

Aus der

Chirurgischen Klinik und Poliklinik, Klinikum Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K.-W. Jauch

**Zelluläre und molekulare Charakterisierung maligner Pleuraergüsse und
ex vivo Therapie mit dem bispezifischen Antikörper MT110**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Juliane Witthauer

aus

Tegernsee

Jahr

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Barbara Mayer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Christian Buske
Prof. Dr. Malte M. Linder

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. Barbara Mayer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 12. November 2009

Meinen Eltern
gewidmet

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Pleurakarzinose	1
1.1.1	Vorkommen	1
1.1.2	Entstehung	2
1.1.3	Prognose	2
1.1.4	Standardtherapien	3
1.2	Molekulare Therapie des fortgeschrittenen Mamma- und Bronchialkarzinoms	4
1.3	Molekulare Therapie der Pleurakarzinose	6
1.4	Bispezifische Antikörper	7
1.4.1	Der bispezifische Antikörper MT110	8
1.4.2	Das epitheliale Antigen EpCAM	8
1.4.3	Immunologische Effekte von MT110	9
1.5	Weitere Zielantigene der Pleurakarzinose	10
1.6	Zielsetzung und Fragestellung	13
2	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	Material	14
2.1.1	Patientenproben	14
2.1.2	Verbrauchsmaterial	14
2.1.3	Lösungen und Reagenzien	15
2.1.4	Puffer	16
2.1.5	Medien	17
2.1.6	Antikörper für ABC Methode für Kryohistologie	18
2.1.7	Antikörper Durchflußzytometrie	21
2.1.8	Geräte	22
2.2	Methoden	22
2.2.1	Pleuraergussgewinnung	22
2.2.2	Isolation der Pleuraergusszellen	23
2.2.3	Zellzählung und Vitalitätsbestimmung	24
2.2.4	Anfertigung von Zytospins	24

2.2.5	Kryokonservierung und Auftauen der Ergusszellen	25
2.2.6	Immunhistochemische Methoden	25
2.2.7	Imitation der malignen Ergüsse	30
2.2.8	Ex vivo Therapie und Analyseverfahren	32
2.2.9	Zytokinbestimmung im FACS	42
2.2.10	Statistik	44
3	ERGEBNISSE	45
3.1	Klinischer Verlauf der Mammakarzinom Patienten	45
3.1.1	Klinisch pathologische Charakterisierung des Primärtumors	45
3.1.2	Therapie und klinischer Verlauf	49
3.2	Klinischer Verlauf der Bronchialkarzinom Patienten	51
3.2.1	Klinisch pathologische Charakterisierung des Primärtumors	51
3.2.2	Therapie und klinischer Verlauf	52
3.3	Pleuraergusszytologie	53
3.3.1	Ergussmenge und Zellzahl	53
3.3.2	Morphologie	57
3.3.3	Zelluläre Pleuraergusszusammensetzung	60
3.4	Molekulare Charakterisierung der Pleurakarzinomzellen	63
3.4.1	Pleuraergüsse von Mammakarzinom Patienten	64
3.4.2	Pleuraergüsse von Bronchialkarzinom Patienten	68
3.5	Auswahl der Analysemethode nach ex vivo Therapie mit MT110	70
3.5.1	Karzinomzelllinie HT-29	70
3.5.2	Ableitung der Therapiebedingungen für die malignen Pleuraergüsse	70
3.5.3	Analysemethoden für die malignen Pleuraergussproben	76
3.6	Ex vivo Therapie der malignen Pleuraergüsse	82
3.6.1	Nachweis der antikörpervermittelten spezifischen Lyse	82
3.6.2	Nachweis der antikörpervermittelten Immunzellstimulation	93
3.6.3	Zytokinnachweis nach Antikörpertherapie maligner Pleuraergüsse beim Mammakarzinom	107
4	DISKUSSION UND AUSBLICK	109
4.1	Methodendiskussion	109

4.1.1	Zelllinie HT29 als Etablierungsgrundlage für primäre Ergussproben	109
4.1.2	Vorteile der FACS Analytik	111
4.1.3	Auswertemethode A und B der FACS Analytik	111
4.2	Pleuraergussheterogenität	112
4.2.1	Zelluläre Heterogenität	112
4.2.2	Molekulare Heterogenität	118
4.3	Effektivität von MT110	122
4.4	Limitationen für den Einsatz bispezifischer Antikörper	126
4.5	Zusammenfassung	127
5	LITERATURVERZEICHNIS	IV
6	ANHANG	XVI
6.1	Tabellen	XVI
6.2	Abkürzungsverzeichnis	XXIII
6.3	Abbildungsverzeichnis	XXVI
6.4	Curriculum Vitae	XXX
6.5	Publikationsliste	XXXI
6.6	Danksagung	XXXII
	ERKLÄRUNG	XXXIII

1 Einleitung

Die Pleurakarzinose tritt in einem fortgeschrittenen Stadium einer Krebserkrankung auf und ist die Folge einer Metastasierung der Pleura. Das langfristige Ziel einer Therapie der Pleurakarzinose ist die Verlängerung der Überlebenszeit der Patienten und die Verbesserung der Lebensqualität. Die häufigsten Therapiemethoden stellen lokale invasive Eingriffe dar, wie z.B. die Drainage des malignen Pleuraergusses und die intrapleurale Instillation von sklerosierenden Substanzen, um ein Wiederauftreten längerfristig zu verhindern (Chen H et al. 2008, Lee YC et al. 2004). Eine Erweiterung des Therapiespektrums wird auch in der palliativen Therapie angestrebt, um die Sicherung oder Wiederherstellung einer möglichst umfassenden Lebensqualität des Patienten zu gewährleisten. Eine Voraussetzung dafür ist die Charakterisierung der Pleurakarzinose d.h. der malignen Zellen und des immunologischen Mikromilieus, sowie die Überprüfung neuer Therapiekonzepte, um effizientere Therapiestrategien zu entwickeln.

1.1 Die Pleurakarzinose

1.1.1 Vorkommen

In den USA treten jährlich 150.000 Fälle maligner Pleuraergüsse auf (Najmunnisa N et al. 2007, Kolschmann S et al. 2005, Neragi-Miandoab S et al. 2006, Antony VB et al 2001). Die jährliche Inzidenz von Pleuraerkrankungen in Deutschland wird auf 300 / 100.000 Einwohner geschätzt. Etwa 22 % aller Pleuraveränderungen sind maligner Genese, die sich in Form von malignen Pleuraergüssen manifestieren (Davies HE et al 2008). Somit sind allein in Deutschland jährlich etwa 53.000 Neuerkrankungen zu erwarten. (Loddenkemper R et al. 2008). Das Bronchialkarzinom und das Mammakarzinom sind mit 50-65 % aller auftretenden malignen Pleuraergüsse die häufigste Ursache für die Entstehung eines malignen Ergusses (Bennett R et al. 2005, Barbetakis N et al. 2004). In selteneren Fällen können maligne Pleuraergüsse auch bei gastrointestinalen Erkrankungen, dem Ovarialkarzinom und Blasenkarzinom nachgewiesen werden (Heffner JE et al. 2008).

1.1.2 Entstehung

Die Pleuraflüssigkeit ist ein Ultrafiltrat des Plasmas und gelangt über die parietale und viszerale Pleura sowie das Zwerchfell in die Pleurahöhle (Antony VB et al. 2003). Bei einem gesunden Menschen findet sich im Pleuraspalt zwischen der Pleura parietalis und viszeralis normalerweise eine konstante Flüssigkeitsmenge (0,5-1ml), die als gleitender Flüssigkeitsfilm dient, kontinuierlich gebildet und wieder resorbiert wird. Der Proteingehalt der Flüssigkeit beträgt weniger als 1,5 g/dl und die Pleuraflüssigkeit enthält 1500 – 4500 Zellen pro ml bestehend aus Makrophagen, Mesothelzellen, Lymphozyten und Granulozyten (Lai-Fook SJ et al. 2004, Antony VB et al. 2003, Agostoni E et al. 1972). Ein Pleuraerguss tritt auf, wenn die Bildung der Pleuraflüssigkeit erhöht und/oder ihre Absorption vermindert ist. Übersteigt die Flüssigkeitsmenge in der Pleurahöhle das Volumen von 20 ml wird von einem Pleuraerguss gesprochen. Bei den proteinärmeren gutartigen (< 30 g/dl) Transsudaten kann die Erhöhung des hydrostatischen Drucks im Kapillargebiet (Herzinsuffizienz) oder die Verminderung des kolloidosmotischen Drucks (Leberzirrhose, nephrotisches Syndrom) einen Pleuraerguss bedingen. Bei den proteinhaltigen Exsudaten (> 30 g/dl) ist dagegen die Pleura bedingt durch Entzündungen oder Neoplasien pathologisch verändert, was zu einer erhöhten Kapillarpermeabilität und/oder zu einem gestörten Lymphabfluss führen kann. (Antunes G et al. 2003). Maligne Pleuraergüsse beim Mammakarzinom entstehen über die Lymphbahnen der Thoraxwand oder über den hämatogenen Weg durch hepatische Metastasen. Beim Adenokarzinom der Lunge wandern die Tumorzellen entweder direkt über die Thoraxwand oder indirekt über den hämatogenen Weg d.h. z.B. über pulmonale Kapillaren in die Pleura ein (Antunes G et al. 2003, Lynch TJ et al. 1993).

1.1.3 Prognose

Die durchschnittliche Überlebenszeit der Mammakarzinompatientinnen mit malignem Pleuraerguss beträgt 6-36 Monate (Gasparri R et al. 2006) bzw. 16 bis 42 Monate (Neragi-Miandoab S et al. 2008, Fentiman IS et al. 1981). Die Überlebenszeit beim Mammakarzinom hängt sehr davon ab, ob es sich bei der Pleurakarzinose um eine Erstmanifestation der Fernmetastasierung oder einer systemischen Generalisierung der Erkrankung handelt (Antony VB et al. 2001). Eine Studie mit 40 Mammakarzinompatientinnen zeigte, dass solche ohne

weitere Metastasierung durchschnittlich 48 Monate, und Patientinnen mit weiteren Fernmetastasen durchschnittlich 12 Monate lebten. Bronchialkarzinompatienten zeigten die kürzeste Lebenserwartung mit durchschnittlich 16 Wochen (Barbetakis N et al. 2004, Antunes G et al. 2003, Antony VB et al. 2001).

1.1.4 Standardtherapien

Primäre Behandlungsziele der Pleurakarzinose sind die Linderung der Symptome wie z.B. thorakale, atemabhängige Schmerzen und Dyspnoe, sowie die Verhinderung des Wiederauftretens des Ergusses. Es wird eine wirksame symptomatische Behandlung mit geringer therapiebedingter Morbidität und Letalität angestrebt. An erster Stelle steht die Entlastungspunktion, bei der der Erguss möglichst vollständig drainiert wird. Therapie der Wahl bei rezidivierenden Ergüssen ist die chemische Pleurodese (Neragi-Miandoab S et al. 2008, Tan C et al. 2006, Rodriguez-Panadero F et al. 2006, Antony VB et al. 1999), bei der durch eine sklerosierende Substanz die Pleurablätter verklebt werden. Im Vergleich zu anderen sklerosierenden Substanzen wie Antibiotika (z.B. Tetrazykline) und Chemotherapeutika (z.B. Bleomycin, Mitoxantron, 5-Fluorouracil) hat sich Talkum als am Effizientesten erwiesen (Chen H. et al. 2008, Neragi-Miandoab S et al. 2008). Die Instillation von Talkum führt durch die Mesothelzellen der Pleura zu einer Ausschüttung von verschiedenen Wachstumsfaktoren wie z.B. bFGF (basic fibroblast growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor) und TGF- β . Die inflammatorische Antwort der Pleura und die dadurch bedingte Fibroblastenproliferation führt zu einer Fibrose (Antony VB et al. 2004). Die Pleurodese kann mittels einer Thoraxdrainage oder thorakoskopisch durchgeführt werden. Voraussetzung für eine erfolgreiche Pleurodese ist die vollständige Entleerung des Ergusses (Heffner JE et al. 2008). Die Erfolgsrate der Pleurodese mit Talkum (Verhinderung der Reakkumulation maligner Ergüsse innerhalb von 30 Tagen) unterschiedlicher Studien lag bei 50-93 % (Yildirim H et al. 2008, Steger V et al. 2007, Walker-Renard PB et al. 1994). Weitere Therapiemöglichkeiten sind die intrapleurale Instillation von Interleukin-2 (IL-2), Interferon α und β (Serman DH et al. 2007, Lissoni P et al. 2001, Astoul P et al. 1993), die Immuntherapie mit OK-432, (Yoshida K et al. 2007) sowie Vakzinierungsstrategien (Chang GC et al. 2005). Ein stark invasiver Eingriff stellt die Pleurektomie dar, bei der die Pleura vollständig entfernt wird, wenn durch die Verklebung der Pleura die Lungenfunktion

irreparabel geschädigt ist (Neragi-Miandoab S et al. 2008, Sahn SA et al. 2001). Bei der Pleurektomie wird jedoch eine hohe perioperative Mortalität (10%) und hohe Morbidität (23 %) beobachtet (Rodriguez-Panadero F et al. 1997). Therapien, die das lokale Immunsystem mit Hilfe von z.B. IL-2 oder OK-432 aktivierten, dienten im Vergleich zur Talkum-Pleurodese nicht nur der Symptombekämpfung, sondern führten auch zu einem längeren Gesamtüberleben (Yoshida K et al 2007, Astoul P et al. 1993)

1.2 Molekulare Therapie des fortgeschrittenen Mamma- und Bronchialkarzinoms

Bei der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms sind monoklonale Antikörper wie z.B. Trastuzumab/Herceptin weltweit etabliert und anerkannt. Trastuzumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der den humanen Wachstumsfaktorrezeptor Her-2/neu bindet. Neben der Hemmung der intrazellulären Signalweiterleitung und Induktion von Apoptose, führt die antikörperabhängige Immunantwort zu einer Rekrutierung von Monozyten, Neutrophilen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), die die Her-2/neu-positiven Zellen gezielt erkennen und eliminieren. Im Rahmen der von Slamon DJ durchgeführten Phase III Studie, konnte bei Patientinnen mit einem Her-2/neu positiven fortgeschrittenen Mammakarzinom (Score nach Remmele und Steger von 2+/3+) durch eine Kombinationstherapie von Trastuzumab und einer Polychemotherapie (n=235) im Vergleich zu Patientinnen, die nur eine Polychemotherapie (Anthrazykline, Cyclophosphamide) erhielten (n=234), die Ansprechrate verbessert (50 % versus 32 %) und das progressionsfreie Intervall verlängert (7,4 versus 4,6 Monate) werden. Nach einem Jahr war in der Gruppe der mit Trastuzumab behandelten Patienten eine signifikant geringere Anzahl an Todesfällen zu beobachten (22 % versus 33 %). Das Gesamtüberleben der Patienten, die zusätzlich Trastuzumab erhielten, konnte von 20,3 Monate auf 25,1 Monate signifikant verbessert werden (Slamon DJ et al. 2001). O'Shaughnessy J et al. setzte in seiner Studie Trastuzumab einzeln und in Kombination mit Lapatinib ein. Lapatinib ist ein niedermolekularer Tyrosinkinaseinhibitor, der intrazellulär den Her2/neu Rezeptor und den EGF-Rezeptor blockiert. Eingeschlossen worden waren Patientinnen nach Progression unter Anthrazyklinen, Taxan und Trastuzumab (n=73). Lapatinib erwies sich in Kombination mit Trastuzumab als wirksame Behandlung bei progredientem HER-2/neu positivem Mammakarzinom während

oder nach Behandlung mit Trastuzumab. Die Kombination mit Trastuzumab verbesserte das progressionsfreie Intervall signifikant (8,4 versus 12 Wochen) und die Patientinnen zeigten nach Kombinationstherapie ein Gesamtüberleben von 51,6 Wochen versus 39 Wochen in der mit ausschließlich Lapatinib behandelten Kontrollgruppe (O'Shaughnessy J et al. 2008). Des Weiteren wurde der vollhumane monoklonale IgG1 Antikörper MT201 gegen das tumorassoziierte Antigen EpCAM, in Kombination mit Docetaxel in einer klinischen Phase I und II Studie bei Patientinnen mit einem metastasierten Mammakarzinom getestet. Die klinische Studie Phase Ib ergab, dass 24 Wochen nach MT201 Therapie 12,2 % der Patienten (aus n=74), die das epitheliale Antigen EpCAM auf ihrem Primärtumor überexprimierten (>50 % positive Tumorzellen) und nur 2,9 % der Patienten, die < 50 % EpCAM positive Tumorzellen aufwiesen, keine Progression ihrer Erkrankung zeigten (Schuler M et al 2008). Des Weiteren wurde in einer Phase II Studie mit MT201 und insgesamt 109 Mammakarzinompatientinnen gezeigt, dass bei Patienten mit einer hohen Expression des tumorassoziierten Antigens EpCAM (> 50 % positive Tumorzellen) weniger neue Metastasen auftraten. 48,3 % (14 von 29) der Patienten mit < 50 % EpCAM positiven Tumorzellen wiesen 6 Wochen nach MT201 Therapie neue Metastasen auf. Aus dem Kollektiv der Patienten, mit > 50 % EpCAM positiven Zellen, entwickelten 16,7 % (3 von 18) der Patienten nach 6 Wochen neue Metastasen (Dittrich C et al. 2007).

In einer Phase III Studie mit insgesamt 878 Patienten, die an einem nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom (Stadium IIIB und IV, mit MPE) erkrankt waren, wurde ein Arm (A) mit Carboplatin und Paclitaxel und ein Arm (B) mit Carboplatin und Paclitaxel in Kombination mit dem monoklonalen humanisierten anti-VEGF (Vascular endothelial growth factor) Antikörper Bevacizumab therapiert (15 mg/kg, drei wöchentlich). Bevacizumab hemmt über die Blockade von VEGF das Gefäßwachstum innerhalb solider Tumore. VEGF wird von 61-92 % der Patienten mit NSCLC exprimiert (Fontanini G et al 1997, Mattern J et al. 1995). Die progressionsfreie Zeit war für Arm B signifikant erhöht (6,2 versus 4,5 Monate). Die 24 Monate Überlebensrate betrug 15 % für Arm A und 23 % für Arm B. Das Gesamtüberleben konnte für Arm B signifikant gegenüber Arm A mit 12,3 Monaten im Vergleich zu 10,3 Monaten verbessert werden (di Costanzo F et al 2008).

Der monoklonale, chimäre Antikörper anti-EGF-R (Cetuximab), der den epidermalen Wachstumsrezeptor (EGF-R) bindet, führte in einer Phase III Studie bei Patienten mit einem metastasierten nicht-kleinzelligem EGF-R+/FISH+ Bronchialkarzinom (NSCLC), in

Kombination mit Cisplatin und Vinorelbine (CV, Arm A) zu einem signifikant verlängertem Überleben im Vergleich zu der mit ausschließlich CV (Arm B) behandelten Kontrollgruppe (Pirker R et al. 2008). Die Überlebensrate der Patienten mit einem Adenokarzinom (n=412) lag für Arm A bei 12 Monaten im Vergleich zu Arm B mit 10,2 Monaten. Wie auch der monoklonale Antikörper gegen Her-2/neu beeinflusst Cetuximab über die Blockade des intrazellulären Signalweges die Proliferation der Tumorzelle und aktiviert eine anti-tumorale Immunantwort (ADCC, CDC) durch den Fc-Rezeptor (FcγRIII) (Beano A et al. 2008).

1.3 Molekulare Therapie der Pleurakarzinose

Molekulare Therapieansätze für die gezielte Behandlung der Pleurakarzinose sind in der Literatur wenig beschrieben. Kroesen BJ et al führten 1993 erstmalig eine lokale Therapie mit einem bispezifischen Antikörper (BIS-1) an neun Patienten mit malignen Ergüssen der Pleura- oder Peritonealhöhle durch. Dabei handelte es sich um ein heterogenes Kollektiv von Patienten mit Ergüssen eines Magen- (n=1), Kolon- (n=3), Mamma- (n=1), Ovarial- (n=2) und Bronchialkarzinoms (n=2). Der bispezifische Antikörper BIS-1 erkennt neben dem T-Zellantigen CD3 das Antigen EGP-2 (epithelassoziertes Glykoprotein 2) auf den Tumorzellen. Die ersten entwickelten bispezifischen Antikörper waren nicht in der Lage die T-Zellen zu stimulieren. Deswegen erhielten die Patienten lokal in die Pleura- oder Peritonealhöhle autologe T-Zellen, die zuvor für zwei Tage mit 60 IU/ml IL-2 stimuliert (AT= „activated T-Lymphocytes“) und mit dem bispezifischen Antikörper (0,1 mg/ml) für 30 Minuten inkubiert wurden (RAT = „redirected activated T-Lymphocytes“). Zwei Patienten (zwei von zehn) wurden ausschließlich mit ATs behandelt. Dies führte zu keiner Lyse der Tumorzellen in der Pleura- bzw. Peritonealhöhle. Die restlichen sieben Patienten wurden mit RATs therapiert. Diese zeigten nach 24h entweder eine Abnahme der Tumorzellen im Erguss (n=3) oder ein vollständiges Verschwinden der Tumorzellen (n=3). Bei einem Patienten konnte auf Grund von Abdominalschmerzen das Experiment nicht beendet werden (n=1). Bei dieser Studie wurde das progressionsfreie Intervall, sowie Gesamtüberleben der Patienten nicht dokumentiert (Kroesen BJ et al. 1993).

Eine intrapleurale Therapie mit dem weiterentwickelten trifunktionellen bispezifischen Antikörper anti EpCAMxCD3 Catumaxomab erfolgte für Patienten mit malignen Pleuraergüssen beim Bronchialkarzinom und Mammakarzinom in einer Phase I /II Studie

(Sebastian M et al. 2006). Die intrapleurale Therapie (5-200 µg, individuelle maximal tolerierbare Dosis individuell ermittelt) mit dem bispezifischen Antikörper führte nach 60 Tagen bei acht Patienten zu einer Abnahme der Tumorzellen im Erguss, wobei die genaue prozentuale Abnahme nicht näher dokumentiert wurde. Bei einer Mammakarzinompatientin konnte der vollständige Rückgang des malignen Ergusses beobachtet werden. Bei vier von fünf Patienten war eine Abnahme der Ergussmenge zu beobachten. Zwei von drei Bronchialkarzinompatienten sprachen nicht auf die Therapie an. Bei einem der drei Patienten wurde ein Erfolg verzeichnet, der aber nicht näher beschrieben wurde. Eine geplante Phase II Studie soll die intrapleurale Antikörpertherapie mit der aktuellen Standardtherapie - der Talkum-Pleurodese - vergleichen.

1.4 Bispezifische Antikörper

Bispezifische Antikörper können zwei verschiedenen Antigene gleichzeitig erkennen. Eine Klasse dieser Moleküle besitzt die Spezifität für die invariante Untereinheit des T-Zellrezeptors (CD3), sowie für ein tumorassoziiertes Oberflächenantigen. Diese Verknüpfung zwischen T-Zelle und Tumorzelle kann den für die Aktivierung der T-Zellen benötigten Komplex aus T-Zell-Rezeptor, Peptidantigen und MHC-Molekül funktionell ersetzen und macht somit eine zytotoxische T-Zellantwort - vermittelt durch die Anwesenheit des bispezifischen Antikörpers - möglich (D' Argouges S et al. 2008; Brischwein K et al. 2006). BiTE-Antikörper (Bispecific T-Cell Engager) bestehen aus zwei unterschiedlichen Einzelketten-Antikörpermolekülen (scFvs =single chain variable Fragments), die über ein nicht-immunogenes Peptid miteinander verbunden sind und von zwei verschiedenen monoklonalen Antikörpern abstammen. (Wolf E et al. 2005). Es werden zwei Klassen bispezifischer Antikörper unterschieden. BiTE-Moleküle, die keinen Fc-Teil aufweisen und bispezifische, trifunktionelle Antikörper, die die Morphologie eines klassischen Antikörpers und damit einen Fc-Teil besitzen. Dieser Fc-Teil ermöglicht zusätzlich die Bindung und Aktivierung von akzessorischen Zellen wie z.B. Makrophagen und NK-Zellen (Morecki S et al. 2008; Burges A et al. 2007; Ruf P et al. 2001). Die Lyse der Tumorzellen erfolgt über die durch den bispezifischen Antikörper aktivierten T-Zellen, die z.B. über Perforine und Granzyme den programmierten Zelltod der malignen Zellen auslösen. Des Weiteren werden

lokal immunstimulatorische Zytokine wie z.B. IFN- γ und TNF- α freigesetzt, die weitere Immunzellen aktivieren.

1.4.1 Der bispezifische Antikörper MT110

Der BiTE-Antikörper MT110 besitzt eine Antigenbindungsstelle für das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM; CD326) und eine Bindungsstelle für das T-Zellantigen CD3. Die Herstellung der Antigenkonstrukte erfolgte durch die Klonierung dieser in einen Expressionsvektor (pEF-DHFR). CHO-Zellen (Chinese hamster ovary) wurden mit dem Expressionsvektor transfiziert (Löffler A et al. 2000) und stabile Transfektanten wurden selektiert. Die sezernierten Proteine wurden aus dem Mediumüberstand der CHO-Zellen angereichert und aufgereinigt (Brischwein K et al. 2006). MT110 ist ein Monomer mit einem Molekulargewicht von 55 kDa. Durch die Bindung des Antikörpers an die EpCAM-positive Tumorzelle und die CD3-positive T-Zelle kommt es zu der Ausbildung einer immunologischen Synapse (Ansammlung von Rezeptoren zwischen der Kontaktstelle von zwei Zellen) zwischen der Effektor- und der Zielzelle. Die Effektorzelle wird aktiviert und die Zielzelle zerstört (Neumann J, Springer Lehrbuch, 2008).

