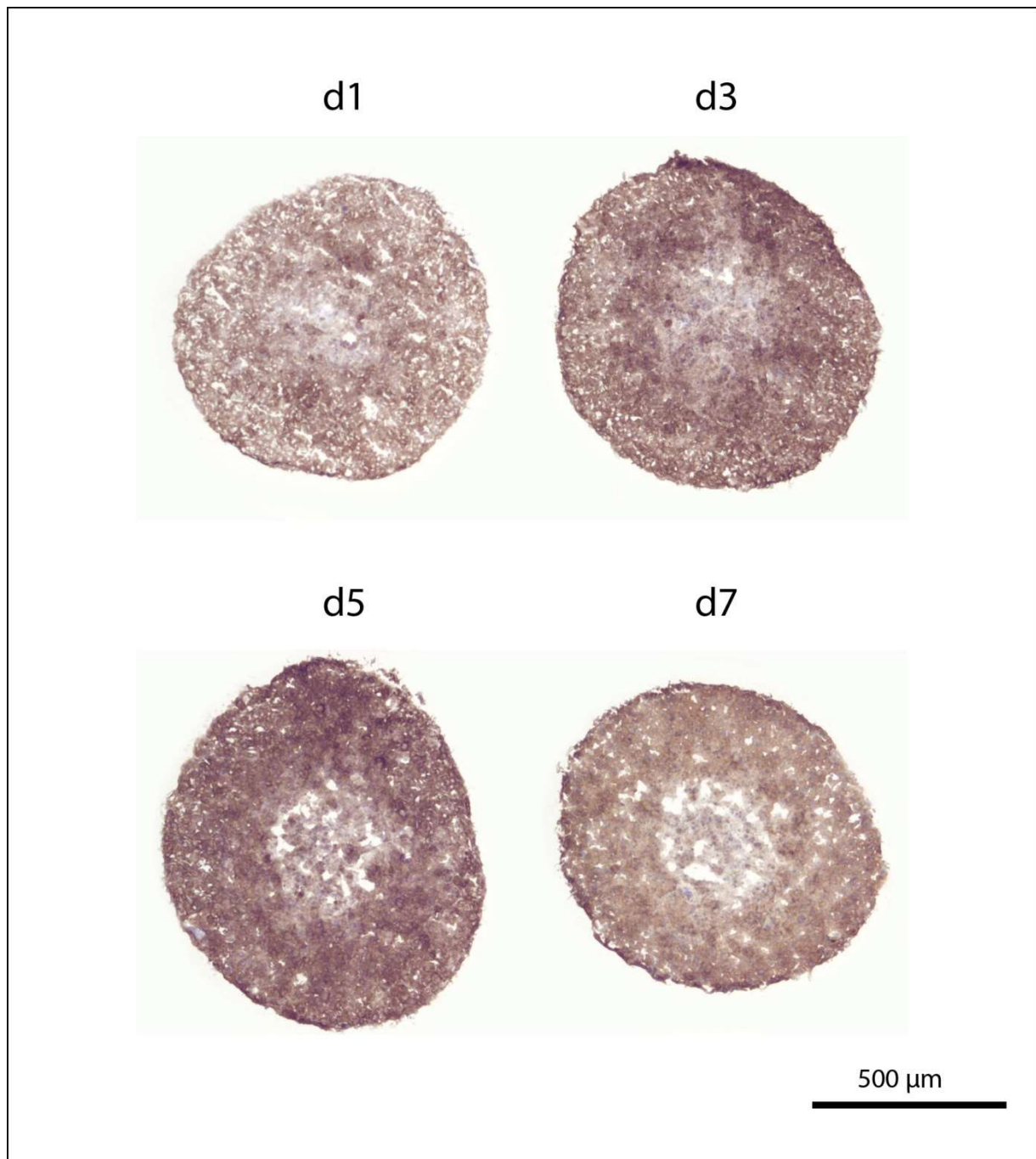


Abbildung 28: HER2 Färbung der FaDu E593 Sphäroide aus dem Kontrollansatz an verschiedenen Tagen des Versuchs.

Weiterhin wird eine Ki67 Färbung der Kontrollsphäroide an verschiedenen Tagen des Versuchs durchgeführt um die Proliferation zu beurteilen (Abbildung 29). Es zeigt sich eine Abnahme der proliferierenden Zellen im Verlauf des Versuchs, welche auch in der Volumenprogression des Versuchs zu beobachten ist. Ab dem siebten Tag des Versuchs ist fast keine Volumenzunahme der Kontrollkultur mehr zu verzeichnen. Weiterhin stellt sich das typische Bild innerhalb des Sphäroids dar. Die vitalen Zellen

befinden sich hauptsächlich in den äußeren Bereichen der Randschicht (gut zu sehen an Tag 7).

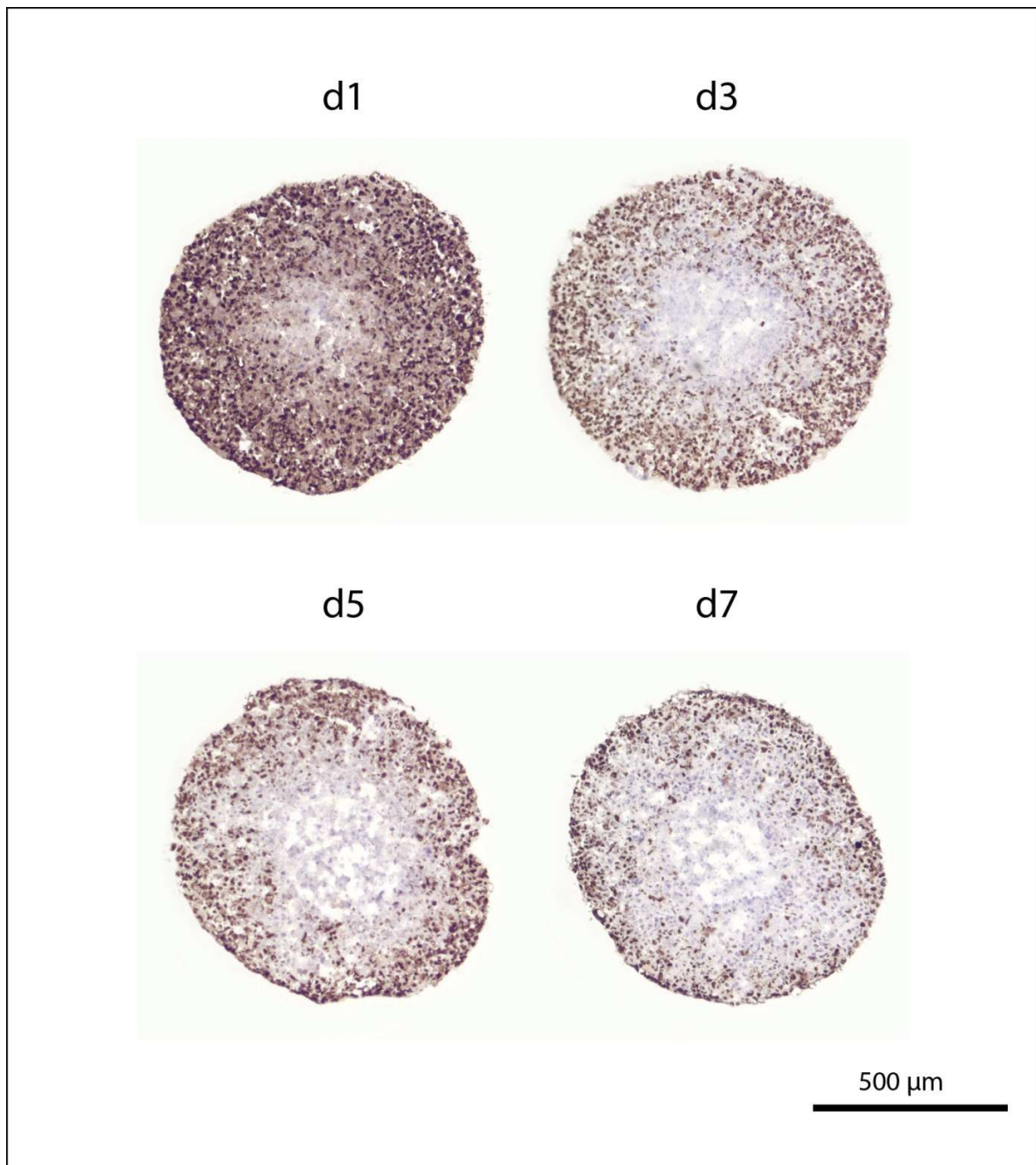


Abbildung 29: Ki67 Färbung der FaDu E593 Sphäroide aus dem Kontrollansatz an verschiedenen Tagen des Versuchs.

Analog zum Versuch mit den FaDu Wildtyp Sphäroiden (Kapitel 4.4.2) werden am fünften Versuchstag aus jedem Ansatz Sphäroide entnommen und histologisch aufbereitet (Abbildung 30). Zunächst werden wieder alle Ansätze zur Übersicht mit HE gefärbt. Bereits hier lassen sich die Größenunterschiede der Sphäroide, die sich auch in der Volumenkurve gezeigt haben, beobachten (v.a. Ansatz 5.6-5.8).

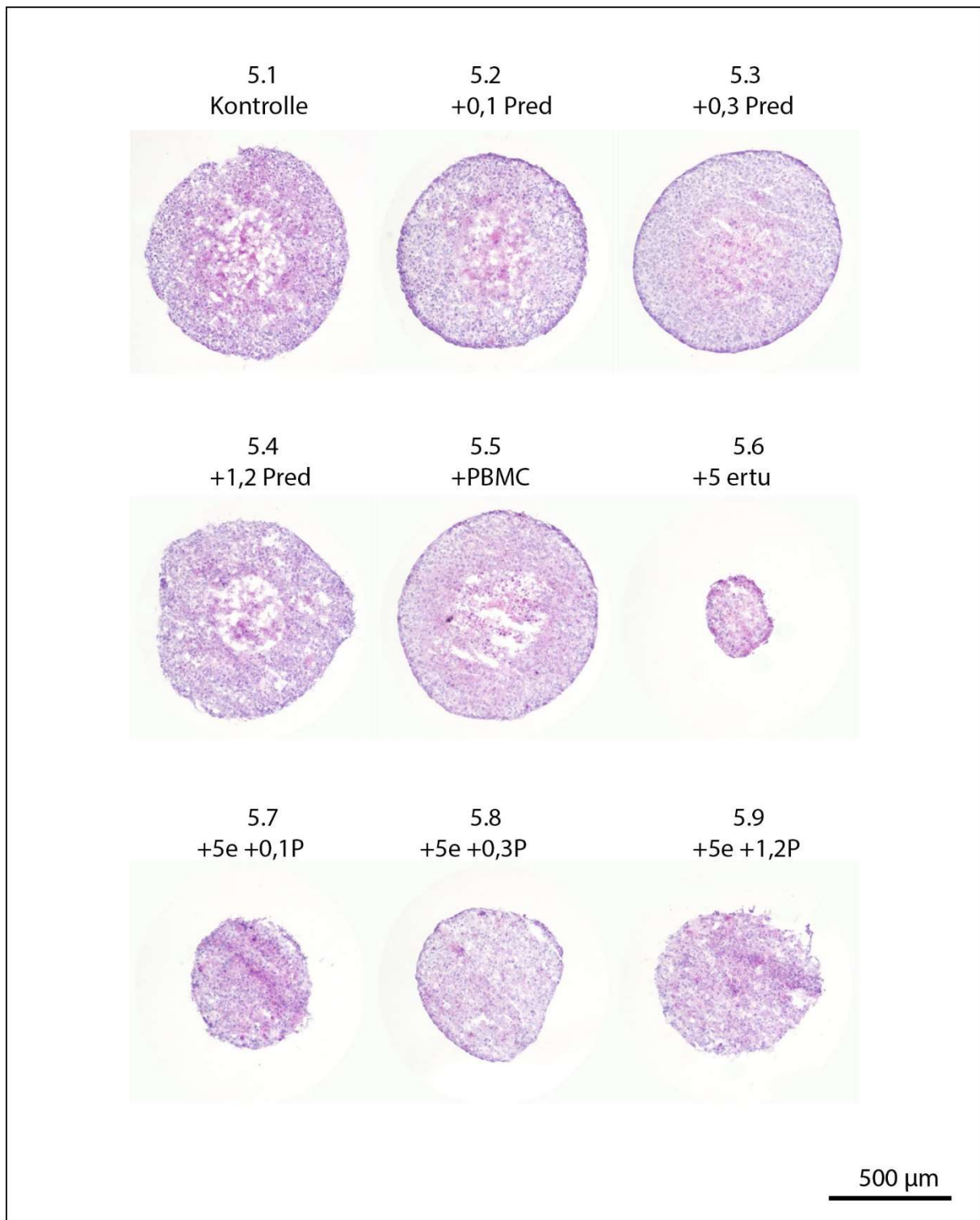


Abbildung 30: HE Übersichtsfärbung der FaDu E593 Sphäroidschnitte aus allen Ansätzen des Versuchs an Tag 5.
Legende siehe Tabelle 7.

Zur Darstellung der Leukozyteninfiltration werden die CD45 Glykoproteine immunhistologisch angefärbt (Abbildung 31). Es zeigt sich eine deutliche Anlagerung der Leukozyten und Infiltration der Sphäroide vermittelt durch die Stimulation der Abwehrzellen mit Hilfe des Antikörpers (Ansatz 5.6). In den mit Glukokortikoid behandelten Kulturen (vor allem Ansatz 5.7, teilweise Ansatz 5.8) sind ebenfalls

vereinzelt Leukozyten zu finden, die das Sphäroid infiltrieren. Aufgrund einer unvollständigen Blockierung der Bindungsstellen mit BSA treten artifizielle Anfärbungen auf, die eine Interpretation erschweren (Ansätze 5.1, 5.5, 5.8, 5.9).

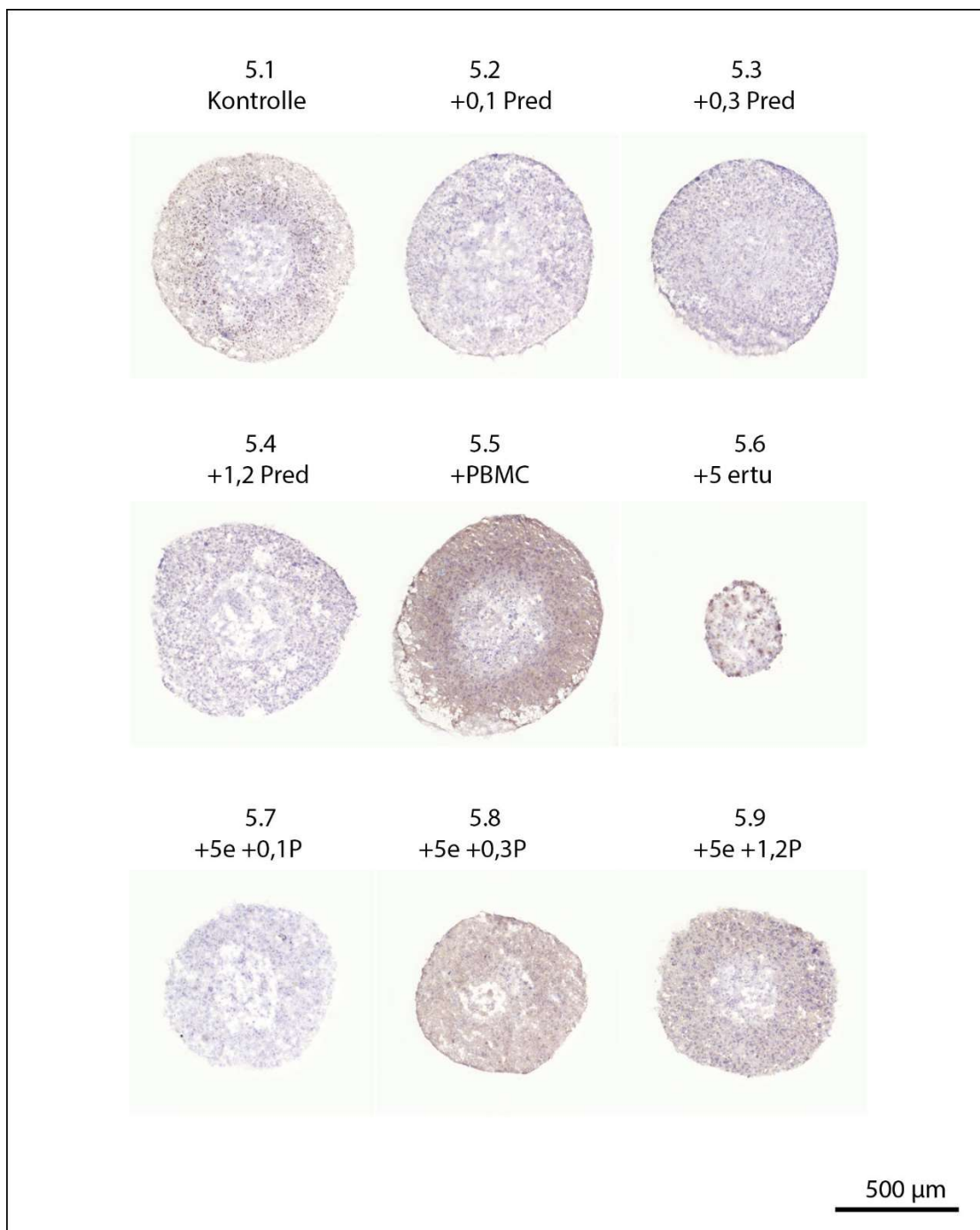


Abbildung 31: CD45 Leukozytenfärbung der FaDu E593 Sphäroidschnitte aus allen Ansätzen des Versuchs an Tag 5. Legende siehe Tabelle 7.

Weiterhin wird eine immunhistologische Färbung des HER2 Antigens an Tag 5 des Versuchs durchgeführt (Abbildung 32). Das Ziel ist das HER2 Expressionsniveau der E593 Zellen mit dem der FaDu Wildtyp Zellen zu vergleichen und zu ermitteln, ob

Prednisolon eventuell einen modulierenden Einfluss ausübt. Es zeigt sich eine deutlich gesteigerte HER2 Expression in allen Ansätzen, verglichen mit den Wildtyp Sphäroiden (Kapitel 4.4.2). Es ist keine Veränderung der HER2 Expression durch die Zugabe von Prednisolon zu beobachten.

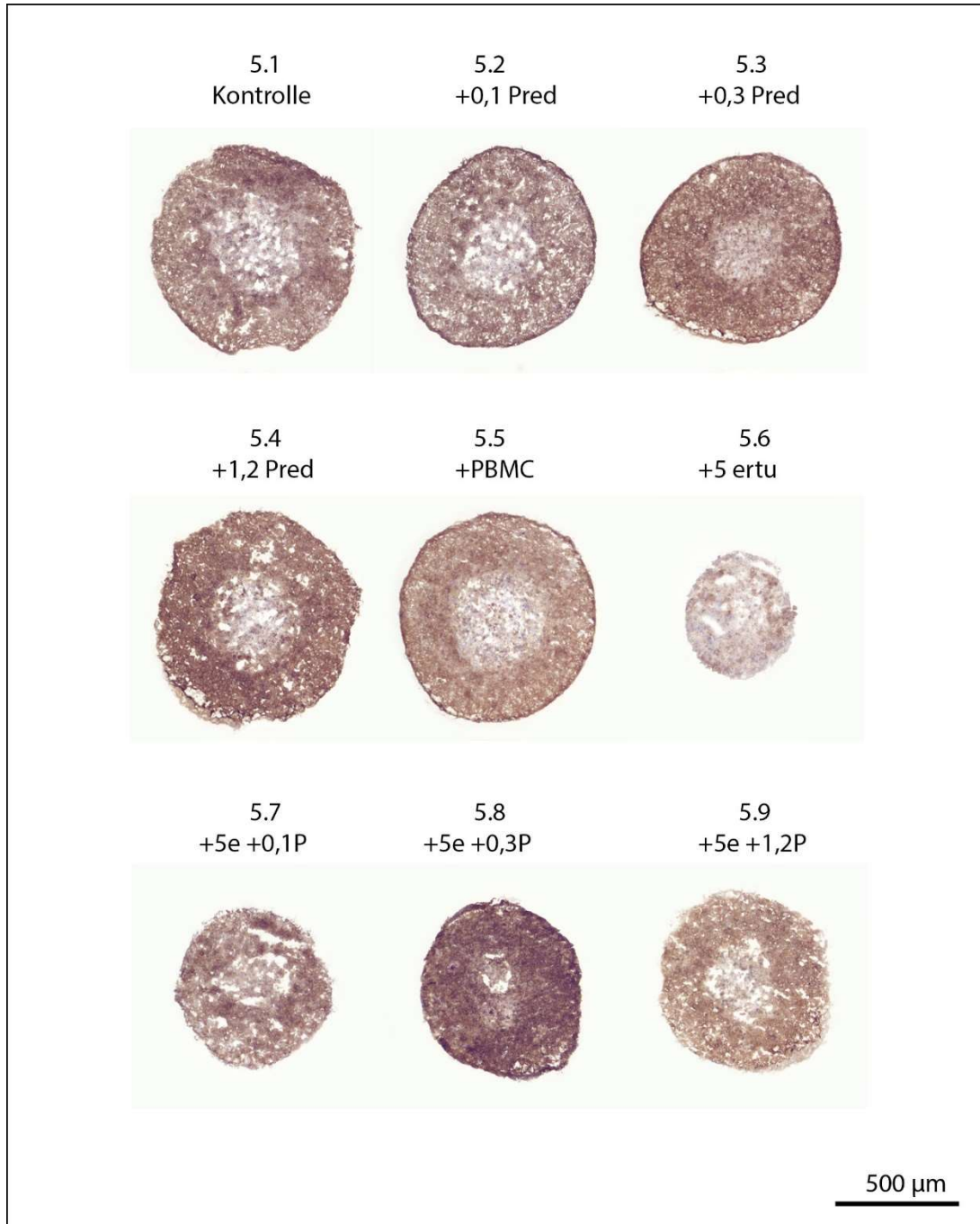


Abbildung 32: HER-2 Färbung der FaDu E593 Sphäroidschnitte an Tag 5 des Versuchs zur Darstellung des Expressionsniveaus in den FaDu E593 Sphäroiden. Legende siehe Tabelle 7.

Zur Beurteilung der Zellproliferation wird eine Ki67 Färbung an Tag 5 des Versuchs durchgeführt (Abbildung 33). Es ist zu beobachten, dass die proliferierenden Zellen ausschließlich im Randsaum lokalisiert sind, die zentrale Nekrose weist keine

Braunfärbung auf. Weiterhin ist der Rand der Sphäroide, denen kein Antikörper zugesetzt wurde deutlich breiter und stärker angefärbt, als in den Kulturen mit ertumaxomab. In dem mit ertumaxomab behandelten Sphäroid ohne Glukokortikoid (Ansatz 5.6) finden sich nur wenige angefärbte Zellen. Die kombinierte Behandlung mit Prednisolon (Ansätze 5.7-5.9) führt zu einem breiteren Randsaum, der sich stärkerbraun färbt.

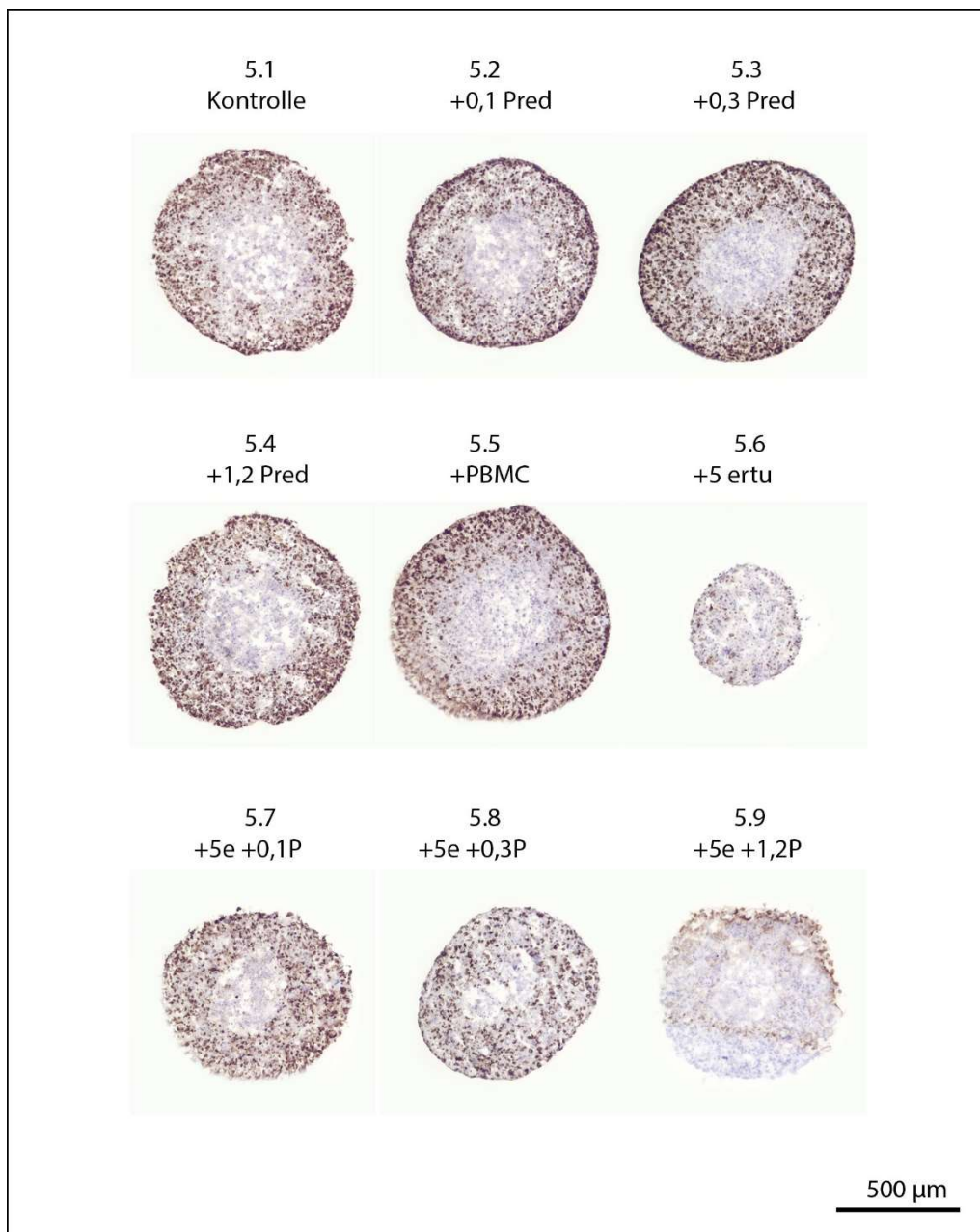


Abbildung 33: Ki67 Färbung der FaDu E593 Sphäroidschnitte an Tag 5 des Versuchs zur Darstellung der Zellproliferation in den FaDu E593 Sphäroiden. Legende siehe Tabelle 7

4.7 Behandlung von FaDu-E593-Monolayerkulturen mit Prednisolon

In diesem Ansatz wurde die alleinige Wirkung von Prednisolon auf die HER-2 transfizierten FaDu E593 Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wird die Glukokortikoid-Konzentration weiter eskaliert bis zu einem Maximum von 9,6 µg/ml. Zunächst werden in eine 96 Well-Platte jeweils 2×10^4 Zellen/Well ausgesät und 48 Stunden inkubiert. Im Anschluss wird das Prednisolon hinzugefügt und die Kulturen erneut für 48 Stunden inkubiert. Zur Bestimmung der Vitalität bzw. der Stoffwechselaktivität wird nun ein XTT-Test in 4fach-Bestimmung durchgeführt. Die Extinktionsmessung ergibt keinen Unterschied der Zellvitalität im Monolayer (die Standardabweichung der Mittelwerte zum Gesamtdurchschnitt beträgt 3,6 %), obwohl sich in den vorangegangenen Sphäroidversuchen ein deutlicher Einfluss der Glukokortikoide auf das Volumenwachstum zeigte. Die detaillierten photometrischen Messungen zeigt Abbildung 34.

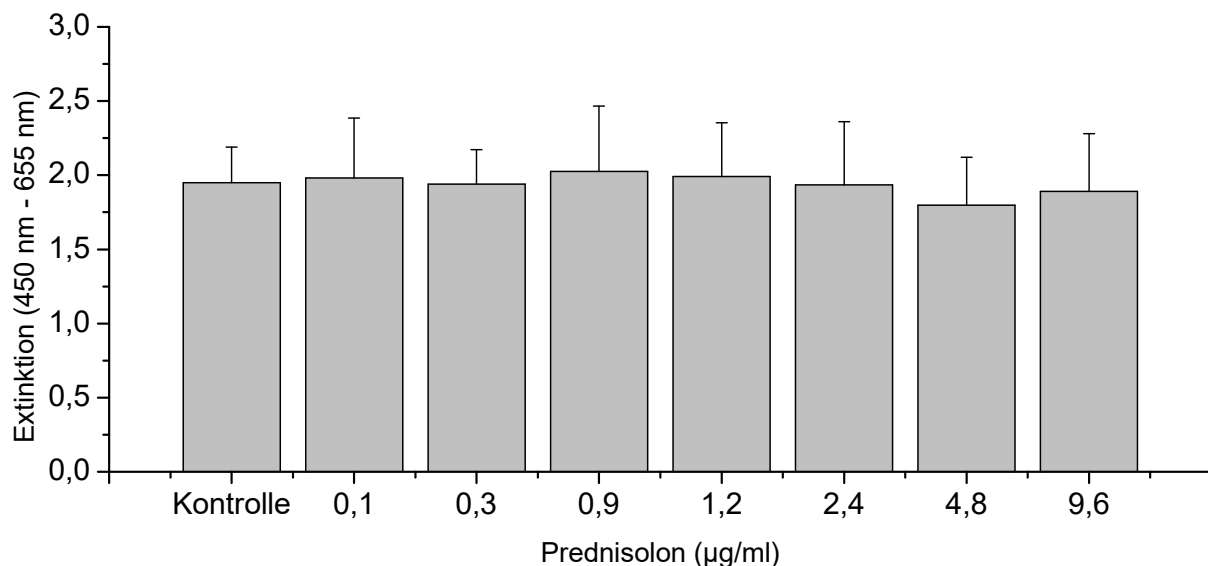


Abbildung 34: XTT-Test von Monolayer Zellen nach zwei Tagen Inkubation mit dem Glukokortikoid. Die Ansätze enthalten jeweils FaDu E593 Zellen sowie verschiedene Konzentrationen Prednisolon. Angegeben ist stets der Mittelwert aus vier Wells und die zugehörige Standardabweichung.

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit ist Teil des Forschungsprojektes "Entwicklung eines pharmakologischen Modells zur Prüfung immuntherapeutischer AK mit dreidimensionalen Tumorzellkulturen in vitro", einer Kooperation der AG Müller-Klieser mit der Fresenius Biotech GmbH, der TRION Pharma GmbH und der EUFETS AG, Idar-Oberstein. Dieser Teil des Projektes beschäftigt sich mit der Interaktion zwischen den therapeutischen Antikörpern und zugesetzten Glukokortikoiden, die in der medizinischen Anwendung als Komedikation verabreicht werden, um Nebenwirkungen zu reduzieren. Die verwendeten Antikörper catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) und ertumaxomab (anti-Her2/neu x anti-CD3) sind jeweils bispezifisch und trifunktional. Sie besitzen zusätzlich zur Bindungsstelle für das jeweilige Tumor-assoziierte Antigen eine weitere Bindungsstelle für CD3-Moleküle, wodurch beide Antikörper imstande sind T-Zellen zu rekrutieren und damit die Immunantwort gegen die Tumorzellen zu verstärken. Weiterhin befindet sich an der schweren Kette der obligatorische Fcγ-Rezeptor zur Rekrutierung von akzessorischen Immunzellen (Makrophagen, dendritische Zellen, NK-Zellen). Als Komedikation zur Behandlung der Nebenwirkungen, die auf der massiven Freisetzung von Zytokinen beruhen, werden Glukokortikoide eingesetzt, wobei in den durchgeführten Versuchen jeweils catumaxomab mit Dexamethason und ertumaxomab mit Prednisolon eingesetzt wurde.

Zunächst sollen nun das verwendete 3D-Modell der MCTS in Spinnerflaschen, sowie die sich anschließenden Methoden zur Bestimmung der Zellvitalität und Klonogenität beurteilt werden. Anschließend werden die Wirkungsweisen der verschiedenen Therapeutika dargestellt und die Ergebnisse aus den durchgeführten Versuchen diskutiert.

5.1 Beurteilung des MCTS 3D-Modells in Spinnerflaschen

Im Vergleich zur Tumorzellkultivierung im Monolayer spiegelt das 3D-Modell die in vivo Situation eines Tumors exakter wider. Es ist somit möglich die Effizienz der angewandten Therapien besser zu beurteilen (Friedrich et al. 2007a). Den Zellen ist

es z. B. nicht möglich an einer artifiziellen Oberfläche zu haften. Es bestehen lediglich Zell-Zell Kontakte. Weiterhin kann jedes Sphäroid als Mikrometastase angesehen werden, welche durch Diffusion von außen versorgt wird und im Zentrum unter anderem durch die schlechtere Versorgungssituation eine Nekrose ausbildet (Groebe et al. 1996; Mueller-Klieser et al. 1986). Durch die Kultivierung in Spinnerflaschen wird ein einheitliches Milieu für alle 200 Sphäroide des jeweiligen Ansatzes geschaffen. Weiterhin kann die Versuchsdauer 10 Tage und länger betragen, da in den Spinnerflaschen mit 20 ml Medium ausreichend Nährstoffe für Sphäroide und PBMC vorhanden sind, ohne einen Medienwechsel durchführen zu müssen. Die Bestimmung der Sphäroidgrößen wurde nicht-invasiv mit Hilfe eines Scanners und anschließender digitaler Auswertung vorgenommen, um die Versuchsansätze so wenig wie möglich zu manipulieren. Außerdem ist es so möglich einen Großteil der Sphäroide zu erfassen und damit ein statistisch besser gesichertes Ergebnis zu erhalten (Rodday et al. 2011) als mit der bisher verwendeten Methode, bei der jeweils eine kleine Anzahl an Sphäroiden entnommen und unter dem Mikroskop manuell vermessen wurde. Der Vergleich beider Verfahren ist in Kap. 4.1.1 dargestellt. Auch ohne einen statistischen Test durchzuführen, lässt sich erkennen, dass das digitale Verfahren verlässliche, wenn nicht sogar exaktere Ergebnisse liefert.

Ein Eingreifen in das System im Verlauf der Versuche ist dennoch nicht zu vermeiden, da am ersten und fünften Tag jeweils einige Sphäroide und eine kleine Menge Medienüberstand für anschließende Untersuchungen entnommen und konserviert werden müssen. Weiterhin müssen die Spinnerflaschen stets leicht geöffnet sein, um den Gasaustausch in den Inkubatoren zu gewährleisten. Der dadurch erhöhte Gefahr der Kontamination der Kulturen wird mit Hilfe von Antibiotika und Antimykotika in den Medien entgegengewirkt. Eine weitere Schwierigkeit besteht in der recht langen Vorbereitungsphase der Versuche, in der die Sphäroide initiiert werden. Durch die Verkürzung dieser Phase von 14 Tagen auf 8 Tage wurde Zeit eingespart, doch vor allem können die Sphäroide in den Kontrollansätzen über die gesamte Dauer des Versuches weiterhin wachsen. Bei einer Initiationszeit von 14 Tagen ist das Wachstum der Sphäroide in den Kontrollansätzen während der Versuche deutlich weniger ausgeprägt (siehe Kap.4.2.1).

Der Materialverbrauch im Vergleich zur Monolayerkultur ist deutlich höher und die auf dem Magnetrührer platzierten Spinnerflaschen können bei schlechter Positionierung

oder auch spontan, wenn auch selten, ausfallen, was den Ansatz unbrauchbar werden lässt.

Letztlich stehen die Vorteile der besseren Imitation der in vivo Situation (hier sei vor allem der Aszites in der Bauchhöhle genannt, für den catumaxomab bereits zugelassen ist) den kalkulierbaren Risiken gegenüber.

5.2 Beurteilung der Sphäroidprozessierung nach Entnahme aus der Spinnerkultur

Am ersten und fünften Tag der immuntherapeutischen Versuche wurden jeweils einige Sphäroide aus den einzelnen Ansätzen entnommen. Mit diesen wurden dann Klonogenitäts- und Vitalitätstests durchgeführt. Einige der Sphäroide wurden kryokonserviert, um später Schnitte anzufertigen, die histologisch eingefärbt wurden. Um die Teilungsfähigkeit und den Metabolismus der Zellen zu untersuchen, wurde von jedem Ansatz ein XTT-Test resp. eine Analyse der Plattierungseffizienz (als Maß für die Klonogenität) durchgeführt. Da diese Methoden eine genaue Zellzahl bei Testbeginn benötigen, mussten die entnommenen Sphäroide zunächst disaggregiert werden, damit eine Zellzählung stattfinden konnte. Dies geschah u. a. mit Hilfe von Trypsin, mit welchem auch in Monolayerkulturen am Boden haftende Zellen abgelöst werden. Die Schwierigkeit bei der Behandlung von Sphäroiden mit Trypsin besteht vor allem in der möglichen Dauer der Anwendung des Enzyms. Es benötigt eine gewisse Zeit, bis die Wirkung eintritt, doch bei zu langer Einwirkzeit werden die Zellen selbst ebenfalls angegriffen und können nekrotisch werden. Bei einer Zellanordnung, wie sie in den Sphäroiden vorliegt, ist es dem Trypsin nicht möglich alle Zellen gleichermaßen zu erreichen. Vor allem bei der FaDu-Zelllinie ist zu beobachten, dass sie sehr feste und stabile MCTS ausbildet. Dies ist wahrscheinlich auf ihre Herkunft zurückzuführen, da es sich um ein Plattenepithelkarzinom handelt, welches aus veränderten Epithelzellen entstand. Dieser Gewebetyp bildet starke Zell-Zell Kontakte aus, dabei sind vor allem Tight Junctions (zonula occludens) ausschlaggebend (Morita et al. 2011), da sie die Diffusion des Trypsins in die inneren Bereiche des Sphäroids verhindern. Dadurch ist es problematisch die MCTS ab einer gewissen Größe vollständig zu disaggregieren, ohne die Zellen zu stark zu manipulieren. Der komplette Prozess von Trypsinapplikation und mechanischer Bearbeitung setzt die Zellen

starken Noxen aus, welche bereits Einfluss auf das Überleben haben können. Aus diesem Grund sind nur grobe Aussagen zur Teilungsfähigkeit der Zellen möglich, welche stets zusammen mit den Wachstumskurven interpretiert werden müssen.