1.4.2 Das epitheliale Antigen EpCAM

Das tumorassoziiertes Antigen EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) ist ein membranständiges epitheliales Zell-Adhäsionsmolekül. Es ist ein Typ I Membranprotein mit 40 kDa, das aus 314 Aminosäuren (AS) besteht und mit 265 AS zum Großteil extrazellulär präsentiert ist. EpCAM kann in bestimmten gesunden Geweben epithelialen Ursprungs (z.B. Drüsenepithelien) nachgewiesen werden. Gesundes Plattenepithel (Hepatozyten, Keratinozyten, myoepitheliale Zellen) zeigt jedoch keine Expression dieses Moleküls (Osta W et al. 2004). EpCAM wird auf humanen Adenokarzinomen (Gastrointestinale Tumore, Mamma-, Prostata-, Leberkarzinom) und squamösen Karzinomen überexprimiert (Baeuerle PA et al. 2007, Went P et al, 2004, Moldenhauer G et al. 1987). Des Weiteren werden EpCAM und CD133 als Krebsstammzell-assoziierte Antigene diskutiert (Horst D et al. 2008, Li C et al. 2007, Al-Hajj M et al. 2007), die von malignen Zellen mit einem hohen

tumorigenen Potential exprimiert werden. Insgesamt ist die Expression von EpCAM mit einer schlechten Prognose für die Patienten assoziiert. Nodal-negative Mammakarzinompatientinnen zeigten bei einer EpCAM Expression auf dem Primärtumorgewebe eine schlechtere Prognose. Das Expressionslevel von EpCAM korrelierte mit einer schwachen Differenzierung der malignen Zellen und mit einer erniedrigten Lebenserwartung der Krebspatienten (Spizzo G et al. 2004). Als homotypisches Zelladhäsionsmolekül ist EpCAM in Signaltransduktionswege wie dem Cadherin-Catenin Weg und auch Wnt Signalweg involviert. Des Weiteren wurde gezeigt, dass es die Expression von Protoonkogenen wie c-myc moduliert (Chaudry MA et al. 2007, Münz M et al. 2004). Die Unterdrückung der EpCAM Expression mit Antisense RNA führte zu einer reduzierten Proliferation und einer Stoffwechselreduktion in humanen Karzinomzellen (Münz M et al. 2004, Osta W et al. 2004). Eine Überexpression von EpCAM auf Mammakarzinom-Zelllinien ist positiv assoziiert bezüglich Proliferation, Migration und Invasivität der Zellen (Osta W et al. 2004). Untersuchungen von dissiminierten Tumorzellen im Knochenmark bei Prostatapatienten zeigten eine positive Korrelation der EpCAM-Positivität der dissiminierten Zellen mit einer Progression der Erkrankung (Klein CA et al. 2002). Das epitheliale Antigen EpCAM (MOC31) wurde bereits in mehreren Studien auf den malignen Zellen in Pleuraergüssen von Adenokarzinomen identifiziert (Dupont VN et al. 2007; Oates J et al. 2000; Athanassiadou P et al. 2000; Morgan RL et al. 1999). Im Vergleich zu gutartigen Ergüssen sowie Ergüssen nicht epithelialen Ursprungs wurde EpCAM auf malignen Ergüssen von Mammakarzinompatienten signifikant verstärkt exprimiert ($p < 0,0001$) (Passebosc-Faure K et al. 2005) und stellt somit auch bei der Therapie maligner Pleuraergüsse ein geeignetes Zielantigen dar.

1.4.3 Immunologische Effekte von MT110

Verschiedene Zelllinien, die das epitheliale Antigen EpCAM exprimieren (Kato III, MCF-7, MDA-MB-453, SK-Br3) wurden in vitro mit dem bispezifischen Antikörper MT110 inkubiert (Brischwein K et al. 2006). Die Zelllinien wurden mit unstimulierten peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) verschiedener Spender mit einem Verhältnis der Effektor- zu Zielzellen von 5:1 gemischt. Die T-Zellen der PBMCs waren vor Therapie negativ für die Aktivierungsmarker CD69 und CD25. Sie zeigten keine Proliferation und sezernierten keine

Zytokine. Nach 4h und 21h MT110 Therapie war auf den CD4+ T-Helfer und CD8+ zytotoxischen T-Zellen –beispielhaft dargestellt mit der Zelllinie Kato III- ein ähnlich hoher Anteil des frühen Aktivierungsmarkers CD69 zu beobachten. Nach 4h und 100 ng/ml MT110 exprimierten 60 % der T-Lymphozyten den frühen Aktivierungsmarker CD69 und nach 21h knapp 90% der T-Zellen. Desweiteren exprimierten nach 16h mit 100 ng/ml MT110 80% der CD8+ Zellen und 44% der CD4+ Zellen die Serinprotease Granzym B die nach 48h auf 90% CD8+/Granzym B+ Zellen und auf >65% CD4+/Granzym B+ Zellen gesteigert werden konnte. Die Untersuchung der Mediumüberstände ergab erhöhte IFN- γ und TNF- α -Spiegel (Brischwein K et al. 2006). Nach 24h waren mit der höchsten MT110 Konzentration (1000 ng/ml) 60-80% der malignen Zellen der Zelllinien Kato III, MCF-7, MDA-MB-453 lysiert. Für die Zelllinie SKBr-3 war nach 24h keine Lyse zu beobachten. Ein Analyse der Bindungsstellen für EpCAM ergab, dass die Dichte des Oberflächenantigens für SKBr-3 mit 125.000 Bindungsstellen/Zelle (Bd/Zelle) schwächer war als bei den Zelllinien Kato III (900.000 Bd/Zelle), MCF-7 (220.000Bd/Zelle) und MDA-MB-453 (180.000 Bd/Zelle). Nach 48h konnte für alle Zelllinien eine Lyse zwischen 60-95% beobachtet werden. Die Daten zeigten, dass die Aktivierung der T-Zellen und die spezifische Lyse nicht direkt koinzident waren (Brischwein K et al. 2006). In vivo Versuche mit der Kolonzelllinie SW480, die vergleichbare Ansprechraten auf MT110 erzielte wie Kato III, MMCF-7 und MDA-MB-453, wurden in NOD/SCID Mäusen durchgeführt. SW480 und PBMCs von gesunden Spendern wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und subkutan in die Mäuse gespritzt. Die i.v. Injektion von 1 μ g/ml MT110 über 5 Tage führte bei allen 8 Mäusen zu einer kompletten Inhibition der Tumorentstehung bis zum Ende des Experiments nach 88 Tagen (Brischwein K et al. 2006). Der Antikörper MT110 befindet sich seit April 2008 in der klinischen Studie Phase I. MT110 wird im Rahmen dieser Studie bei Patienten mit EpCAM-positiven, lokal fortgeschrittenen, rezidierten oder metastasierten Karzinomen auf Verträglichkeit und Antitumoraktivität hin untersucht (NCT00635596).

1.5 Weitere Zielantigene der Pleurakarzinose

Die Zytologie maligner Pleuraergüsse verschiedenster Tumorentitäten wurde seit 1960 mehrfach analysiert und diskutiert (Michael CW et al. 1997, Dieterich M et al 1994, Price BA et al 1992, Wiley EL et al 1990, Danner DE et al 1975). Über die Zeit wurden mittels

verschiedenster immunhistochemischer Methoden die malignen Zellen in den Ergüssen näher charakterisiert (Davidson B et al 2004, Longatto Filho A et al 2002, Risberg B et al 2000). Die Schwerpunkte lagen hier auf der Identifizierung geeigneter Marker auf den malignen Zellen, um Ergüsse als eindeutig maligne klassifizieren zu können und um Adenokarzinome von malignen Mesotheliomen zu unterscheiden. Oberflächenantigene wie z.B. CEA (Carcinoembryonale Antigen), B72.3 (TAG-72) und EpCAM (epitheliales Antigen) waren nicht auf reaktiven Mesothelzellen zu detektieren und wurden als geeignete Marker diskutiert, um maligne Zellen in Ergüssen gynäkologischen Ursprungs zu identifizieren (Davidson B et al. 1999, Lee JS et al. 1996, Brown RW et al. 1993). Aktuelle Literatur diskutiert sowohl für Adenokarzinome, als auch für Mesotheliome die Marker Calretinin, EMA (epitheliales Membranantigen), HMFG-2 (Anti-human milk fat globules) und CEA (Grefte JM et al. 2008). Li Q et al. und Pu RT et al. stellten hingegen unabhängig voneinander als geeignete Marker für die Unterscheidung von Mesotheliomen und Adenokarzinomen Zytokeratin 5/6 fest, die 97 % der untersuchten Mesotheliome anfärbten (Pu RT et al. 2008) und nur 10 % der malignen Ergüsse von Adenokarzinomen. Des Weiteren zeigte Li et al, dass der Marker Calretinin alle Mesotheliome (100%) positiv und alle Adenokarzinome negativ färbte (Li Q et al. 2006). Eine vergleichende Charakterisierung der malignen Zellen in Pleuraergüssen mit verschiedenen prognostischen, therapielevanten und chemoresistenzvermittelten Markern, wie sie in dieser Arbeit vorgestellt wird, ist in der Literatur nicht zu finden. Die zu untersuchenden Antigene auf den Epithelzellen in den malignen Pleuraergüssen der Mamma- und Bronchialkarzinomzellen sind in Tabelle 1.4 zusammengefasst.

Antigen	Bezeichnung	Literatur
<i>Prognose-assoziiert</i>		
CEA	Carcinoembryonales Antigen	Park BW et al. 2008; Uehara M et al. 2008, Egeling FG et al. 2002
E-Cadherin	E-Cadherin	Park D et al. 2007; Rakha EA et al. 2007
CD44 v6	CD4 v6	Auvinen P et al. 2005, Foekens J et al. 1999; Kaufmann M et al. 1995
UPA-R	Urokinase Plasminogen Aktivator-Rezeptor	Thomsson C et al. 2003, Rha SY et al 2000
PAI-1	Plasminogen Aktivator-Inhibitor	Foekens JA et al. 2000; Buo L et al. 1995, Pedersen H et al 1994
UPA	Urokinase Plasminogen Aktivator	Jänicke F et al 1993; Duffy MJ et al 1990
KI-67	KI-67	Jones RL et al 2008
<i>Therapie-assoziiert</i>		
MUC1	MUC1 Glykoprotein	Engelmann K et al 2008; Kurian S et al 2008
EGF-R	EGF-Rezeptor	Payne RE et al 2009; Heist RS et al 2009
Her-2	Her-2/neu Rezeptor	Duffy MJ et al 2008; Fischgräbe J et al 2008
ER	Östrogen-Rezeptor	Yamashita H et al 2008; Dowsett M et al 2008
PgR	Progesteron-Rezeptor	Hayashi SI et al 2003
Topoisomerase I	Topoisomerase I	Moulder S et al 2008
<i>Therapie-und prognose-assoziiert</i>		
EpCAM	Epitheliales Antigen	Witthauer J et al 2008, Baeuerle PA et al 2007 Spizzo et al 2004
EphrinA2	Ephrin A2 Rezeptor	Wykosky J et al 2008, Fang WB D et al 2005
<i>Chemoresistenz-assoziiert</i>		
P-Glykoprotein	P-Glykoprotein	Overmoyer B et al 2008; Coley HM et al 2008
bcl-2	Bcl-2 Onkoprotein	Bonetti A et al 1998
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein	Yuan JH et al 2008

Tabelle 1.4: Ausgewählte Antigene für die Charakterisierung der Pleurakarzinomzellen

1.6 Zielsetzung und Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist die zelluläre und molekulare Charakterisierung der malignen Pleuraergüsse beim Mammakarzinom und Bronchialkarzinom. Für die zelluläre Charakterisierung wird die zytologische Beschaffenheit der malignen Pleuraergüsse (MPE), sowie ihre zelluläre Zusammensetzung und die Immunzellcharakterisierung im Erguss berücksichtigt. Hierbei stellt sich die Frage, ob eine individuelle und tumorbedingte zelluläre Heterogenität nachzuweisen ist. Für die molekulare Charakterisierung der Karzinomzellen werden prognose-, therapie- und resistenzvermittelnde Antigene nachgewiesen. Aus der molekularen Charakterisierung der Karzinomzellen im MPE werden molekulare Therapiestrategien für die Therapie der Pleurakarzinose abgeleitet. Die ex vivo Therapie der MPE mit dem bispezifischen Antikörper gegen das epitheliale Antigen EpCAM und CD3 (MT110) soll zeigen, ob EpCAM ein geeignetes Zielantigen der Therapie der Pleurakarzinose darstellt. Des Weiteren wird die Wirkungsweise des Antikörpers MT110 auf die Tumorzellen und Immunzellen im Erguss bestimmt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenproben

Maligne Pleuraergüsse von 35 Mammakarzinompatienten und 18 Bronchialkarzinompatienten wurden innerhalb des Zeitraums von Januar 2004 bis Juli 2007 im Klinikum Großhadern gesammelt. Davon konnten auf Grund von ausreichend vorhandenem Zellmaterial 18 MPE der Mammakarzinompatienten und vier MPE der Bronchialkarzinompatienten näher charakterisiert werden.

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Material	Firma
1,5 ml Zentrifugenröhrchen	Eppendorf
50 ml Zentrifugenröhrchen	Falcon
96 Well Flachbodenplatten	Nunc
96 Well Flachbodenplatten, weiß, steril	Nunc
96 Well Spitzbodenplatte	Corning Incorporate
Brutschrank	Heraeus
Drainagebeutel, Drainageflasche	Reproline medical GmbH
Eindeckgläser 22 x 40mm	Menzel
Feuchte Kammer	Carl Roth
Glasküvetten 105x85x70	Carl Roth
Glasschiffchen 85x60x45	Carl Roth
Kryoröhrchen	Nunc
Mikrowelle	Siemens
Neubauer-Zählkammer	Pesce
Petrischale	Nunc
Schutzbrille	Neolab
Serologische Pipetten 1, 5, 10, 25 ml	Costar
Spritze 50 ml	BD
Super Frost Plus	Menzel

2. MATERIAL UND METHODEN

Zellkulturflasche 75cm ²	Nunc
-------------------------------------	------

2.1.3 Lösungen und Reagenzien

Lösungen/Reagenzien	Firma
1 x PBS w/o Mg ²⁺ und Ca ²⁺ pH=7,4	Gibco/Invitrogen
30% iges H ₂ O ₂	VWR
3-Amino-9-Ethylcarbazol = AEC	Sigma
7-AAD	BD
70 % Isopropanol	Apotheke Klinikum München Innenstadt
7-AAD	BD
AB-Serum	Biotest, Dreieich
Aceton zur Synthese	Merck
Aethylendianintetraessigsäure (EDTA)	Fluka
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Fluka
Caspase Glo-Assay	Promega
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Essigsäure 100 %	Merck
Ficoll	Sigma-Aldrich
Fötales Kälber Serum (FCS)	Gibco
Kaisers-Glycerin-Gelatine	Merck
Kalibrierungsbeads	BD
Kaliumchlorid	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Fluka
Lymphozyten Kit	BD
Mayer's Hämaun	Merck
N,N-Dimethylformamid	Fluka
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Sigma
Natriumchlorid	Fluka

2. MATERIAL UND METHODEN

Natriumhydrogenphosphat-1-hydrat	Merck
Natriumhydrogenphosphatdihydrat	Merck
NEAA (Non essential amino acids)	Gibco/Invitrogen
Paraformaldehyd	Sigma
Permeabilisierungskit	BD
Pikrinsäure	Fluka
RPMI-Medium 1640	Gibco/Invitrogen
Sodiumpyruvat	Gibco/Invitrogen
Toxilight-Assay	Cambrex
Trypanblaulösung 0,5 % (w/v)	Biochrom AG
Cytometric Bead Array Kit Human Th1/Th2 Cytokine CBA-II	BD

Zambonis Fixierung:

150 ml wässrige Pikrinsäure

+ 20 g Paraformaldehyd

Das Gemisch wird auf 60 °C erhitzt bis es vollständig gelöst ist (ca. 24h). Die Lösung mit 2N NaOH auf einen PH von 7 einstellen. Die Lösung wird filtriert und mit 0,15 M Phosphatpuffer (2.1.4) auf 1000 ml aufgefüllt.

Natriumacetat –Stammlösung:

28,7 g Natriumacetat + 50 ml Aqua dest.

+ 9,4 ml Essigsäure ad 100ml Aqua dest.

2.1.4 Puffer

Erylysepuffer:

8,92 g Ammoniumchlorid (NH₄Cl)

+ 0,029 g Kaliumhydrogencarbonat (KHCO₃)

+ 1 g Aethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

ad 1L Aqua dest.

FACS-Puffer:

500 ml 1 x PBS w/o Mg²⁺ und Ca²⁺
+ 5 ml FCS
+ 50 µl Natriumazid

1 x Waschpuffer :

1 ml 10 x Waschpuffer aus „Fixation und Permeabilization“ Kit
+ 9 ml Aqua dest

0,15 M Phosphatpuffer:

3,31 g Natriumhydrogenphosphat-1-hydrat
+ 22,2 g Natriumhydrogenphosphatdihydrat
ad 1L Aqua dest.

2.1.5 Medien

Einfriermedium:

4,5 ml RPMI 1640 Medium
+ 4,5 ml FCS
+ 1 ml DMSO

Kulturmedium für Zelllinien:

500 ml RPMI 1640 Medium
+ 37,5 ml FCS

Kulturmedium für Pleuraergüsse:

500 ml RPMI 1640 Medium
+ 10 ml FCS
+ 1 ml NEAA
+ 1 ml Natriumpyruvat

2.1.6 Antikörper für ABC Methode für Kryohistologie

Antikörper	Isotyp	Klon	Firma/Ort	Arbeits- konzentration µg/ml	Sekundär- system
Isotypkontrollen					
IgG1 anti Maus	IgG1	MOPC-21	Sigma	10 20	SA Kit
IgG2a anti Maus	IgG2a	UPC-10	Sigma	0,5 1,2 10 20	Kit SA Kit Kit
Kaninchenserum			Sigma	2	Kit
Antikörper anti human					
Pan Zytokeratin	IgG1	KL-1	Beckman Coulter	0,32	SA
Vimentin	IgG2a	Vim3B4	Dako	1,2	SA
Calretinin	IgG2a	Z11-E3	Invitrogen	10	Kit
Epitheliales Antigen	IgG1	BerEP4	Dako	5	SA
CD45	IgG1	T200	Dako	4,5	SA
CEA	IgG1	CEA	Micromet	8,8	SA
E-Cadherin	IgG1	NCH-38	Dako	1,8	SA
Ephrin A2	IgG1	B233	Micromet	3,53	SA
MUC1	IgG1	MA552	Dako	0,25	SA

2. MATERIAL UND METHODEN

Antikörper	Isotyp	Klon	Firma	Arbeitskonzentration µg/ml	Sekundär system
CD44 v6	IgG1	VFF-18	Bender MedSystems	1	SA
UPA	IgG1	31-9	American Diagnostica	2	SA
UPA-R	IgG2a	3/B10	American Diagnostica	20	Kit
PAI-1	IgG1	5PAI	American Diagnostica	20	SA
ER	IgG1	1D5	Dako	10	Kit
PgR	IgG1	PgR636	Dako	1,44	SA
HER/2-neu	IgG1	CB11	Novocastra	0,26	SA
EGF-R	IgG1	H11	Dako	3,07	SA
Bcl2	IgG1	124	Dako	2,6	SA
TOPO1	IgG2b	1D6	Novocastra	0,36	Kit
P-Glykoprotein	IgG2a	UIC-2	Millipore	1	Kit
BCRP	IgG1	BXP-34	Signet	5	SA
KI-67	IgG1	MIB-1	Dako	1,1	SA
Kaninchen Antikörper anti human					
CD3	--	polyklonal	Dako	2	Kit

2. MATERIAL UND METHODEN

Sekundärantikörper	Isotyp	Firma/Ort	Arbeits- konzentration µg/ml
Kaninchen anti-Maus biotinyliert	IgG Gesamt- molekül	Dianova	0,35
Ziege anti-Kaninchen biotinyliert	IgG Gesamt- molekül	Dianova	0,3
Streptavidin Peroxidase konjugiert	-	Dianova	1
Kit: Biotinylierter Breitbandantikörper	IgG Breitspektrum	Zymed Invitrogen	gebrauchsfertig
Kit: Streptavidin Peroxidase konjugiert	-	Zymed Invitrogen	gebrauchsfertig

* SA = Sekundärantikörper anti Maus/anti Kaninchen Biotin; Streptavidin-Peroxidase
Kit = ABC (Avidin-Biotin Komplex)-Detektionskit der Firma Invitrogen/Zymed

2.1.7 Antikörper Durchflußzytometrie

Antikörper	Isotyp	Klon	Firma	Arbeitskonzentration in µg/ml
Isotypkontrollen				
IgG1 APC	IgG1	MOPC-21	BD	0,6
IgG1 APC	IgG1	MOPC-21	BD	0,7
IgG1 FITC	IgG1	MOPC-21	BD	0,3
IgG1 FITC	IgG1	MOPC-21	BD	1,9
IgG1 PE	IgG1	MOPC-21	BD	0,25
IgG1 PE	IgG1	MOPC-21	BD	0,7
IgG1 PerCP	IgG1	MOPC-21	BD	0,2
Lymphozyten Kit:			BD	5 µl / Test
IgG1 FITC/IgG2a PE	IgG1/IgG2a	X40/X39	BD	
CD45 FITC/CD14 PE	IgG1/IgG2a	2D1/MOP9	BD	
CD3 FITC/CD4 PE	IgG1/IgG2a	SK7/SK3	BD	
CD3 FITC/CD8 PE	IgG1/IgG2a	SK7/SK1	BD	
CD56 FITC/CD16 PE	IgG1/IgG2a	B73.1/MY31	BD	
CD3 FITC	IgG1	UCHT1	BD	
CD3 PE	IgG1	UCHT1	BD	0,7
CD4 FITC	IgG1	RPA-T4	BD	1,9
CD8 PERCP	IgG1	SK-1	BD	0,2
CD25 APC	IgG1	M-A251	BD	0,7
EpCAM APC	IgG1	EBA-1	BD	0,6
Granzym B PE	IgG1	GB11	Caltag	0,25

2.1.8 Geräte

Gerät	Firma	Gerätetyp
FACS-Gerät	BD	FACS-Calibur
Luminometer	Tecan	SpectraFluorPlus
Mikroskop	Zeiss	X50
Mikroskop	Olympus	BX40
Mikrowelle	Electrolux	Typ NF4061
pH-Meter	WTW	pH523
Schüttler	HT	MTS4
Sterilwerkbank	Gelaire	BSB6A
Wasserbad	GFL	GFL
Zentrifuge	Hettich	Roto Silenta/RP
Zytozentrifuge	Shendon	Zxtospin 2
-80°C Gefrierschrank	Heraeus	Hera Freeze
Stickstofftank	Air Liquide	Arpege 110

2.2 Methoden

2.2.1 Pleuraergussgewinnung

Maligne Pleuraergüsse von 35 Patientinnen mit einem metastasierten Mammakarzinom und als Vergleichskollektiv von 18 Patienten mit einem Bronchialkarzinom konnten unter standardisierten Bedingungen mittels einer therapeutisch indizierten Entlastungspunktion gewonnen werden (Ethik Nr. 278/04). Hierbei wurde ein Drainageschlauch in die Pleurahöhle eingeführt, um die im Pleuraspalt vorhandene Flüssigkeit zu erhalten. Die Gewinnung erfolgte steril in eine Spritze (20 ml, 100 ml) oder in eine Drainageflasche bzw. – beutel. Die zytologische Befunderhebung erfolgte durch das pathologische Institut in München, Großhadern.

2.2.2 Isolation der Pleuraergusszellen

Vor der Isolation der Pleuraergusszellen wurde ein Milliliter der Ergussflüssigkeit steril entnommen und in einer Petrischale unter dem Mikroskop analysiert. Bestand der Erguss neben Einzelzellen auch aus Aggregaten so wurden diese nach ihrem Durchmesser vermessen. Für die Vermessung der Aggregate wurde eine Skalierung im linken Okular des Mikroskops verwendet. Bei einer 100-fachen Vergrößerung des Objekts (Okular und Objektiv mit jeweils einer zehnfachen Vergrößerung) entsprach ein Teilstrich der Skalierung einem Wert von 10 μm . Die unterschiedlichen Größen der im Erguss vorhandenen lockeren und kompakten Aggregate wurden auf diese Weise erfasst und dokumentiert.

Die Isolation der Pleuraergusszellen erfolgte steril und unter standardisierten Bedingungen. Die Pleuraergussflüssigkeit wurde entweder aus der Drainageflasche bzw. dem Drainagebeutel in 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert oder die Spritze wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen entleert. Danach wurde die Pleuraergussflüssigkeit für 15 Minuten bei 250g zentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsschritt wurde ein Milliliter des Überstand in eine Petrischale pipettiert und unter dem Mikroskop kontrolliert. Falls sich noch Zellen im Überstand befanden wurde dieser erneut in 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt und für 15 Minuten bei 350g abzentrifugiert. Die gewonnenen Zellpellets der zwei Fraktionen wurden in 50 ml 1 x PBS w/o Ca^{2+} und Mg^{2+} resuspendiert, in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt und erneut bei 300g für 12 Minuten abzentrifugiert. Falls das gewonnene Zellpellet auf Grund eines hohen Erythrozytengehalts rötlich verfärbt war, so wurde eine Erylyse durchgeführt. Der Erylysepuffer wurde in einem Verhältnis von zehn zu eins eingesetzt d.h. es wurde ein Teil Zellsuspension (z.B. zwei Milliliter) mit neun Teilen Erylysepuffer (z.B. 18 ml) vermischt und bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Die Suspension wurde in dieser Zeit mehrmals sanft geschüttelt und geschwenkt. Färbte sich während der Inkubationszeit der ursprünglich farblose Erylysepuffer rötlich so konnte das auf die Lyse der Erythrozyten zurückgeführt werden. Die Reaktion wurde nach 15 Minuten mit 30 ml 1 x PBS gestoppt und das Röhrchen wurde bei 300 g für 12 Minuten abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Pellet erneut in 1 x PBS aufgenommen. Das Volumen der PBS-Lösung variierte je nach Pelletgröße zwischen einem und 30 ml. Aus dieser Zellsuspension erfolgte mit Hilfe der Neubauerzählkammer die Zellzählung und Vitalitätsbestimmung (siehe 2.2.3)

2.2.3 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Dem PBS-Zellgemisch wurden 20 µl entnommen und für die Vitalitätsbestimmung eins zu eins mit 20 µl einer 0,5 % igen Trypanblaulösung (w/v) versetzt. Das Trypanblau diffundiert in beschädigte und tote Zellen und färbt diese sichtbar im Zytoplasma und Zellkern blau. Nach fünf Minuten Inkubationszeit wurden 20 µl des Trypanblau-Zellgemischs in die Neubauerzählkammer pipettiert. Die Zellzählung und Vitalitätsbestimmung erfolgte unter dem Mikroskop bei einer 100-fachen Vergrößerung (Okular und Objektiv zehnfach). Alle vier Eckfelder die aus 16 Einzelquadraten bestehen wurden ausgezählt. Es wurden alle Zellen innerhalb der Quadrate gezählt. Pro Quadrat wurden die gleichen zwei Grenzlinien ausgewählt. Zellen, die auf diesen Grenzlinien lagen wurden in die Zählung eingeschlossen. Die vitalen ungefärbten und toten blaugefärbten Zellen wurden separat gezählt. Die jeweils ermittelte Zellzahl wurde durch die Zahl vier geteilt um den Mittelwert zu bestimmen. Danach wurde das Ergebnis mit der Zahl zwei multipliziert, um den Verdünnungsfaktor durch das Trypanblau einzurechnen. Dieses Ergebnis wurde mit dem Volumen des PBS-Zellgemischs aus dem die 20 µl entnommen wurden und dem Kammerfaktor (x 10.000) multipliziert. Der Anteil der vitalen Zellen wurde folgendermaßen bestimmt:

Zellzahl der vitalen Zellen + Zellzahl der toten Zellen = Summe Y

Anteil der vitalen Zellen = Zellzahl der vitalen Zellen / Summe Y x 100

Nach der Zellzählung und Vitalitätsbestimmung wurden in Abhängigkeit von der zuvor bestimmten Zellzahl Zytospinpräparate hergestellt und die Pleuraergusszellen wurden kryokonserviert.

2.2.4 Anfertigung von Zytospins

Nach der Isolation, Zellzählung und Vitalitätsbestimmung der Pleuraergusszellen wurden bei ausreichend vorhandenem Zellmaterial für die immunzytochemische Charakterisierung der Pleuraergusszellen 30 Zytospinpräparate angefertigt. Die frisch isolierten Zellen wurden auf spezielle Glasobjektträger (Super-Frost Plus) mit einer verstärkt-adhäsiven Oberfläche mittels einer Zytocentrifuge aufgebracht. Für 30 Präparate wurden 1,5 Millionen Pleuraergusszellen benötigt die in 1 x PBS mit einem Volumen von drei Milliliter resuspendiert wurden. Pro Zytospinpräparat wurden 50.000 Zellen (in 100 µl) eingesetzt und für fünf Minuten bei 500

Umdrehungen pro Minute auf die Glasobjektträger zentrifugiert Die Zytospins wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und bei – 80°C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

2.2.5 Kryokonservierung und Auftauen der Ergusszellen

Um die gewonnene Zellfraktion aus jedem Pleuraerguss nach der immunzytologischen Antigencharakterisierung für die ex vivo Therapie zu verwenden, wurden die Pleuraergusszellen bis zu ihrer Weiterverwendung in Flüssigstickstoff kryokonserviert. Das Einfrieren der Zellen erfolgte nach einem standardisierten Protokoll. Die Zellen wurden in eisgekühltem Einfriermedium aufgenommen und in spezielle zwei Milliliter Kryoröhrchen bei -80°C eingefroren. In einem Kryoröhrchen wurden bis zu zehn Millionen Zellen in maximal zwei Milliliter Einfriermedium konserviert. Die Pleuraergusszellen wurden nach einer Lagerungszeit von mindestens 24h bei -80°C in flüssigen Stickstoff überführt. Für das Auftauen der Ergusszellen wurde das erforderliche Kryoröhrchen wurde aus dem Stickstofftank entfernt und nach gründlichem Absprühen mit 70 % Isopropanol im Wasserbad (37°C) durch sanftes schwenken aufgetaut. Das Tragen einer Schutzbrille war während des gesamten Auftauvorgangs nötig. Die Zellen wurden so lange im Wasserbad geschwenkt bis diese bis auf einen etwa kirschkerngroßen Rest im Kryoröhrchen aufgetaut waren. Das Röhrchen wurde erneut mit 70 % Isopropanol abgesprüht und die Zellsuspension wurde zügig in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen in das 30 ml Kulturmedium vorgelegt war, pipettiert. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 12 Minuten bei 250 g. Das gewonnene Zellpellet wurde erneut in Kulturmedium resuspendiert und die Zellen konnten für die weiteren Versuche (2.2.6; 2.2.7) verwendet werden.

2.2.6 Immunhistochemische Methoden

2.2.6.1 Charakterisierung der Pleuraergusszellen mittels der ABC-Methode

Für die immunzytologische Charakterisierung ausgewählter Antigene auf den Zytospinpräparaten der Pleuraergusszellen wurde für jedes Antigen eine geeignete Zelllinie als Positivkontrolle ausgewählt. Als geeignete Positivkontrolle sollte diese das

2. MATERIAL UND METHODEN

nachzuweisende Antigen mit einem Anteil von $\geq 60\%$ exprimieren (siehe Tabelle eins). Die in Flüssigstickstoff gelagerten Zelllinien wurden aufgetaut (2.2.5) und in einer 75 cm² Zellkulturflasche mit Kulturmedium im Brutschrank bei 37°C und fünf Prozent CO₂ kultiviert. Bei einer Konfluenz von 80% bis 100 % wurden die Zellen nach einem standardisiertem Protokoll abgelöst. Die Zelllinien wurden mit sieben Milliliter einer ein mmolaren EDTA-Lösung in einer T75 Zellkulturflasche für zehn bis 20 Minuten vom Flaschenboden abgelöst. Die Ablösezeit variierte je nach Zelllinie. Der Fortschritt der Zellablösung wurde in kurzen Zeitabständen im Mikroskop kontrolliert. Die Reaktion wurde mit demselben Volumen an Kulturmedium (sieben Milliliter) abgestoppt, die Zellen wurden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt, abzentrifugiert (250 g, zehn Minuten, RT) und ihre Zellzahl sowie Vitalität wurde bestimmt (2.2.3). Ein Vorrat an Zytospinpräparaten (2.2.4) wurde angefertigt und bei -80°C gelagert.

Positivkontrolle für Antigen	Zelllinie	Herkunft	ATCC-Nr.
Zytokeratin, Vimentin	SK-BR-3	maligner Pleuraerguss eines Mammakarzinoms	HTB-30
Epitheliales Antigen, CEA, E-Cadherin, Ephrin A2, CD44 v.6, EGFR, KI-67	HT-29	Kolorektales Karzinom	HTB-38
CD45, CD3, Bcl2	HL-60	Akute promyeloische Leukämie	CCL-240
MUC-1, PgR,	T47D	maligner Pleuraerguss eines duktales Mammakarzinoms	HTB-133
Her2-neu	N87	Magenkarzinom, Metastase aus der Leber	CRL-5822
BCRP	Caco-2	Kolorektales Karzinom	HTB-37
Topoisomerase 1	HeLa	Cervixkarzinom	CCL-2
ER	T47D	maligner Pleuraerguss eines duktales Mammakarzinoms	HTB-133
UPA, UPAR, PAI-1	OV-10	Labor Professor Magdolen TU München, Rechts d. Isar	keine
Patientengewebe			
P-Glykoprotein	Mukosa Kolon	Patientennummer 3838	keine

Tabelle 2.2.6: Antigene und die jeweiligen Zelllinien und Gewebe, die als Positivkontrolle für die nachzuweisenden Antigene verwendet wurden. Die Zelllinien bzw. das Gewebe wurde auf Zytospinpräparate aufgebracht und mittels der ABC-Methode immunzytologisch mit dem jeweiligen Antikörper gefärbt.

Die immunhistochemische Detektion ausgewählter Antigene (2.1.6) auf den Pleuraergusszellen und den jeweiligen Positivkontrollen (siehe Tabelle 2.2.6) erfolgte mittels der ABC- Methode (Avidin-Biotin Komplex) auf Zytospinpräparaten. Bei dieser Methode wird ein biotinylierter, gegen die Spezies (z.B. Maus oder Kaninchen) des Erstantikörpers gerichteter Zweitantikörper eingesetzt, der einen Komplex mit Streptavidin-Peroxidase eingeht. Durch die anschließende Reaktion der Peroxidase mit dem Reagenz Aminoethylcarbazol (AEC) in der Färbelösung entsteht eine spezifische Farbreaktion, die sich in einer rötlich-braunen Farbe äußert. Die jeweiligen Isotypkontrollen für die Primärantikörper sind in Tabelle zwei aufgeführt. In Vorversuchen wurde die Arbeitskonzentration in $\mu\text{g/ml}$ für jeden Antikörper ausgetestet. Außerdem wurde festgelegt ob der Nachweis des Antikörpers mit oder ohne einem signalverstärkenden Kit (Invitrogen) erfolgt. Die Nachweismethode des Kits beruht auf demselben Prinzip wie die ABC-Methode, verstärkt jedoch die Farbreaktion um ein vielfaches.

Für die immunzytochemische Charakterisierung der Zytospinpräparate wurden diese aus dem -80°C Gefrierschrank aufgetaut und für zehn Minuten bei Raumtemperatur (RT) getrocknet. Danach erfolgte die Fixierung der Präparate für acht Minuten in Aceton bei RT. Für den Antikörper gegen das Antigen Topoisomerase I mussten die Präparate mittels Zambonis Lösung für zehn Minuten fixiert werden. Nach Lufttrocknung für weitere acht Minuten bei RT wurden die Präparate in die feuchten Kammern überführt damit eine spätere Austrocknung während der Färbung verhindert wird. Die Fc-Blockade auf den Pleuraergusszellen und Positivkontrollen erfolgte mit jeweils $100\ \mu\text{l}$ eines zehn prozentigen 1xPBS/AB-Serum Gemischs für 15 Minuten. Danach folgte nach Abkippen des PBS/AB-Serums auf ein Stofftuch die Inkubation des Primärantikörpers für 60 Minuten. Die Primärantikörper und ihre jeweiligen Isotypkontrollen wurden in der erforderlichen Arbeitskonzentration in zehn prozentigem PBS/AB-Serum angesetzt (2.1.6). Auf jedes Präparat wurden $100\ \mu\text{l}$ des jeweiligen Antikörpers pipettiert. Nach der Antikörper-Inkubation wurden die Präparate dreimal für fünf Minuten in $1\ \times\ \text{PBS}$ ($\text{pH}=4,7$) gewaschen. Die Waschschrte erfolgten in Glasschiffchen in Glasküvetten. Nach dem letzten Waschschrte wurde der Glasobjektträger um das Präparat herum abgetrocknet und $100\ \mu\text{l}$ des biotinylierten Sekundärantikörpers inkubierten für 30 Minuten in der feuchten Kammer. Der biotinylierte Sekundärantikörper gegen die Spezies des Primärantikörpers anti Maus bzw. anti-Kaninchen (2.1.6) wurde in zehnprozentigem PBS/AB-Serum angesetzt. Der für fünf der 22 Antigene

2. MATERIAL UND METHODEN

erforderliche Kit (2.1.6) wurde unverdünnt für zehn Minuten eingesetzt. Danach erfolgte nach drei weiteren Waschschritten mit 1 x PBS die Inkubation von 100 µl des in zehn prozentigem PBS/AB-Serum verdünnten Peroxidase gekoppelten Streptavidins für 30 Minuten. Das Kit wurde unverdünnt für zehn Minuten eingesetzt. Danach wurden die Präparate erneut für 15 Minuten in 1 x PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschriff wurden die Präparate in Glasküvetten für sechs Minuten auf einem Schüttler mit der AEC-Färbelösung inkubiert. Die AEC Färbelösung wurde kurz vor der Entwicklung der Präparate frisch hergestellt:

- a) 200 ml Aqua dest. + zwei Milliliter 100x Natriumacetat-Stammlösung
- b) Leicht schwenken.
- c) 50 mg 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) in fünf Milliliter N,N Dimethylformamid lösen
- d) **b) in a)** geben und leicht schütteln
- e) In Lösung b+a werden 100µl 30%iges H₂O₂ gegeben und Lösung wird erneut durch vorsichtiges Schwenken sorgfältig vermischt.

Nach der Entwicklung wurden die Objektträger für zehn Sekunden in Leitungswasser geschwenkt und für zehn Sekunden in frischer Hämalaunlösung, die die Zellkerne anfärbt, gegengefärbt. Um das Nachbläuen der Präparate zu ermöglichen, wurden diese für weitere fünf Minuten in Leitungswasser gespült und weitere zehn Minuten in Leitungswasser inkubiert. Das Eindecken der Präparate erfolgte mit Kaisers-Glycerin-Gelatine, die zuvor in der Mikrowelle (Stufe zwei) erwärmt und somit verflüssigt wurde.

Die Auswertung der Präparate erfolgte unter dem Mikroskop. Die für jedes Antigen anteilig positiv gefärbten Zellen in Prozent wurden im Vergleich zu der jeweiligen Isotypkontrolle semiquantitativ bestimmt. Der Anteil der für die tumorassoziierten Antigene positiv gefärbten Zellen in Prozent, wurde in Relation zu dem prozentualen Anteil der durch den Pan Zytokeratin Antikörper (Klon KL-1) identifizierten Epithelzellen auf den Zytospinpräparaten gesetzt. Auf diese Weise wurde die anteilige Expression der tumorassoziierten Antigene auf den Epithelzellen im Pleuraerguss bestimmt.

Beispiel: Bei einer Pleuraergussprobe wurden 30 % Epithelzellen identifiziert, die mit dem Antikörper anti-Pan Zytokeratin eins, zwei, fünf, sechs, sieben, acht, 11, 14, 16, 17 und 18 (Klon KL-1) angefärbt wurden. Der Nachweis des Östrogenrezeptors ER (Klon 1D5) ergab

15 % positiv gefärbte Pleuraergusszellen. Die anteilige Expression des Östrogenrezeptors auf den Epithelzellen lag somit bei 50 %.

Das Verhältnis der Effektorzellen (E: CD3⁺ Zellen) und der Targetzellen (T: EpCAM⁺ Zellen) im Erguss (E:T Ratio) wurde an Hand der immunhistochemischen Färbung auf den Zytospinpräparaten bestimmt, indem der prozentuale Anteil der im Erguss vorhandenen CD3⁺ Zellen durch den prozentualen Anteil der vorhandenen EpCAM⁺ Zellen im Erguss dividiert wurde.

2.2.6.2 Charakterisierung der Pleuraergusszellen mittels Durchflußzytometrie

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie (FACS= Fluorescence Activated Cell Sorting) ist die Expression zytoplasmatischer oder membranständiger Proteine bestimmbar. Diese Antigene werden mit einem spezifischen Erstantikörper markiert, der direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Diese Methode erlaubt die gleichzeitige Identifizierung von zwei bis vier Antigenen in einer Probe bei unterschiedlicher Fluorochrommarkierung der eingesetzten Antikörper. Die zu charakterisierenden fluorochrommarkierten Zellen werden in einem FACS-Gerät analysiert. Die Zellen werden durch eine Kapillare gesogen und an einem Laser vorbeigeleitet. Es gibt sechs Detektoren, die beim Vorbeifließen der Zellen zum einen die Streuung des Lichts und zum anderen die Fluoreszenz messen. Anhand der Streuung misst der FSC (Vorwärts-Scatter)-Detektor die Größe und der SSC (Seitwärts-Scatter)-Detektor die Granularität der Zellen. Die Fluoreszenz wird von vier weiteren Detektoren (Lasern) registriert. Detektor 1 erkennt eine Wellenlänge von 537 nm (FL-1, grün), Detektor 2 eine Wellenlänge von 597 nm (FL-2, orange), Detektor 3 eine Wellenlänge von 650 nm (FL-3, rot) und Detektor 4 eine Wellenlänge von 670 nm. Mit Hilfe der FACS-Analyse erfolgte eine Charakterisierung der Immunzellen im malignen Pleuraerguss, sowie die Bestimmung des E:T Ratios (E:CD3⁺; T: EpCAM⁺) Für die Charakterisierung der Immunzellen im Pleuraerguss wurde der „Simultest IMK Lymphocyte-Kit“ von BD Biosciences verwendet. Der Kit identifizierte über eine FITC/PE Doppelfärbung der Pleuraergusszellen, humane Leukozyten (CD45⁺/CD14⁻), Monozyten (CD45⁺/CD14⁺), T-Helfer Zellen (CD3⁺/CD4⁺), T-Supressorzellen (CD3⁺/CD8⁺) und natürliche Killerzellen (CD3⁻/CD16⁺/CD56⁺) im malignen Pleuraerguss. Als Negativkontrolle der Färbung wurden die Isotypkontrollen anti-Maus IgG1 FITC und IgG2a PE verwendet. Zusätzlich zu den im Kit vorhandenen

Antikörpern wurde der Anteil aktiver T-Lymphozyten mit einem FITC-markierten Antikörper anti human-CD3 und einem APC-markierten Antikörper anti-human CD25 bestimmt, die mit den Isotypkontrollen anti-Maus IgG1 FITC und IgG1 APC kontrolliert wurden. Für die Bestimmung des E:T Ratios in der Pleuraergussprobe wurde eine Doppelfärbung mit dem APC-markierten Antikörper gegen das humane epitheliale Antigen EpCAM und einem PE-markierten Antikörper gegen das humane Lymphozytenantigen CD3 durchgeführt. Als Isotypkontrollen wurden der Antikörper anti-Maus IgG1 APC und IgG1 PE verwendet. Die frisch aufgetauten Pleuraergusszellen wurden gezählt und ihre Vitalität wurde bestimmt (2.1.7). Für die zelluläre Charakterisierung sowie die Bestimmung des E:T Ratios im Pleuraerguss wurden für jede Doppelfärbung 100.000 Zellen verwendet. Die immunzytologische Färbung erfolgte in 1,5 ml Zentrifugenröhrchen. Die 100.000 Zellen wurden jeweils in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Komponenten des Lymphozyten-Kits von BD waren gebrauchsfertig. Von jedem Antikörpergemisch des Kits wurden 5µl verwendet. Die Arbeitskonzentration der Antikörper konnte nicht berechnet werden, da die Firma BD die Stockkonzentrationen nicht preisgab. Die Detektion der CD3+/CD25+ Zellen im Erguss erfolgte mit 3 µl CD3 FITC (AK 0,3 µg/ml) und 4,8 µl CD25 APC (AK 0,7 µg/ml). Für die Bestimmung des E:T Ratios wurden die Zellen in 200 µl FACS-Puffer mit einem Mikroliter EpCAM APC (AK 0,6 µg/ml) und sechs Mikroliter CD3 PE (AK 0,7 µg/ml) gefärbt. Die Inkubationszeit der Antikörper betrug 50 Minuten. Danach erfolgten zwei Waschschrte mit jeweils einem Milliliter FACS Puffer. Nach dem letzten Waschschrte wurden die Zellen in 250 µl FACS Puffer für die Messung im FACS Calibur aufgenommen. Die Identifizierung von toten Zellen erfolgte mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff 7-AAD. Dieser wurde zu den zu messenden Proben mit einer Arbeitskonzentration von 1,5 µg/ml zehn Minuten vor der FACS-Messung pipettiert. Dies entsprach einem Volumen von 7,5 µl 7-AAD. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Cell Quest Pro Software.

2.2.7 Imitation der malignen Ergüsse

Für eine geeignete Dosisfindung und die Festlegung des ex vivo Behandlungszeitraums der MPE mit dem bispezifischen Antikörper MT110 sowie die Etablierung der ausgewählten Analysesysteme Caspase Glo und Toxilight wurde der maligne Pleuraerguss mit Hilfe einer malignen Zelllinie und peripheren Blutlymphozyten von gesunden Spendern imitiert. Die

Imitation des malignen Pleuraergusses ermöglichte die Einsparung des wertvollen Patientenmaterials. Hierfür wurden die 98 % EpCAM-positive Zelllinie HT-29 (ATCC Nr. HTB-38) und periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) von zwei gesunden Spendern verwendet. Um eine Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wurde die Zelllinie HT-29 expandiert und mehrere Aliquots einer Passage bis zu ihrer Verwendung kryokonserviert. Die PBMCs der Spender wurden mittels eines Ficoll-Gradienten gewonnen. Es wurde je Spender 40 ml Vollblut gewonnen, die eins zu eins mit 1 x PBS verdünnt wurden. In vier 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden jeweils 20 ml bei vier Grad Celcius gekühltes Ficoll vorgelegt. Jeweils 20 ml des Vollblut-PBS-Gemischs wurden sehr langsam mit einer 25 ml Pipette über das Ficoll gelegt. Die Zentrifugenröhrchen wurden bei 400 g für 20 Minuten bei vier Grad Celcius zentrifugiert. Die Bremse der Zentrifuge wurde ausgestellt, um eine Phasentrennung des Vollbluts zu ermöglichen. Nach der Ficollierung wurden die Röhrchen vorsichtig der Zentrifuge entnommen. Es ließ sich eine Trennung des Vollbluts in drei Phasen erkennen. Die oberste Phase mit Plasma, die weiße Interphase in der die peripheren mononukleären Zellen enthalten sind, sowie die unterste Schicht mit Ficoll und Erythrozyten. Das Plasma wurde verworfen, die Interphase vorsichtig abgesaugt und in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Es wurde darauf geachtet, dass beim Abnehmen der Interphase möglichst wenig Ficoll abgesaugt wurde, da dies toxisch für die Zellen ist. Nachdem alle Interphasen in den 50 ml Röhrchen gesammelt wurden, wurden diese mit 1 x PBS auf 50 ml aufgefüllt und bei 350 g für zehn Minuten abzentrifugiert. Es folgten zwei weitere Waschschriffe mit jeweils 40 ml 1 x PBS. Zwischen dem vorletzten und letzten Waschschriff wurden die Zellen in der Neubauerzählkammer gezählt, sowie ihre Vitalität mit 0,5 % Trypanblaulösung bestimmt. Die isolierten Zellen der Spender wurden miteinander gepoolt. Die HT-29-Zellen und peripheren Blutlymphozyten wurden in unterschiedlichen Verhältnissen vermischt. Folgende E:T Ratios (E: mononukleäre Zellen; T: EpCAM+ Zellen) wurden auf Grund der Ergebnisse der immunzytochemischen Charakterisierung der MPE hergestellt: 1:5; 1:1; 5:1; 25:1. Da die primären malignen Pleuraergüsse für die ex vivo Therapie aufgetaut wurden, wurden die Aliquots der imitierten Pleuraergüsse mit den verschiedenen E:T Ratios ebenso bis zu ihrer Verwendung kryokonserviert. Neben den verschiedenen E:T Ratios wurden auch Aliquots mit ausschließlich peripheren mononukleären Zellen kryokonserviert.

2.2.8 Ex vivo Therapie und Analyseverfahren

2.2.8.1 Zelllinie

Für die ex vivo Therapie der Zelllinie HT-29 wurden die unterschiedlichen E:T Ratios des HT-29 / PBMCs Gemischs (1:5, 1:1, 5:1, 25:1) aufgetaut und in Kulturmedium in 96 Well Flachbodenplatten ausgesät. Für jeden zu analysierenden Wert wurden Triplets eingesetzt. In jedem Well der Platte wurde eine anteilig konstante Zellzahl von 10.000 Target-Zellen (=EpCAM-positive Zellen) angestrebt, da dies die unterste Nachweisgrenze der Analysesysteme widerspiegelte und auf diese Weise eine Einsparung des Patientenmaterials ermöglicht wurde. In Abhängigkeit des E:T Ratios befanden sich somit minimal 12.500 Zellen (E:T 1:5) und maximal 250.000 Zellen (E:T 25:1) in dem jeweiligen Well. Das Volumen betrug unabhängig von dem eingesetzten E:T Verhältnis 100 µl. Es wurden je E:T Ratio drei Wells ausgesät die zu 100 % lysiert wurden und als Lysekontrolle dienten. Um zu bestimmen wie hoch der Hintergrund der mononukleären Zellen war wurden diese je E:T Ratio als Triplets eingesät und dienten ebenso als 100% Lysekontrolle. Bei einem E:T Ratio von z.B. 1:5 wurden 2500 der mononukleären Zellen eingesät. Bei einem E:T Ratio von z.B. 25:1 wurden 240.000 der Effektorzellen eingesetzt. Um das Hintergrundsignal, das durch das AK Detektionsreagenz bedingt war zu bestimmen wurden drei Wells nur mit dem Kulturmedium ohne Zellen belegt. Die E:T Ratios 1:5, 1:1 und 5:1 wurden mit 100, 1000 und 10.000 ng/ml MT110 ex vivo therapiert. Die Proben mit einem sehr hohen Anteil an Effektorzellen (E:T Ratio 25:1) wurden zusätzlich mit zehn ng/ml MT110 therapiert. Als Kontrollen wurden neben der Mediumkontrolle (MK), spezielle bispezifische Antikörper (Mec, α EpCAM) verwendet die jeweils in der höchsten MT110 Konzentration von 10.000 ng/ml eingesetzt wurden (siehe Tabelle 2.2.8)

Bispezifischer Antikörper	Zielantigen	Isotyp	Firma	Bezeichnung
MT110	anti-human EpCAM anti-human CD3		Micromet	therapeutischer Antikörper
muS110	anti-maus EpCAM anti-maus CD3		Micromet	Kontrollantikörper
Mecoprop (Mec)	anti-human CD3 anti-maus EpCAM		Micromet	Kontrollantikörper
α EpCAM	anti-human EpCAM anti-maus CD3		Micromet	Kontrollantikörper

Tabelle 2.2.8: Für die ex vivo Therapie der imitierten und primären malignen Pleuraergüsse verwendete Antikörper.

Es wurden mit Hilfe des Toxilight-Assays (Cambrex) und des Caspase Glo Assays (Promega) die Zeitpunkte 24h, 48h und 72h gemessen. Für jede MT110 Konzentration und jeden Zeitpunkt wurde die durch den Antikörper induzierte lytische sowie apoptotische Wirkung auf die malignen Zellen mit Hilfe des Toxilight- und Caspase Glo-Assays erfasst und dokumentiert. Das Analyseverfahren für die beiden Assays konnte kombiniert werden. Für beide Assays wurde ein und dieselbe 96 Well Platte angesetzt. Anhand dieser Ergebnisse der ex vivo Therapie der imitierten Pleuraergüsse ließ sich eine für die ex vivo Therapie der Pleuraergüsse geeignete Dosisfindung und ein entsprechender Behandlungszeitraum ableiten.