Weniger Stress wären die Zellen bei Assays ausgesetzt, die mit kompletten Sphäroiden durchgeführt werden und es wäre möglich zuverlässigere Ergebnisse zu erhalten (Friedrich et al. 2007b). Es wäre allerdings zu prüfen, ob dies mit FaDu-Sphäroiden möglich ist, vor allem in Hinblick auf Größe und Zellzahl.

5.3 Wirkungsweise der Immuntherapeutika und Immunsuppressiva

5.3.1 catumaxomab

Der erste verwendete Antikörper ist catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3). Er gehört biochemisch zu den Immunglobulinen der Klasse IgG. Er setzt sich aus zwei Halbantikörpern zusammen und gehört zu den chimären Antikörpern. Der eine Teil besteht aus einem IgG2a Halbantikörper der Maus mit einer schweren und einer leichten Kette. Dieser Teil beinhaltet die Antigenbindungsstelle zur Bindung an das EpCAM, sowie einen Teil des Fc γ -Rezeptors. Der zweite Halbantikörper ist vom Typ IgG2b und entstammt einer Ratte. Er besteht ebenfalls aus einer schweren und einer leichten Kette und weist die Bindungsstelle für CD3 Moleküle zur Rekrutierung von T-Zellen auf. Weiterhin komplettiert er den Fc γ -Rezeptor (Chelius et al. 2010).

Durch die Bindung an EpCAM können Tumorentitäten, die dieses Molekül überexprimieren, gezielt therapiert werden. Dazu gehören u. a. die meisten Karzinome gastrointestinalen Ursprungs, des Urogenitaltraktes, sowie bestimmte Typen des Mammakarzinoms und einige Kopf-Hals Tumoren (Spizzo et al. 2011).

EpCAM (CD326) ist ein membranständiges Glykoprotein und vermittelt die Ca²⁺-unabhängige homophile Zelladhäsion (Litvinov et al. 1994). Dabei wird das Molekül durch intramembranöse Proteolyse katalysiert durch TACE (tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme) und PS2 (presenilin-2) in eine Ektodomäne EpEX und eine intrazelluläre Domäne EpICD gespalten. Letztere bildet mit FHL-2, Lef-1 und β -catenin einen nukleären Komplex und bindet nach Translokation in den Nukleus an die Lef-1 DNA Konsensus-Sequenz (Maetzel et al. 2009). In der Folge wird die

Expression von Cyclin D1, sowie Cyclin A/E und des Proto-Onkogens c-myc gesteigert (Chaves-Perez et al. 2012; Inoue et al. 2011; Munz et al. 2004). Weiterhin wird die Expression von Tumorsuppressorgenen wie p53 und p21 herabgesetzt (Huang et al. 2011). In Kombination führt diese Reprogrammierung zur Deregulation des Zellzyklus und trägt wesentlich zur Tumorentstehung bei, weshalb EpCAM auch in Tumoriitierenden Zellen eine wichtige Rolle beigemessen wird (Imrich et al. 2012). Hinzu kommt die Interaktion zwischen EpCAM und E-Cadherin, sowie N-Cadherin über die Phosphatidylinositol-3 Kinase, die zu einer Beeinträchtigung der Cadherin vermittelten Zell-Zell Adhäsion führt und somit zur Bildung von Metastasen beiträgt (Winter et al. 2007).

Schließlich kann die EpCAM Expression durch hohe TNF- α Konzentrationen herabgesetzt werden (Gires et al. 2001), was vermuten lässt, dass catumaxomab zusätzlich zur immunologischen Wirkung einen indirekten antitumoralen Effekt über den Einfluss auf die EpCAM Expression hat. Es müsste jedoch untersucht werden, ob der kurze Zeitraum, in dem hohe TNF- α Spiegel erreicht werden, genügt, um Einfluss auf die EpCAM Expression zu nehmen.

Weiterhin besitzt catumaxomab eine Bindungsstelle für das CD3 Molekül, welches spezifisch von T-Zellen exprimiert wird (Ji et al. 2002). Der Antikörper bringt somit sowohl T-Helfer Zellen als auch zytotoxische T-Zellen in unmittelbare Nähe der Tumorzellen. Die TH1-Zellen können durch Freisetzung von IL-2 sich selbst und andere T-Zellen aktivieren (Lauritzsen et al. 1991), die CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen beginnen sich zu vermehren und die Tumorzellen mit Hilfe von Perforinen und Granzymen anzugreifen. Weiterhin können sie mit ihrem membranständigen Fas-Ligand durch die Aktivierung des Fas-Rezeptors auf den Tumorzellen deren Apoptose einleiten (Renner et al. 1997).

Durch Freisetzung von IFN- γ werden diese Mechanismen verstärkt und vor allem dient es zur Aktivierung von Makrophagen, die über das Fc-Fragment des Antikörpers an die Tumorzellen binden und diese phagozytieren.

Generell besitzen alle Immunglobuline der Klasse IgG ein Fc-Fragment, welches von entsprechenden Fc γ -Rezeptoren auf akzessorischen Zellen erkannt und gebunden werden kann. Hier spielen vor allem die Fc γ -RI (CD64), Fc γ -RIIa (CD32) und Fc γ -RIII (CD16) eine große Rolle, da bekannt ist, dass sie an catumaxomab binden und aktivierend auf die jeweilige Zelle wirken (Sebastian et al. 2009). Der Fc γ -RI (CD64) Rezeptor wird vor allem auf Monozyten und Makrophagen exprimiert und aktiviert die

Zelle über eine intrazelluläre Tyrosinkinase, was letztendlich zur Phagozytose der Zielzelle führt. Der Fcγ-RIII (CD16) Rezeptor wird hauptsächlich auf NK-Zellen exprimiert und vermittelt ebenfalls über eine intrazelluläre Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität eine Aktivierung der Zelle. Hier führt es zur ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity) und somit zur Zerstörung der Zielzelle über die Freisetzung zytotoxischer Substanzen während der Degranulation. Der Fcγ-RIIa (CD32) Rezeptor befindet sich vor allem auf B-Zellen und die Signaltransduktion geschieht über eine intrazelluläre Tyrosinkinase, doch im Gegensatz zu den anderen beiden Rezeptortypen spielt die gamma-Kette hier keine Rolle (Kim et al. 2001).

Die stärkste Affinität aller Fcγ-Rezeptoren besteht für die Immunglobulinsubtypen IgG1 und IgG3, doch durch Polymorphismen der Rezeptoren kann sich die Bindungsaffinität interindividuell unterscheiden (de Haas 2001). Da bei den durchgeführten Versuchen jeweils Leukozyten unterschiedlicher Spender zum Einsatz kamen, könnte dies ein Faktor für die (wenn auch nur geringen) zeitlichen Unterschiede der Antikörperwirkung in der Kultur sein.

Seit 2009 ist catumaxomab zur Behandlung des malignen Aszites in der europäischen Union zugelassen. In weiteren Studien im Verlauf zeigte sich eine Verbesserung der Lebensqualität bei Patienten mit malignem Aszites unter Therapie mit catumaxomab sowie ein verlängertes Intervall zwischen notwendigen Parazentesen. (Ornella et al. 2023)

5.3.2 ertumaxomab

Wie catumaxomab gehört auch ertumaxomab biochemisch zur Gruppe der IgG Immunglobuline. Der Antikörper setzt sich ebenfalls aus einem IgG2a Halbantikörper der Maus und einem IgG2b Halbantikörper der Ratte zusammen. Der Unterschied zu catumaxomab besteht in der Antigenspezifität, die sich gegen HER2/neu richtet, wobei catumaxomab das EpCAM Molekül bindet. HER2/neu (human epidermal growth factor receptor 2) gehört zur Gruppe der EGFR/erbB Rezeptoren und wird dementsprechend vom erbB2 Gen codiert. Es sind bisher 4 Rezeptoren dieser Familie bekannt (erbB1 - erbB4), wobei HER2/neu ein orphan receptor ist, das heißt es existiert kein endogener Ligand oder dieser ist bisher nicht bekannt. Die Aktivierung geschieht über die Bindung eines Liganden an einen anderen Rezeptor der erbB Familie. Im weiteren Verlauf bilden sich Heterodimere aus, wobei HER2/neu am häufigsten als Partner

genutzt wird, gleichermaßen sind aber auch Homodimere oder Oligomere möglich (Brennan et al. 2000). HER2/neu Homodimere bilden sich auch ohne Bindung eines Liganden aus. Es folgt die Phosphorylierung der intrazellulären Tyrosinkinase und damit die intrazelluläre Signalweiterleitung. Durch Aktivierung verschiedener Signalwege, darunter MAPK (mitogen-activated protein kinase), PI3K/Akt (phosphoinositide 3-kinase), Phospholipase C-gamma und STAT (Signal transducer and activator of transcription) (Olayioye 2001; Turke et al. 2012) wird die proliferative Aktivität der Zelle auf DNA Ebene gesteigert, die onkogene Transformation begünstigt und die Apoptose verhindert (Vijapurkar et al. 2003). Weiterhin bewirkt HER2/neu eine Erleichterung der Zellmigration durch Veränderungen am Aktin-Myosin Zytoskelett, wodurch bei einer Überexpression die Tumorentität und Metastasierung begünstigt wird (Spencer et al. 2000). HER2/neu ist als Ziel für die antitumorale Therapie gut geeignet, da es eine hohe und stabile Expression auf Tumorgewebe aufweist, gleichzeitig aber eine geringe Expression auf normalem Gewebe. Es wird auf einigen Tumorentitäten überexprimiert, darunter Brustkrebs, Lungenkrebs und Karzinome des Gastrointestinaltraktes (Koeppen et al. 2001). Weiterhin befindet es sich auf der Zelloberfläche und ist dementsprechend für die therapeutischen Antikörper gut zugänglich (Fink-Retter et al. 2007; Pegram et al. 2000).

Antikörper der IgG Klasse wie ertumaxomab haben ein molekulares Gewicht von ca. 150 kDa und können aufgrund ihrer Größe nicht aus normalen Gefäßen austreten. Tumorgefäße besitzen eine höhere Permeabilität, so dass die Antikörper ihr Ziel im Tumorgewebe leichter erreichen können (Cao 2009).

Seit 2000 ist in der europäischen Union der monoklonale Antikörper Trastuzumab (*Herceptin*[®]) zur Behandlung von HER2 überexprimierenden Mamma-Karzinomen zugelassen. Dabei muss das IHC-Expressionslevel 2+ oder höher betragen, da die Patienten bei niedrigeren Expressionsleveln nicht von der Therapie profitieren. Die Wirkung von Trastuzumab besteht einerseits aus der Rekrutierung von Immunzellen und der anschließenden Eliminierung der Tumorzellen durch ADCC und Phagozytose. Andererseits wird durch die Bindung an das HER2/neu Molekül auch der intrazelluläre Signalweg blockiert. Dabei findet ein Arrest der Zelle in der G1 Phase statt, bedingt durch Hochregulierung des cyclin-dependent kinase inhibitor p27, was zu verminderter Proliferation und gesteigerter Apoptose führt (Baselga et al. 2001). Weiterhin führt die Beeinträchtigung des PI3K/Akt Signalweges durch eine Steigerung des PTEN (phosphatase and tensin homologue) ebenfalls zu weniger Proliferation und hin zur

Apoptose. Es wird vermutet, dass ein Fehlen von PTEN zur Resistenz gegen Trastuzumab beiträgt (Nagata et al. 2004). Als weitere Wirkmechanismen werden eine Hemmung der Angiogenese sowie eine Inhibition des HER2 shedding beschrieben, eine HER2 Downregulation wird aktuell ebenfalls diskutiert (Valabrega et al. 2007).

Ein Problem bei der Therapie mit Trastuzumab ist die Resistenzentwicklung. Bis zu 70% der Patienten weisen entweder eine primäre intrinsische Resistenz auf oder entwickeln nach kurzer Zeit eine sekundäre Resistenz (Wilken et al. 2010; Wong et al. 2012). Dabei spielen verschiedene Mechanismen eine Rolle. Durch Abspaltung der extrazellulären Domäne des HER2 Moleküls durch Metalloproteasen wird die Bindung des Antikörpers verhindert, wobei der verbleibende intrazelluläre Teil des Moleküls weiterhin aktiv bleibt (Molina et al. 2002). Durch das membran-assoziierte Glykoprotein Mucin 4 (MUC4) kann das Epitop zur Bindung des Antikörpers maskiert werden und die Tumorzelle entgeht der Erkennung durch das Immunsystem (Price-Schiavi et al. 2002). Ein weiterer Mechanismus, der zur Resistenz beiträgt, ist die gesteigerte Aktivität des PI3K/Akt Signalweges durch Mutation des PIK3R1 Gens (Jimenez et al. 1998). Weiterhin ist die Modulation von p27(kip1), eines cyclin-dependent kinase (CDK) Inhibitor bedeutsam. Durch Downregulation steigt die CDK Aktivität und führt zu gesteigerter Zellproliferation und verminderter Apoptose (Le et al. 2003; Nahta et al. 2004). Auch die Steigerung der Signalwege anderer Rezeptoren der erbB Familie oder aber Rezeptoren anderer Familien wie insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) (Lu et al. 2004) oder vascular endothelial growth factor receptor (VEGF-R) (Izumi et al. 2002) tragen zur Resistenzentwicklung bei. Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Transaktivierung von HER2 durch TNF α (Tumor necrosis factor alpha). Es führt zu einer vermehrten Phosphorylierung von HER2 und erleichtert die Bildung von HER2/HER3 Heterodimeren. In der Folge wird sowohl der Akt als auch der NF- κ B (nuclear factor kappa B) Signalweg verstärkt (Rivas et al. 2010). Dies ist bedeutsam, da bei der Immunreaktion einerseits hohe TNF α -Spiegel erreicht werden, andererseits aber die NF- κ B Kaskade durch Glukokortikoide gehemmt werden kann. Weitere Mechanismen der Resistenzentwicklung werden derzeit untersucht und diskutiert (Fizman et al. 2011).

Durch eine kombinierte Therapie mit anderen Wirkstoffen ist es möglich der Resistenz zu begegnen. Neben zugelassenen Chemotherapeutika wie z. B. Docetaxel ist auch eine Kombinationstherapie mit anderen Antikörpern, die sich gegen HER2 richten, denkbar. Pertuzumab verhindert die Dimerisierung von HER2 und somit die

intrazelluläre Signalweiterleitung. Ein Synergismus mit Trastuzumab ist möglich, da Pertuzumab an ein anderes Epitop des HER2 Moleküls bindet (Domäne II) als Trastuzumab (Domäne IV) (Baselga et al. 2009; Fuentes et al. 2011).

Der hier verwendete Antikörper ertumaxomab ist bereits bei niedrigeren HER2 Expressionsleveln wirksam (ab 1+ bestimmt durch Immunhistochemie oder Fluoreszenz in situ Hybridisierung), Trastuzumab hingegen ist erst ab Expressionsleveln von 2+ zugelassen. Es bildet sich im Idealfall ein Trizellkomplex aus Tumorzelle, T-Zell und akzessorischer Zelle aus, vermittelt durch den Antikörper. Dabei kommt es zu einer Stimulation der Immunzellen untereinander und einer starken gerichteten Immunantwort gegen den Tumor (Jager et al. 2009). Weiterhin ist anzunehmen, dass die oben beschriebenen Mechanismen der Resistenzentwicklung bei ertumaxomab eine geringere Rolle spielen, da die antitumorale Wirkung hauptsächlich über das Immunsystem vermittelt wird. Die Bindungsstelle von ertumaxomab an das HER2 Molekül überschneidet sich nicht mit den Bindungsstellen von Pertuzumab und Trastuzumab. Der Einfluss auf die Phosphorylierung und auf die intrazelluläre Signalkaskade von HER2 scheint gering zu sein. Dadurch ist es möglich, ertumaxomab mit einem oder sogar beiden anderen Antikörpern zu kombinieren, um eine Wirkungssteigerung zu erreichen (Diermeier-Daucher et al. 2012).

Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei ertumaxomab genau wie bei catumaxomab um einen chimären Antikörper aus Maus und Ratte handelt, muss die Ausbildung von HAMA (human antimouse antibody) nach der Applikation, vor allem bei mehrfacher Verabreichung, untersucht werden. Im Falle von catumaxomab konnte bei Ausbildung von HAMA im Serum der Patienten eine positive Wirkung auf das Überleben beobachtet werden (Ott et al. 2012). Im Allgemeinen können körpereigene Antikörper, die gegen den therapeutischen Antikörper gerichtet sind, jedoch auch zu einer Verminderung bis hin zu einem kompletten Verlust der Wirkung führen. Diese Untersuchungen stehen für ertumaxomab noch aus.

5.3.3 Glukokortikoide

Glukokortikoide gehören zur Gruppe der Steroidhormone und werden in der humanen Nebennierenrinde gebildet. Als körpereigenes Glukokortikoid wird aus Cholesterin konsekutiv Cortisol synthetisiert. Durch die lipophilen Eigenschaften der Glukokortikoide können sie durch Zellmembranen diffundieren um zu ihren

intrazellulären Rezeptoren zu gelangen. Der Glukokortikoidrezeptor befindet sich in seiner inaktivierten Form im Zytosol. Dabei ist er an zwei Hsp90 (heat shock protein) Moleküle, sowie an ein p59 Molekül gebunden, die eine Aktivierung verhindern (Gehring 1993). Die Bindungsstelle für den Liganden ist zugänglich und nach Bindung des Glukokortikoids dissoziieren Hsp90 und p59 vom Rezeptor. In der Folge können sich an den frei gewordenen Domänen Rezeptordimere ausbilden. Nach Translokation in den Nukleus binden sie dort an entsprechende DNA-Sequenzen u. a. an das GRE (glucocorticoid responsive element) und entfalten ihre Wirkung als Transkriptionsfaktoren. Eine Vielfalt an Genen kann dadurch aktiviert oder herunterreguliert werden. Diese genomische Wirkung führt ab einer gewissen Dosis durch cis Repression bestimmter Gene durch Bindung an nGRE (negative glucocorticoid responsive element) Sequenzen zu verminderter Transkription. Unter den betroffenen Genen ist u.a IL-1 β , wodurch eine antiinflammatorische Wirkung erreicht werden kann. Hauptsächlich bewirkt dieser Mechanismus jedoch die Nebenwirkungen der Glukokortikoidtherapie u. a. an Knochen (Osteocalcin), Haut (Keratin) und Angiogenese (Proliferin) (Dostert et al. 2004). Die antiinflammatorische Wirkung der Glukokortikoide wird hauptsächlich durch die Hemmung des NF- κ B Signalweges erreicht. Durch Bindung an GRE wird eine Steigerung der Expression von I κ B- α bewirkt, welches an NF- κ B Moleküle bindet und einen in der Folge inaktiven Komplex bildet (Auphan et al. 1995). Über diesen Mechanismus der Transaktivierung wird die Transkription einer Reihe weiterer Gene antiinflammatorischer Proteine gesteigert. Darunter befindet sich auch Annexin I, welches die Bindung von NF- κ B an die DNA verhindert und damit die Zytokinexpression reduziert (Yang et al. 2009; Zhang et al. 2010). Weiterhin hemmt Annexin I die zytosolische Phospholipase A2 α (cPLA2 α), wodurch die Substrate für die Produktion von Prostaglandinen nicht mehr zur Verfügung gestellt werden können mit dem Resultat einer Hemmung der Entzündungsreaktion (Hirabayashi et al. 2004). Ein weiteres Enzym, das durch den Glukokortikoidrezeptor induziert wird, ist die MAPK-Phosphatase I. Durch Dephosphorylierung und somit Inaktivierung der MAPK und der sich anschließenden Signalwege (u. a. cPLA2 α) wird eine antiinflammatorische Wirkung erreicht (Kassel et al. 2001). Zusätzlich dient der MAPK Signalweg auch zur Regulation der Proliferation, z. B. ausgelöst durch die EGF-R Familie. Es ist anzunehmen, dass antiproliferative Effekte auf HER2 exprimierende Zellen, wie sie in den Versuchen beobachtet werden konnten, u. a. auf diesen Mechanismus zurückzuführen sind.