2.2.8.2 Maligne Pleuraergüsse

Für die ex vivo Therapie der malignen Pleuraergüsse mit MT110 und die Analyse mit dem Toxilight- und Caspase Glo-Assay wurden die Ergussproben aufgetaut und in Dupletts in eine 96 Well Flachbodenplatte ausgesät. Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter humanisierten Bedingungen bei 37°C und fünf Prozent CO₂ im Brutschrank. Wie in den Vorversuchen mit der Zelllinie HT-29 wurde auf den Einsatz von 10.000 Targetzellen in jedem Well geachtet.

Die Zellmenge für jedes Well wurde anhand des immunzytologisch auf Zytospins gewonnenen E:T Ratios (Verhältnis der CD3+ Effektorzellen zu EpCAM+ Targetzellen) berechnet. Lag von einer Pleuraergussprobe z.B. ein E:T Ratio von eins zu eins vor, so wurden pro Well 20.000 Zellen ausgesät. Bei einem E:T Ratio von z.B. sieben zu eins wurden pro Well 70.000 Zellen verwendet. Zwei Wells mit Pleuraergusszellen wurden für den Toxilight-Assay als 100 % Lysekontrolle verwendet. Um das Hintergrundsignal, das durch das AK Detektionsreagenz (Toxilight Assay) bedingt war zu bestimmen, wurden jeweils zwei Wells nur mit Kulturmedium ohne Zellen belegt. Nachdem sich die Zellen über Nacht erholt hatten, wurden die malignen Ergussproben je nach Verfügbarkeit des Patientenmaterials für maximal drei Zeitpunkte (24h, 48h, 72h) ex vivo mit den nach den Vorversuchen ausgewählten MT110 Konzentrationen 10, 100 und 1000 ng/ml therapiert. Als Kontrollen wurden wie in den Vorversuchen neben dem Kulturmedium (MK) die Kontrollantikörper Mec und α EpCAM mit 1000 ng/ml verwendet (Tab. 2.2.8). Die Auswertung der durch den Antikörper MT110 bedingten Lyse und der freigesetzten aktiven Caspasen drei und sieben erfolgte mit dem Toxilight- und dem Caspase Glo Assay.

2.2.8.3 Toxilight-Assay

Der Toxilight-Assay ermöglicht die Messung der Adenylatkinase, die von zerstörten Zellen freigesetzt wird und im Zellkulturmedium nachweisbar ist. Das freigesetzte Enzym phosphoryliert ADP zu ATP. Das ATP reagiert mit dem luziferasehaltigen AK Detektionsreagenz unter Lichtfreisetzung d.h. unter Abgabe von Photonen. Je größer die im Medium enthaltene Adenylatkinase-Konzentration desto stärker ist die Lichtfreisetzung. Die Stärke des Lichts ist in einem Luminometer messbar (Abb. 2.2.8.3).

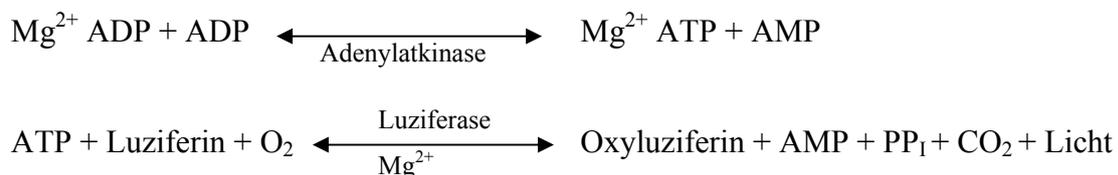


Abb. 2.2.8.3: Prinzip des Toxilight-Assays

2. MATERIAL UND METHODEN

Die Durchführung des Toxilight-Assays erfolgte nach einer standardisierten Arbeitsanweisung. Der Kit bestand aus dem AK Detektionsreagenz (AKDR), dem AK Assaypuffer und dem Toxilight 100 % Lysereagenz. Die Komponenten wurden vor Gebrauch auf Raumtemperatur equilibriert. Das AKDR wurde in 20 ml des AK Assaypuffers unter vorsichtigem Schütteln aufgelöst. Das gelöste AKDR war bei -20°C stabil und konnte auf diese Weise bis zu 24 Monaten in Aliquots bei -20°C gelagert werden. Ein und Auftauschritte wurden vermieden, da dies ein Signalverlust des Reagenz zur Folge hatte. Das 100 % Lysereagenz war nach der Equilibrierung gebrauchsfertig. Das Lysereagenz lysiert alle im Well vorhandenen Zellen vollständig. Der auf diese Weise enthaltene Wert entsprach einer 100% igen Adenylatkinasefreisetzung und somit 100 % Zelltod im Well. Dieser Wert wurde als Bezugsgröße verwendet, um den lytischen Effekt von MT110 zu berechnen. Die zu messende 96 Well Platte wurde dem Brutschrank entnommen und für fünf Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt. Aus den Wells die zu 100 % lysiert werden sollten wurden sehr vorsichtig 40 µl des Überstands entnommen und 40 µl des 100% Lysereagenz pipettiert (Endvolumen 100 µl). Die Inkubationszeit bis zur vollständigen Lyse der Zellen betrug 15 Minuten. Währenddessen wurden die Zellen im Well leicht auf- und abpipettiert. Aus jedem zu messenden 96 Well wurden 20 µl des Mediumüberstands entnommen und in eine weiße sterile undurchsichtige 96-Flachbodenplatte pipettiert. Jeweils 100 µl des AKD-Reagenz wurde mit einer Multikanalpipette in jedes Well pipettiert (Endvolumen 120 ml). Die Platte wurde für 30 Sekunden auf einem Schüttler bei 70 g vorsichtig gemischt. Die Inkubationszeit betrug fünf Minuten bei Raumtemperatur (RT). Danach erfolgte die Messung des Lumineszenzsignals im Luminometer. Für das Luminometer wurden mit der von Tecan bereitgestellten Software „XFluor 4“ spezielle Parameter für die Messung der Lumineszenz ausgewählt: Nachdem der Lumineszenz Modus aktiviert wurde, wurde die Messzeit jedes einzelnen Wells der Platte auf 1000 ms festgelegt. Die Messtemperatur betrug 22 °C bei einem Verstärkungsgrad („gain“) von 150. Nachdem alle Einstellungen vorgenommen wurden konnte die Platte im Luminometer gemessen werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

Berechnung des Anteils der lysierten Zellen im Well (Zelllinie):

1. Alle gemessenen Signale – Hintergrundsignal von AKD-Reagenz = X
2. $100 \% \text{ Lyse Signal von HT29/PBMCs Gemisch} - 100 \% \text{ Lysesignal der Effektorzellen} = \text{Lyse Signal der Targetzellen} = Y$
3. Signale der Kontrollen (Mediumkontrolle MK, Mec und α EpCAM) : $Y \times 100 = \text{Lyse der Targetzellen in } \%$
4. Signale der MT110 therapierten Wells : $Y \times 100 = \text{Lyse der Targetzellen in } \%$
5. Finale Werte: Signale der Kontrollen Mec und α EpCAM bzw. der ex vivo therapierten Wells - Signal der Mediumkontrolle

Berechnung des Anteils der lysierten Zellen im Well (maligne Pleuraergüsse):

Im Gegensatz zu dem Analyseverfahren mit den imitierten Pleuraergüssen, konnten für die primären Ergussproben die autologen Effektorzellen nicht alleine ausgesät werden. Der Anteils der lysierten Zellen im Well wurde deswegen wie folgt berechnet:

1. Alle gemessenen Signale – Hintergrundsignal von AKD-Reagenz = X
2. $100 \% \text{ Lyse Signal der Pleuraergusszellen} = Y$
3. Signale der Kontrollen (Mediumkontrolle MK, Mec und α EpCAM) : $Y \times 100 = \text{Lyse der Pleuraergusszellen der Kontrollen in } \%$
4. Signale der MT110 therapierten Wells : $Y \times 100 = \text{Lyse der therapierten Pleuraergusszellen in } \%$
5. Finale Werte: Signale der Kontrollen Mec und α EpCAM bzw. der ex vivo therapierten Wells - Signal der Mediumkontrolle

Anhand der für die primären Ergüsse erhaltenen Ergebnisse wurde entschieden, ob das Analysesystem Toxilight für die MPE geeignet war.

2.2.8.4 Caspase Glo- Assay

Der Caspase Glo Assay funktioniert wie der Toxilight-Assay nach dem Prinzip der messbaren Chemolumineszenz. Mit Hilfe von Caspase-Glo können apoptotische Zellen detektiert werden indem die Aktivität der Caspasen drei und sieben gemessen werden. Nach der Zugabe des Caspase Glo 3/7 Reagenz zu den Zellen werden diese lysiert. Bei vorhandenen durch die Lyse freigesetzten aktiven Caspasen drei und sieben spalten diese das Substrat auf, das mit der im Reagenz vorhandener Luciferase reagiert und Licht wird freisetzt (Abb. 2.2.8.4). Die Stärke der Lichtfreisetzung ist proportional zum Anteil der in den Zellen aktiven Caspasen. Diese Lichtfreisetzung ist in einem Luminometer detektierbar.

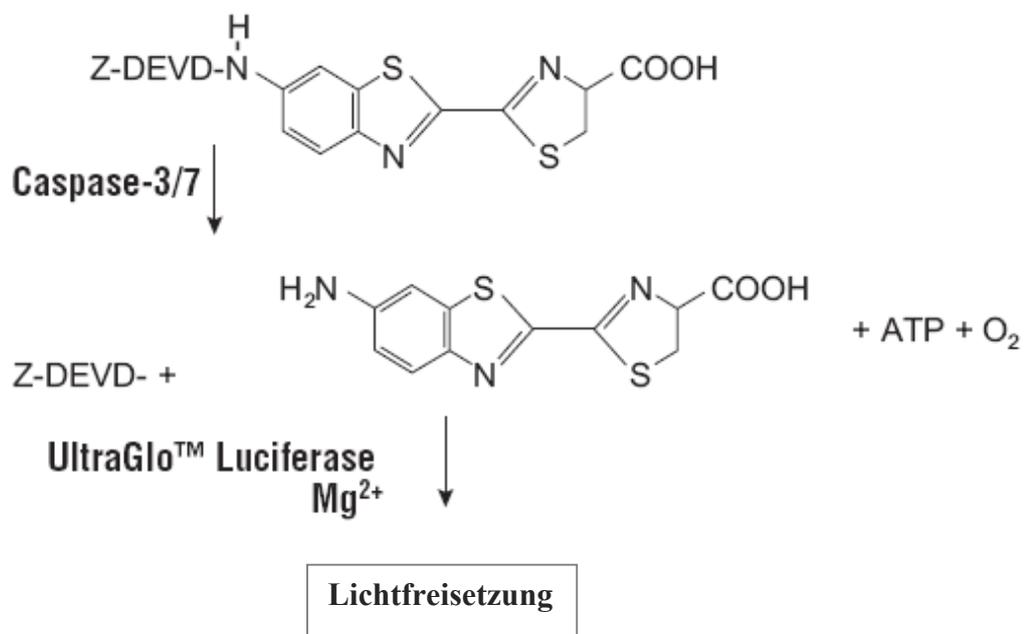


Abb. 2.2.8.4: Prinzip des Caspase Glo-Assays

Die Durchführung des Caspase-Assays erfolgte nach einer standardisierten Arbeitsanweisung. Der im Caspase Glo Assay vorhandene Caspase Glo 3/7 Puffer und das pulverisierte Caspase Glo 3/7 Substrat wurden auf Raumtemperatur equilibriert. Zehn Milliliter des Caspase Glo Puffers wurden in das Caspase Glo Substrat pipettiert und unter vorsichtigem Schütteln vollständig gelöst (=Caspase Glo Reagenz). Die empfohlenen Lagerungsbedingungen des

Caspase Glo Reagenz waren bei -20°C in Aliquots um erneutes Ein- und Auftauen des Substrats zu vermeiden. Die zu messende 96 Well Platte wurde für fünf Minuten auf Raumtemperatur equilibriert. Das Caspase Glo Reagenz wurde in einem Verhältnis von eins zu eins in den jeweiligen Wells eingesetzt. Da für die Analyse mit dem Toxilight – und Caspase Glo-Assay ein und dieselbe Platte verwendet wurde, wurden in jedes zu messende Well 80 μl Caspase Glo Reagenz pipettiert. Die Platte wurde lichtgeschützt abgedeckt und für eine Minute bei 70 g auf dem Schüttler gemischt. Die Inkubationszeit des Caspase Glo Reagenz betrug 90 Minuten. Währenddessen wurde die Platte alle 20 Minuten bei 70 g für 30 Sekunden auf dem Schüttler gemischt. Das Ausleseverfahren erfolgte in einem Luminometer. Die Einstellungen des Luminometers waren identisch zu den Einstellungen des Toxilight-Assays. Die anteilig zu der Mediumkontrolle erhöhte Caspase 3/7 Aktivität wurde wie folgt bestimmt:

1. Signal der Kontrollantikörper Mec und αEpCAM / Signal der Mediumkontrolle = Caspase 3/7 Aktivität für Mec und αEpCAM
2. Signal der ex vivo therapierten Proben / Signal der Mediumkontrolle = Caspase 3/7 Aktivität für MT110 therapierte Proben

Die Analyse der MPE nach MT110 Therapie erfolgte identisch zu der Analyse der imitierten Pleuraergüsse. Anhand der Ergebnisse wurde entschieden, ob der Caspase Glo-Assay als geeignetes Analysesystem für die MPE gewählt wurde.

2.2.8.5 Mikroskopaufnahmen

Eine visuelle Kontrolle der ex vivo Therapie erfolgte unter dem Mikroskop. Dabei wurde auf den zytotoxischen Effekt von MT110 auf die Pleurakarzinomzellen (Zunahme von Schrott, tote Zellen) sowie auf den stimulatorischen Effekt auf die Immunzellen geachtet (morphologische Veränderungen in Form und Größe, Rosettenbildung der Immunzellen und die Tumorzellen). Es wurden Mikroskopaufnahmen mit einer 100-, 200- und 400-fachen Vergrößerung zu verschiedenen Zeitpunkten der MT110-Therapie angefertigt.

2.2.8.6 Durchflußzytometrie

Als ein weiteres mögliches Analysesystem für den Nachweis der Effizienz von MT110 wurde die FACS-Analytik gewählt. Die aufgetauten Pleuraergusszellen wurden in Dupletts à 100.000 Zellen in eine 96 Well Flachbodenplatte ausgesät. Die Kultivierung erfolgte unter humanisierten Bedingungen bei 37°C und fünf Prozent CO₂ im Brutschrank. Nachdem sich die Zellen über Nacht erholt hatten wurde diese für 48h und 72h mit 0,1, 1, 10 und 1000 ng/ml MT110 ex vivo therapiert. Als Kontrollen wurden neben der Mediumkontrolle (MK) die Kontrollantikörper muS110, Mecoprop (Mec) und αEpCAM mit einer Konzentration von 1000 ng/ml verwendet (siehe Tabelle 2.2.8).

2.2.8.6.1 Nachweis der spezifischen Lyse durch MT110

Die Zytotoxizität von MT110 auf die Pleurakarzinomzellen nach ex vivo Therapie wurde mit Hilfe einer Fluoreszenzdoppelfärbung im FACS nachgewiesen. Hierfür wurde das Antigen EpCAM auf den Pleuraergusszellen mit einem Fluorochrom (APC) markierten monoklonalen Antikörper detektiert. Der Nachweis der toten Zellen nach der ex vivo Therapie erfolgte mit einem DNA-interkalierenden Farbstoff (7-AAD). Bevor die Zellen für ihre Analyse geerntet wurden, wurden aus jedem therapierten Well 30 µl Mediumüberstand entnommen und für die Zytokinanalyse (2.2.9) bei -80°C gelagert. Danach wurde der Medienüberstand der zu messenden Proben vollständig abpipettiert und in einer 96 Well Spitzbodenplatte gesammelt. Adhärente Zellen wurden für fünf bis sieben Minuten mit 1 x Trypsin/EDTA abgelöst und ebenfalls in die jeweiligen Wells der Spitzbodenplatte überführt. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt mit 300g für zehn Minuten. Die pelletierten Zellen wurden nach Abnahme des Überstands in 100 µl FACS-Puffer gelöst und mit dem APC markierten monoklonalen Antikörper anti-human EpCAM mit einer Arbeitskonzentration (AK) von 0,6 µg/ml für 45 Minuten inkubiert. Der Antikörper wurde mit einem APC markierten IgG1 Isotyp mit identischer Arbeitskonzentration kontrolliert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgten zwei Waschschrte mit jeweils einem Milliliter FACS-Puffer und anschließender Zentrifugation für erneut zehn Minuten bei 300 g. Die pelletierten Zellen wurden für die Messung am FACS in 200 µl FACS Puffer aufgenommen. Farblose Kalibrierungsbeads wurden in einem Volumen von 50 µl zu jeder zu messenden Probe pipettiert. Die Anzahl der

gemessen Beads je Probe wurde mit den jeweils gemessenen zellulären Events verrechnet (siehe Berechnung nächste Seite). Dies ermöglichte den Vergleich der Proben untereinander. Mit Hilfe dieser Beads konnte gewährleistet werden, dass aus jeder Probe die gleiche Anzahl an Zellen gemessen wurde und somit die einzelnen Proben miteinander verglichen werden konnten. Zur Bestimmung der toten bzw. lysierten EpCAM+ Zellen wurde zehn Minuten vor der Messung im FACS der Vitalfarbstoff 7-AAD zu jeder Probe mit einer Endkonzentration von 1,5 µg/ml pipettiert. Die Messung der Zytotoxizität von MT110 erfolgte im FACS Calibur von BD. Die Auswertung erfolgte mit der Cell Quest Pro Software von BD. Anhand der zellulären Events der vitalen und toten EpCAM-positiven Zellen, die mit Hilfe der Cell Quest Pro Software erfasst wurden, konnte die Lyse der EpCAM positiven Zellen bestimmt werden. Die zellulären Events wurden mit der gemessenen Anzahl an Kalibrierungsbeads verrechnet d.h. ins Verhältnis gesetzt. Die spezifische Lyse der EpCAM positiven Zellen wurde in Bezug zu dem Mittelwert der Kontrollen Mediumkontrolle und muS110 errechnet.

Berechnung der spezifischen Lyse in Prozent (Auswertemethode A):

1. Zelluläre Events der EpCAM+/7-AAD- (vitalen) Zellen : Anzahl der gemessenen Beads = X
2. Zelluläre Events der EpCAM+/ 7-AAD+ (toten) Zellen : Anzahl der gemessenen Beads = Y
3. $X + Y = \text{EpCAM-positiv e Zellen gesamt} = Z$
4. $X : Z \times 100 = \text{EpCAM positiv e vitale Zellen in \%} = A$
5. Mittelwertbildung von A der Mediumkontrolle und A des Kontrollantikörpers muS110 = B
6. $100 - [A \text{ der MT110 therapierten Zellen} : B \times 100]$
= Spezifische Lyse der EpCAM+ Zellen in %

Neben der Auswertemethode A ergab sich für die Erfassung des Anteils der lysierten EpCAM positiven Zellen nach der ex vivo Therapie eine weitere Möglichkeit der Auswertung (Auswertemethode B). Hierfür wurde ausschließlich die Abnahme der zellulären Events der EpCAM positiven Zellen nach der ex vivo Therapie im Vergleich zu den Kontrollen bestimmt. Die zellulären Events wurden mit der gemessenen Anzahl an Kalibrierungsbeads

ins Verhältnis gesetzt. Der Verlust der EpCAM positiven Zellen wurde in Bezug zu dem Mittelwert der Kontrollen Mediumkontrolle und muS110 errechnet.

Berechnung des Verlusts EpCAM-positiver Zellen in Prozent (Auswertemethode B):

1. Zelluläre Events der EpCAM +/7-AAD- (vitalen) Zellen : Anzahl der gemessenen Beads = X
2. Mittelwertbildung von X der Mediumkontrolle und X des Kontrollantikörpers MuS110 = Y
6. $X : Y \times 100 = \text{EpCAM+}/7\text{-AAD- (vitale) Zellen in MT110 behandelte Probe in \% = Z$
4. $100 - Z = \text{Verlust EpCAM positiver Zellen in \% in MT110 behandelte Probe}$

Nach vergleichender Analyse der Auswertemethoden A und B fiel die Entscheidung für die Berechnung der Lyse nach der ex vivo Therapie der sieben Ergussproben auf die Auswertemethode A

2.2.8.6.2 Nachweis der Immunzellstimulation durch MT110

Der Effekt von MT110 auf die Immunzellen im Pleuraerguss wurde über eine Vierfarbenfluoreszenz-Färbung durchgeführt. Die Oberflächenantigene CD4, CD8, CD25 und das intrazellulär nachweisbare Granzym B wurden mit jeweils einem Fluorochrom markierten Antikörper nachgewiesen (CD4 FITC, CD8 Perc-P, CD25 APC, Granzym B PE). Die Oberflächenfärbung von CD25+, CD4+ und CD8+ Zellen erfolgte vor der intrazellulären Färbung von Granzym B. Die Zellen wurden aus den jeweiligen Wells wie unter 2.2.8.6.1 geerntet, in einer 96 Well Spitzbodenplatte gesammelt und für zehn Minuten bei 350 g abzentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 100 µl FACS Puffer aufgenommen. Die Pleuraergusszellen wurden für 45 Minuten mit den monoklonalen Antikörpern CD4 FITC (AK 1,9 µg/ml), CD8 PERCP (AK 0,2 µg/ml) und CD25 APC (AK 0,7 µg/ml) inkubiert. Danach erfolgte ein Waschschriff mit einem Milliliter 1 x PBS. Die Zellen wurden erneut bei 350 g abzentrifugiert. Für die intrazelluläre Färbung von Granzym B wurden die Zellen permeabilisiert. Dies erfolgte mit einer gebrauchsfertigen Fixierungslösung aus dem Fixation und Permeabilization Kit von BD Biosciences. Auf die pelletierten Zellen in jedem Well wurden 180 µl der Fixierungslösung gegeben. Diese wurden, nachdem die Zellen im Gefäß

auf- und abpipettiert wurden, für 20 Minuten bei vier Grad Celsius inkubiert. Danach erfolgten zwei Waschschrte mit jeweils einem Milliliter 1 x Waschpuffer (350 g, 12 Minuten). Nach der Permeabilisierung der Zellen wurden diese in jeweils 100 µl 1 x Waschpuffer aufgenommen und es erfolgte die Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper Granzym B PE für 45 Minuten (AK 0,25 µg/ml). Die Zellen wurden erneut zweimal mit dem 1 x Waschpuffer gewaschen und bei 350 g für 12 Minuten zentrifugiert. Vor der FACS Messung wurden farblose Kalibrierungsbeads in einem Volumen von 50 µl zu jeder zu messenden Probe pipettiert. Dies ermöglichte die Messung einer gleichen Anzahl an Zellen aus jeder Probe. Der Anteil der positiv gefärbten Zellen nach der ex vivo Therapie wurde mit Hilfe der Cell Quest Pro Software (BD) im FACS bestimmt. Die Berechnung des prozentualen Anteils von CD25- und Granzym B-positiven T-Helfer- und zytotoxischen T-Zellen nach der ex vivo Therapie mit MT110 erfolgte für die Kontrolle (K), die sich aus dem Mittel der Medienkontrolle und des Kontrollantikörpers MuS110 zusammensetzte, sowie für die Kontrollantikörper Mecoprop (Mec), αEpCAM und die mit MT110 behandelten Proben. Die gemessene Anzahl an zellulären Events je Probe wurde mit den aus der Probe detektierten Kalibrierungsbeads ins Verhältnis gesetzt. Der berechnete Wert für MK und MuS110 wurde gemittelt.

Berechnung der Immunzellstimulation in Prozent (Beispielhaft anhand von CD25 auf den CD4+ Zellen):

1. Zelluläre Events der CD4+/CD25- Zellen : Anzahl der gemessenen Beads = X
2. Zelluläre Events der CD4+/CD25+ Zellen : Anzahl der gemessenen Beads = Y
3. $X + Y = \text{Anzahl der CD4+ Zellen gesamt} = Z$
4. $Y : Z \times 100 = \text{CD4+/CD25+ Zellen in \%}$

2.2.9 Zytokinbestimmung im FACS

Jeweils 30 µl des Mediumüberstands der ex vivo therapierten Proben wurden, bevor die Ergussproben für die Analyse am FACS aus den Wells geerntet wurden, abgenommen. Die Überstände wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäßen gesammelt und bei -80°C bis zur Zytokinbestimmung gelagert. Insgesamt wurden je Kontrolle und MT110 Konzentration 120

µl gewonnen. Die Bestimmung des Zytokinlevels im Mediumüberstand erfolgte mittels der FACS-Analytik nach einem standardisierten Protokoll. Mit dem Cytometric Bead Array (CBA) System von BD Pharmingen konnten aus einer Probe (Zellkulturüberstand) fluorometrisch sechs verschiedene Zytokine (Interleukin-2, Interleukin-4, Interleukin-6, Interleukin-10, TNF-gamma und TNF-alpha) gleichzeitig nachgewiesen und quantifiziert werden. Das Prinzip dieses Systems basierte auf sechs unterschiedliche Bead-Populationen, an deren Oberfläche jeweils das spezifische Zytokin binden konnte. Zudem unterschieden sich die Bead-Populationen in ihrer Fluoreszenzintensität im FL3-Bereich, so dass sie bei der Auswertung voneinander isoliert betrachtet werden konnten. Die verschiedenen Beadpopulationen, die getrennt in verschiedenen Fläschchen vorlagen wurden miteinander vermischt um den „Zytokin-Bead-Mix“ zu erhalten. Für jede zu quantifizierende Probe wurden fünf Mikroliter aus jeder Bead-Suspension entnommen, in einem Reaktionsgefäß vereinigt und gründlich gemischt. Die Beads (Zytokin-Bead-Mix) wurden anschließend im Dunkeln für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und konnten danach für den Assay verwendet werden. Mittels des Zytokinstandards (Bestandteil des CBA Kits) wurden über serielle Verdünnungsschritte Standardkurven erstellt, die als Basis für die Quantifizierung dieser Zytokine aus den Zellkulturüberständen dienten. Diese Standardkurven erfassten einen Zytokin-Konzentrationsbereich von 20 pg/ml bis 5000 pg/ml.