Die Transaktivierung durch den Glukokortikoidrezeptor kann auf 3 Wegen erfolgen abhängig von dem jeweiligen GRE. Eine direkte Bindung des Glukokortikoidrezeptors an die DNA nach Ausbildung eines Homodimers ist möglich (simple GRE). Alternativ bindet der Glukokortikoidrezeptor zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren an die DNA (composite GRE) oder er bindet lediglich an die Transkriptionsfaktoren, ohne selbst Kontakt zur DNA zu haben (tethering GRE) (Newton 2000).

Weiterhin nehmen Glukokortikoide Einfluss auf die Cyclooxygenase-2. Durch Hemmung der Expression wird ebenfalls die Produktion der Prostaglandine herabgesetzt (Masferrer et al. 1994).

Schließlich induzieren Glukokortikoide das GILZ (glucocorticoid induced leucine zipper) Protein, welches NF- κ B, AP-1 (activator protein 1) und andere Transkriptionsfaktoren inhibiert, die bei Entzündungsreaktionen von Bedeutung sind. Außerdem spielt GILZ eine Rolle bei der antiproliferativen Aktivität der Glukokortikoide (Ayroldi et al. 2009). Durch direkte Protein-Protein Bindung an Ras und Raf und deren Inaktivierung werden die sich anschließenden Signalwege wie PI3K/Akt und MEK1/2 gehemmt, welche auf das Überleben sowie die Proliferation der Zelle Einfluss nehmen (Ayroldi et al. 2002; Ayroldi et al. 2007).

Diese als Transrepression bezeichnete direkte Interaktion zwischen Proteinen führt ebenfalls zu einer Hemmung der Entzündungsreaktion, da der Glukokortikoidrezeptor NF- κ B und AP-1 auf diesem Wege auch ohne DNA Bindung inaktivieren kann. Dabei bindet der Glukokortikoidrezeptor die Transkriptionsfaktoren an der Promotorregion der zu exprimierenden Gene entweder mit DNA Kontakt (composite) oder ohne DNA Kontakt (tethering), was in beiden Fällen die Transkription verhindert (Newton et al. 2007). Der inhibierende Effekt des Glukokortikoidrezeptors auf DNA-Ebene kann ebenfalls durch eine zusätzliche Aktivierung der HDAC2 (histone deacetylase 2) bewirkt werden. Durch HDAC2 Aktivierung werden die Histone an den entsprechenden Stellen der DNA deazetyliert. Eine Azetylierung ist jedoch für die Transkription unbedingt notwendig, da die DNA nur auf diesem Wege von den Histonen getrennt und zur Transkription vorbereitet werden kann (Ito et al. 2006).

Auch posttranskriptionale Effekte sind für Glukokortikoide beschrieben. Durch Destabilisierung der mRNA (messenger RNA) verschiedener Proteine, darunter IL-1 (Interleukin 1), IL-6 (Interleukin 6) und COX2 (Cyclooxygenase 2) kann deren Expression vermindert und die Inflammation gehemmt werden. Die Wirkung wird durch die Beeinflussung verschiedener intrazellulärer Signalwege erreicht. Unter anderem

wird der MAPK/ERK Weg durch die MAPK-Phosphatase und der Raf-MEK-ERK Signalweg durch GILZ Aktivierung gehemmt (Stellato 2004).

Da diese Mechanismen hauptsächlich auf der Interaktion von intrazellulären Rezeptoren mit der DNA beruhen tritt die Wirkung erst nach einigen Stunden oder gar Tagen ein. Letztendlich haben Glukokortikoide auch schnelle Effekte, die bereits nach einigen Minuten einsetzen und z. B. über membranständige Rezeptoren oder direkte Wirkung an der Plasmamembran vermittelt werden. In Tierexperimenten konnten vor allem neurobiologische Effekte und Verhaltensveränderungen auf diese Mechanismen zurückgeführt werden (Losel et al. 2003). Weiterhin scheinen die schnellen Glukokortikoid Wirkungen auch antiinflammatorische Effekte zu betreffen. So kann in Makrophagen die Produktion von Superoxid-Anionen vermindert und generell die Fähigkeit zur Phagozytose eingeschränkt werden (Long et al. 2005).

5.4 Diskussion der Ergebnisse

5.4.1 Sphäroidwachstum und Zugabe der PBMC ohne Therapie

5.4.1.1 Initiationsphase

Zunächst müssen vor Versuchsbeginn aus den Zellen in der Monolayer-Kultur multizelluläre Tumorsphäroide ausgebildet werden. Dieser Zeitraum wird als Initiationsphase bezeichnet und beträgt 14 Tage. In den ersten 7 Tagen bilden die Zellen in mit Agarose beschichteten 96 Well Platten Sphäroide aus. Das Größenwachstum ist in dieser Zeit wenig ausgeprägt, da die Zellen sich zusammenfinden müssen, um einen kompakten Sphäroid zu bilden. Weiterhin ist zu beobachten, dass die Zellzahl zwei Tage und auch vier Tage nach dem Aussäen unter das Ausgangsniveau gefallen ist. Eine mögliche Erklärung ist, dass nicht alle Zellen die Überführung in die 96 Well-Platte überleben, oder dass sich nicht alle Zellen im Sphäroid zusammenfinden und somit ein Teil bei der Zellzählung des disaggregierten Sphäroids nicht erfasst wird.

Am siebten Tag findet der Übergang von der 96 Well-Platte in die Spinnerflasche statt. Die Messungen an Tag 7 (Kap. 4.1.1) zeigen den direkten Vergleich zwischen Sphäroiden aus einer Spinnerflasche und aus den 96 Well Platten. Die Reduktion des

Volumens bei der digitalen Messung an Tag 7 entsteht durch die Formveränderung der Sphäroide zu einer Kugel (in der 96 Well-Platte entspricht die Form eher einem Diskus) und resultiert aus der Messung des Durchmessers mit folgender Umrechnung in das Volumen.

Nach der Überführung in die große Spinnerflasche steigen Volumen und Zellzahl der MCTS schneller an als in der 96 Well-Platte. Dies lässt sich auf die verbesserte Versorgungssituation zurückführen, da die Sphäroide nun von allen Seiten von Medium umgeben sind. Weiterhin steht weit mehr Nährmedium zur Verfügung als in der 96 Well-Platte. Ebenfalls haben sich in den ersten Tagen bereits die nötigen Zell-Zell Kontakte ausgebildet um die Stabilität des Sphäroids zu gewährleisten. Die Zellen haben im weiteren Verlauf dementsprechend mehr Zeit zur Proliferation.

Am Ende der Initiationsphase sind die MCTS stabil und groß genug um den potenten Therapeutika lange genug zu widerstehen, damit im Verlauf des Versuchs Untersuchungen zur Klonogenität und Vitalität möglich sind. Weiterhin haben die Sphäroide auch unter Therapie nach 5 Tagen noch eine ausreichende Größe um immunhistologische Färbungen anfertigen zu können. Problematisch ist allerdings, dass die Sphäroide nach einer Initiationszeit von 14 Tagen während der Versuchsdauer von etwa 10 Tagen eine Größe bzw. einen Zeitpunkt erreichen, an dem auch unbehandelt keine weitere Volumenzunahme mehr stattfindet. Aus diesem Grund wurde für die Versuche mit ertumaxomab die Initiationszeit auf insgesamt 8 Tage verkürzt, um die Wirkung der Therapeutika besser beurteilen zu können, da die Kontrollansätze über den gesamten Versuchszeitraum eine Volumenzunahme erfahren.

5.4.1.2 Versuchsphase

Jede Versuchsanordnung beinhaltet zwei Referenzansätze. In einem Ansatz werden parallel zur Therapie Sphäroide ohne Zusatz von Therapeutika kultiviert. Weiterhin gibt es einen Ansatz, welcher zusätzlich zu den Sphäroiden PBMC enthält, jedoch ebenfalls frei von Medikamenten bleibt. Die Referenzansätze sind zwingend notwendig, da sich die Sphäroidgrößen zwischen zwei Versuchen bereits zu Beginn stark unterscheiden. Dies gilt gleichermaßen für das Wachstum der unbehandelten Sphäroide, weshalb die Ansätze stets nur innerhalb eines Versuchs verglichen werden sollten. Durch verschiedene Passagen der Zellen in jeweils anderen Versuchen und

durch die aufwändige Behandlung der Zellen, um die Monolayerkultur in eine Spinnerkultur zu überführen, ist es leider nicht möglich, eine absolut gleiche Behandlung über den kompletten Zeitraum aller Versuche zu gewährleisten. Es ist zu beobachten, dass die FaDu-Sphäroide unbehandelt bis zu einer kritischen Größe anwachsen, bei der die Volumenzunahme stagniert. Dieses Volumen liegt bei ca. 0,4-0,5 mm³, dabei nimmt vor allem gegen Ende die zentrale Nekrose an Größe zu (siehe Kap 4.4). Dies trifft nur auf eine Initiationszeit von 8 Tagen zu, im ersten Versuch mit einer Initiationszeit von 14 Tagen sind die Sphäroide deutlich kleiner, was an der Tatsache liegen kann, dass es sich um eine andere Zellcharge handelt. Die E593 Zelllinie hingegen bildet bezogen auf das maximale Volumen etwas kleinere Sphäroide aus. Das maximale Volumen liegt hier bei ca. 0,3-0,35 mm³. Auch stagniert ab dieser Größe die Volumenzunahme oder das Volumen nimmt sogar wieder ab. Eine mögliche Erklärung ist der Verbrauch des Nährmediums im Laufe des Versuchs, da in diesem Zeitraum weder Medium erneuert noch hinzugefügt wird. Besonders deutlich ist der Effekt in Kap 4.4 zu sehen, bei dem Ansatz mit hinzugefügten PBMC. Diese verbrauchen zusätzlich Nährstoffe und der Volumenabfall der Sphäroide nach Tag 7 ist dort am deutlichsten zu beobachten.

Die Zugabe von Leukozyten ohne weitere Stimulation durch Antikörper führt nicht zu einer Reduktion der Sphäroidvolumina. Weiterhin ist in den immunhistologischen Untersuchungen keine Infiltration von PBMC in das Sphäroid zu beobachten. Ohne Applikation der Therapeutika besitzen die PBMC keine messbare antitumorale Wirkung. In einigen Versuchen nahmen die MCTS durch Zugabe von PBMC sogar stärker an Größe zu als der jeweilige Kontrollansatz. Eine mögliche Erklärung ist die Transaktivierung von HER2 durch TNF- α . Am ersten Tag des Versuchs konnten in den Ansätzen mit PBMC ohne Zugabe von Glukokortikoiden signifikante TNF- α -Konzentrationen nachgewiesen werden. Bei der FaDu-Zelllinie scheint der Effekt dabei deutlicher zu sein (in allen Versuchen zu beobachten) als bei den E593 Sphäroiden. Vermutlich lässt sich hier aufgrund der Überexpression von HER2 der sich anschließende Signalweg nicht weiter durch TNF- α stimulieren.

Schließlich wurde in einem Versuch der Einfluss von geringen Mengen Ethanol auf das Sphäroidwachstum untersucht (Kap. **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Dies war nötig, da reines Prednisolon für die Versuche verwendet wurde, welches nur sehr schlecht wasserlöslich ist. Als Lösungsvermittler wurde

Ethanol verwendet, welches in den geringen Gesamtkonzentrationen in den Versuchsansätzen keinen Einfluss auf das Sphäroidwachstum hatte.

5.4.2 Therapie der FaDu-Sphäroide mit catumaxomab und Dexamethason

5.4.2.1 catumaxomab

Durch die Zugabe von catumaxomab, welches das EpCAM Antigen auf den FaDu-Zellen bindet, werden die im Ansatz vorhandenen PBMC aktiviert. Die daraufhin folgende Inflamationsreaktion ist bereits einen Tag nach Versuchsbeginn anhand der Zytokinsekretion deutlich zu beobachten. Die IL-6 und IFN- γ Konzentrationen steigen massiv an im Vergleich zu den Kontrollen, die Zugabe von PBMC alleine bewirkt eine deutlich geringere Ausschüttung der Zytokine. Weiterhin ist zu sehen, dass die FaDu-Zellen an sich bereits in der Lage sind geringe Mengen an Zytokinen zu sezernieren, darunter auch IL-6 und IFN- γ . Bis zum fünften Versuchstag führt die Behandlung mit catumaxomab zu einer Steigerung der Sekretion von IL-6 auf etwa das 10fache des Ausgangswertes, bei IFN- γ auf etwa den 5fachen Ausgangswert. Die IL-6 Konzentrationen bleiben bis zum Ende des Versuchs auf diesem Niveau, wohingegen die IFN- γ Konzentrationen an Tag 10 wieder fast vollständig rückläufig sind. Die Sekretion von IFN- γ scheint mit der Anzahl an verbleibenden Tumorzellen zurückzugehen, bis an Tag 10 weder vitale Tumorzellen noch IFN- γ Level im Ansatz vorhanden sind.

Der Effekt von catumaxomab auf das Sphäroidwachstum lässt sich nach 3 Tagen beobachten. Ab diesem Tag nimmt das Sphäroidvolumen rapide ab, bis zur vollständigen Auflösung an Tag 9. Die Wirkung von catumaxomab auf FaDu-Sphäroide ist dabei deutlich ausgeprägter als die Wirkung von ertumaxomab, welches sich gegen das HER2 Antigen richtet (catumaxomab wirkt etwa 4mal so stark). Diese Beobachtung lässt sich durch die Überexpression von EpCAM auf den FaDu Zellen erklären. HER2 hingegen wird nicht überexprimiert. Doch auch bei den mit HER2 transfizierten FaDu E593, die das Molekül in der Folge überexprimieren, wirkt ertumaxomab bei gleicher Konzentration nur etwa halb so stark wie catumaxomab. Schließlich lässt sich die Wirkung von catumaxomab noch an den Zellvitalitäts- und -klonogenitätsuntersuchungen veranschaulichen. Am ersten Tag sind die Zellen

in allen Ansätzen auf gleichem Niveau bezüglich Klonogenität und Vitalität. Nach Wirkeintritt an Tag 3 fand die nächste Untersuchung an Tag 5 des Versuchs statt. Hier ist eine deutliche Reduktion der Vitalität und Klonogenität durch die Behandlung mit catumaxomab zu sehen. Die Untersuchungen wurden an disaggregierten Sphäroiden durchgeführt. Dabei kann ausgeschlossen werden, dass sich die Tumorzellen aus dem Sphäroid gelöst haben und als Einzelzellen im Medium verbleiben, da Klonogenitätstests der Medienüberstände keine teilungsfähigen Zellen hervorbrachten (hier nicht gezeigt).

5.4.2.2 Dexamethason

Glukokortikoide werden im klinischen Alltag bei vielen Krankheitsbildern zur Immunsuppression eingesetzt. Durch die Behandlung mit Antikörpern, die gegen Tumorantigene gerichtet sind, leiden alle Patienten unter Nebenwirkungen. Diese sind bedingt durch die massive Zytokinausschüttung (cytokine storm) der PBMC im Laufe der Behandlung. Der massive Zytokinanstieg spiegelt die Aktivierung der Leukozyten wider und ist somit für den Therapieerfolg erforderlich. Werden die Nebenwirkungen allerdings zu schwerwiegend muss die Therapie abgebrochen werden (Burges et al. 2007). Mit Hilfe der Glukokortikoide soll ein Zustand erreicht werden, in dem bestenfalls die Antikörperwirkung vollständig erhalten bleibt und die Nebenwirkungen auf ein Minimum reduziert werden. Auf jeden Fall müssen die Nebenwirkungen soweit reduziert werden, dass die Behandlung nicht vorzeitig beendet werden muss.

In Kombination mit catumaxomab wird Dexamethason eingesetzt. Die Wirkstärke der Glukokortikoide wird in Bezug auf Hydrocortison (auch endogenes Cortisol genannt) angegeben, welche auf den Wert 1 festgelegt wurde. Dexamethason besitzt eine Potenz von 25, es wird also eine rund 25mal kleinere Dosis als bei Hydrocortison benötigt, um gleiche Effekte zu erzielen. Die in diesem Fall entscheidende antiinflammatorische Potenz ist sogar 30 mal höher (Zoorob et al. 1998). Da Dexamethason sehr schlecht wasserlöslich ist, wurde bei den Versuchen Fortecortin® (Dexamethason-21-dihydrogenphosphat, Dinatriumsalz) eingesetzt, welches gut wasserlöslich ist und als Wirkstoff Dexamethason enthält. Auch wenn es sich dabei formal um eine Prodrug handelt ist in den Versuchen zu sehen, dass der Wirkstoff freigesetzt wird und zu seinem Ziel gelangen kann.

Die verwendeten Konzentrationen von 0,1 µg/ml und 1 µg/ml liegen im Bereich der Dosen bei der klinischen Anwendung. Die kleinste klinisch applizierte Dosis von 4 mg entspricht nach Extrapolation bezogen auf die Daten von Czok und Kollegen (Czock et al. 2005) einer maximalen Plasmakonzentration von 0,042 µg/ml. Bei der Behandlung mit catumaxomab werden als Prämedikation Dosen von 10 mg resp. 40 mg Dexamethason verabreicht (Sebastian et al. 2007). Dies entspricht nach Extrapolation aus den Daten von Czock et al. maximalen Plasmakonzentrationen von 0,1 µg/ml resp. 0,42 µg/ml. Eine Plasmakonzentration von 1 µg/ml würde bei einer Applikation von 100 mg Fortecortin erreicht werden, einer Dosis, die z. B. zur Behandlung eines anaphylaktischen Schocks oder eines MS-Schubs (Multiple Sklerose) eingesetzt wird.