In jede Vertiefung einer 96 Well Spitzbodenplatte wurden 25 µl des Zytokin-Bead-Mixes pipettiert. Der Zytokin-Bead-Mix wurde kurz vorher für fünf Sekunden gründlich gemischt. Es wurden 25 µl des gebrauchsfertigen humanen Th1/Th2-II PE Detektionsreagenz (Bestandteil des CBA Kits) sowie 25 µl der Probe (Zellkulturüberstand oder Zytokinstandard) dazugegeben. Für die Negativkontrolle wurden 25 µl des im Kit enthaltenen Dilutionspuffers verwendet. Die Inkubation der Ansätze erfolgte bei Raumtemperatur über 180 Minuten im Dunkeln. Anschließend wurden 100 µl Waschpuffer (Bestandteil des CBA-Kits) in jedes Well pipettiert und die Platte wurde bei 250 x g für fünf Minuten abzentrifugiert. Die Überstände wurden abpipettiert und somit wurden nicht gebundene Zytokin-Beads verworfen. Das Beadsediment wurde in 150 µl Waschpuffer resuspendiert und erneut bei 250 x g für fünf Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abpipettiert und verworfen. Abschließend wurde das Beadsediment in 200 µl Waschpuffer resuspendiert, in FACS Röhren überführt und am Durchflusszytometer (FACS Calibur) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der CBA Software von BD. Mit Hilfe dieses Programmes wurden

Standardkurven für jedes einzelnes Zytokin als nicht lineare Regression vom Typ „4-Parameter Logistic Model“ dargestellt (x-Achse: Zytokinkonzentration; y-Achse: MFI-Signal). Anhand dieser Standardkurven und den MFI-Signalen der gemessenen Proben wurden die Konzentrationen der einzelnen Zytokine errechnet. Die Berechnung erfolgte über das Softwareprogramm von BD.

2.2.10 Statistik

Die statistische Signifikanz der dosis- und zeitabhängigen zytotoxischen bzw. stimulatorischen Wirkung von MT110 auf die Tumorzellen und bzw. die Immunzellen wurde mit Hilfe des Wilcoxon Rangsummentest bestimmt. Mit Hilfe diesen nicht-parametrischen Tests werden unabhängig vom Verteilungstyp Unterschiede zwischen zwei unverbundenen Messreihen festgestellt. Mit Hilfe der Rangkorrelation nach Spearman wurden die mittels IHC bestimmten prognoserelevanten Antigene auf den Pleuraergusszellen mit der Progression der Erkrankung der Patientin korreliert. Dieser ebenfalls nicht-parametrische Test ermöglicht die Korrelation zweier Variablen. Des Weiteren wurden das E:T Ratio, die spezifischen Lyse, der Anteil der stimulierten T-Zellen, und die anteilige Zytokinausschüttung nach MT110 Therapie miteinander mit Hilfe der Spearman-Rank Korrelation korreliert.

3 Ergebnisse

Von 18 Mammakarzinompatientinnen und vier Bronchialkarzinompatienten, die einen malignen Pleuraerguss entwickelten, wurden die klinisch pathologischen Daten des Primärtumors, die therapeutische Behandlung der Patienten bis zur Entwicklung des malignen Ergusses („first-, second-, und third-line“ Therapie), die Therapie des malignen Pleuraergusses und die Überlebenszeit der Patienten (Follow-up) näher untersucht.

3.1 Klinischer Verlauf der Mammakarzinom Patienten

3.1.1 Klinisch pathologische Charakterisierung des Primärtumors

Als klinisch pathologische Parameter wurden das TNM-Stadium, das UICC-Stadium, der Differenzierungsgrad sowie der Hormonrezeptor- und Her2/neu – Status des Primärtumors gewählt. Des Weiteren wurde die Tumorprogression jedes Patienten bis zum erstmaligen Auftreten eines malignen Pleuraergusses analysiert und ob rezidivierende Pleuraergüsse vorlagen (Tab. 1).

Innerhalb des Patientenkollektivs wiesen 61 % (11 von 18) der Patienten ein T1 oder T2-Stadium (<2 cm / > 2cm – maximal 5 cm) ihres Primärtumors auf und 39 % (sieben von 18) ein T3 oder T4-Stadium (> 5cm/jede Größe, Ausdehnung auf die Thoraxwand oder Haut). Der Anteil der Patienten, die befallene Lymphknoten zeigten (N1, N2, N3) war mit 83 % (15 von 18) deutlich vertreten. Eine Fernmetastasierung (M1) zum Zeitpunkt der Diagnose des Primärtumors konnte aber bei über der Hälfte der Patienten (67 %, 12 von 18) ausgeschlossen werden. Keine eindeutige Aussage bezüglich einer Fernmetastasierung (Mx) lag bei 11 % (zwei von 18) der Patienten (3823, 3745) vor. Der Großteil des Patientenkollektivs konnte dem UICC-Stadium III (56 %, 9 von 16) und IV (25 %, vier von 16) zugeordnet werden, was auf ein Kollektiv mit einer eher ungünstigeren Prognose hinweist. Die histopathologische Differenzierung der Primärtumore zeigte jedoch, dass bei 72 % (13 von 18) der Patientinnen eine eher schwache bis mäßig starke Differenzierung der Tumorzellen vorlag (G1, G2). Ein Differenzierungsgrad von drei (G3) ließ sich bei 28 % (fünf von 18) der Patienten feststellen. Die immunhistologische Charakterisierung des Hormonrezeptorstatus der Primärtumore (Tab.

3. ERGEBNISSE

1 und 2) ergab einen hohen Anteil an Patienten, die einen positiven Östrogen (ER)- und Progesteronrezeptorstatus (PgR) aufwiesen. 78 % (14 von 18) der Patienten waren positiv für den Östrogenrezeptor und 72 % (13 von 18) für den Progesteronrezeptor. Genaue Informationen über den Hormonrezeptorstatus waren für zwei von 18 Patienten aus den pathologischen Berichten nicht klar ersichtlich (3862, 3866). Eine dieser Patienten erhielt jedoch eine Tamoxifentherapie (3866). Für 39 % der Patienten konnte ein positiver Her2/neu Status nachgewiesen werden (sieben von 18). Jedoch bei nur zwei Patientinnen aus diesem Kollektiv wurde eine Überexpression des Rezeptors (3+) festgestellt (3841, 3848). Der Datensatz von n=15 Patienten bezüglich des Her2/neu Status ist darauf zurückzuführen, dass die Expression des Her2-neu Antigens in den 80er und 90er Jahren nicht routinemäßig bestimmt wurde.

Die Progression der Erkrankung wurde bis zum Zeitpunkt der Entwicklung des malignen Pleuraergusses näher untersucht. Nur ein Patient zeigte bereits zum Zeitpunkt der Diagnose des Primärtumors einen malignen Pleuraerguss (3917). Nach Diagnose des Primärtumors war der maligne Pleuraerguss bei 33,3 % (sechs von 18) der Patienten im Laufe ihrer Erkrankung erster Metastasierungsort. Weitere 33,3 % (sechs von 18) entwickelten ein Rezidiv bis zur Entwicklung eines malignen Ergusses, das bei einem Großteil der Patienten (67 %) einer Fernmetastasierung entsprach. Am Häufigsten traten ossäre Metastasen, gefolgt von pulmonalen und hepatischen Metastasen auf. Bei weiteren 33,3 % der Patienten (sechs von 18) war eine Progression zeitlich versetzt an zwei Lokalisationen zu beobachten. Hier zeigte sich am Häufigsten ein Lokal bzw. Thoraxwandrezidiv (Rezidiv I) in Kombination mit Fernmetastasen (Rezidiv II) für vier von sechs der Patienten (67 %). Ossäre und pulmonale Metastasen waren in diesem Kollektiv gleich stark vertreten. Hepatische Metastasen traten hier nicht auf. Nach der Diagnose eines malignen Pleuraergusses war dieser bei 94 % (17/18) der Patientinnen rezidivierend.

3. ERGEBNISSE

Merkmal Primärtumor	Mammakarzinom (n=18)	
	Fallzahl	Anteil in %
Tumorgröße T1, T2 T3, T4	11/18 7/18	61 39
Lymphknotenstatus N0 N1, N2, N3	3/18 15/18	17 83
Metastasierungsstatus M0 M1 Mx	12/18 4/18 2/18	67 22 11
UICC-Stadium I II III IV	2/16 1/16 9/16 4/16	12,5 6,25 56,25 25
Differenzierungsgrad G1, G2 G3	13/18 5/18	72 28
ER-Status positiv negativ k.A.	14/18 2/18 2/18	78 11 11
PgR-Status positiv negativ k.A.	13/18 3/18 2/18	72 17 11
Her2-neu Status positiv negativ k.A.	7/18 8/18 3/18	39 44 17
Tumorprogression		
keine Entwicklung von Rezidiv	6/18	33,33
<u>Rezidiv I:</u> -Thoraxwandrezidiv -Fernmetastasen - Thoraxwandrezidiv+ Fernmetastasen	6/18 1/6 4/6 1/6	33,33 17 67 17
<u>Rezidiv I und II:</u> -Lokal-/Thoraxwandrezidiv + Fernmetastasen - Fernmetastasen	6/18 4/6 2/6	33,33 67 33
maligner Pleuraerguss rezidivierend	17/18	94 %

Tabelle 1: Klinisch-pathologische Charakterisierung des Primärtumors und Tumorprogression von n=18 Mammakarzinompatientinnen, die im Laufe ihrer Erkrankung einen malignen Pleuraerguss entwickelten (k.A. = keine Angabe in pathologischen Akten, Patient erhielt aber eine Tamoxifentherapie).

3. ERGEBNISSE

Patientennummer	Primärtumor			Rezidiv I				Rezidiv II				MPE		
	ER	PgR	Her2/neu	Lokalität	ER	PgR	Her2/neu	Lokalität	ER	PgR	Her2/neu	ER	PgR	Her2/neu
												Angaben in %		
3892	0	0	0									0	0	35
3736	6/12	12/12	0									0	0	0
3745	+	+	0									0	0	0
3841	2/12	6/12	3+									0	0	0
3766	21	830	0									0	0	0
3917	12/12	6/12	0									n.g.	n.g.	n.g.
3888	4/12	0/12	1+	FM	k.A.	k.A.	k.A.					0	0	35
3815	12/12	4/12	2+	TW	3/12	9/12	1+					0	0	0
3824	0	0	0	TW	0	0	0					0	0	0
				FM	k.A.	k.A.	k.A.							
3874	58	10	k.A.	FM	k.A.	k.A.	k.A.					10	0	0
3848	+	+	3+	TW	-	-	3+					0	0	20
3882	4/12	2/12	2+	FM	k.A.	k.A.	k.A.					0	0	0
3924	3/12	12/12	1+	LR	4/12	12/12	1+	FM	k.A.	k.A.	k.A.	0	0	0
3866	Tam.	Tam.	k.A.	TW	k.A.	k.A.	k.A.	FM	k.A.	k.A.	k.A.	25	0	80
3823	12/12	12/12	2+	TW	4/12	3/12	0	FM	k.A.	k.A.	k.A.	100	0	65
								LR	12/12	1/12	2+			
3834	124	51	k.A.	FM	k.A.	k.A.	k.A.	FM	k.A.	k.A.	k.A.	0	0	0
3826	20	173	0	TW	2/12	2/12	3+	TW	12/12	12/12	0	100	10	0
				FM	k.A.	k.A.	k.A.							
3862	k.A.	k.A.	0	FM	k.A.	k.A.	k.A.	FM	k.A.	k.A.	k.A.	0	0	50

Tabelle 2: Darstellung des Hormonrezeptor- (*Immunreaktiver Score nach Rimmeler und Stegner Skala*; fmol / mg Protein) und Her2/neu-Status des Primärtumors, der zeitlich nachfolgenden Rezidive (Rezidiv I, II) und der Epithelzellen in malignen Pleuraerguss (ABC-Methode auf Zytospins) von 18 Mammakarzinompatientinnen (ER=Östrogenrezeptorstatus; PgR=Progesteronrezeptorstatus; FM= Fernmetastase; TW= Thoraxwandrezidiv; LR=Lokalrezidiv; Tam.=keine Angaben bezüglich Hormonrezeptorstatus aber Tamoxifentherapie; k.A. =keine Angabe; n.g.=nicht gemessen, da nicht ausreichend Zellmaterial).

3.1.2 Therapie und klinischer Verlauf

Alle 18 Mammakarzinompatientinnen wurden bis zur Entwicklung eines malignen Pleuraergusses multimodal therapiert (Tab. 3). 22 % der Patienten (vier von 18) erhielten nach der Diagnose des Primärtumors eine neoadjuvante Chemotherapie (3924, 3745, 3848, 3823). Eine Patientin aus diesem Kollektiv erhielt zusätzlich eine neoadjuvante Strahlentherapie (3745). Allen Patienten des Gesamtkollektivs wurde der Primärtumor operativ entfernt. Eine Strahlentherapie nach Tumorentfernung erhielten 61 % (11 von 18) der Patienten. 94 % (17 von 18) wurden chemotherapeutisch, 66,7 % (12 von 18) anti-hormonell behandelt. Eine der Patientinnen, die sich in der Gruppe der „First-Line“ therapierten Gruppe befand erhielt eine Antikörper-Therapie. Zwölf Patienten aus dem Gesamtkollektiv entwickelten in einem durchschnittlichen Zeitraum von 57 Monaten (Streubreite 3-236 Monate) eine Progression ihrer Erkrankung und erhielten eine „second-line“ Therapie (66,7 %). Ein Thoraxwand- oder Lokalrezidiv konnte bei 33 % der Patienten (vier von 12) festgestellt werden. Fernmetastasen waren bei 50 % der Patienten zu beobachten (sechs von 12). Ein Thoraxwandrezidiv sowie gleichzeitig auftretende Fernmetastasen konnte für 16,7 % (zwei von 12) des Kollektivs festgestellt werden. Daraufhin kam es für 58 % (sieben von 12) der Patienten erneut zu einem operativen Eingriff und zu einer Bestrahlung. Eine Chemotherapie erhielten 75 % (neun von 12). Eine anti-hormonelle Therapie wurden 50 % (sechs von 12) verabreicht und 25 % (drei von 12) wurden mittels Antikörpertherapie behandelt. Eine der drei Patientinnen (3815) erhielt den bispezifischen Antikörper anti-Her2/neu/CD3 Rexomab. Weitere sechs Patienten aus diesem Kollektiv erhielten eine „third-line“ Therapie (33 %). Der durchschnittliche Zeitraum von „Rezidiv I“ bis zur Entwicklung von „Rezidiv II“ betrug 17 Monate (Streubreite 4-37 Monate). Der Großteil der Patienten entwickelten Fernmetastasen (83 %, fünf von sechs). Bei einer Patientin (17 %) wurde ein erneutes Thoraxwandrezidiv festgestellt. Bei 33 % der Patienten (zwei von sechs) wurde ein operativer Eingriff durchgeführt. Die Hälfte der Patienten wurde radiotherapeutisch behandelt (50 %, drei von sechs). Alle Patienten erhielten eine Chemotherapie. Alle bis auf eine Patientin (83 %, fünf von sechs) wurden anti-hormonell behandelt. Eine Patientin erhielt eine Antikörpertherapie (17 %, eine von sechs). Nach Auftreten eines malignen Pleuraergusses wurden 17 % (drei von 17) der Patienten einer Pleurodese mit Talkum unterzogen. Die Nachverfolgung des Patientenkollektiv ergab eine tumorbedingte Mortalitätsrate von 83 % (15 von 18). Die mittlere Überlebenszeit der

3. ERGEBNISSE

Patienten von dem im Labor erstmalig erhaltenen malignen Pleuraerguss bis zu ihrem Tod betrug 312 Tage (Streuung ein Tag - 1373 Tage). Die „first-line“ therapierten Patienten (n=4) lebten durchschnittlich 289,5 Tage (Streuung 34-557 Tage), die „second-line“ therapierten Patienten (n=5) 247 Tage (Streuung 8-1153 Tage) und die „third-line“ therapierten Patienten (n=6) 381 Tage (Streuung 1-1373 Tage) gemessen ab dem im Labor erstmalig erhaltenen Pleuraerguss. Ein signifikanter Unterschied der Überlebenszeit der drei Gruppen ließ sich nicht feststellen.

Patient	UICC	First-line: Therapie nach Primärtumor					Second-line: Therapie nach Rezidiv I					Third-line: Therapie nach Rezidiv II					T MPE	TT	Ü
		OP	R	C	E	A	OP	R	C	E	A	OP	R	C	E	A	P		
3892	Ib	+	+	+	-	-											-	+	157
3736	Ib	+	+	+	+	-											-	-	1327
3745	k.A.	+	+	+	+	-											-	+	34
3841	IIIa	+	+	+	+	+											-	-	1349
3766	Iib	+	+	+	-	-											-	+	410
3917 [#]	IV	+	+	+	+	-											k.A.	+	557
3888	IV	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-						-	+	22
3815	IV	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+						+	+	1152
3824	IIIb	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-						-	+	8
3874	IIIa	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-						-	+	27
3848	IIIa	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+						-	-	1319
3882	IIIa	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-						+	+	24
3924	IIIa	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	55
3866	IIIb	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	1373
3823	k.A.	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	263
3834	IIIa	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	399
3826	IIIa	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	195
3862	IV	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	1

Tabelle 3: Therapieverfahren von 18 Mammakarzinompatientinnen nach Diagnose des Primärtumors bis zum Zeitpunkt der Diagnose eines malignen Pleuraergusses. Darstellung des Überlebenszeitraums (Ü) ab dem erstmaligen Auftreten des malignen Ergusses bis zum Tod bzw. Nachverfolgung bis 9/2008 in Tagen. [#] MPE trat zum Zeitpunkt des Primärtumors auf. (OP=Operation; R=Radiotherapie; C=Chemotherapie; E=endokrine Therapie; A=Antikörpertherapie mit Herceptin * Therapie mit Antikörper anti-Her2/neu/CD3 Rexomab; T=Therapie; MPE= maligner Pleuraerguss; P=Pleurodese mit Talkum; TT= tumorbedingter Tod Ü=Überlebenszeit in Tagen; k.A=keine Angabe, X=Patientin nicht verstorben

3.2 Klinischer Verlauf der Bronchialkarzinom Patienten

3.2.1 Klinisch pathologische Charakterisierung des Primärtumors

Die klinisch-pathologischen Daten der vier Bronchialkarzinompatienten mit einem nichtkleinzelligem Karzinom sind in Tabelle vier aufgeführt. Bezüglich des T- und N-Stadiums der Primärtumore zeigte sich ein heterogenes Bild. Patient 3972 wies ein T1-Stadium (Primärtumor < 3cm), Patient 3878 ein T2-Stadium (Tumor > 3cm) und Patient 4124 ein T4-Stadium (jede Größe des Primärtumors, Infiltration bestimmter Strukturen) auf. Von Patient 3879, bei dem ein Plattenepithelkarzinom diagnostiziert wurde, lag keine Angabe bezüglich des T-Stadiums vor. Die angrenzenden Lymphknoten wurden von Patient 3972 und 4124 untersucht, wobei ein positiver Befund bei Patient 3972 zu verzeichnen war (N3). Ein homogenes Bild ergab die Untersuchung des Metastasierungsstatus. Bei allen Patienten lag zum Zeitpunkt des Primärtumors bereits eine Fernmetastasierung vor. Ein Patient des Kollektivs (eins von vier) zeigte zum Zeitpunkt der Diagnose des Primärtumors bereits eine pleurale Metastasierung und einen malignen Pleuraerguss (4124). Pulmonale, ossäre und hepatische Metastasen wurden bei einem der Patienten festgestellt (3878). Ein Patient zeigte vor Entwicklung des malignen Pleuraerguss zerebrale Metastasen (3879), ein weiterer ossäre und pulmonale Metastasen (3972). Folglich konnten alle Patienten einem UICC-Stadium IV zugeordnet werden. Histologisch wurden alle Primärtumore als ein gering differenziertes nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (NCSLC) bewertet. Alle Patienten zeigten einen rezidivierenden malignen Erguss.

	Bronchialkarzinom (n=4)	
Merkmal Primärtumor	Fallzahl	Anteil in %
Tumorgröße		
-T1, T2	2/4	50
-T4	1/4	25
-Plattenepithelkarzinom	1/4	25
Lymphknotenstatus		
-N0,	1/2	50
-N1, N2, N3	1/2	50
Metastasierungsstatus		
-M0		
-M1	4/4	100
UICC-Stadium		
-I		
-II		
-III		
-IV	4/4	100
Histologie		
-NCSLC	4/4	100
Differenzierungsgrad		
-mäßig, gering	4/4	100
Pleuraerguss		
rezidivierend	4/4	100

Tabelle 4: Klinisch-pathologische Charakterisierung des Primärtumors von vier Bronchialkarzinompatienten, die einen malignen Pleuraerguss entwickelten.

3.2.2 Therapie und klinischer Verlauf

Nach Diagnose des Primärtumors erfolgte ein operativer Eingriff bei allen Patienten gefolgt von einer chemotherapeutischen Behandlung (n=4). Alle bis auf einen Patienten (drei von vier) wurden zudem bestrahlt. Eine Antikörper basierte Therapie erfolgte für einen der Patienten (n=1). Nach Auftreten der malignen Pleuraergüsse wurde bei drei von vier Patienten eine Pleurodese mit Talkum durchgeführt (Tab. 5). Die Nachverfolgung der Patienten ergab

3. ERGEBNISSE

lediglich für einen Patienten ein Ergebnis (3878), der 173 Tage nach der Diagnose des malignen Ergusses verstarb.

	Patient	UICC	First line: Therapie nach Primärtumor				Therapie MPE	TT	Ü
			OP	R	C	A			
							Pleurodese		
1	3972	IV	+	+	+	+	-	k.A.	k.A.
2	3878 [#]	IV	+	+	+	-	+	+	173
3	4124 [#]	IV	+	-	+	-	+	k.A.	k.A.
4	3879	IV	+	+	+	-	+	k.A.	k.A.

Tabelle 5: Therapieverfahren von vier Bronchialkarzinompatienten nach Diagnose des Primärtumors bis zum Zeitpunkt der Diagnose eines malignen Pleuraergusses. Darstellung der Überlebenszeit (Ü) in Tagen ab dem erstmaligen Auftreten eines malignen Ergusses bis zum Tod bzw. Nachverfolgung bis 9/2008. (OP=Operation; R=Radiotherapie; C=Chemotherapie; A=Antikörpertherapie, * Therapie mit Erlotinib; MPE= maligner Pleuraerguss; TT=tumorbedingter Tod; Ü=Überlebenszeit in Tagen; # MPE trat zum Zeitpunkt der Diagnose des Primärtumors auf; k.A. keine Angaben).

3.3 Pleuraergusszytologie

3.3.1 Ergussmenge und Zellzahl

Die malignen Pleuraergüsse der Mamma- und Bronchialkarzinompatienten wurden bezüglich der Ergussmenge, gewonnen Zellzahl pro ml und ihrer zellulären Morphologie und Zusammensetzung charakterisiert (Tab. 6, 7, 8). Die Ergussmenge der MPE beim Mammakarzinom (Tab. 6) lag im Mittel bei 399 ml (Streubreite 40-800 ml). Die mittlere Zellzahl/ml betrug 4×10^5 (Streubreite $1,1 \times 10^4 - 1,5 \times 10^6$ Zellen /ml). Die Ergussmenge der MPE beim Bronchialkarzinom (Tab. 7) war mit einem Mittelwert von 310 ml (Streubreite 160– 300 ml) ähnlich hoch. Die Zellzahl pro ml war im Durchschnitt niedriger im Vergleich zu den Ergüssen beim Mammakarzinom mit $2,6 \times 10^5$ Zellen/ml (Streubreite $7,2 \times 10^4 - 3,9 \times 10^5$ Zellen/ml). Als Vergleichskollektiv zu den malignen Pleuraergüssen fungierten elf benigne Pleuraergüsse (Tab. 8). Die mittlere Ergussmenge der benignen Proben betrug 435 ml (Streubreite 45– 600 ml). Die Anzahl der aus den benignen Ergüssen isolierten Zellen/ml war im Vergleich zu den malignen Ergüssen deutlich erniedrigt im Mittel bei $1,8 \times 10^5$ Zellen/ml

(Streubreite $7,6 \times 10^3 - 5,4 \times 10^5$ Zellen/ml; Tab. 6-8). Ein statistisch signifikanter Unterschied zu den malignen Pleuraergüssen konnte aber nicht festgestellt werden.

Ein Vergleich der durchschnittlichen Zellzahl/ml innerhalb des Kollektivs der Mammakarzinompatienten zeigte, dass die „third-line“ (Tab. 3) therapierten Patienten im Vergleich zu den „first-“ und „second-line“ therapierten Patienten die geringste durchschnittliche Zellzahl/ml aufwiesen. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. „third-line“ therapierte Patienten entwickelten maligne Pleuraergüsse mit durchschnittlich $1,8 \times 10^5$ Zellen/ml (Streubreite $1,7 \times 10^4 - 4,2 \times 10^5$ Zellen/ml) im Vergleich zu „second-“ und „first-line“ therapierte Patienten, die im Mittel $3,4 \times 10^5$ (Streubreite $1,1 \times 10^4 - 8,6 \times 10^5$ Zellen/ml) und $5,2 \times 10^5$ Zellen/ml (Streubreite $1 \times 10^4 - 1,5 \times 10^6$ Zellen/ml) aufwiesen. Unterschiede zwischen „first-, second- und third-line“ therapierten Patientinnen bezüglich der durchschnittlichen Ergussmenge waren nicht zu beobachten.

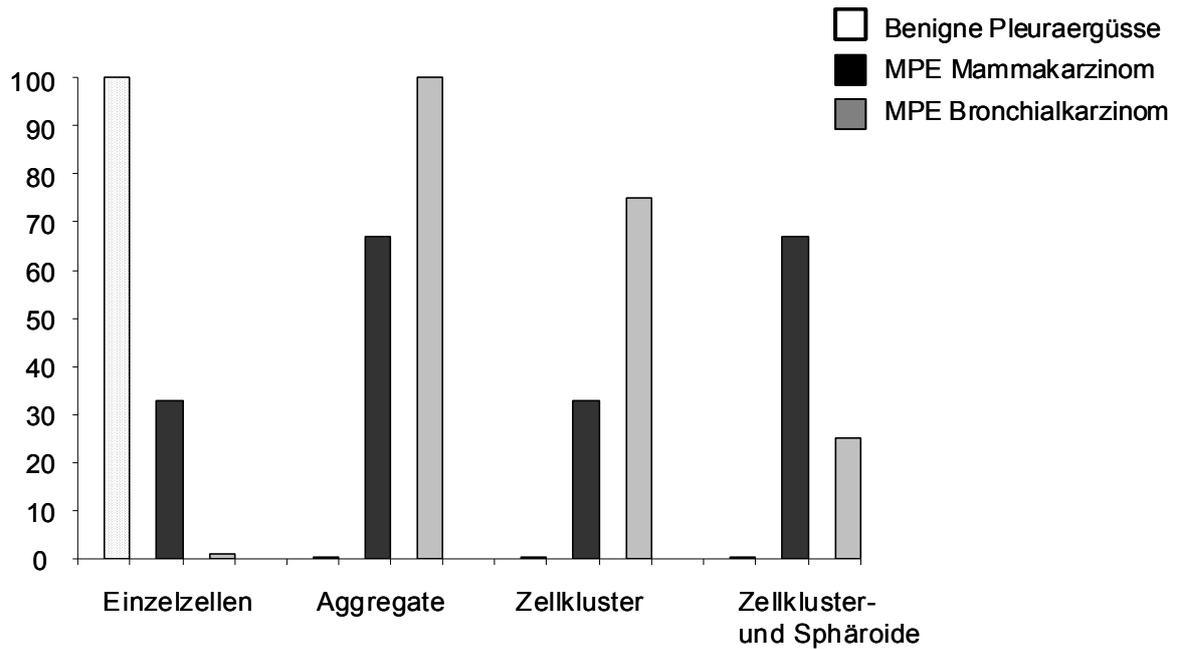
3. ERGEBNISSE

Nr	Patienten-Nr	Ergussvolumen in ml	Zellzahl/ml	Morphologisches Erscheinungsbild					
				Aggregate					
				Zellkluster		Sphäroide			
				N	SB	N	SB		
1	3736	600	$1,0 \times 10^4$	+	n.g.	+	n.g.		
2	3745	320	$1,5 \times 10^6$	+	100-300	+	100-300		
3	3766	40	$1,3 \times 10^6$	+	n.g.	+	n.g.		
4	3815	50	$5,7 \times 10^5$	-	-	-	-		
5	3823	400	$1,6 \times 10^5$	+	n.g.	+	n.g.		
6	3824	100	$1,1 \times 10^4$	-	-	-	-		
7	3826	300	$5,7 \times 10^4$	+	20-50	-			
8	3834	800	$1,2 \times 10^5$	+	30-50	+	50-160		
9	3841	700	$1,3 \times 10^6$	+	50-120	-			
10	3848	50	$8,6 \times 10^5$	+	30-100	+	50-100		
11	3862	700	$1,7 \times 10^4$	+	30-100	-			
12	3866	500	$4,2 \times 10^5$	+	30-50	+	50-150		
13	3874	650	$1,7 \times 10^5$	-	-	-	-		
14	3882	50	$1,7 \times 10^5$	-	-	-	-		
15	3888	700	$2,2 \times 10^5$	+	50-100	-			
16	3892	650	$2,7 \times 10^5$	+	n.g.	+	50-300		
17	3917	100	$3,3 \times 10^4$	-	-	-	-		
18	3924	265	$3,1 \times 10^5$	-	-	-	-		
				Morphologisches Erscheinungsbild		Fallzahl		Prozentanteil	
				keine Aggregate		6/18		33 %	
				<u>Aggregate</u>		12/18		67 %	
				Zellkluster		4/12		33 %	
				Zellkluster und Sphäroide		8/12		67 %	

Tabelle 6: Zytomorphologie der malignen Pleuraergüsse beim Mammakarzinom. Heterogenität der malignen Pleuraergüsse bezüglich Ergussmenge, Zellzahl/ml und morphologisches Erscheinungsbild (N=Nachweis; SB=Streubreite der Aggregate in μm ; n.g.=nicht gemessen).

Aggregate mit nicht mehr voneinander sichtbar abgrenzbaren Zellen wurden als Ergusssphäroide beschrieben (siehe Abb. 2). Bei 67 % (12 von 18) der malignen Pleuraergüsse beim Mammakarzinom wurden Aggregate im Erguss festgestellt. Zellkluster waren bei 33 % (vier von 12) der Proben zu beobachten. Die Größe der Zellkluster der malignen Pleuraergüsse beim Mammakarzinom variierte im Mittel zwischen 40 µm und 110 µm (Streubreite 20-300 µm). Bei acht der zwölf Ergussproben (67 %) wurden neben den Zellklustern zusätzlich Sphäroide beobachtet (Tab. 6, Abb. 1). Hier zeigte sich im Mittel ein Durchmesser der Ergusssphäroide von 60 µm – 200 µm (Streubreite 50-300 µm). Bei allen Bronchialkarzinompatienten waren im MPE (maligner Pleuraerguss) neben Einzelzellen auch Zellaggregate festzustellen (n=4). Bei drei von vier Patienten waren ausschließlich Kluster im MPE vorhanden. Die Größe der Zellkluster variierte im Mittel zwischen 30 µm und 150 µm (Streubreite 20-300 µm). Lediglich eine Patientenprobe (n=1) wies Ergusssphäroide auf. Die Größe der Ergusssphäroide dieser Probe bewegte sich zwischen 50 µm und 250 µm. Eine Ergussprobe, die ausschließlich Sphäroide enthielt wurde sowohl bei den Mammakarzinom- als auch bei den Bronchialkarzinompatienten nicht beobachtet. (Tab. 7, Abb. 1).

Eine „first“ -bzw. „third-line“ Therapie bei den Mammakarzinompatienten hatte keinen Einfluss auf das Vorhandensein von Zellaggregaten im Erguss, da sowohl 42 % der „first-line“ als auch 42 % der „third-line“ therapierten Patientinnen Zellaggregate aufwiesen. MPE mit ausschließlich Einzelzellen waren mit 67 % am häufigsten bei den „second-line“ therapierten Patientinnen vertreten.



Pleuraergüsse	Einzelzellen in %	Aggregate in %	Kluster in %	Kluster und Sphäroide in %
benigne	100	0	0	0
Mammakarzinom	33	67	33	67
Bronchialkarzinom	0	100	75	25

Abbildung 1: Zytomorphologie der Pleuraergüsse. Verteilung der Einzelzellen, Aggregate, Zellkluster sowie Zellkluster- und Sphäroide in benignen Ergüssen und malignen Ergüssen beim Mamma- und Bronchialkarzinom.

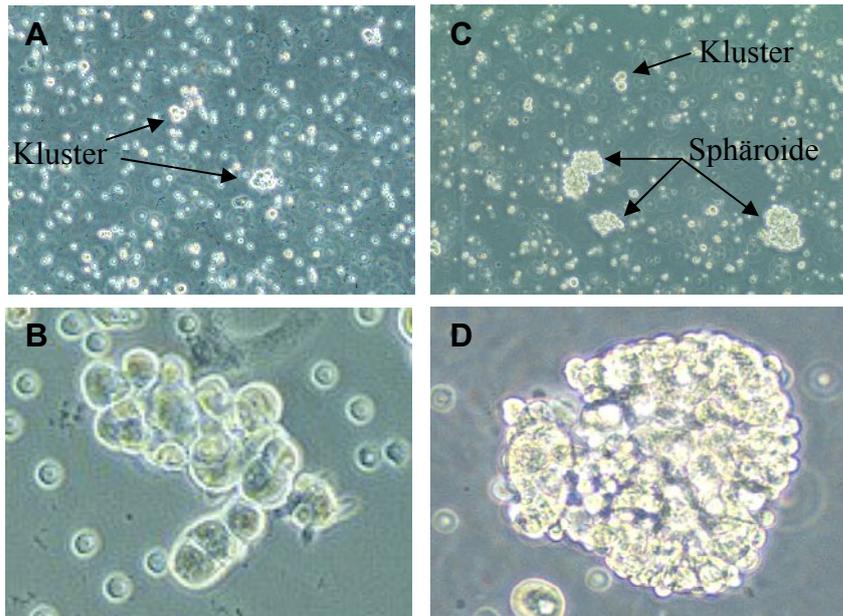


Abbildung 2: Lichtmikroskopische Aufnahmen

A,B. Maligner Pleuraerguss bei einem Bronchialkarzinom (3743) bestehend aus Einzelzellen und lockeren Aggregaten (Kluster, 100x). **B.** Cluster mit sichtbar abgrenzbaren Zellen aus einem malignen Pleuraerguss bei einem Bronchialkarzinom (400 x). **C,D.** Maligner Erguss bei einem Mammakarzinom (3766) bestehend aus Einzelzellen, lockeren und kompakten Aggregaten (Sphäroiden, 100x). **D.** Sphäroid mit nicht sichtbar abgrenzbaren Zellen aus einem malignen Pleuraerguss eines Mammakarzinoms (3766, 400x).

3.3.3 Zelluläre Pleuraergusszusammensetzung

Die Pleuraergusszusammensetzung wurde immunhistologisch auf Zytospinpräparaten bestimmt. Zytospinpräparate konnten nach Aufbereitung der Pleuraergüsse für insgesamt 17 der 18 MPE beim Mammakarzinom (94 %) und für drei der vier MPE beim Bronchialkarzinom (75 %) angefertigt werden. In allen malignen Pleuraergüssen beider Tumorentitäten waren Epithelzellen, Fibroblasten, Mesothelzellen, Leukozyten und Lymphozyten nachweisbar (Tab. 9, Abb.3). Der Anteil der Epithelzellen war bei den Mammakarzinompatienten mit 32 % (Streubreite 3-80 %) geringer als bei Bronchialkarzinompatienten mit 65 % (Streubreite 20-95 %). Vimentin-positive Zellen (z.B. Fibroblasten, reaktive Leukozyten) waren mit 48 % (Streubreite 5-90 %) etwas häufiger bei den malignen Ergüssen des Mammakarzinoms wie des Bronchialkarzinoms (40 %, Streubreite 5-75 %) vertreten. Der Anteil der Calretinin-positiven Pleurazellen (Mesothelzellen) lag mit 14 % (Streubreite 2-90 %) bei den Mammakarzinompatienten höher

3. ERGEBNISSE

als bei den Bronchialkarzinompatienten, die im Mittel 5 % Calretinin-positive Zellen zeigten (Streubreite 1-8 %). Die hohe Streubreite von 2-90 % bei den malignen Pleuraergüssen der Mammakarzinompatienten ist drauf zurückzuführen, dass mikroskopisch neben der Mesothelzellfärbung bei vier von 17 der Ergussproben eine Positivfärbung der Epithelzellen im Pleuraerguss zu beobachten war. Der Leukozytenanteil war bei den Mammakarzinompatienten mit 61 % (Streubreite 5-95 %) deutlich höher als bei den Bronchialkarzinompatienten mit einem Leukozytenanteil von 37 % (Streubreite 5-75 %; Tab. 9).

Zelltyp	Antigen	Mammakarzinom n = 17		Bronchialkarzinom n=3	
		Antigen Expression in %		Antigen Expression in %	
		Mittelwert	Streubreite	Mittelwert	Streubreite
Epithelzellen	Pan Zytokeratin	32 ± 30	3-80	65 ± 32	20-95
Fibroblasten, reaktive Leukozyten	Vimentin	48 ± 30	5-90	40 ± 29	5-75
Mesothelzellen	Calretinin	14 ± 25	2-90	5 ± 3	1-8
Leukozyten	CD45	61 ± 28	5-95	37 ± 29	5-75

Tabelle 9: Zelluläre Charakterisierung der malignen Pleureergüsse von n=17 Mammakarzinompatienten und n=3 Bronchialkarzinompatienten mittels ABC-Methode auf Zytospinpräparaten (3917 und 4124 fehlen auf Grund von Limitation des zellulären Materials).

Eine genauere Charakterisierung der Immunzellen im Pleuraerguss erfolgte mittels Durchflußzytometrie (FACS). Die einzelnen Subpopulationen wurden auf die Gesamtpopulation der im FACS bestimmten CD45+ Leukozyten normiert (Tab. 10). Die anteilige Lymphozytenpopulation war im MPE der Mammakarzinome und Bronchialkarzinome mit 75 % (Streubreite 45-93 %) und 85 % (Streubreite 60-97 %) ähnlich hoch. Der Prozentanteil an Lymphozyten, die den späten Aktivierungsmarker CD25 exprimierten lag sowohl bei den Ergüssen des Bronchialkarzinoms als auch des Mammakarzinoms unter 10 %. Das Verhältnis der CD4+ T-Helfer Zellen und CD8+ zytotoxischen T-Zellen war mit 2,5:1 bei beiden Tumorentitäten gleich.

3. ERGEBNISSE

		Mammakarzinom n=16		Bronchialkarzinom n=4	
		Antigen Expression in %		Antigen Expression in %	
Antigen	Zelltyp	Mittelwert ± stabwn	Streubreite	Mittelwert ± stabwn	Streubreite
CD3	T-Zellen	75 ± 16	45-93	85±15	60-97
CD3+/CD25+	aktivierte T-Zellen	3 ± 2	1-6	8±1	6-9
CD4	T-Helfer Zellen	53 ± 16	18-85	62±22	24-78
CD8	Zytotoxische T-Zellen	21 ± 6	8-30	25±10	13-38
CD14	Monozyten	11 ± 15	1-53	5±2	2-8
CD3- /CD56+,CD16+	NK-Zellen „natürliche Killer Zellen“	12 ± 9	1-27	20±15	2-41

Tabelle 10: Charakterisierung des Immunzellstatus der MPE von n=16 (P3882, P3862 fehlen auf Grund von Limitation des zellulären Materials) Mammakarzinompatienten und n=4 Bronchialkarzinompatienten mittels Durchflusszytometrie. Die Normierung erfolgte auf die im FACS bestimmte CD45+ Leukozytenpopulation.

Die Monozytenpopulation war bei den malignen Ergüssen des Mammakarzinoms mit 11 % (Streubreite 1-53 %) deutlich höher im Vergleich zu den malignen Ergüssen der Bronchialkarzinompatienten mit 5 % (Streubreite 2-8 %). Natürliche Killerzellen konnten im Mittel knapp doppelt so häufig bei den Bronchialkarzinompatienten (20 %, Streubreite 2-41 %) beobachtet werden wie bei den Mammakarzinompatienten (12 %, Streubreite 1-27 %). Auf Grund von Materiallimitation konnten 16 der 18 malignen Pleuraergüsse beim Mammakarzinom im FACS charakterisiert werden.

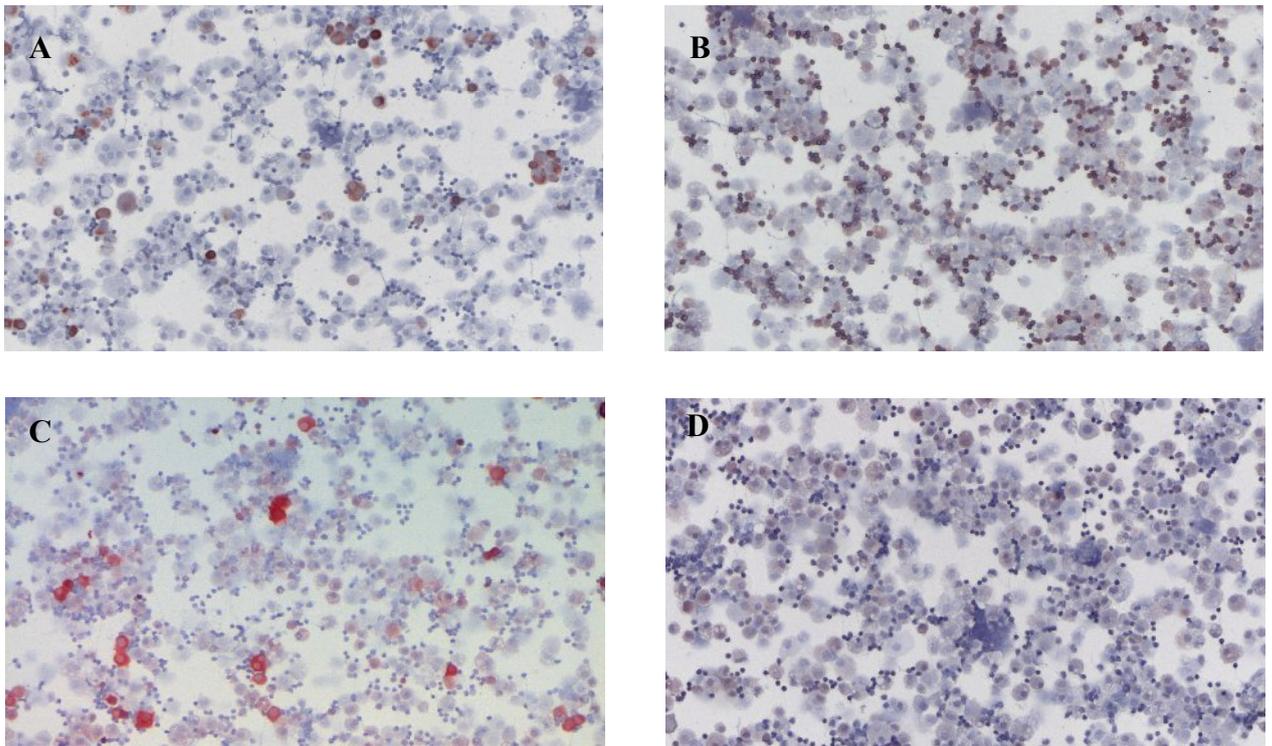


Abbildung 3: Zelluläre Charakterisierung der malignen Pleuraergüsse mittels Immunzytologie (ABC-Methode) auf Zytospinpräparaten (3736). Lichtmikroskopische Aufnahmen (100 x). **A.** Darstellung der Epithelzellen (Pan-Zytokeratinfärbung, Klon KI-1, IgG1). **B.** Darstellung der Leukozyten (anti-CD45 Leukozytenantigen, Klon T200, IgG1). **C.** Darstellung der Mesothelzellen (anti-Calretinin, Klon Z11-E3, IgG 2a). **D.** Darstellung der Fibroblasten (anti-Vimentin, Klon Vim3B4, IgG2a).

3.4 Molekulare Charakterisierung der Pleurakarzinomzellen

Die Antigencharakterisierung der Pleurakarzinomzellen erfolgte immunzytologisch auf Zytospinpräparaten. Die Antigencharakterisierung konnte auf Grund von Materiallimitation für 17 von 18 maligne Pleuraergüsse beim Mammakarzinom (3917 fehlt, Tab. 11) und für drei von vier maligne Pleuraergüsse beim Bronchialkarzinom durchgeführt werden (4124 fehlt, Tab. 12). Hierfür wurden prognose-, therapie- und chemoresistenzrelevante Antigene ausgewählt. Prognoserelevante Antigene waren das Carcinoembryonale Antigen CEA, E-Cadherin, CD44 v6 (CD44 Variante 6), der UPA-Rezeptor, PAI-I und uPA des UPA-Systems, sowie Ki-67. Therapierelevante Antigene waren MUC1, Topoisomerase I, EGFR, die Hormonrezeptoren ER und PgR und Her2/neu. Antigene, die sowohl als prognose- und

therapierelevant eingestuft werden können waren das epitheliale Antigen EpCAM und Ephrin A2. Als chemoresistenz- bzw. therapieresistenzvermittelnde Antigene wurden das P-Glykoprotein, bcl-2, und das „Breast Cancer Resistance Protein“ BCRP ausgewählt. Mikroskopisch wurde die Anzahl der für das jeweilige Antigen positiven Pleuraergussproben, sowie semiquantitativ der Anteil der positiv gefärbten Epithelzellen bestimmt.

3.4.1 Pleuraergüsse von Mammakarzinom Patienten

Aus der Gruppe der prognoserelevanten Antigene war der UPA-Rezeptor mit 71 % (12 aus 17) am häufigsten vertreten. Gleichzeitig war dieser auf einem Großteil der Epithelzellen nachweisbar (80 %, Streubreite 20-100 %). CEA, E-Cadherin und CD44v6 wurden bei ≥ 50 % der Pleuraergussproben exprimiert (CEA: 59 %, 10 aus 17; E-Cadherin: 59 %, 10 aus 17; CD44v6: 53 %, 9 aus 17). Der Anteil der positiv-gefärbten Epithelzellen war jeweils ähnlich hoch mit 64 % für CEA, 67 % für E-Cadherin und 68 % für CD44v6. Die Antigene PAI-I, KI-67 und uPA war weniger häufig nachweisbar. Lediglich 24 % der MPE (4 aus 17) exprimierten PAI-1 auf durchschnittlich 38 % (Streubreite 5-60 %) und KI-67 auf im Mittel 77 % (Streubreite 20-100%) der Epithelzellen. uPA war nur auf einer Ergussprobe nachzuweisen, mit anteilig 40 % positiv gefärbter Epithelzellen.

Das Glykoprotein MUC1 und der Wachstumsfaktor-Rezeptor EGF (EGFR) waren in der Gruppe der therapierelevanten Antigen mit 82 % (14 aus 17) am häufigsten vertreten, gefolgt von Her-2/neu- (35 %, 6 aus 17), dem Östrogenrezeptor (24 %, 4 aus 17), Topoisomerase I (12 %, 2 aus 17) und dem Progesteronrezeptor (6 %, 1 aus 17). Der Anteil der positiv gefärbten Epithelzellen zeigte sich vergleichbar für MUC1 und EGFR mit 70 % (Streubreite 5-100 %) und 72 % (Streubreite 10-100 %). Her-2/neu war auf 48 % der Epithelzellen (Streubreite 20-80 %), der Östrogenrezeptor auf 59 % (Streubreite 10-100 %), Topoisomerase I auf 53 % (Streubreite 40-65 %) und der Progesteronrezeptor auf nur 10 % der Epithelzellen nachweisbar. Die Charakterisierung der prognose- und therapierelevanten Antigene ergab für EpCAM mit 76 % einen hohen Anteil positiver maligner Ergussproben (13 aus 17). Die anteilige Expression von EpCAM auf den Epithelzellen lag bei 77 % (Streubreite 20-100 %). Bei 6 % der MPE (1 aus 17) war EphrinA2 auf 40 % der Epithelzellen nachweisbar.

3. ERGEBNISSE

Antigen	Bezeichnung	positive Ergussproben		Mittelwert ± Stabwn	SB
		in %	Anteil	Zytokeratin + Zellen in %	
<i>Prognose-assoziiert</i>					
CEA	Carcinoembryonales Antigen	59	(10/17)	64 ± 38,5	5-100
E-Cadherin	E-Cadherin	59	(10/17)	67 ± 33,4	10-100
CD44 v6	CD44 v6	53	(9/17)	68 ± 29	20-100
UPA-R	Urokinase Plasminogen Aktivator-Rezeptor	71	(12/17)	80 ± 25	20-100
PAI-1	Plasminogen Aktivator-Inhibitor	24	(4/17)	38 ± 20	5-60
UPA	Urokinase Plasminogen Aktivator	6	(1/17)	40	-
KI-67	KI-67	76	(13/17)	24 ± 27	1-85
<i>Therapie-assoziiert</i>					
MUC1	MUC1 Glykoprotein	82	(14/17)	70 ± 38	5-100
EGF-R	EGF-Rezeptor	82	(14/17)	72 ± 29	10-100
ER	Östrogen-Rezeptor	24	(4/17)	59 ± 42	10-100
PgR	Progesteron-Rezeptor	6	(1/17)	10	-
Her-2	Her-2/neu Rezeptor	35	(6/17)	48 ± 20	20-80
Topoisomerase 1	Topoisomerase 1	12	(2/17)	53 ± 12,5	40-65
<i>Therapie-und prognose-assoziiert</i>					
EpCAM	Epitheliales Antigen	76	(13/17)	77 ± 32	20-100
EphrinA2	Ephrin A2 Rezeptor	6	(1/17)	40	-
<i>Chemoresistenz-assoziiert</i>					
P-Glykoprotein	P-Glykoprotein	29	(5/17)	25 ± 25,5	2-75
bcl-2	Bcl-2 Onkoprotein	12	(2/17)	58 ± 27,5	30-85
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein	6	(1/17)	30	-

Tabelle 11: Molekulare Charakterisierung der MPE beim Mammakarzinom (n=17) mittels Immunzytologie (ABC-Methode) auf Zytospinpräparaten (3917 fehlt, da Limitation von zellulärem Material). Stabwn = Standardabweichung; SB = Streubreite. Dargestellt sind für die jeweiligen Antigene der prozentuale Anteil der positiv gefärbten Ergussproben („positive Ergussproben“), sowie der prozentuale Anteil der positiv gefärbten Epithelzellen („Mittelwert in % ± Stabwn“).

Das P-Glykoprotein war innerhalb des Kollektivs der therapieresistenzvermittelnden Antigene mit 29 % (5 aus 17) am stärksten vertreten. Jedoch exprimierte nur ein kleiner Anteil von durchschnittlich 25 % der Epithelzellen (Streubreite 2-75 %) das Protein. Das Bcl-2 Onkoprotein ließ sich auf 12 % (2 aus 17) der MPE Proben detektieren. Der Anteil der positiven Epithelzellen lag bei durchschnittlich 58 % (Streubreite 30 -85 %). Das Breast Cancer Resistance Protein BCRP war mit 6 % (1 aus 17) und anteilig 30 % positiver Epithelzellen am seltensten repräsentiert.