In den durchgeführten Versuchen war eine Hemmung des Sphäroidwachstums durch Dexamethason alleine zu beobachten. Im Vergleich zu den Kontrollen nahmen die behandelten Sphäroide nicht an Volumen zu, der Effekt tritt bereits bei der kleinsten verwendeten Konzentration des Glukokortikoids auf. Die Ursache liegt wahrscheinlich in der Hemmung der EpCAM und HER2 Signalwege, welche für das unkontrollierte Wachstum der Sphäroide verantwortlich sind. Die XTT-Tests an Tag 5 zeigen ebenfalls eine reduzierte Vitalität der mit Dexamethason behandelten Sphäroide. Es ist eine Dosisabhängigkeit zu erkennen, die intrazellulären Signalwege, die für Proliferation und Vitalität von Bedeutung sind, werden scheinbar bei höheren Dosen stärker beeinträchtigt. Auch die Plattierungseffizienz ist deutlich reduziert. Hier ist der antiproliferative Effekt deutlicher zu sehen als in den Wachstumskurven.

5.4.2.3 catumaxomab in Kombination mit Dexamethason

Durch die Komedikation mit Dexamethason wird die Wirkung von catumaxomab teilweise aufgehoben. Das Sphäroidvolumen wird zwar reduziert, doch es findet keine Abtötung der Tumorzellen statt wie in der catumaxomab Monotherapie. Dies ist bereits bei der kleinsten verwendeten Dexamethason Dosis zu beobachten. Anhand der Zytokinmessungen lässt sich eine dosisabhängige Reduktion der Expression von IL-6 und IFN-γ erkennen, die am deutlichsten am ersten Tag des Versuchs zu sehen ist. Dabei fällt auf, dass die FaDu-Zelllinie ebenfalls Zytokine freisetzt. Im weiteren Verlauf zeigt sich der massive Zytokinsturm, der durch die Applikation von catumaxomab ausgelöst wird, vor allem der Anstieg von IL-6 und IFN- γ ist beträchtlich.

Dexamethason reduziert in der Folge somit wahrscheinlich deutlich die Nebenwirkungen der Patienten, jedoch auch in nicht unerheblichem Maße die Effektivität von catumaxomab, da der Antikörper hauptsächlich über die Immunstimulation und weniger über die Blockade intrazellulärer Signalwege wirkt (wie z. B. Trastuzumab). Bei zusätzlicher Betrachtung der Vitalitäts- und Klonogenitätstests wird deutlich, dass die kombinierte Therapie zu einer deutlichen Reduzierung der Zellvitalität und -klonogenität führt, welche anhand der Wachstumskurve nicht zu sehen war.

Insgesamt wird die Tumorprogression sowohl durch catumaxomab als auch durch Dexamethason herabgesetzt, dennoch sollte bei der Therapie eine möglichst kleine Dosis Dexamethason verwendet werden um die Tumorreduktion durch catumaxomab nicht zu stark zu beeinträchtigen.

5.4.3 Therapie der FaDu- und E593-Sphäroide mit ertumaxomab und Prednisolon

5.4.3.1 ertumaxomab

Durch die Zugabe von ertumaxomab können die PBMC spezifisch an das HER2 Antigen binden. In der Folge werden die PBMC aktiviert und es wird eine gezielte Abtötung der HER2 positiven Tumorzellen erreicht. Der Wirkmechanismus entspricht dem von catumaxomab (anti-EpCAM statt anti-HER2), doch wird zum Erreichen gleicher Effekte bei der FaDu-Zelllinie etwa die 4fache Dosis an ertumaxomab benötigt (die FaDu-Zelllinie überexprimiert EpCAM, jedoch nicht HER2). Bei der zusätzlich mit HER2 transfizierten FaDu E593-Zelllinie wird im Vergleich zu catumaxomab die doppelte Dosis ertumaxomab benötigt um ähnliche Effekte zu erzielen. Der Dosisescalationsversuch zeigte eine dosisabhängige Reduktion der Sphäroidvolumina, bei den beiden höchsten Dosen waren die MCTS bei Versuchsende vollständig lysiert. Zusätzlich zur Dosis spielt also auch die Expression des Zielantigens eine Rolle bei der Wirkstärke von ertumaxomab. Durch Überexpression von HER2 wurde im vorliegenden Fall nur etwa die halbe Dosis an Antikörper benötigt, um ähnliche Effekte zu erzielen. Dass der antitumorale Effekt von ertumaxomab vor allem auf der zielgerichteten Aktivierung von PMBC beruht wird in den immunhistologischen Untersuchungen deutlich. Die CD45 Färbungen zeigen eine

massive Einwanderung von Leukozyten in das Sphäroid. Weiterhin ist bei der Ki67-Proliferationsfärbung eine Reduktion der teilungsaktiven Zellen im Vergleich zu den Kontrollansätzen zu sehen. In der HER2 Färbung zeigt sich qualitativ eine höhere Expression bei der E593-Zelllinie im Vergleich zum FaDu-Wildtyp. Schließlich ist in der HE-Färbung zu beobachten, dass durch die Therapie mit ertumaxomab eine strukturelle Veränderung der Sphäroide stattfindet, da unter anderem an Tag 5 des Versuchs das Sphäroid nicht nur deutlich an Volumen verloren hat, sondern auch die charakteristische zentrale Nekrose verschwunden ist.

5.4.3.2 Prednisolon

Prednisolon gehört wie Dexamethason zur Gruppe der synthetischen Glukokortikoide. Die Wirkstärke beträgt etwa 4, das heißt im Vergleich zu Hydrocortison wird um gleiche Effekte zu erzielen nur ein Viertel der Dosis benötigt. Weiterhin kam Prednisolon als Reinsubstanz zum Einsatz, welche sehr schlecht wasserlöslich ist. Aus diesem Grund wurden geringe Mengen Ethanol als Lösungsvermittler eingesetzt. In einem Kontrollansatz konnte ausgeschlossen werden, dass der Alkohol Einfluss auf das Zellwachstum nimmt.

Die Behandlung mit Prednisolon alleine führt bereits zu einer Wachstumshemmung der Sphäroide. Dieser Effekt beruht sehr wahrscheinlich auf der Hemmung des intrazellulären HER2-Signalweges, vor allem durch den induzierten Abbau der MAPK durch Aktivierung der MAPK-Phosphatase (siehe Kap. 5.3.3). Der Effekt ist bei FaDu-Sphäroiden deutlich ausgeprägt. Es findet bereits bei der kleinsten Prednisolon Dosis keine Volumenzunahme über den Versuchszeitraum mehr statt. Bei den E593 Sphäroiden, die sich vom FaDu Wildtyp lediglich durch erhöhte HER2 Level unterscheiden, ist der Effekt deutlich geringer. Die Volumenzunahme der Sphäroide ist lediglich vermindert. In einem der Versuche waren die Volumina zum Ende des Versuchs sogar wieder auf dem Niveau des Kontrollansatzes (siehe Abbildung 25). Durch Überexpression des HER2-Antigens scheint also der intrazelluläre Signalweg stärker aktiviert zu sein, wodurch der hemmende Effekt der Glukokortikoide abgeschwächt wird. Die Prednisolon Dosis spielt dabei offenbar nur eine untergeordnete Rolle, die Hemmung wird nicht stärker.

Die immunhistologische Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki67 bestätigt zumindest qualitativ die verminderte Anzahl an teilungsaktiven Zellen, mit gesteigerter Dosis scheint der Effekt etwas größer zu sein (siehe Abbildung 23). Vor allem im Vergleich mit den E593-Sphäroiden ist zu beobachten, dass gesteigerte HER2-Expression zu mehr proliferativen Zellen unter der Prednisolontherapie führt (siehe Abbildung 33).

Der Monolayer Versuch, in welchem mit einem Dosierungsspektrum von 0,1 µg/ml bis 9,6 µg/ml Prednisolon behandelt wurde, zeigt selbst bei der höchsten Glukokortikoid-Dosis keinen Einfluss auf die Zellvitalität. Dies könnte auf die Monolayerkultur zurückzuführen sein, da sich die Versorgungssituation und die Umgebung der Zellen, wie auch die Expression bestimmter Proteine deutlich von der Spinnerkultur unterscheiden. Bei der Plattenepithelkarzinomzelllinie A431 konnte bereits gezeigt werden, dass die Stimulation mit EGF (epidermal growth factor) im Monolayer keine Wachstumssteigerung bewirkt, bei Tumorsphäroiden der gleichen Zelllinie allerdings schon (Mansbridge et al. 1992). Somit ist es naheliegend, dass die Hemmung des HER2 Signalweges durch Prednisolon, wodurch eine Verlangsamung der Proliferation entstehen würde, ebenfalls nur im 3D-Sphäroid Modell funktioniert und Monolayerzellen diesem Effekt nicht unterliegen.

5.4.3.3 ertumaxomab in Kombination mit Prednisolon

Anhand der deutlichen Inhibition von catumaxomab durch bereits geringe Dosen Dexamethason musste zunächst für die Kombination von ertumaxomab mit Prednisolon ein geeignetes Dosis-Spektrum gefunden werden. In der klinischen Therapie wird eine Dosis von 25 mg appliziert. Basierend auf den daraus resultierenden Plasmakonzentrationen von etwa 11-13 ng/ml pro mg appliziertem Prednisolon ergibt sich durch Extrapolation ein Konzentrationsbereich von 275-325 ng/ml (Wilson et al. 1975). In einem Versuch zur Dosisfindung (siehe Kap. **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) konnte festgestellt werden, dass eine Steigerung der Glukokortikoidkonzentration über etwa 1 µg/ml keinen verstärkenden Einfluss mehr hat. Der in den Versuchen verwendete Konzentrationsbereich beginnt aus diesem Grund bei 0,1 µg/ml und endet bei einer Maximaldosis von 1,2 µg/ml Prednisolon.

Die Wirkung von ertumaxomab auf die FaDu-Sphäroide wird durch die kleinste Prednisolon-Dosis nur wenig beeinflusst. Dennoch sind bereits die inhibierenden Effekte des Glukokortikoids auf das Tumorwachstum zu beobachten, da die Sphäroide im Vergleich zur Monotherapie mit ertumaxomab bereits ab Versuchsbeginn keine Volumenzunahme erfahren. Der Wirkeintritt von ertumaxomab wird durch Prednisolon um einige Tage verzögert, jedoch nicht aufgehoben. Bei höheren Dosen wird die ertumaxomab Effektivität stärker beeinträchtigt, jedoch führt die weitere Erhöhung der Prednisolon-Dosis nicht zu einer Verstärkung des Effekts.

In den immunhistologischen Färbungen ist eine reduzierte Einwanderung CD45-positiver Zellen in die Sphäroide im Vergleich zur Monotherapie zu beobachten. Passend zur verminderten Volumenreduktion zeigt sich hier die verminderte Aktivität der Leukozyten bedingt durch die Applikation des Glukokortikoids. Verglichen mit den Sphäroiden, denen lediglich PBMC ohne weitere Therapeutika zugesetzt wurden, zeigt sich allerdings eine deutlich stärkere Einwanderung von Leukozyten, die antitumorale Wirkung von ertumaxomab wird nur zum Teil aufgehoben. In der Ki67-Proliferationsfärbung werden die kombinierten Effekte von ertumaxomab und Prednisolon deutlich. Bei steigender Glukokortikoiddosis sind qualitativ weniger proliferative Zellen im vitalen Randsaum der Sphäroide zu finden als bei der kleinsten Dosis. Trotz Hemmung der immunologischen Wirkung von ertumaxomab durch Prednisolon proliferieren die Tumorzellen also weniger als bei geringen Glukokortikoiddosen. Bezogen auf die unbehandelten bzw. lediglich mit PBMC behandelten Ansätze ist der antiproliferative Effekt sogar noch deutlicher sichtbar.

Die Therapie der HER2 überexprimierenden FaDu E593-Tumorsphäroide mit ertumaxomab und Prednisolon zeigt die bereits erwähnten kombinierten Effekte noch ausgeprägter. Zunächst fällt die Wachstumshemmung der Sphäroide durch Prednisolon auf, da bereits ab Versuchsbeginn die Volumenprogression hinter den Kontrollansätzen und auch hinter dem mit ertumaxomab monotherapierten Ansatz zurückbleibt. Ab dem fünften Versuchstag setzt die durch die Glukokortikoide verzögerte Wirkung von ertumaxomab ein (bei Monotherapie tritt die Wirkung bereits nach 2-3 Tagen ein). Das Volumen der Sphäroide nimmt bis zum Versuchsende stetig ab. Der Effekt des Antikörpers wird um ungefähr 50% vermindert. Da zum Zeitpunkt des Versuchsendes die Sphäroide unter Kombinationstherapie nicht vollständig lysiert waren ist ebenso eine zeitliche Verzögerung anstatt Aufhebung der Wirkung denkbar. Die immunhistologischen Färbungen zeigen wie bei den FaDu-Sphäroiden eine

verminderte Einwanderung von Leukozyten in die Sphäroide durch Zugabe von Prednisolon. Weiterhin vermindert das Glukokortikoid die Proliferation der Zellen. Schließlich zeigt die HER2-Färbung die deutlich höheren HER2-Expressionslevel der E593-Zelllinie. Durch die gesteigerte Präsenz des Antigens wird einerseits die antiproliferative Wirkung von Prednisolon beeinträchtigt, andererseits aber die Stimulation der PBMC durch ertumaxomab deutlich gesteigert, obwohl nur die halbe Dosis des Antikörpers verglichen mit der Therapie der FaDu Wildtyp Sphäroide verwendet wurde. Insgesamt ist also bei hohem HER2 Niveau die Kombinationstherapie deutlich wirksamer und weniger durch die Glukokortikoiddosis beeinträchtigt. Daraus resultierend kann zur Behandlung der Nebenwirkungen also großzügiger Prednisolon appliziert oder eventuell alternativ die Antikörperdosis reduziert werden, ohne den Therapieerfolg zu gefährden.

5.4.4 Ausblick

In der aktuellen Krebstherapie sind monoklonale Antikörper bereits seit einiger Zeit ein fester Bestandteil. Um eine bessere und gezieltere Wirkung zu erzielen wurden die Antikörper weiterentwickelt und es entstanden unter anderem die hier verwendeten trifunktionalen Antikörper oder z.B. Antikörperkonjugate (Lordick et al. 2023). Die Grundlagenforschung ist ein wichtiger Bestandteil vor jeder möglichen Zulassung eines Medikamentes. Hier kann insbesondere das Modell der multizellulären Tumorsphäroide wichtige Informationen zu Wirkung und ggf. auch unerwünschten Wirkungen der Medikamente geben.

Hinsichtlich der hier durchgeführten Experimente erfolgte die Applikation der Antikörper sowie der Komedikation jeweils vollständig zu Beginn der Durchführung. In der klinischen Praxis wird eine Kortikoidtherapie jedoch auch häufig fraktioniert über mehrere Tage oder gar Wochen verabreicht. Der Einfluss auf die Wirksamkeit der trifunktionalen Antikörper im Verlauf könnte in weiteren Experimenten untersucht werden, auch mögliche unerwünschte Wirkungen, welche durch den Zytokinsturm ausgelöst werden.

Durch die Flexibilität und vergleichsweise einfache Durchführung (durch z.B. weitere Standardisierung der Methode) des MCTS Modells können auch andere Komedikationen, welche klassischerweise verabreicht werden (z.B. Paracetamol) untersucht werden.

Insgesamt bieten sich somit viele Möglichkeiten bereits vor der klinischen Phase und sogar vor der tierexperimentellen Phase wichtige Informationen mit guter Übertragbarkeit zu erhalten.

6 Zusammenfassung

Monoklonale Antikörper werden bereits seit einiger Zeit erfolgreich in der Krebstherapie eingesetzt. Durch ihre Spezifität für bestimmte Antigene, welche in der Regel TAA (tumor assoziierte Antigene) sind, können sie mit den klassischen Therapien kombiniert werden, wirken dabei synergistisch durch Rezeptorblockaden und Immunstimulation. Zwei vor allem immunstimulatorisch wirkende Antikörper sind catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) und ertumaxomab (anti-Her2/neu x anti-CD3). Diese werden als bispezifische, trifunktionale Antikörper bezeichnet, da sie im Gegensatz zu klassischen Antikörpern zwei unterschiedliche Antigenbindungsstellen besitzen. Dadurch können zusätzlich zum Antigen und dem FcγRI/IIa/III Rezeptor, welcher auf akzessorischen Immunzellen zu finden ist, CD3-positive Zellen gebunden werden. In der Folge kann ein postulierter, theoretischer Trizellkomplex aus allen 3 Zelltypen entstehen, wodurch die Immunantwort durch Interaktion zwischen T-Zellen und akzessorischen Zellen entscheidend verstärkt wird.

Dies führt allerdings auch zu den typischen Nebenwirkungen, welche durch die massive Zytokinausschüttung bedingt sind (Cytokine release syndrome, Cytokine storm). Die Therapie erfolgt vor allem mit Glukokortikoiden, welche bereits seit langer Zeit als potente Immunsuppressiva eingesetzt werden.

Mit Hilfe eines dreidimensionalen Zellkultur-Testsystems, den multizellulären Tumorsphäroiden (MCTS), sollten die kombinierten Wirkungen von Antikörpern, PBMC (peripheral blood mononuclear cell) und Glukokortikoiden auf Tumorzellen untersucht werden, um die Wirkungen auf zellulärer Ebene besser zu verstehen und um für spätere Versuche einen Anhaltspunkt über die optimale Glukokortikoiddosis zu erhalten.

In den Untersuchungen wurden zwei Zelllinien verwendet. Die FaDu-Zelllinie stammt aus einem Plattenepithelkarzinom, ist stark positiv für EpCAM und schwach positiv für HER2/neu. Als zweite Zelllinie wurde FaDu E593 eingesetzt, welche stabil mit HER2/neu transfiziert wurde und somit stark positiv für beide Antigene ist.

Als Endpunkte zur Bestimmung der Therapieeffizienz dienten die Volumenprogression der Sphäroide, sowie die Zellvitalität und -klonogenität. Mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen wurde qualitativ die Proliferation, die Invasion von Leukozyten in die Sphäroide und die Ausprägung des Zielantigens bestimmt. Nebenwirkungen und Aktivität der Abwehrzellen wurden durch Zytokinbestimmung aus Medienüberständen beurteilt.

Unter der Antikörpertherapie zeigte sich eine zeit- und dosisabhängige Volumenreduktion der Sphäroide, die Ausprägung des Zielantigens spielte hier ebenfalls eine Rolle. Bei höheren HER2/neu Leveln führte die halbe Dosis zur gleichen Wirkung. Proliferation und Zellvitalität nahmen durch die Antikörpertherapie gleichermaßen ab, die Invasion von PBMC in die Sphäroide nahm deutlich zu.

Durch Zugabe von Dexamethason wird die Wirkung von catumaxomab teilweise aufgehoben, vor allem die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine wird dosisabhängig reduziert, was die Vermutung nahelegt, dass Nebenwirkungen beim Einsatz in situ ebenfalls reduziert würden.

Die Zugabe von Dexamethason alleine hat bereits einen hemmenden Einfluss auf die Volumenzunahme der Sphäroide sowie auf die Zellvitalität und -klonogenität. Gleiches gilt für Prednisolon. Die Wirkung nimmt allerdings bei steigenden HER2/neu Expressionslevel ab. In einem Versuch mit Monolayerzellen der gleichen Linie unter Therapie mit Prednisolon konnte keine Wachstumshemmung beobachtet werden.