Die Tumorprogression jeder Patientin wurde mit den auf den Pleuraergusszellen nachgewiesenen prognoserelevanten Antigenen korreliert. Hierfür wurde das Patientenkollektiv (n=18) in Gruppen unterteilt. Gruppe null (n=6) waren Patientinnen, die bis zur Entwicklung des malignen Ergusses keine Progression zeigten („first-line“). Gruppe eins (n=6) waren Patientinnen, die bis zur Entwicklung des malignen Ergusses ein Rezidiv (Rezidiv I, „second-line“) aufwiesen. Gruppe zwei (n=6) waren Patientinnen, die bis zur Entwicklung des malignen Ergusses zeitlich versetzt zwei Rezidive (Rezidiv I und II, „third-line“) aufwiesen (Tab. 3). Eine positive Korrelation zeigte sich für das Antigen CEA und der Gruppe zwei ($p=0,0027$; $R=1$). Alle Patientinnen dieser Gruppe (6 von 6) waren für das Antigen CEA positiv und entwickelten nach der Diagnose des Primärtumors zwei Rezidive und maligne Pleuraergüsse. In der Gruppe null hingegen, die bis zur Entwicklung des malignen Ergusses keine Rezidive aufwiesen, wurden vier der fünf Patientinnen negativ für CEA auf den Pleurakarzinomzellen getestet. In Gruppe eins waren die Hälfte der Ergussproben (drei von sechs) positiv für CEA. Des Weiteren zeigte sich eine positive Korrelation für das epitheliale Antigen EpCAM und die Gruppe zwei der Patienten („third-line“). Alle Patientenproben dieser Gruppe waren positiv für EpCAM ($p=0,003$; $R=1$). Innerhalb der Gruppe null konnten zwei von fünf maligne Pleuraergüsse positiv getestet werden. In der Gruppe eins waren fünf von sechs der Ergussproben EpCAM-positiv ($p=0,06$). Der Positivnachweis des UPA-Rezeptors auf den malignen Ergusszellen korrelierte signifikant mit der Gruppe null ($p=0,017$, $R=1$), da alle Pleuraergussproben (fünf von fünf) positiv für den UPA-R gefärbt waren. Innerhalb der Gruppe eins ließ sich bei zwei von vier Ergüssen der UPA-R nachweisen. In der Gruppe zwei waren jedoch fünf von sechs Patienten positiv für den UPA-R ($p=0,06$). Für die Antigene E-Cadherin, CD44 v.6, PAI-1, uPA und Ki-67 ließ sich mit keiner der Gruppen eine signifikante Korrelation nachweisen.

3. ERGEBNISSE

Der Hormonrezeptor- und Her2/neu Status der malignen Pleuraergusszellen (n=15) wurde mit dem Hormonrezeptor- und Her2/neu Status des korrespondierenden Primärtumors (n=15) verglichen. Da für die Patientenproben 3866 und 3862 keine pathologischen Daten bezüglich des Primärtumors und für 3917 keine Östrogen- und Progesteronrezeptordaten der Pleuraergusszellen vorlagen, konnte für n=15 Ergussproben ein Vergleich hergestellt werden. Der Östrogenrezeptor war bei den Primärtumoren mit 87 % (13 von 15) nachzuweisen. Im Vergleich dazu waren 20 % der MPE beim Mammakarzinom positiv (drei von 15). Es zeigte sich im Vergleich zum korrespondierenden Primärtumor ein signifikanter Verlust des Östrogenrezeptors ($p < 0,002$). Der Progesteronrezeptor war gleich stark wie der ER bei den Primärtumoren mit 87 % vertreten (drei von 15). Ein signifikanter Verlust des Progesteronrezeptors war mit 7 % (eins von 15) PgR positiven malignen Ergüssen und 87 % positiven Primärtumoren zu beobachten ($p < 0,0005$). Der Nachweis eines positiven Her2/neu Status war bei den malignen Pleuraergüssen und den korrespondierenden Primärtumoren nicht signifikant unterschiedlich mit 47 % (Primärtumore, sieben von 15) und 33 % (MPE, fünf von 15; Abb. 4).

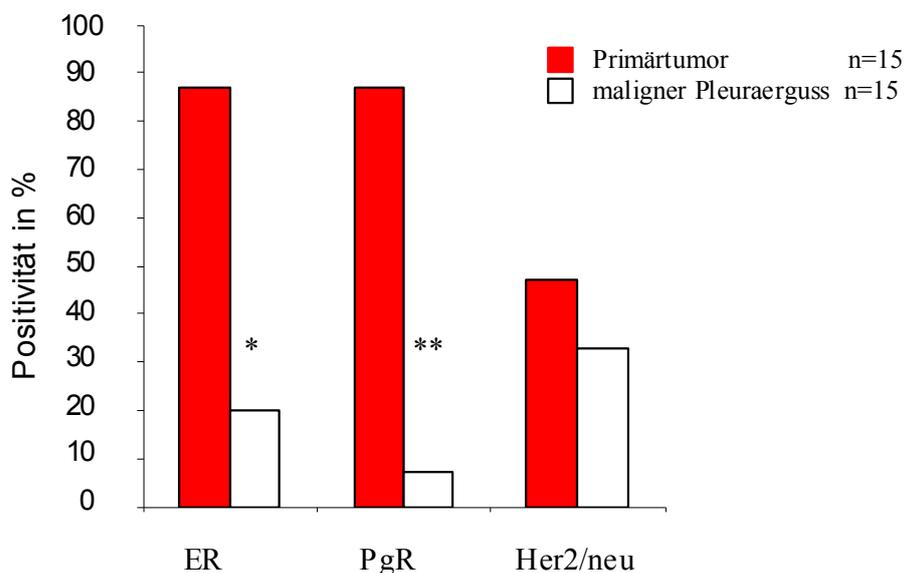


Abbildung 4: Vergleich Hormonrezeptor- und Her2/neu Positivität auf den malignen Pleuraergüssen und dem korrespondierenden Primärtumor beim Mammakarzinom. Die Verlust der Rezeptoren ER und PgR auf den malignen Pleuraergüssen war signifikant im Vergleich zu den Primärtumoren ($*p < 0,002$; $**p < 0,0005$). Bezüglich des Her2/neu Status war kein signifikanter Unterschied zu beobachten ($p = 0,6$).

3.4.2 Pleuraergüsse von Bronchialkarzinom Patienten

Die malignen Pleuraergüsse der Bronchialkarzinompatienten wurden mit demselben Antikörper-Panel wie die malignen Ergussproben der Mammakarzinompatienten charakterisiert (Tab. 12).

Die prognoserelevanten Antigene CEA, E-Cadherin, CD44v6 und KI-67 konnten auf allen MPE Proben nachgewiesen werden (drei von drei). CEA war vergleichbar mit den Ergüssen beim Mammakarzinom auf durchschnittlich 65 % der Epithelzellen (Streubreite 30-100 %) nachweisbar. E-Cadherin und CD44v6 zeigten auf den Ergussproben eine vergleichbare durchschnittliche Expression von 47 % (E-Cadherin: Streubreite 10-80 %; CD44v6: 25-80 %) positiven Pleurakarzinomzellen. KI-67 wurde im Mittel auf 47 % der Pleurakarzinomzellen detektiert (Streubreite 15-80%). Der UPA-R wurde auf zwei von drei, PAI-1 und uPA auf einem von drei der MPE exprimiert. Der UPA-R wurde, mit im Vergleich zu den Ergüssen beim Mammakarzinom annähernd stark auf durchschnittlich 85 % (Streubreite 70-100 %) der Epithelzellen nachgewiesen. PAI-1 und uPA wurden anteilig schwächer auf nur 20 % der Epithelzellen exprimiert. Im Gegensatz zu den MPE der Mammakarzinompatienten wurden nicht alle der therapielevanten Antigene auf den malignen Pleuraergusszellen der Bronchialkarzinompatienten präsentiert. Die Hormonrezeptoren ER und PgR, sowie Her2/neu waren bei allen MPE-Proben der Bronchialkarzinompatienten negativ. Ein positiver Nachweis zeigte sich für MUC1 und den EGF-Rezeptor für alle untersuchten MPE (drei von drei). Der Anteil der positiven Epithelzellen war im Vergleich zum Mammakarzinom leicht erhöht mit 80 % für MUC1 (Streubreite 50-100%) und 88 % (Streubreite 75-100 %) für den EGF-R. Topoisomerase I war bei einem der Patienten mit 70 % positiv gefärbten Epithelzellen nachweisbar. Ähnlich der MPE der Mammakarzinompatienten waren innerhalb des Kollektivs der prognose- und therapielevanten Antigene das Antigene EpCAM am stärksten vertreten und fast alle Epithelzellen (98 %, Streubreite 95-100 %) exprimierten EpCAM. EphrinA2 war bei den Bronchialkarzinompatienten im Vergleich zu den Mammakarzinompatienten häufiger nachweisbar (zwei von drei) und konnte mit einer anteiligen Expression auf den Epithelzellen von 70 % (Streubreite 50-90 %) nachgewiesen werden.

Das P-Glykoprotein aus der Gruppe der therapieresistenzvermittelnden Antigene war bei einer Patientenprobe zu detektieren (33 %, 1 von 3) und wurde aber auf einem Großteil der

3. ERGEBNISSE

Antigen	Bezeichnung	positive Ergussproben		Mittelwert ± Stabwn	SB
		in %	Anteil		
				Zytokeratin + Zellen in %	
<i>Prognose-assoziiert</i>					
CEA	Carcinoembryonales Antigen	100	(3/3)	65 ± 29	30-100
E-Cadherin	E-Cadherin	100	(3/3)	47 ± 29	10-80
CD44 v6	CD44 v6	100	(3/3)	47 ± 24	25-80
UPA-R	Urokinase Plasminogen Aktivator-Rezeptor	67	(2/3)	85 ± 42	70-100
PAI-1	Plasminogen Aktivator-Inhibitor	33	(1/3)	20	-
UPA	Urokinase Plasminogen Aktivator	33	(1/3)	20	-
KI-67	KI-67	100	(3/3)	47 ± 27	15-80
<i>Therapie-assoziiert</i>					
MUC1	MUC1 Glykoprotein	100	(3/3)	80 ± 22	50-100
EGF-R	EGF-Rezeptor	100	(3/3)	88 ± 10	75-100
ER	Östrogen-Rezeptor	0	(0/3)	0	-
PgR	Progesteron-Rezeptor	0	(0/3)	0	-
Her-2	Her-2/neu Rezeptor	0	(0/3)	0	-
Topoisomerase 1	Topoisomerase 1	33	(1/3)	70	-
<i>Therapie-und prognose-assoziiert</i>					
EpCAM	Epitheliales Antigen	100	(3/3)	98 ± 2	95-100
EphrinA2	Ephrin A2 Rezeptor	67	(2/3)	70 ± 37	50-90
<i>Chemoresistenz-assoziiert</i>					
P-Glykoprotein	P-Glykoprotein	33	(1/3)	75	-
bcl-2	Bcl-2 Onkoprotein	0	(0/3)	0	-
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein	0	(0/3)	0	-

Tabelle 12: Molekulare Charakterisierung der MPE beim Bronchialkarzinom (n=3) mittels Immunzytologie (ABC-Methode) auf Zytospinpräparaten (4124 fehlt, auf Grund von Limitation des zellulären Materials). Stabwn = Standardabweichung; SB = Streubreite. Dargestellt sind für die jeweiligen Antigene der prozentuale Anteil der positiv gefärbten Ergussproben („positive Ergussproben“), sowie der prozentuale Anteil der positiv gefärbten Epithelzellen („Mittelwert in % ± Stabwn“).

malignen Pleuraergusszellen (75 %) exprimiert. BCL-2 und BCRP hingegen waren für die MPE der Bronchialkarzinompatienten negativ.

3.5 Auswahl der Analysemethode nach ex vivo Therapie mit MT110

3.5.1 Karzinomzelllinie HT-29

Als Analysesysteme nach der ex vivo Therapie der malignen Pleuraergüsse mit dem bispezifischen Antikörper MT110 wurden der Toxilight- und Caspase Glo-Assay gewählt, um den Anteil der toten bzw. lysierten (Toxilight) und apoptotischen (Caspase Glo) Zellen zu bestimmen. Die stark EpCAM-positive Zelllinie HT-29 mit 98 % EpCAM-positiven Zellen wurde verwendet, um die Analysesysteme Toxilight- und Caspase Glo Assay mit MT110 therapierten Zellen zu etablieren und die Therapiedosis- und -dauer der geplanten ex vivo Experimente mit den malignen Pleuraergüssen festzulegen. Hierfür wurde der Pleuraerguss „imitiert“, indem die HT-29 Zellen mit peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) aus dem Peripherblut zweier Spender in bestimmten Verhältnissen gemischt wurden. Die für die Vorversuche festgelegten E (E=Effektorzellen=mononukleäre Zellen) : T (T=Targetzellen=EpCAM+ Zellen) Ratios waren 1:5, 1:1, 5:1 und 25:1. Jedes E:T Ratio wurde mit 100, 1000 und 10.000 ng/ml MT110 für 24h, 48h und 72h therapiert. Danach wurden die imitierten Ergussproben mit dem Toxilight- (3.5.2.1) und dem Caspase Glo-Assay (3.5.2.2) analysiert. Auf Grund dieser Ergebnisse wurden die Therapiebedingungen für die malignen Pleuraergüsse abgeleitet.

3.5.2 Ableitung der Therapiebedingungen für die malignen Pleuraergüsse

In den Vorversuchen mit der Zelllinie HT-29 wurde an verschiedenen E:T Ratios mit unterschiedlichen Konzentrationen (10, 100, 1000 und 10.000 ng/ml) der bispezifischen Antikörper MT110 über einen Zeitraum von 24h, 48h und 72h getestet.

3.5.2.1 Toxilight-Assay

Mit Hilfe des Toxilight-Assays konnte die nach der MT110 Therapie durch lysierte Zellen freigesetzte Adenylatkinase im Luminometer quantifiziert werden. In Abbildung fünf sind die Ergebnisse für jedes E:T Ratio zusammengefasst. Für das E:T Ratio 1:5 war für 100 ng/ml MT110 nach 24h, 48h und 72h keine Lyse zu beobachten. Für die Konzentrationen 1000 und 10.000 ng/ml konnte kein lytischer Effekt nach 24h und ein lytischer Effekt von < 10 % nach 48h und 72h detektiert werden (Abb. 5A). Für das E:T Ratio 1:1 war für 100 ng/ml nach 24h keine Lyse, nach 48h eine Lyse mit 7,5 % und nach 72h mit 26 % zu beobachten. Mit der Konzentration von 1000 ng/ml MT110 wurde die Lyse nach 24h nicht gesteigert. Nach 48h konnte die Lyse mit 1000 ng/ml MT110 auf 23 % und nach 72 h auf 72 % ausgeweitet werden. Für 10.000 ng/ml war nach 24h, 48h und 72h keine Steigerung der Lyse im Vergleich zu 1000 ng/ml zu erkennen. (Abb. 5B). Für das E:T Ratio 5:1 war für 100 ng/ml nach 24h keine Lyse, nach 48h eine Lyse mit 56 % und nach 72h mit 97 % zu beobachten. Die Therapie mit 1000 ng/ml MT110 führte nach 24h zu keinem Anstieg der Lyse. Nach 48h wurden 87 % tote Zellen und nach 72h 100 % tote Zellen detektiert. Mit der Konzentration 10.000 ng/ml konnten die Lyse leicht gesteigert werden und lag nach 48h und 72h bei 100 % (Abb. 5C). Für das E:T Ratio von 25:1 war für 10 ng/ml nach 24h eine Lyse von 7,5 %, nach 48h von 54 % und nach 72h von 86 % zu detektieren. Mit der MT110 Konzentration von 100 ng/ml wurde die Lyse nach 24h auf 24 %, nach 48h auf 68 % gesteigert. Nach 72h mit 100 ng/ml war kein Anstieg der lytischen Aktivität zu beobachten. Eine schwache Steigerung der Lyse konnte man mit 1000 ng/ml nach 24h und 48h auf 29 % und 62 % und mit 10.000 ng/ml nach 24h und 48h auf 37 % und 75 % detektieren. Nach 72h war für 1000 ng/ml und 10.000 ng/ml keine Steigerung der Lyse zu sehen (Abb. 5D).

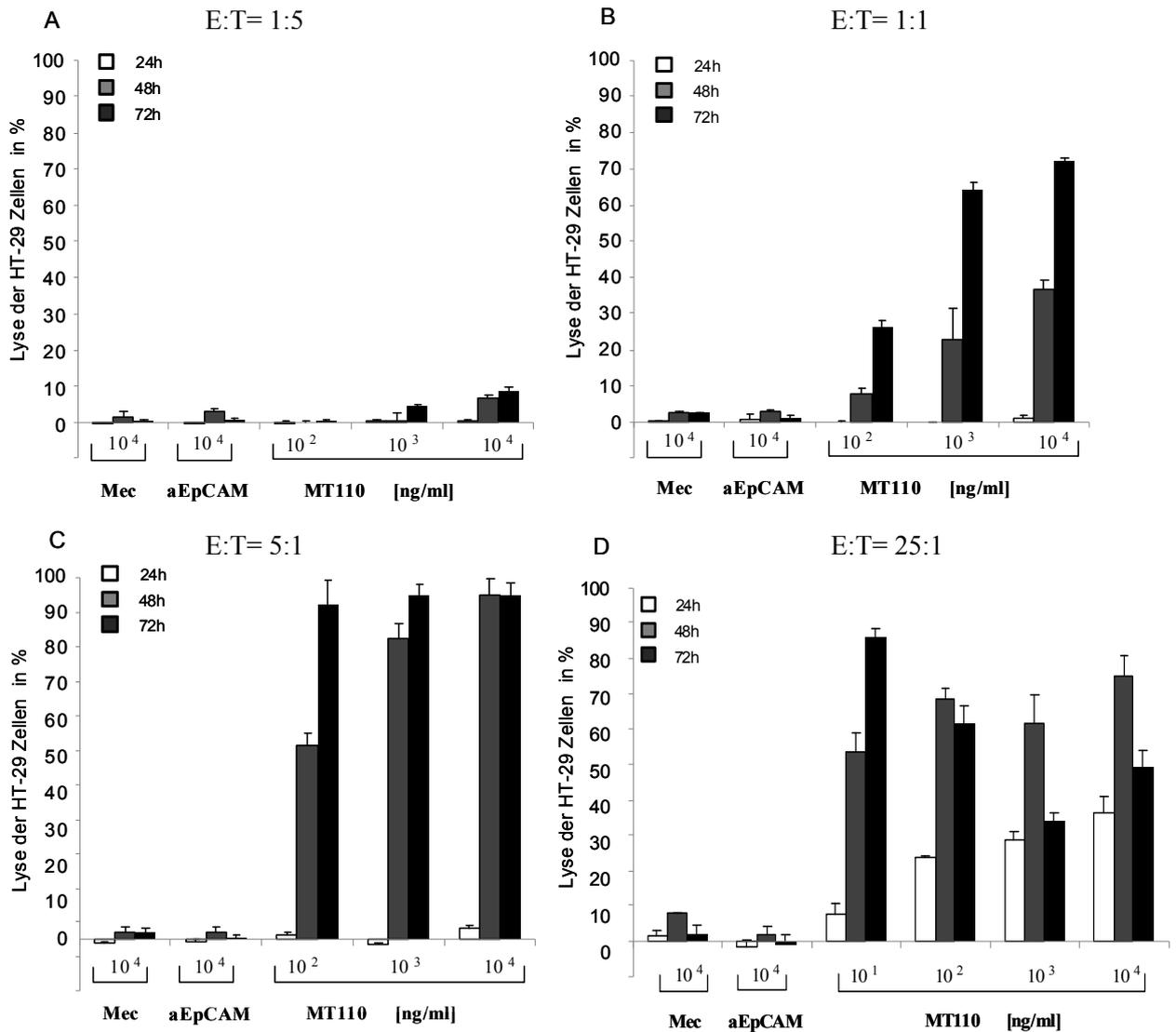


Abbildung 5: Ex vivo Therapie der mit peripheren T-Lymphozyten versetzten Zelllinie HT29 über einen definierten Zeitraum (24h, 48h, 72h) und mit verschiedenen Dosen (10¹, 10², 10³, 10⁴ ng/ml) von MT110. Der Anteil der lysierten bzw. toten Targetzellen wurde mit dem Toxilight-Assay (Cambrex) im Luminometer bestimmt. **A.** E:T Ratio 1:5; **B.** E:T Ratio 1:1; **C.** E:T Ratio 5:1; **D.** E:T Ratio 25:1 (E: Effektorzellen=mononukleäre Zellen; T: Targetzelle=EpCAM+ Zellen)

3.5.2.2 Caspase Glo-Assay

Der Caspase Glo-Assay wurde parallel zum Toxilight-Assay durchgeführt. Mit Hilfe des Caspase Glo-Assays kann die vermehrte Aktivität der Caspasen 3 und 7 gegenüber der unbehandelten Mediumkontrolle bestimmt werden. Für das E:T Ratio 1:5 waren für 100 ng/ml MT110 nach 24h, 48h und 72h keine aktiven Caspasen 3/7 zu detektieren. Für die Konzentrationen 1000 und 10.000 ng/ml konnte nach 24h keine Caspase Aktivität festgestellt werden. Für 1000 ng/ml und 10.000 ng/ml MT110 war nach 48h und 72h eine schwach verstärkte Caspaseaktivität im Vergleich zur Mediumkontrolle zu detektieren (Abb. 6A). Für das E:T Ratio 1:1 waren für 100 ng/ml nach 24h keine aktiven Caspasen 3/7 nachweisbar. Für 100 ng/ml MT110 nach 48h konnte eine 3-fach verstärkte Caspase-Aktivität und nach 72h eine 5-fach verstärkte Caspase-Aktivität nachgewiesen werden. Mit der Konzentration von 1000 ng/ml MT110 wurde die Caspase-Aktivität nach 24h nicht gesteigert. Nach 48h mit 1000 ng/ml MT110 konnte die Caspase-Aktivität im Vergleich zu 100 ng/ml verdoppelt werden (6fach). Nach 72h war keine Steigerung zu sehen. Für 10.000 ng/ml war wie für den Toxilight-Assay nach 24h, 48h und 72h keine Steigerung der Caspase-Aktivität im Vergleich zu 1000 ng/ml zu erkennen. (Abb. 6B). Für das E:T Ratio 5:1 war für 100 ng/ml nach 24h im Vergleich zur Mediumkontrolle eine Steigerung der Caspase-Aktivität um das 4-fache und nach 48h mit 100ng/ml um das 7-fache zu beobachten. Nach 72h konnte der Wert nicht gesteigert werden. Die Therapie mit 1000 ng/ml und 10.000 ng/ml führte zu einem vergleichbaren Ergebnis nach 24h, 48h und 72h. Im Vergleich zu 100 ng/ml konnte die Caspase-Aktivität nur nach 48h leicht gesteigert werden. Insgesamt veränderten sich die Werte für 1000 ng/ml und 10.000 ng/ml im Vergleich zu 100 ng/ml minimal. (Abb. 6C). Für das E:T Ratio von 25:1 war mit der niedrigsten Konzentration von 10 ng/ml nach 24 keine gesteigerte Caspase-Aktivität zu detektieren. Mit 10 ng/ml war nach 48h eine 2-fach und nach 72h eine 3-fach erhöhte Aktivität zu sehen. Mit 100 ng/ml war nach 24h ein schwacher Anstieg der Caspase-Aktivität zu detektieren, der sich nach 48h auf eine 2,4-fach verstärkte Caspase-Aktivität und nach 72h auf eine 3,5-fach verstärkte Caspase-Aktivität steigern ließ. Für die Konzentrationen 1000 ng/ml und 10.000 ng/ml war keine gesteigerte Caspase-Aktivität im Vergleich zu 100 ng/ml MT110 festzustellen (6D).

Zusammenfassend wurde anhand der Vorversuche für die ex vivo Therapie der malignen Pleuraergüsse folgende Therapiebedingungen festgelegt:

3. ERGEBNISSE

Als Therapiedosis wurde eine MT110 Konzentrationsreihe für alle E:T Ratios von 10, 100 und 1000 ng/ml festgelegt. Die Lyse der Zellen sowie die Caspase-Aktivität ließ sich bei keinem E:T Ratio mit 10.000 ng/ml MT110 wesentlich steigern und deswegen wurde diese Therapiedosis nicht in Betracht gezogen. Als Therapiezeitraum wurden für jedes E:T Ratio jeweils zwei Therapiezeitpunkte festgelegt. Der 48h-Wert wurde für die ex vivo Therapie der malignen Pleuraergüsse für alle E:T Ratios als ein fester Therapiezeitpunkt ausgewählt, da nach 48h MT110 Therapie für alle E:T Ratios und MT110 Konzentrationen ein Effekt zu detektieren war. Für ein E:T Ratio mit $T > 1$ wurde der 96 Wert als zweiter Therapiezeitpunkt in Betracht gezogen, da die Zellyse für alle Konzentrationen $<10\%$ ausfiel und nach 72h aktive Caspasen 3 und 7 nur schwach nachweisbar waren (Abb. 5A und 6A). Für ein E:T Ratio von 1:1 wurde der 48h und 72h Zeitpunkt gewählt, das sowohl für den Toxilight- und den Caspase Glo Assay nach diesem Zeitraum ein Effekt zu sehen war (Abb. 5B und 6B). Für Pleuraergüsse mit einem E:T Ratio mit $E \geq 5$ wurde auf Grund der Vorergebnisse der 24h Wert neben 48h als zweiter Therapiezeitpunkt in Betracht gezogen, da nach 24h für alle Konzentrationen unabhängig vom verwendeten Assay ein Effekt zu detektieren war. Sowohl für den Toxilight-Assay als auch für den Caspase Glo-Assay war ein starker Effekt nach 48h zu beobachten, der nach 72h nicht wesentlich gesteigert werden konnte (Abb. 5 C, D und Abb. 6 C,D).