Die Wirkung von ertumaxomab wird durch die Zugabe von Prednisolon ab einer bestimmten Dosis vermindert, bei kleineren Dosen kann man besser von einer zeitlichen Verzögerung sprechen. Leukozyteninfiltration und Volumenabnahme der Sphäroide sind ebenfalls reduziert bzw. verzögert.

Bei der Therapie von zytokinassoziierten Nebenwirkungen sollte also sowohl die Wahl des Glukokortikoids, wie auch die Dosis berücksichtigt werden um einerseits die Therapie durch Reduzierung der Nebenwirkungen verträglicher zu machen, andererseits aber auch die Wirkung der antitumoralen Therapie nicht zu stark abzuschwächen.

7 Literaturverzeichnis

Abolhassani, H., Y. Wang, L. Hammarstrom and Q. Pan-Hammarstrom (2021). "Hallmarks of Cancers: Primary Antibody Deficiency Versus Other Inborn Errors of Immunity." *Front Immunol* 12: 720025.

Adams, J. M.; Cory, S. (2007): The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9): 1324-1337

Atkins, M. B.; Regan, M.; McDermott, D. (2004): Update on the role of interleukin 2 and other cytokines in the treatment of patients with stage IV renal carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 10(18 Pt 2): 6342S-6346S

Auphan, N.; DiDonato, J. A.; Rosette, C.; Helmberg, A.; Karin, M. (1995): Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science*, 270(5234): 286-290

Ayrolidi, E.; Riccardi, C. (2009): Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *FASEB J.*, 23(11): 3649-3658

Ayrolidi, E.; Zollo, O.; Bastianelli, A.; Marchetti, C.; Agostini, M.; Di, V. R.; Riccardi, C. (2007): GILZ mediates the antiproliferative activity of glucocorticoids by negative regulation of Ras signaling. *J. Clin. Invest.*, 117(6): 1605-1615

Ayrolidi, E.; Zollo, O.; Macchiarulo, A.; Di, M. B.; Marchetti, C.; Riccardi, C. (2002): Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1. *Mol. Cell Biol.*, 22(22): 7929-7941

Bagshawe, K. D. (2006): Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) for cancer. *Expert. Rev. Anticancer Ther.*, 6(10): 1421-1431

Baldo, B. A. (2013): Adverse events to monoclonal antibodies used for cancer therapy: Focus on hypersensitivity responses. *Oncoimmunology.*, 2(10): e26333

Balkwill, F.; Charles, K. A.; Mantovani, A. (2005): Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*, 7(3): 211-217

Baselga, J.; Albanell, J.; Molina, M. A.; Arribas, J. (2001): Mechanism of action of trastuzumab and scientific update. *Semin. Oncol.*, 28(5 Suppl 16): 4-11

Baselga, J.; Swain, S. M. (2009): Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat. Rev. Cancer*, 9(7): 463-475

Berdasco, M.; Esteller, M. (2010): Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev. Cell*, 19(5): 698-711

Berx, G.; van, R. F. (2009): Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 1(6): a003129

Blasco, M. A. (2005): Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.*, 6(8): 611-622

Brennan, P. J.; Kumagai, T.; Berezov, A.; Murali, R.; Greene, M. I. (2000): HER2/neu: mechanisms of dimerization/oligomerization. *Oncogene*, 19(53): 6093-6101

Brichard, V.; Van, P. A.; Wolfel, T.; Wolfel, C.; De, P. E.; Lethe, B.; Coulie, P.; Boon, T. (1993): The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.*, 178(2): 489-495

Bundesamt, S. (2022). Todesursachen nach Krankheitsarten 2020. S. Bundesamt. https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html;jsessionid=1C713024E152A5CD54058F9CCDB00BFA.live722#sprg235878, Statistisches Bundesamt.

Burges, A.; Wimberger, P.; Kumper, C.; Gorbounova, V.; Sommer, H.; Schmalfeldt, B.; Pfisterer, J.; Lichinitser, M.; Makhson, A.; Moiseyenko, V.; Lahr, A.; Schulze, E.; Jager, M.; Strohlein, M. A.; Heiss, M. M.; Gottwald, T.; Lindhofer, H.; Kimmig, R. (2007): Effective relief of malignant ascites in patients with advanced ovarian cancer by a trifunctional anti-EpCAM x anti-CD3 antibody: a phase I/II study. *Clin. Cancer Res.*, 13(13): 3899-3905

Burkhardt, D. L.; Sage, J. (2008): Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat. Rev. Cancer*, 8(9): 671-682

Cao, Y. (2009): Tumor angiogenesis and molecular targets for therapy. *Front Biosci.*, 14 3962-3973

Chaves-Perez, A.; Mack, B.; Maetzel, D.; Kremling, H.; Eggert, C.; Harreus, U.; Gires, O. (2012): EpCAM regulates cell cycle progression via control of cyclin D1 expression. *Oncogene*,

Chelius, D.; Ruf, P.; Gruber, P.; Ploscher, M.; Liedtke, R.; Gansberger, E.; Hess, J.; Wasiliu, M.; Lindhofer, H. (2010): Structural and functional characterization of the trifunctional antibody catumaxomab. *MAbs.*, 2(3): 309-319

Chen, Y. T.; Scanlan, M. J.; Sahin, U.; Tureci, O.; Gure, A. O.; Tsang, S.; Williamson, B.; Stockert, E.; Pfreundschuh, M.; Old, L. J. (1997): A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 94(5): 1914-1918

Curto, M.; Cole, B. K.; Lallemand, D.; Liu, C. H.; McClatchey, A. I. (2007): Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin. *J. Cell Biol.*, 177(5): 893-903

Cvetkovic, R. S.; Scott, L. J. (2005): Dexrazoxane : a review of its use for cardioprotection during anthracycline chemotherapy. *Drugs*, 65(7): 1005-1024

Czock, D.; Keller, F.; Rasche, F. M.; Haussler, U. (2005): Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clin. Pharmacokinet.*, 44(1): 61-98

de Haas, M. (2001): IgG-Fc receptors and the clinical relevance of their polymorphisms. *Wien. Klin. Wochenschr.*, 113(20-21): 825-831

Desoize, B.; Gimonet, D.; Jardillier, J. C. (1998): Multicellular resistance: another mechanism for multidrug resistance? *Bull. Cancer*, 85(9): 785

Diermeier-Daucher, S.; Ortmann, O.; Buchholz, S.; Brockhoff, G. (2012): Trifunctional antibody ertumaxomab: Non-immunological effects on Her2 receptor activity and downstream signaling. *MAbs.*, 4(5): 614-622

Disis, M. L.; Wallace, D. R.; Gooley, T. A.; Dang, Y.; Slota, M.; Lu, H.; Coveler, A. L.; Childs, J. S.; Higgins, D. M.; Fintak, P. A.; dela, R. C.; Tietje, K.; Link, J.; Waisman, J.; Salazar, L. G. (2009): Concurrent trastuzumab and HER2/neu-specific vaccination in patients with metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 27(28): 4685-4692

Dostert, A.; Heinzl, T. (2004): Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. *Curr. Pharm. Des.*, 10(23): 2807-2816

Dunn, G. P.; Bruce, A. T.; Sheehan, K. C.; Shankaran, V.; Uppaluri, R.; Bui, J. D.; Diamond, M. S.; Koebel, C. M.; Arthur, C.; White, J. M.; Schreiber, R. D. (2005): A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat. Immunol.*, 6(7): 722-729

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

Efeyan, A.; Serrano, M. (2007): p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle*, 6(9): 1006-1010

Esteller, M. (2008): Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.*, 358(11): 1148-1159

European Medicines Agency (2009): SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS - Removab.

Ferrara, N. (2009): Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 29(6): 789-791

Fink-Retter, A.; Gschwantler-Kaulich, D.; Hudelist, G.; Mueller, R.; Kubista, E.; Czerwenka, K.; Singer, C. F. (2007): Differential spatial expression and activation pattern of EGFR and HER2 in human breast cancer. *Oncol. Rep.*, 18(2): 299-304

Fizman, G. L.; Jasniss, M. A. (2011): Molecular Mechanisms of Trastuzumab Resistance in HER2 Overexpressing Breast Cancer. *Int. J. Breast Cancer*, 2011 352182

Friedl, P.; Wolf, K. (2010): Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J. Cell Biol.*, 188(1): 11-19

Friedrich, J.; Ebner, R.; Kunz-Schughart, L. A. (2007a): Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids--old hat or new challenge? *Int. J. Radiat. Biol.*, 83(11-12): 849-871

Friedrich, J.; Eder, W.; Castaneda, J.; Doss, M.; Huber, E.; Ebner, R.; Kunz-Schughart, L. A. (2007b): A reliable tool to determine cell viability in complex 3-d culture: the acid phosphatase assay. *J. Biomol. Screen.*, 12(7): 925-937

Fuentes, G.; Scaltriti, M.; Baselga, J.; Verma, C. S. (2011): Synergy between trastuzumab and pertuzumab for human epidermal growth factor 2 (Her2) from colocalization: an in silico based mechanism. *Breast Cancer Res.*, 13(3): R54

Gehring, U. (1993): The structure of glucocorticoid receptors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 45(1-3): 183-190

Gires, O.; Kieu, C.; Fix, P.; Schmitt, B.; Munz, M.; Wollenberg, B.; Zeidler, R. (2001): Tumor necrosis factor alpha negatively regulates the expression of the carcinoma-associated antigen epithelial cell adhesion molecule. *Cancer*, 92(3): 620-628

Gnjatic, S.; Nishikawa, H.; Jungbluth, A. A.; Gure, A. O.; Ritter, G.; Jager, E.; Knuth, A.; Chen, Y. T.; Old, L. J. (2006): NY-ESO-1: review of an immunogenic tumor antigen. *Adv. Cancer Res.*, 95 1-30

Groebe, K.; Mueller-Klieser, W. (1996): On the relation between size of necrosis and diameter of tumor spheroids. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 34(2): 395-401

Gunawardana, C. G.; Diamandis, E. P. (2007): High throughput proteomic strategies for identifying tumour-associated antigens. *Cancer Lett.*, 249(1): 110-119

Hanahan, D.; Folkman, J. (1996): Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86(3): 353-364

Hanahan, D.; Weinberg, R. A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5): 646-674

Hanahan, D. (2022). "Hallmarks of Cancer: New Dimensions." *Cancer Discov* **12**(1): 31-46.

Heiss, M. M.; Murawa, P.; Koralewski, P.; Kutarska, E.; Kolesnik, O. O.; Ivanchenko, V. V.; Dudnichenko, A. S.; Aleknaviciene, B.; Razbadauskas, A.; Gore, M.; Ganea-Motan, E.; Ciuleanu, T.; Wimberger, P.; Schmittel, A.; Schmalfeldt, B.; Burges, A.; Bokemeyer, C.; Lindhofer, H.; Lahr, A.; Parsons, S. L. (2010): The trifunctional antibody catumaxomab for the treatment of malignant ascites due to epithelial cancer:

Results of a prospective randomized phase II/III trial. *Int. J. Cancer*, 127(9): 2209-2221

Hirabayashi, T.; Murayama, T.; Shimizu, T. (2004): Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A2. *Biol. Pharm. Bull.*, 27(8): 1168-1173

Hirschhaeuser, F.; Menne, H.; Dittfeld, C.; West, J.; Mueller-Klieser, W.; Kunz-Schughart, L. A. (2010): Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J. Biotechnol.*, 148(1): 3-15

Holtfreter, J. (1944): A study of the mechanics of gastrulation. *J. Exp. Zool.*, 95(2): 171-212

Huang, H. P.; Chen, P. H.; Yu, C. Y.; Chuang, C. Y.; Stone, L.; Hsiao, W. C.; Li, C. L.; Tsai, S. C.; Chen, K. Y.; Chen, H. F.; Ho, H. N.; Kuo, H. C. (2011): Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) complex proteins promote transcription factor-mediated pluripotency reprogramming. *J. Biol. Chem.*, 286(38): 33520-33532

Hugo, H.; Ackland, M. L.; Blick, T.; Lawrence, M. G.; Clements, J. A.; Williams, E. D.; Thompson, E. W. (2007): Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. *J. Cell Physiol*, 213(2): 374-383

Imrich, S.; Hachmeister, M.; Gires, O. (2012): EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells. *Cell Adh. Migr.*, 6(1): 30-38

Inoue, H.; Ohnishi, Y.; Nakajima, M.; Kakudo, K.; Nozaki, M. (2011): A novel function of EpCAM in oral squamous cell carcinoma cells under anchorage-independent conditions. *Int. J. Oncol.*, 39(6): 1401-1405

Ito, K.; Yamamura, S.; Essilfie-Quaye, S.; Cosio, B.; Ito, M.; Barnes, P. J.; Adcock, I. M. (2006): Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kappaB suppression. *J. Exp. Med.*, 203(1): 7-13

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

Jager, M.; Schoberth, A.; Ruf, P.; Hess, J.; Lindhofer, H. (2009): The trifunctional antibody ertumaxomab destroys tumor cells that express low levels of human epidermal growth factor receptor 2. *Cancer Res.*, 69(10): 4270-4276

Ji, H. B.; Gupta, A.; Okamoto, S.; Blum, M. D.; Tan, L.; Goldring, M. B.; Lacy, E.; Roy, A. L.; Terhorst, C. (2002): T cell-specific expression of the murine CD3delta promoter. *J. Biol. Chem.*, 277(49): 47898-47906

Jiang, B. H.; Liu, L. Z. (2009): PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv. Cancer Res.*, 102 19-65

Jimenez, C.; Jones, D. R.; Rodriguez-Viciana, P.; Gonzalez-Garcia, A.; Leonardo, E.; Wennstrom, S.; von, K. C.; Toran, J. L.; Borlado, L.; Calvo, V.; Copin, S. G.; Albar, J. P.; Gaspar, M. L.; Diez, E.; Marcos, M. A.; Downward, J.; Martinez, A.; Merida, I.; Carrera, A. C. (1998): Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *EMBO J.*, 17(3): 743-753

Kassel, O.; Sancono, A.; Kratzschmar, J.; Kreft, B.; Stassen, M.; Cato, A. C. (2001): Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. *EMBO J.*, 20(24): 7108-7116

Kiewe, P.; Hasmmuller, S.; Kahlert, S.; Heinrigs, M.; Rack, B.; Marme, A.; Korfel, A.; Jager, M.; Lindhofer, H.; Sommer, H.; Thiel, E.; Untch, M. (2006): Phase I trial of the trifunctional anti-HER2 x anti-CD3 antibody ertumaxomab in metastatic breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 12(10): 3085-3091

Kim, M. K.; Pan, X. Q.; Huang, Z. Y.; Hunter, S.; Hwang, P. H.; Indik, Z. K.; Schreiber, A. D. (2001): Fc gamma receptors differ in their structural requirements for interaction with the tyrosine kinase Syk in the initial steps of signaling for phagocytosis. *Clin. Immunol.*, 98(1): 125-132

Kim, R.; Emi, M.; Tanabe, K. (2007): Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 121(1): 1-14

Klade, C. S.; Voss, T.; Krystek, E.; Ahorn, H.; Zatloukal, K.; Pummer, K.; Adolf, G. R. (2001): Identification of tumor antigens in renal cell carcinoma by serological proteome analysis. *Proteomics.*, 1(7): 890-898

Klymkowsky, M. W.; Savagner, P. (2009): Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am. J. Pathol.*, 174(5): 1588-1593

- Koeppen, H. K.; Wright, B. D.; Burt, A. D.; Quirke, P.; McNicol, A. M.; Dybdal, N. O.; Sliwowski, M. X.; Hillan, K. J. (2001): Overexpression of HER2/neu in solid tumours: an immunohistochemical survey. *Histopathology*, 38(2): 96-104
- Kohler, G.; Milstein, C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517): 495-497
- Kroemer, G.; Zitvogel, L.; Galluzzi, L. (2013): Victories and deceptions in tumor immunology: Stimuvax. *Oncoimmunology*., 2(1): e23687
- Kunz-Schughart, L. A.; Freyer, J. P.; Hofstaedter, F.; Ebner, R. (2004): The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *J. Biomol. Screen.*, 9(4): 273-285
- Lauritzsen, G. F.; Bogen, B. (1991): Idiotypic-specific, major histocompatibility complex restricted T cells are of both Th1 and Th2 type. *Scand. J. Immunol.*, 33(6): 647-656
- Le, X. F.; Claret, F. X.; Lammayot, A.; Tian, L.; Deshpande, D.; LaPushin, R.; Tari, A. M.; Bast, R. C., Jr. (2003): The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in anti-HER2 antibody-induced G1 cell cycle arrest and tumor growth inhibition. *J. Biol. Chem.*, 278(26): 23441-23450
- Lee, S.; Margolin, K. (2011): Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cancers*, 3(4): 3856-3893
- Lindhofer, H.; Mocikat, R.; Steipe, B.; Thierfelder, S. (1995): Preferential species-restricted heavy/light chain pairing in rat/mouse quadromas. Implications for a single-step purification of bispecific antibodies. *J. Immunol.*, 155(1): 219-225
- Litvinov, S. V.; Velders, M. P.; Bakker, H. A.; Fleuren, G. J.; Warnaar, S. O. (1994): Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J. Cell Biol.*, 125(2): 437-446
- Loch, C. M., A. B. Ramirez, Y. Liu, C. L. Sather, J. J. Delrow, N. Scholler, B. M. Garvik, N. D. Urban, M. W. McIntosh and P. D. Lampe (2007). "Use of high density antibody arrays to validate and discover cancer serum biomarkers." *Mol Oncol* 1(3): 313-320.

Long, F.; Wang, Y. X.; Liu, L.; Zhou, J.; Cui, R. Y.; Jiang, C. L. (2005): Rapid nongenomic inhibitory effects of glucocorticoids on phagocytosis and superoxide anion production by macrophages. *Steroids*, 70(1): 55-61

Lordick, F., M. Merz, E. Buch and A. Aigner (2023). "Antibody-Drug Conjugates as a Targeted Therapeutic Approach Across Entities in Oncology." *Dtsch Arztebl Int*(Forthcoming).

Losel, R. M.; Falkenstein, E.; Feuring, M.; Schultz, A.; Tillmann, H. C.; Rossol-Haseroth, K.; Wehling, M. (2003): Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol Rev.*, 83(3): 965-1016

Lu, Y.; Zi, X.; Pollak, M. (2004): Molecular mechanisms underlying IGF-I-induced attenuation of the growth-inhibitory activity of trastuzumab (Herceptin) on SKBR3 breast cancer cells. *Int. J. Cancer*, 108(3): 334-341

Luiten, R. M.; Kueter, E. W.; Mooi, W.; Gallee, M. P.; Rankin, E. M.; Gerritsen, W. R.; Clift, S. M.; Nooijen, W. J.; Weder, P.; van de Kastele, W. F.; Sein, J.; van den Berk, P. C.; Nieweg, O. E.; Berns, A. M.; Spits, H.; de Gast, G. C. (2005): Immunogenicity, including vitiligo, and feasibility of vaccination with autologous GM-CSF-transduced tumor cells in metastatic melanoma patients. *J. Clin. Oncol.*, 23(35): 8978-8991

Ma, H. L.; Jiang, Q.; Han, S.; Wu, Y.; Cui, T. J.; Wang, D.; Gan, Y.; Zou, G.; Liang, X. J. (2012): Multicellular tumor spheroids as an in vivo-like tumor model for three-dimensional imaging of chemotherapeutic and nano material cellular penetration. *Mol. Imaging*, 11(6): 487-498

MacBeath, G.; Schreiber, S. L. (2000): Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science*, 289(5485): 1760-1763

Maetzel, D.; Denzel, S.; Mack, B.; Canis, M.; Went, P.; Benk, M.; Kieu, C.; Papior, P.; Baeuerle, P. A.; Munz, M.; Gires, O. (2009): Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat. Cell Biol.*, 11(2): 162-171

Mansbridge, J. N.; Knuchel, R.; Knapp, A. M.; Sutherland, R. M. (1992): Importance of tyrosine phosphatases in the effects of cell-cell contact and microenvironments on EGF-stimulated tyrosine phosphorylation. *J. Cell Physiol*, 151(3): 433-442

Marshall, J. L.; Hoyer, R. J.; Toomey, M. A.; Faraguna, K.; Chang, P.; Richmond, E.; Pedicano, J. E.; Gehan, E.; Peck, R. A.; Arlen, P.; Tsang, K. Y.; Schlom, J. (2000): Phase I study in advanced cancer patients of a diversified prime-and-boost vaccination protocol using recombinant vaccinia virus and recombinant nonreplicating avipox virus to elicit anti-carcinoembryonic antigen immune responses. *J. Clin. Oncol.*, 18(23): 3964-3973

Masferrer, J. L.; Reddy, S. T.; Zweifel, B. S.; Seibert, K.; Needleman, P.; Gilbert, R. S.; Herschman, H. R. (1994): In vivo glucocorticoids regulate cyclooxygenase-2 but not cyclooxygenase-1 in peritoneal macrophages. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 270(3): 1340-1344

Minotti, G.; Menna, P.; Salvatorelli, E.; Cairo, G.; Gianni, L. (2004): Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.*, 56(2): 185-229

Mocellin, S.; Pasquali, S.; Rossi, C. R.; Nitti, D. (2010): Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high-risk melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 102(7): 493-501

Molina, M. A.; Saez, R.; Ramsey, E. E.; Garcia-Barchino, M. J.; Rojo, F.; Evans, A. J.; Albanell, J.; Keenan, E. J.; Lluch, A.; Garcia-Conde, J.; Baselga, J.; Clinton, G. M. (2002): NH(2)-terminal truncated HER-2 protein but not full-length receptor is associated with nodal metastasis in human breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 8(2): 347-353

Mori, S.; Jewett, A.; Murakami-Mori, K.; Cavalcanti, M.; Bonavida, B. (1997): The participation of the Fas-mediated cytotoxic pathway by natural killer cells is tumor-cell-dependent. *Cancer Immunol. Immunother.*, 44(5): 282-290

Morita, K.; Miyachi, Y.; Furuse, M. (2011): Tight junctions in epidermis: from barrier to keratinization. *Eur. J. Dermatol.*, 21(1): 12-17

MOSCONA, A. (1957): THE DEVELOPMENT IN VITRO OF CHIMERIC AGGREGATES OF DISSOCIATED EMBRYONIC CHICK AND MOUSE CELLS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 43(1): 184-194

- MOSCONA, A.; MOSCONA, H. (1952): The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. *J. Anat.*, 86(3): 287-301
- Mueller-Klieser, W. (1987): Multicellular spheroids. A review on cellular aggregates in cancer research. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 113(2): 101-122
- Mueller-Klieser, W. (1997): Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *Am. J. Physiol*, 273(4 Pt 1): C1109-C1123
- Mueller-Klieser, W.; Freyer, J. P.; Sutherland, R. M. (1986): Influence of glucose and oxygen supply conditions on the oxygenation of multicellular spheroids. *Br. J. Cancer*, 53(3): 345-353
- Munz, M.; Kieu, C.; Mack, B.; Schmitt, B.; Zeidler, R.; Gires, O. (2004): The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. *Oncogene*, 23(34): 5748-5758
- Nagata, Y.; Lan, K. H.; Zhou, X.; Tan, M.; Esteva, F. J.; Sahin, A. A.; Klos, K. S.; Li, P.; Monia, B. P.; Nguyen, N. T.; Hortobagyi, G. N.; Hung, M. C.; Yu, D. (2004): PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell*, 6(2): 117-127
- Nagy, J. A.; Chang, S. H.; Shih, S. C.; Dvorak, A. M.; Dvorak, H. F. (2010): Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin. Thromb. Hemost.*, 36(3): 321-331
- Nahta, R.; Takahashi, T.; Ueno, N. T.; Hung, M. C.; Esteva, F. J. (2004): P27(kip1) down-regulation is associated with trastuzumab resistance in breast cancer cells. *Cancer Res.*, 64(11): 3981-3986
- National Institutes of Health (2010): Common Terminology Criteria for Adverse Events.
- Newton, R. (2000): Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax*, 55(7): 603-613
- Newton, R.; Holden, N. S. (2007): Separating transrepression and transactivation: a distressing divorce for the glucocorticoid receptor? *Mol. Pharmacol.*, 72(4): 799-809
- Nickoloff, B. J.; Ben-Neriah, Y.; Pikarsky, E. (2005): Inflammation and cancer: is the link as simple as we think? *J. Invest Dermatol.*, 124(6): x-xiv

Olayioye, M. A. (2001): Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res.*, 3(6): 385-389

Olive, P. L.; Durand, R. E. (1994): Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics. *Cancer Metastasis Rev.*, 13(2): 121-138

Ornella, M. S. C., N. Badrinath, K. A. Kim, J. H. Kim, E. Cho, T. H. Hwang and J. J. Kim (2023). "Immunotherapy for Peritoneal Carcinomatosis: Challenges and Prospective Outcomes." *Cancers (Basel)* 15(8).

Ott, M. G.; Marme, F.; Moldenhauer, G.; Lindhofer, H.; Hennig, M.; Spannagl, R.; Essing, M. M.; Linke, R.; Seimetz, D. (2012): Humoral response to catumaxomab correlates with clinical outcome: results of the pivotal phase II/III study in patients with malignant ascites. *Int. J. Cancer*, 130(9): 2195-2203

Park, S.; Lim, Y.; Lee, D.; Cho, B.; Bang, Y. J.; Sung, S.; Kim, H. Y.; Kim, D. K.; Lee, Y. S.; Song, Y.; Jeoung, D. I. (2003): Identification and characterization of a novel cancer/testis antigen gene CAGE-1. *Biochim. Biophys. Acta*, 1625(2): 173-182

Partanen, J. I.; Nieminen, A. I.; Klefstrom, J. (2009): 3D view to tumor suppression: Lkb1, polarity and the arrest of oncogenic c-Myc. *Cell Cycle*, 8(5): 716-724

Paul Ehrlich Institut (2023): Monoklonale Antikörper.

Pegram, M.; Slamon, D. (2000): Biological rationale for HER2/neu (c-erbB2) as a target for monoclonal antibody therapy. *Semin. Oncol.*, 27(5 Suppl 9): 13-19

Perche, F.; Patel, N. R.; Torchilin, V. P. (2012): Accumulation and toxicity of antibody-targeted doxorubicin-loaded PEG-PE micelles in ovarian cancer cell spheroid model. *J. Control Release*, 164(1): 95-102

Price-Schiavi, S. A.; Jepson, S.; Li, P.; Arango, M.; Rudland, P. S.; Yee, L.; Carraway, K. L. (2002): Rat Muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-ErbB2 antibodies to tumor cell surfaces, a potential mechanism for herceptin resistance. *Int. J. Cancer*, 99(6): 783-791

Renner, C.; Held, G.; Ohnesorge, S.; Bauer, S.; Gerlach, K.; Pfitzenmeier, J. P.; Pfreundschuh, M. (1997): Role of perforin, granzymes and the proliferative state of the

target cells in apoptosis and necrosis mediated by bispecific-antibody-activated cytotoxic T cells. *Cancer Immunol. Immunother.*, 44(2): 70-76

Ressing, M. E.; Sette, A.; Brandt, R. M.; Ruppert, J.; Wentworth, P. A.; Hartman, M.; Oseroff, C.; Grey, H. M.; Melief, C. J.; Kast, W. M. (1995): Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides. *J. Immunol.*, 154(11): 5934-5943

Rivas, M. A.; Tkach, M.; Beguelin, W.; Proietti, C. J.; Rosembly, C.; Charreau, E. H.; Elizalde, P. V.; Schillaci, R. (2010): Transactivation of ErbB-2 induced by tumor necrosis factor alpha promotes NF-kappaB activation and breast cancer cell proliferation. *Breast Cancer Res. Treat.*, 122(1): 111-124

Roche Pharma AG (2011): Rote-Hand-Brief zu MabThera® (Rituximab).

Rodday, B.; Hirschhaeuser, F.; Walenta, S.; Mueller-Klieser, W. (2011): Semiautomatic growth analysis of multicellular tumor spheroids. *J. Biomol. Screen.*, 16(9): 1119-1124

Sahin, U.; Tureci, O.; Schmitt, H.; Cochlovius, B.; Johannes, T.; Schmits, R.; Stenner, F.; Luo, G.; Schobert, I.; Pfreundschuh, M. (1995): Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92(25): 11810-11813

Santini, M. T.; Rainaldi, G.; Indovina, P. L. (2000): Apoptosis, cell adhesion and the extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids. *Crit Rev. Oncol. Hematol.*, 36(2-3): 75-87

Sebastian, M.; Kuemmel, A.; Schmidt, M.; Schmitt, A. (2009): Catumaxomab: a bispecific trifunctional antibody. *Drugs Today (Barc.)*, 45(8): 589-597

Sebastian, M.; Passlick, B.; Friccius-Quecke, H.; Jager, M.; Lindhofer, H.; Kannies, F.; Wiewrodt, R.; Thiel, E.; Buhl, R.; Schmitt, A. (2007): Treatment of non-small cell lung cancer patients with the trifunctional monoclonal antibody catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3): a phase I study. *Cancer Immunol. Immunother.*, 56(10): 1637-1644

Seidman, A.; Hudis, C.; Pierri, M. K.; Shak, S.; Paton, V.; Ashby, M.; Murphy, M.; Stewart, S. J.; Keefe, D. (2002): Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. *J. Clin. Oncol.*, 20(5): 1215-1221

Seimetz, D. (2011): Novel monoclonal antibodies for cancer treatment: the trifunctional antibody catumaxomab (removab). *J. Cancer*, 2 309-316

Semenza, G. L. (2010): HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 20(1): 51-56

Senavirathna, L. K.; Fernando, R.; Maples, D.; Zheng, Y.; Polf, J. C.; Ranjan, A. (2013): Tumor Spheroids as an in vitro model for determining the therapeutic response to proton beam radiotherapy and thermally sensitive nanocarriers. *Theranostics.*, 3(9): 687-691

Smyth, M. J.; Thia, K. Y.; Street, S. E.; MacGregor, D.; Godfrey, D. I.; Trapani, J. A. (2000): Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J. Exp. Med.*, 192(5): 755-760

Solinas, G.; Germano, G.; Mantovani, A.; Allavena, P. (2009): Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J. Leukoc. Biol.*, 86(5): 1065-1073

Spencer, K. S.; Graus-Porta, D.; Leng, J.; Hynes, N. E.; Klemke, R. L. (2000): ErbB2 is necessary for induction of carcinoma cell invasion by ErbB family receptor tyrosine kinases. *J. Cell Biol.*, 148(2): 385-397

Spizzo, G.; Fong, D.; Wurm, M.; Ensinger, C.; Obrist, P.; Hofer, C.; Mazzoleni, G.; Gastl, G.; Went, P. (2011): EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. *J. Clin. Pathol.*, 64(5): 415-420

Stellato, C. (2004): Post-transcriptional and nongenomic effects of glucocorticoids. *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 1(3): 255-263

Steroids., A. C. (1997). "Adrenal Cortical Steroids. In *Drug Facts and Comparisons.*" *Facts and Comparisons* 5th ed. St. Louis: 122-128.

- Sutherland, R. M.; Inch, W. R.; McCredie, J. A.; Kruuv, J. (1970): A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model. *Int. J. Radiat. Biol. Relat Stud. Phys. Chem. Med.*, 18(5): 491-495
- Turke, A. B.; Song, Y.; Costa, C.; Cook, R.; Arteaga, C. L.; Asara, J. M.; Engelman, J. A. (2012): MEK inhibition leads to PI3K/AKT activation by relieving a negative feedback on ERBB receptors. *Cancer Res.*, 72(13): 3228-3237
- Valabrega, G.; Montemurro, F.; Aglietta, M. (2007): Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann. Oncol.*, 18(6): 977-984
- van Hasselt, J. G.; Boekhout, A. H.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H.; Huitema, A. D. (2011): Population pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of trastuzumab-associated cardiotoxicity. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 90(1): 126-132
- Vander Heiden, M. G.; Cantley, L. C.; Thompson, C. B. (2009): Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930): 1029-1033
- Vijapurkar, U.; Kim, M. S.; Koland, J. G. (2003): Roles of mitogen-activated protein kinase and phosphoinositide 3'-kinase in ErbB2/ErbB3 coreceptor-mediated heregulin signaling. *Exp. Cell Res.*, 284(2): 291-302
- Vinci, M.; Gowan, S.; Boxall, F.; Patterson, L.; Zimmermann, M.; Court, W.; Lomas, C.; Mendiola, M.; Hardisson, D.; Eccles, S. A. (2012): Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC. Biol.*, 10 29
- Walenta, S.; Mueller-Klieser, W. F. (2004): Lactate: mirror and motor of tumor malignancy. *Semin. Radiat. Oncol.*, 14(3): 267-274
- Wang, X.; Yu, J.; Sreekumar, A.; Varambally, S.; Shen, R.; Giacherio, D.; Mehra, R.; Montie, J. E.; Pienta, K. J.; Sanda, M. G.; Kantoff, P. W.; Rubin, M. A.; Wei, J. T.; Ghosh, D.; Chinnaiyan, A. M. (2005): Autoantibody signatures in prostate cancer. *N. Engl. J. Med.*, 353(12): 1224-1235

Wilken, J. A.; Maihle, N. J. (2010): Primary trastuzumab resistance: new tricks for an old drug. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1210 53-65

Wilson, C. G.; Ssendagire, R.; May, C. S.; Paterson, J. W. (1975): Measurement of plasma prednisolone in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 2(4): 321-325

Winter, M. J.; Cirulli, V.; Briaire-de Bruijn, I. H.; Litvinov, S. V. (2007): Cadherins are regulated by Ep-CAM via phosphatidylinositol-3 kinase. *Mol. Cell Biochem.*, 302(1-2): 19-26

Wolfel, T., et al. (1995). "A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma." *Science* 269(5228): 1281-1284.

Wong, A. L.; Lee, S. C. (2012): Mechanisms of Resistance to Trastuzumab and Novel Therapeutic Strategies in HER2-Positive Breast Cancer. *Int. J. Breast Cancer*, 2012 415170

World Health Organization (WHO) (2011): International Nonproprietary Names (INN) for biological and biotechnological substances.

Yang, Y. H.; Aeberli, D.; Dacumos, A.; Xue, J. R.; Morand, E. F. (2009): Annexin-1 regulates macrophage IL-6 and TNF via glucocorticoid-induced leucine zipper. *J. Immunol.*, 183(2): 1435-1445

Zhang, Z.; Huang, L.; Zhao, W.; Rigas, B. (2010): Annexin 1 induced by anti-inflammatory drugs binds to NF-kappaB and inhibits its activation: anticancer effects in vitro and in vivo. *Cancer Res.*, 70(6): 2379-2388

Zhang, T. Y., H. Xu, X. N. Zheng, X. Y. Xiong, S. Y. Zhang, X. Y. Yi, J. Li, Q. Wei and J. Z. Ai (2023). "Clinical benefit and safety associated with mRNA vaccines for advanced solid tumors: A meta-analysis." *MedComm* (2020) 4(4): e286.

Zoorob, R. J.; Cender, D. (1998): A different look at corticosteroids. *Am. Fam. Physician*, 58(2): 443-450

8 Anhang

8.1 Chemikalien und Reagenzien

8.1.1 Chemikalien

Aceton	Roth	Karlsruhe
Agarose	Roth	Karlsruhe
BSA (Albumin Fraktion V)	Roth	Karlsruhe
Casy Clean	Schärfe	Reutlingen
Casyton	Schärfe	Reutlingen
DMSO	Sigma-Aldrich	Steinheim
EDTA	Sigma-Aldrich	Steinheim
Eosin	Merck	Darmstadt
Essigsäure	Roth	Karlsruhe
Ethanol	Roth	Karlsruhe
Fortecortin® Inject	Merck	Darmstadt
Glukose	Merck	Darmstadt
Glycerin	Roth	Karlsruhe
Hämalaun	Roth	Karlsruhe
Hepes	Roth	Karlsruhe
Isopropanol	Roth	Karlsruhe
Methylenblau	Sigma-Aldrich	Steinheim
Myco Alert	Lonza	Rockland ME USA
Natriumacetat	Roth	Karlsruhe
Natriumcarbonat	Roth	Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Roth	Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck	Darmstadt
Natriumpyruvat	AppliChem	Darmstadt
PBS	Biochrom	AG Berlin
Prednisolone	Sigma-Aldrich	Steinheim
RBS neutral	Roth	Karlsruhe
Roti-Histokit II	Roth	Karlsruhe
Silikon/Isopropanol	Serva	Heidelberg

TissueTek	Sakura	Torrance, CA, USA
Wasserstoffperoxid 30 %	AppliChem	Darmstadt
Xylol	Roth	Karlsruhe

8.1.2 Medien und Zusätze

Amphotericin B	PAA	Pasching, Österreich
DMEM 4,5 g/l Glukose, mit L-Glut	PAA	Pasching, Österreich
DMEM 4,5 g/l Glukose, ohne Phenolrot	PAA	Pasching, Österreich
D-PBS	PAA	Pasching, Österreich
FCS	PAA	Pasching, Österreich
Geneticin (G418)	PAA	Pasching, Österreich
Hepes	Roth	Karlsruhe
LSM 1077	PAA	Pasching, Österreich
Natriumpyruvat	AppliChem	Darmstadt
nicht-essentielle Aminosäuren	PAA	Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin	PAA	Pasching, Österreich
Trypsin/EDTA	PAA	Pasching, Österreich

8.1.3 Puffer und Lösungen

Hank's Lösung:

Natriumchlorid	136,9 mM
Kaliumchlorid	5,36 mM
di-Natriumhydrogenphosphat	0,28 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	0,44 mM
HEPES	27,43 mM

pH: 7,2; autoklavieren; Lagerung 4 °C

Vor Gebrauch (à 500 ml):

Glukose	0,5 g
EDTA Tetranatriumsalz Dihydrat	4,75 g

10x PBS (pH 7,4)

KCl	2,0 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
Na ₂ HPO ₄	9,17 g
NaCl	80 g
Ad 1 l Aqua dest.	

8.1.4 Kits

DAB+	Dako	Hamburg
MycoAlert® Detection 100	Lonza	Köln
PapPen (ImmEdge Pen)	Vector/Linaris	Wertheim
Tox-2 XTT Assay	Sigma-Aldrich	Steinheim

8.2 Geräte

-80°C Truhe Here Freeze	Thermo Scientific	Bonn
AccuJet pro	Brand	Wertheim
Brutschrank	Heraeus	Hanau
CASY TT	Schärfe	Reutlingen
Dispenser Handystep Electronic	Brand	Wertheim
Einfrierbehälter (Mr. Frosty)	Qualilab/VWR	Darmstadt
Färbeschiffchen	VWR	Darmstadt
Federpinzette	VWR	Darmstadt
Feuchte Kammer	VWR	Darmstadt
Kanadabalsamglas	Roth	Karlsruhe
Kryotom	SLEE	Mainz
Küvetten (Choplin, Hellendahl)	VWR	Darmstadt
Magnetinduktionsplatte	VWR	Darmstadt
Mikroskop	Axiotron	Zeiss Oberkochen
Mikroskop BZ-8000	Keyence	Neu-Isenburg
Mikroskop Olympus IM	Olympus	Hamburg
Mehrkanalpipette	Labnet	Woodbridge, NJ, USA
Multiplate Reader DTX 880	Beckman Coulter	Krefeld
Neubauerkammer	Hecht-Assistent	Sondheim

Objektmikrometer	Olympus	Hamburg
Okularmikrometer	Olympus	Hamburg
pH Meter	Schott	Mainz
Scanner Epson Perfection 2400	Epson	Japan
Spinnerflaschen, 20 ml	Wheaton	Millville, NJ, USA
Spinnerflaschen, 100 ml 300 ml	Schott	Mainz
Sterilwerkbank	Gelair	Meckenheim
Stickstoffanlage	Air Liquide	Düsseldorf
Tischzentrifuge	Eppendorf	Hamburg
Trockenschrank	Ehret	Emmendingen
Vakuumpumpe	Neuberger	Freiburg
Vortexer	Bender+Hohlbein	Zürich
Waage	Sartorius	Göttingen
Wasserbad	GFL	Hannover
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus	Hanau

8.3 Verbrauchsmaterial

96 well optical reaction plate	ABI	Forster City, USA
Deckgläschen	Menzel-Gläser	Braunschweig
Dispenserspitzen	Brand	Wertheim
Einwegskalpelle	Braun	Melsungen
Einwegspritzen	Braun	Melsungen
Kanüle (0,9 mm)	Braun	Melsungen
Kombitips versch. Volumina	Eppendorf	Hamburg
Kryoröhrchen	Nalgene	Rochester, USA
Magnete, blau	VWR	Darmstadt
Mikrotiterplatten	Greiner bio-one	Frickenhausen
Objektträger SuperFrostPlus	Menzel-Gläser	Braunschweig
optical adhesive covers	ABI	Forster City, USA
Pasteurpipetten, gestopft	Roth	Karlsruhe
Parafilm®M	Roth	Karlsruhe
Petrischalen	Greiner	Frickenhausen
Pipettenspitzen (10 µl)	Roth	Karlsruhe
Pipettenspitzen (200 µl, 1000 µl)	Greiner	Frickenhausen

Reaktionsgefäße (0,5 ml - 2 ml)	Eppendorf	Hamburg
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner	Frickenhausen
Serologische Pipetten	Greiner	Frickenhausen
Skalpell	Braun	Melsungen
Spitzen für Multipette	VWR	Darmstadt
Spritzen 1 ml	Braun	Melsungen
Sterilfilter 0,22 µm	Roth	Karlsruhe
Zellkulturflaschen (25, 75, 175 cm ²)	Greiner	Frickenhausen

8.4 Software

Programm	Version	Verwendung
Adobe Photoshop	CS3	Bildbearbeitung, Bildanalyse
ImageJ	1.40	Bildbearbeitung, Bildanalyse
Microsoft Office	2007	Textverarbeitung, Tabellenkalkulation, Statistik
Origin	8G	Erstellung von Diagrammen
Reference Manager	12.0.3	Zitationen

8.5 Datentabellen

Datensatz zu Kap. 4.1.1 Abbildung 7

Zeit (d)	Volumen FaDu MCTS digital (mm ³)	Standardabweichung (mm ³)
2	0,1065	0,0058
4	0,1758	0,0474
7	0,0744	0,0055
9	0,1441	0,0245
11	0,2013	0,0582
14	0,3219	0,0717

Zeit (d)	Volumen FaDu MCTS Mikroskop (mm ³)	Standardabweichung (mm ³)
2	0,1505	0,0186
4	0,1283	0,0192
7	0,1317	0,0136
9	0,1333	0,0210
11	0,2038	0,0366
14	0,3327	0,0825

Datensatz zu Kap. 4.1.2 Abbildung 8

Zeit (d)	Zellzahl
0	10000
2	8331
4	8016
7	11000
9	15120
11	19542
14	33400

Datensatz zu Kap. 4.2.1 Abbildung 9

Ansatz	Tag 0	Tag 1	Tag 3	Tag 5	Tag 7	Tag 9	Tag 10
1.1 Kontrolle	0,1490	0,1649	0,2128	0,1919	0,1897	0,2094	0,2230
1.2 +0,1 Dexa	0,1294	0,1589	0,1325	0,1526	0,1380	0,1404	0,1411
1.3 +1 Dexa	0,1484	0,1664	0,1369	0,1374	0,1421	0,1459	0,1299
1.4 +10 Dexa	0,1610	0,1557	0,1302	0,1231	0,1294	0,0936	0,1168
1.5 +PBMC	0,1730	0,1677	0,1972	0,2228	0,2379	0,1855	0,1741
1.6 +2,5 catu	0,1306	0,1418	0,1873	0,0808	0,0250	0,0000	---
1.7 +2,5c +0,1D	0,1654	0,1662	0,1513	0,1553	0,1375	0,1353	0,1110
1.8 +2,5c +1D	0,1617	0,1633	0,1627	0,1623	0,1408	0,1216	0,1231
1.9 +2,5c +10D	0,1789	0,1753	0,1564	0,1603	0,1544	0,1411	0,1536

Datensatz zu Kap. 4.2.2 Abbildung 10

Ansatz	Extinktion (Mittelwert)	Standardabweichung (absolut)	Standardabweichung (%)
1.1 Kontrolle	1,5513	0,2371	15,2834
1.2 +0,1 Dexa	2,0963	0,0936	4,4637
1.3 +1 Dexa	1,6271	0,3923	24,1131
1.4 +10 Dexa	1,5776	0,5194	32,9261
1.5 +PBMC	1,8229	0,1034	5,6745
1.6 +2,5 catu	1,7789	0,2035	11,4425
1.7 +2,5c +0,1D	1,5738	0,3705	23,5434
1.8 +2,5c +1D	0,9573	0,3363	35,1308
1.9 +2,5c +10D	1,6094	0,4158	25,8357

Datensatz zu Kap. 4.2.2 Abbildung 11

Ansatz	Extinktion (MW)	Extinktion (MW (%))	SD	SD (%)
1.1 Kontrolle	1,5513	100	0,2371	15,2834
1.2 +0,1 Dexa	2,0963	135	0,0936	4,463682
1.3 +1 Dexa	1,6271	105	0,3923	24,11306
1.4 +10 Dexa	1,5776	102	0,5194	32,92607
1.5 +PBMC	1,8229	118	0,1034	5,674508
1.6 +2,5 catu	1,7789	115	0,2035	11,44248
1.7 +2,5c +0,1D	1,5738	101	0,3705	23,54341
1.8 +2,5c +1D	0,9573	62	0,3363	35,1308
1.9 +2,5c +10D	1,6094	104	0,4158	25,83574

Datensatz zu Kap. 4.2.3 Abbildung 12

Ansatz	Mittelwert 1000 (%)	Standardabweichun g 1000 (%)	Mittelwert 2000 (%)	Standardabweichun g 2000 (%)
1.1 Kontrolle	100,00	22,39	100,00	7,62
1.2 +0,1 Dexa	131,05	26,22	94,72	10,42
1.3 +1 Dexa	100,37	6,54	75,50	1,92
1.4 +10 Dexa	88,54	8,23	73,68	11,23
1.5 +PBMC	143,99	17,26	109,58	21,44
1.6 +2,5 catu	96,49	26,45	93,42	9,06
1.7 +2,5c +0,1D	135,67	18,28	90,42	26,16
1.8 +2,5c +1D	56,01	23,81	53,29	9,00
1.9 +2,5c +10D	53,05	15,30	100,85	4,70

Datensatz zu Kap. 4.2.3 Abbildung 13

Ansatz	Mittelwert 1000 (%)	Standardabweichung 1000 (%)	Mittelwert 2000 (%)	Standardabweichung 2000 (%)
1.1 Kontrolle	100,00	11,63	100,00	14,81
1.2 +0,1 Dexa	25,81	16,13	3,29	2,28
1.3 +1 Dexa	8,60	12,21	19,08	29,69
1.4 +10 Dexa	49,46	40,07	1,97	1,97
1.5 +PBMC	55,91	30,49	122,37	93,99
1.6 +2,5 catu	178,49	246,10	82,24	51,93
1.7 +2,5c +0,1D	5,38	4,93	1,32	2,28
1.8 +2,5c +1D	12,90	9,68	5,26	4,56
1.9 +2,5c +10D	2,15	3,72	1,32	2,28

Datensatz zu Kap. 4.2.4 Abbildung 14

Ansatz	gemessenes Zytokin (pg/ml)					
	IFN-g	TNF-a	IL-10	IL-6	IL-4	IL-2
1.1 Kontrolle	81,90	0,00	0,00	169,50	0,00	125,50
1.2 +0,1 Dexam	65,40	0,00	0,00	98,30	0,00	0,00
1.3 +1 Dexam	65,40	0,00	127,00	72,80	0,00	0,00
1.4 +10 Dexam	151,00	0,00	0,00	67,30	52,40	0,00
1.5 +PBMC	88,00	78,60	99,60	298,10	81,60	0,00
1.6 +2,5 catu	619,10	91,70	0,00	522,10	43,80	248,10
1.7 +2,5c +0,1D	388,30	0,00	0,00	119,80	43,80	86,10
1.8 +2,5c +1D	326,50	0,00	0,00	100,70	69,50	80,50
1.9 +2,5c +10D	220,00	0,00	0,00	107,90	0,00	0,00

Datensatz zu Kap. 4.2.4 Abbildung 15

Ansatz	gemessenes Zytokin (pg/ml)					
	IFN-g	TNF-a	IL-10	IL-6	IL-4	IL-2
1.1 Kontrolle	122,80	0,00	0,00	107,90	0,00	0,00
1.2 +0,1 Dexam	94,00	0,00	0,00	0,00	0,00	74,70
1.3 +1 Dexam	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1.4 +10 Dexam	0,00	0,00	0,00	47,80	0,00	0,00
1.5 +PBMC	0,00	0,00	0,00	287,10	0,00	0,00
1.6 +2,5 catu	2578,30	0,00	0,00	5217,10	0,00	0,00
1.7 +2,5c +0,1D	99,90	0,00	0,00	201,10	0,00	0,00
1.8 +2,5c +1D	37,00	0,00	0,00	48,70	0,00	0,00
1.9 +2,5c +10D	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Datensatz zu Kap. 4.2.4 Abbildung 16

Ansatz	gemessenes Zytokin (pg/ml)					
	IFN-g	TNF-a	IL-10	IL-6	IL-4	IL-2
1.1 Kontrolle	0,00	0,00	0,00	62,90	0,00	0,00
1.2 +0,1 Dexam	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1.3 +1 Dexam	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1.4 +10 Dexam	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1.5 +PBMC	0,00	0,00	0,00	213,00	22,90	0,00
1.6 +2,5 catu	1079,60	0,00	0,00	4989,50	0,00	0,00
1.7 +2,5c +0,1D	0,00	0,00	0,00	109,00	16,70	0,00
1.8 +2,5c +1D	0,00	0,00	0,00	37,50	0,00	0,00
1.9 +2,5c +10D	0,00	0,00	29,30	17,40	0,00	0,00

Datensatz zu Kap. 4.2.4 Abbildung 17

Ansatz	gemessenes Zytokin (pg/ml)					
	IFN-g	TNF-a	IL-10	IL-6	IL-4	IL-2
1.1 Kontrolle	0,00	0,00	0,00	71,10	0,00	0,00
1.2 +0,1 Dexa	0,00	0,00	0,00	20,20	0,00	0,00
1.3 +1 Dexa	26,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1.4 +10 Dexa	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1.5 +PBMC	0,00	0,00	0,00	286,00	0,00	0,00
1.6 +2,5 catu	21,80	0,00	0,00	4750,20	0,00	0,00
1.7 +2,5c +0,1D	0,00	0,00	0,00	102,70	0,00	0,00
1.8 +2,5c +1D	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1.9 +2,5c +10D	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Datensatz zu Kap. 4.3 Abbildung 18

Ansatz	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9
2.1 Kontrolle	0,083	0,113	0,139	0,163	0,244	0,255	0,315	0,323	0,347
2.2 Kontrolle +EtOH	0,083	0,121	0,141	0,172	0,261	0,259	0,312	0,354	0,359
2.3 +PBMC +EtOH	0,083	0,117	0,146	0,161	0,246	0,273	0,315	0,402	0,402
2.4 +10 ertu +EtOH	0,083	0,106	0,151	0,132	0,022	0,016	0,000	---	---
2.5 +10e +0,1P	0,083	0,115	0,140	0,133	0,040	0,022	0,015	0,000	---
2.6 +10e +0,3P	0,083	0,115	0,124	0,133	0,094	0,075	0,065	0,063	0,055
2.7 +10e +0,9P	0,083	0,107	0,129	0,137	0,159	0,106	0,090	0,086	0,070
2.8 +10e +1,2P	0,083	0,106	0,118	0,111	0,108	0,087	0,079	0,081	0,071
2.9 +10e +2,4P	0,083	0,113	0,118	0,124	0,100	0,081	0,084	0,071	0,075

Datensatz zu Kap. 4.4.1 Abbildung 19 **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**

Ansatz	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 10
3.1 Kontrolle	0,204	0,213	0,236	0,259	0,300	0,339	0,357	0,379	0,437	0,512
3.2 +0,1 Pred	0,204	0,176	0,181	0,181	0,214	0,194	0,207	0,232	0,208	0,210
3.3 +0,3 Pred	0,204	0,162	0,164	0,158	0,162	0,155	0,162	0,179	0,155	0,189
3.4 +1,2 Pred	0,204	0,155	0,153	0,159	0,167	0,165	0,169	0,168	0,156	0,156

3.5 +PBMC	0,20 4	0,21 2	0,24 8	0,28 0	0,31 9	0,37 6	0,43 8	0,50 3	0,44 2	0,30 7
3.6 +5 ertu	0,20 4	0,20 2	0,25 2	0,30 0	0,26 2	0,13 8	0,05 1	0,01 7	0,00 0	---
3.7 +5e + 0,1P	0,20 4	0,16 0	0,18 2	0,20 4	0,19 6	0,18 4	0,19 0	0,15 6	0,09 8	0,06 4
3.8 +5e + 0,3P	0,20 4	0,19 2	0,19 8	0,21 4	0,22 0	0,20 2	0,21 3	0,19 1	0,18 0	0,16 1
3.9 +5e + 1,2P	0,20 4	0,15 5	0,18 3	0,16 8	0,19 0	0,18 8	0,18 2	0,17 8	0,16 5	0,15 0

Datensatz zu Kap. 4.5 Abbildung 24

Ansatz	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9
4.1 Kontrolle	0,195	0,244	0,289	0,305	0,323	0,343	0,326	0,316	0,293
4.2 +PBMC	0,205	0,256	0,277	0,289	0,282	0,308	0,309	0,299	0,264
4.3 +0,25 ertu	0,183	0,238	0,264	0,283	0,268	0,262	0,258	0,252	0,217
4.4 +0,5 ertu	0,187	0,241	0,271	0,263	0,233	0,227	0,226	0,210	0,169
4.5 +1 ertu	0,182	0,234	0,253	0,230	0,189	0,171	0,155	0,119	0,095
4.6 +2,5 ertu	0,186	0,222	0,232	0,211	0,154	0,136	0,108	0,085	0,065
4.7 +5 ertu	0,181	0,235	0,233	0,213	0,109	0,072	0,041	0,026	0,000
4.8 +10 ertu	0,179	0,242	0,224	0,196	0,072	0,038	0,019	0,018	0,000

Datensatz zu Kap. 4.6.1 Abbildung 25

Ansatz	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 10	Tag 11
5.1 Kontrolle	0,168	0,206	0,219	0,248	0,267	0,293	0,312	0,305	0,309	0,322	0,308
5.2 +0,1 Pred	0,168	0,184	0,195	0,205	0,228	0,239	0,255	0,278	0,278	0,297	0,304
5.3 +0,3 Pred	0,168	0,184	0,186	0,206	0,222	0,247	0,262	0,279	0,293	0,313	0,306
5.4 +1,2 Pred	0,168	0,181	0,195	0,217	0,228	0,256	0,272	0,292	0,304	0,316	0,297
5.5 +PBMC	0,168	0,202	0,230	0,256	0,276	0,287	0,277	0,298	0,297	0,301	0,300
5.6 +5 ertu	0,168	0,212	0,213	0,180	0,133	0,085	0,058	0,040	0,029	0,015	0,015
5.7 +5e +0,1P	0,168	0,190	0,190	0,206	0,174	0,179	0,180	0,165	0,148	0,131	0,122
5.8 +5e +0,3P	0,168	0,181	0,186	0,188	0,182	0,174	0,175	0,172	0,164	0,142	0,122
5.9 +5e +1,2P	0,168	0,171	0,189	0,198	0,190	0,193	0,193	0,183	0,178	0,157	0,142

Datensatz zu Kap.4.6.1 Abbildung 26

Ansatz	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 10
Kontrolle	0,070	0,084	0,078	0,096	0,115	0,122	0,137	0,156	0,168	0,174
+0,1 Pred	0,070	0,077	0,073	0,076	0,086	0,082	0,088	0,091	0,090	0,093
+0,3 Pred	0,070	0,071	0,077	0,079	0,083	0,089	0,097	0,096	0,107	0,112
+1,2 Pred	0,070	0,070	0,071	0,071	0,080	0,081	0,082	0,090	0,091	0,101
+P BMC	0,070	0,076	0,082	0,114	0,136	0,150	0,150	0,159	0,178	0,205
+5 ertu	0,070	0,091	0,090	0,094	0,036	0,012	0,000	---	---	---
+5e +0,1P	0,070	0,075	0,075	0,084	0,078	0,083	0,075	0,059	0,045	0,017
+5e +0,3P	0,070	0,076	0,074	0,079	0,083	0,091	0,078	0,072	0,063	0,055
+5e +1,2P	0,070	0,077	0,068	0,081	0,075	0,080	0,073	0,065	0,050	0,032

Datensatz zu Kap. 4.7 Abbildung 34

Ansatz	Extinktion (Mittelwert)	Standardabweichung
Kontrolle	1,9504	0,2399
+0,1 Pred	1,9815	0,4042
+0,3 Pred	1,9396	0,2323
+0,9 Pred	2,0242	0,4423
+1,2 Pred	1,9901	0,3623
+2,4 Pred	1,9336	0,4285
+4,8 Pred	1,7966	0,3240
+9,6 Pred	1,8906	0,3889