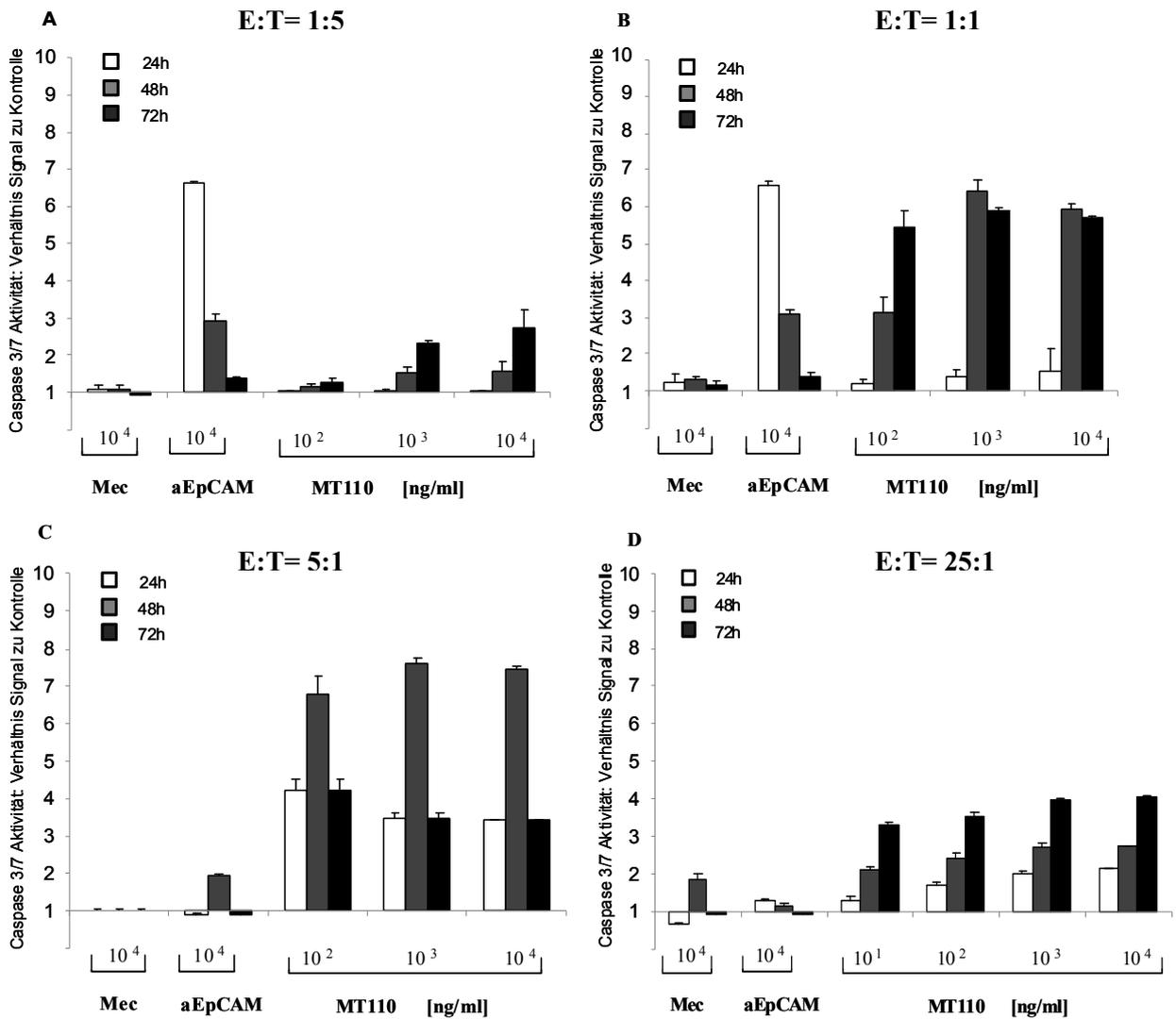


Abbildung 6: Ex vivo Therapie der mit peripheren T-Lymphozyten versetzten Zelllinie HT29 über einen definierten Zeitraum (24h, 48h, 72h) und mit verschiedenen Dosen (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 ng/ml) von MT110. Die Caspase 3/7 Aktivität in den Targetzellen wurde mit Hilfe des Caspase Glo-Assays (Promega) im Luminometer gemessen. **A.** E:T Ratio 1:5; **B.** E:T Ratio 1:1; **C.** E:T Ratio 5:1; **D.** E:T Ratio 25:1 (E: Effektorzellen=mononukleäre Zellen; T: Targetzelle=EpCAM+ Zellen)

3.5.3 Analysemethoden für die malignen Pleuraergussproben

3.5.3.1 Toxilight- und Caspase Glo-Assay

Die Ergebnisse der Vorversuche wurden auf die malignen Pleuraergüsse der Mammakarzinompatienten übertragen. Hierfür wurden vier malignen Ergüsse (3826, 3823, 3874, 3888) ex vivo mit MT110 therapiert (10, 100 und 1000 ng/ml). Die Ergebnisse sind für jede Patientenprobe in Abbildung 7, 8, 9 und 10 mit jeweils A und B für die Analysesysteme Toxilight (A) und Caspase Glo (B) abgebildet. Es wurden maximal drei Zeitpunkte je nach Verfügbarkeit des Patientenmaterials gemessen (24h, 48h, 72h). Die Vitalität der Pleuraergusszellen, gemessen an den Kontrollen nahm im Laufe der Therapie deutlich ab (Tab. 13). Deswegen wurde die Therapiedauer für Pleuraergüsse bei einem E:T Ratio mit $T > 1$ nicht auf 96h ausgeweitet.

Die Ergebnisse zeigen, dass unabhängig von der Therapiedauer und -dosis bei keiner der Patientenproben mit Hilfe des Toxilight-Assays eine antikörperabhängige spezifische Lyse der Pleuraergusszellen zu detektieren war (Abb. 7-10 A). Aktive Caspasen 3 und 7 waren mittels des Caspase Glo-Assays nach 72h MT110 Therapie (100, 1000 ng/ml) nur für einen der vier ex vivo therapierten Patientenproben nachweisbar (Abb. 7 B). Auf Grund dieser Ergebnisse wurde auf die Durchflußzytometrie als Analysesystem ausgewichen.

3.5.3.2 Durchflußzytometrie

Die Abbildungen 7 C,D und, 8, 9, 10, C, D und E zeigen die gleichen malignen Pleuraergussproben 3826, 3823, 3874, 3888 nach ex vivo Therapie mit MT110. Als Analysesystem wurde die Durchflußzytometrie verwendet. Der Pleuraerguss 3826 (Abb. 7) wurde ex vivo mit den MT110 Konzentrationen 10, 100 und 1000 ng/ml therapiert (Abb. 7 C). Hier war nach 48 und 72h eine spezifische Lyse der EpCAM+ Zellen zu beobachten, die jedoch nicht dosisabhängig war. Die weiteren malignen Ergussproben (3823, 3874 und 3874) wurden deswegen mit den MT110 Konzentrationen 0,1, 1, 10 und 1000 ng/ml therapiert (Abb. 8, 9, 10, C). Die Analysezeitpunkte 48h und 72h für 3874 und 3888 mit einem E:T Ratio von 11:1 (3874) und 54:1 (3888) wurden gewählt, da nach 24h ex vivo Therapie

mikroskopisch kein Effekt von MT110 zu sehen war. Die malignen Ergüsse 3823 und 3826, die ein E:T Ratio von 1:2 (3823) und 1:1 (3826) aufwiesen wurden für 48h und 72h ex vivo therapiert. Als Kontrollantikörper wurden spezielle bispezifische Antikörper verwendet, die entweder die anti-humane EpCAM (α EpCAM) oder anti-humane CD3 (Mec) Bindungsstelle von MT110 aufwiesen. Die zweite Bindungsstelle war das nicht reaktive Pendant wie z.B. anti-murine CD3 (α EpCAM) oder anti-murine EpCAM (Mec). Die FACS-Analyse ermöglichte über eine Doppelfärbung mit einem Antikörper gegen das epitheliale Antigen EpCAM und einem Vitalfarbstoff (7-AAD) die gezielte Detektion der nach der ex vivo Therapie lysierten bzw. toten EpCAM-positiven Zellen. Die Auswertung zeigte für die malignen Pleuraergüsse 3823 (Abb. 8 C), 3874 (Abb. 9C), 3888 (Abb. 10C) eine dosisabhängige spezifische Lyse der EpCAM-positiven Zellen. Die durchflusszytometrische Analyse ermöglichte zudem die Messung der MT110 abhängigen Stimulation der autologen T-Lymphozyten im malignen Pleuraerguss. Der Nachweis erfolgte mit einem Antikörper gegen die IL-2 Rezeptoren (anti human CD25) auf den T-Lymphozyten. Für den malignen Erguss 3826 erfolgte der Nachweis des Antigens CD25 auf den CD3+ T-Lymphozyten (Abb. 7 D). Der Nachweis von CD25 erfolgte für die Proben 3823, 3874 und 3888 auf den Subpopulationen CD4 und CD8 der T-Lymphozyten (Abb. 8, 9, 10 D und E). Bei allen malignen Ergüssen war nach der MT110 Therapie eine Stimulation der T-Lymphozyten zu beobachten (Abb. 7 D, Abb. 8, 9, 10 D und E).

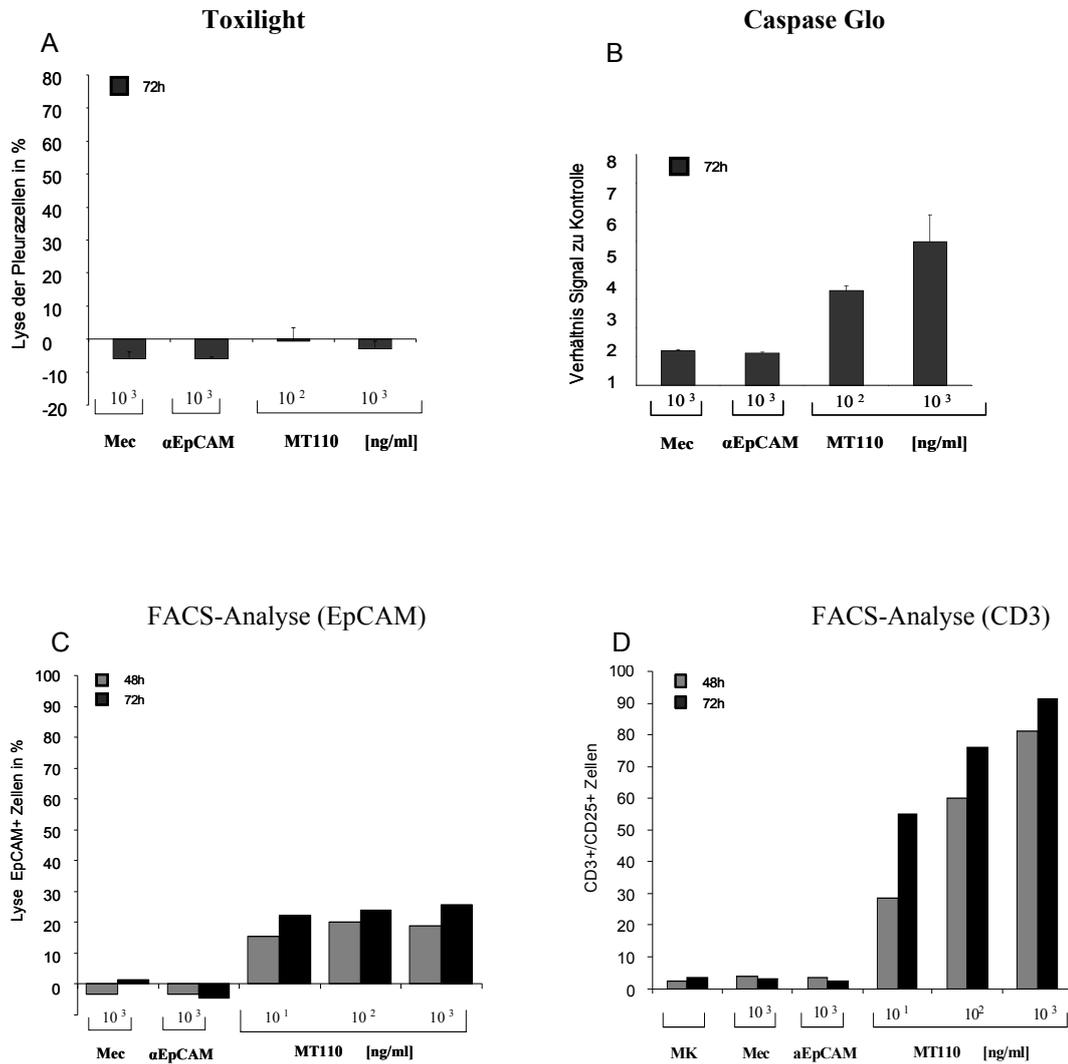


Abbildung 7: Ex vivo Therapie des malignen Pleuraergusses **3826** (E:T Ratio = 1:1) mit dem bispezifischen Antikörper MT110. Vergleichende Darstellung der Ergebnisse von unterschiedlichen Analyse-Systemen: **A.** Toxilight-Assay; **B.** Caspase-Glo Assay; **C.** FACS-Analyse (Lyse der EpCAM+ Zellen); **D.** FACS-Analyse (Stimulation der CD3+ Zellen). (MK=Mediumkontrolle)

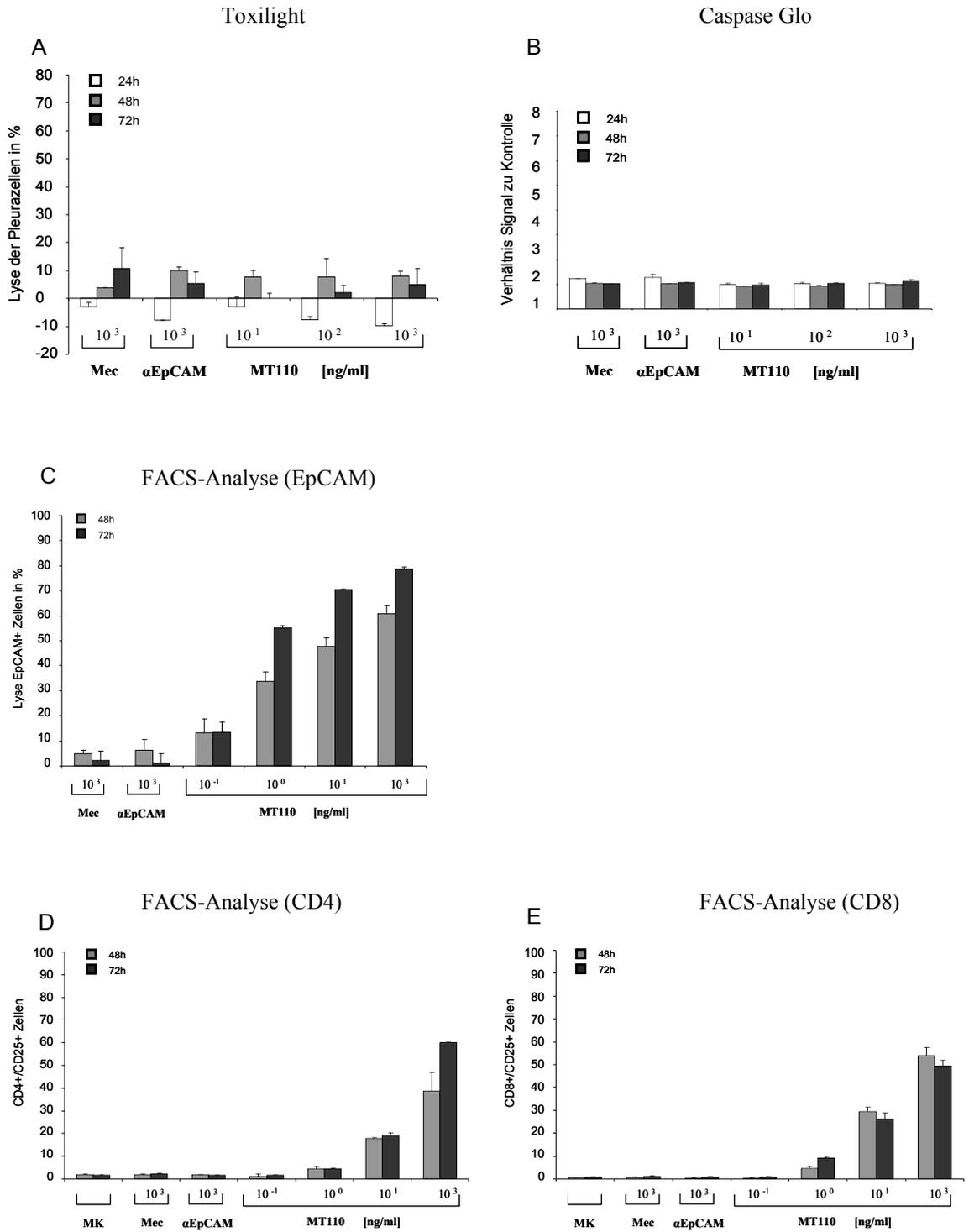


Abbildung 8: Ex vivo Therapie des malignen Pleuraergusses 3823 (E:T Ratio 1:1) mit dem bispezifischen Antikörper MT110. Vergleichende Darstellung der Ergebnisse von unterschiedlichen Analyse-Systemen: **A.** Toxilight-Assay; **B.** Caspase-Glo Assay; **C.** FACS-Analyse (Lyse der EpCAM+ Zellen); **D.** FACS-Analyse (Stimulation der CD4+ Zellen); **E.** FACS-Analyse (Stimulation der CD8+ Zellen). (MK=Mediumkontrolle)

3. ERGEBNISSE

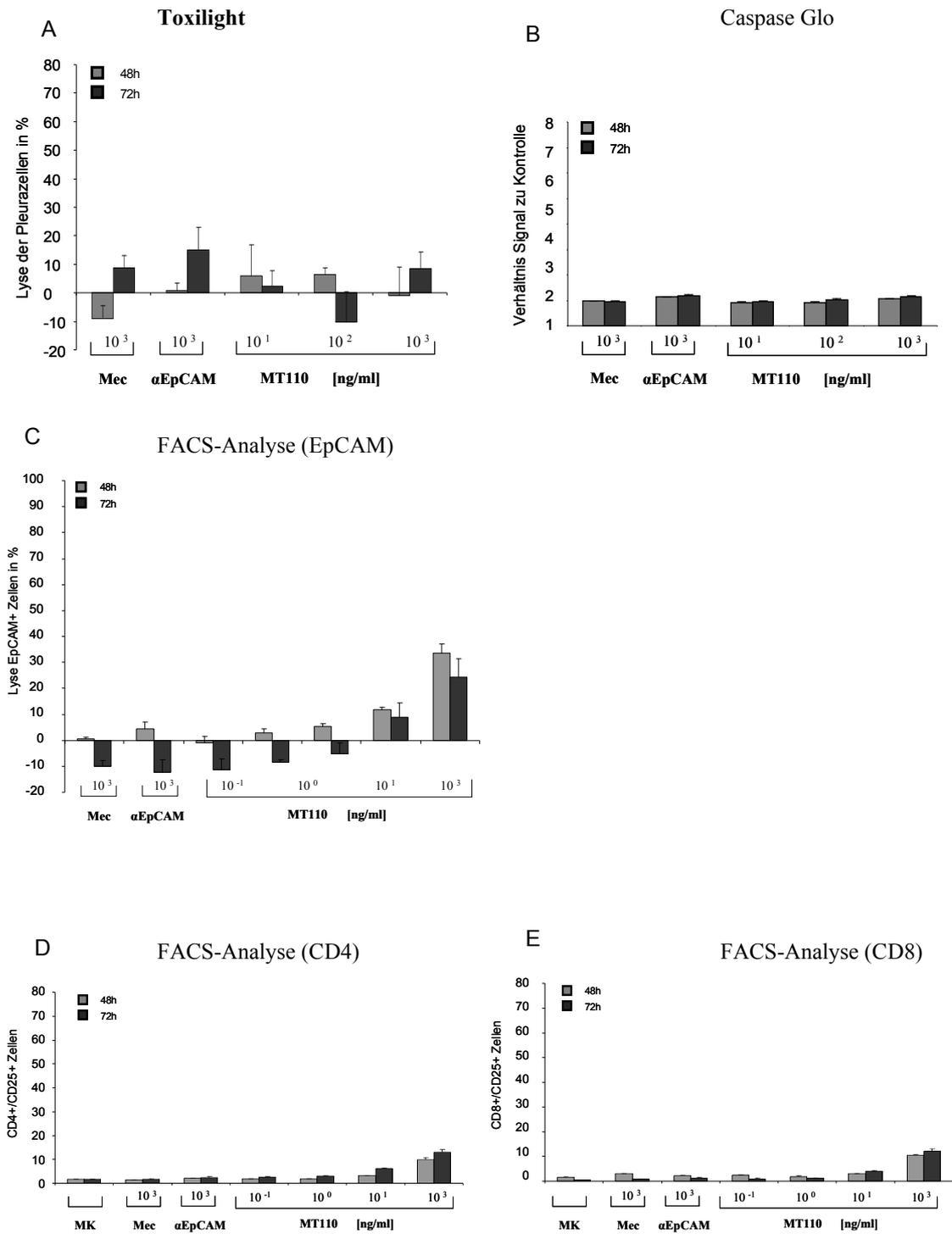


Abbildung 9: Ex vivo Therapie des malignen Pleuraergusses **3874** (E:T Ratio 11:1) mit dem bispezifischen Antikörper MT110. Vergleichende Darstellung der Ergebnisse von unterschiedlichen Analyse-Systemen: **A.** Toxilight-Assay; **B.** Caspase Glo Assay; **C.** FACS-Analyse (Lyse der EpCAM+ Zellen); **D.** FACS-Analyse (Stimulation der CD4+ Zellen); **E.** FACS-Analyse (Stimulation der CD8+ Zellen). (MK=Mediumkontrolle)

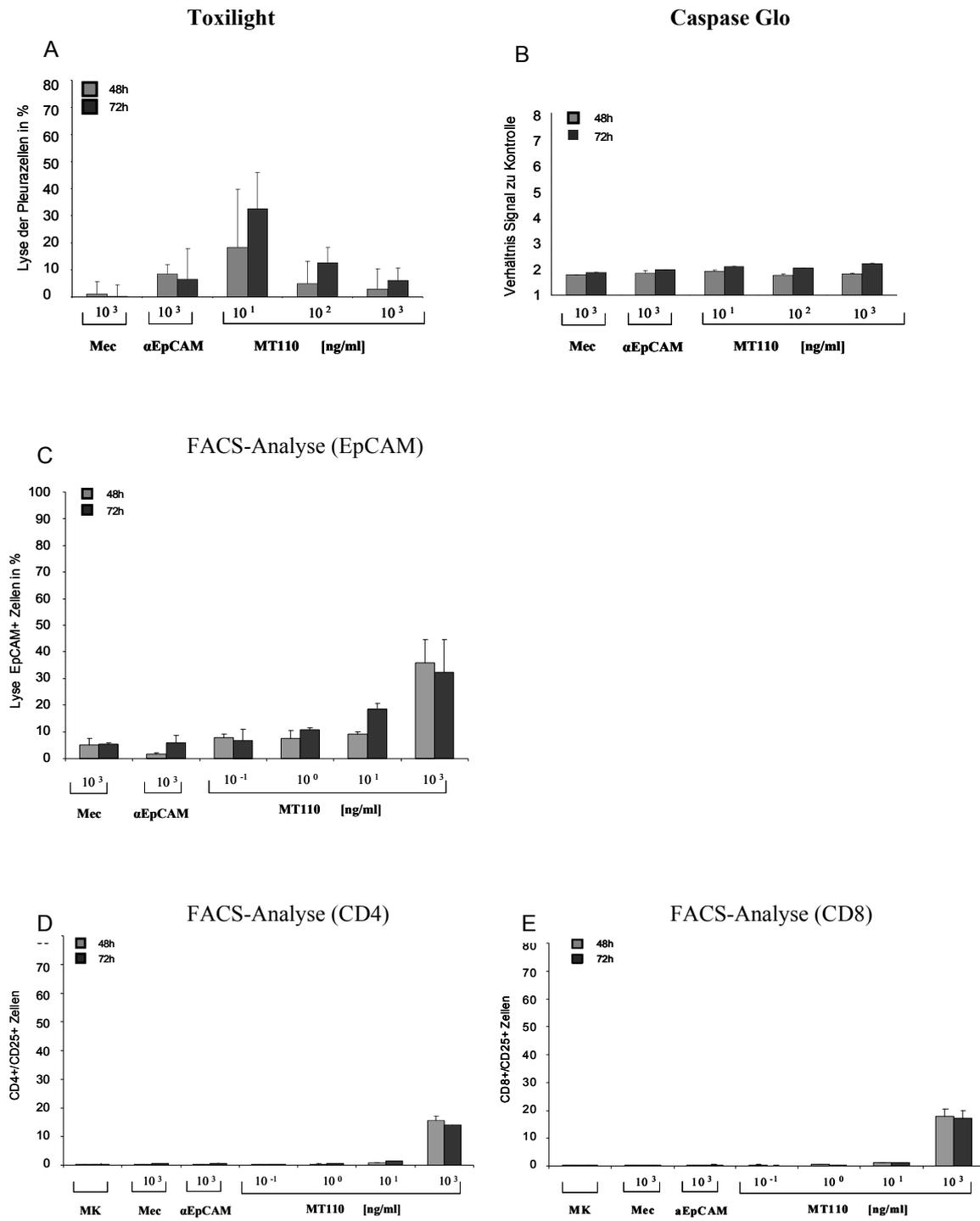


Abbildung 10: Ex vivo Therapie des malignen Pleuraergusses 3888 (E:T Ratio 54:1) mit dem bispezifischen Antikörper MT110. Vergleichende Darstellung der Ergebnisse von unterschiedlichen Read-out Systemen: **A.** Toxilight-Assay; **B.** Caspase-Glo Assay; **C.** FACS-Analyse (Lyse der EpCAM+ Zellen); **D.** FACS-Analyse (Stimulation der CD4+ Zellen) ; **E.** FACS-Analyse (Stimulation der CD8+ Zellen). (MK=Mediumkontrolle)

Patientennummer	Anteil toter Zellen in Pleuraerguss in%			
	nach Auftauen	24h	48h	72h
P3823	27	33	47,73	65
P3874	14	n.g.	63	74
P3888	20	38,14	n.g.	44,3
P3866	15	n.g.	n.g.	48

Tabelle 13: Vitalität der Gesamtheit der Zellen im Pleuraerguss beim Mammakarzinom. über bestimmten Zeitraum Die Werte wurden nach Auftauen der Zellen mit Trypanblau bestimmt. Nach 24h, 48h und 72h nach in Kulturen wurde der Anteil der toten Zellen mit dem Vitalfarbstoff 7-AAD mittels FACS-Analytik bestimmt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in in 7,5 % FCS haltigem RPMI-Medium (n.g.=nicht gemessen).

3.6 Ex vivo Therapie der malignen Pleuraergüsse

Die malignen Pleuraergüsse der Mammakarzinom- und Bronchialkarzinompatienten wurden ex vivo mit dem bispezifischen Antikörper MT110 über einen Zeitraum von 48h und 72h und vier verschiedenen Antikörperkonzentrationen therapiert (0,1, 1, 10, 1000 ng/ml). Als Analysesystem wurde entsprechend der Voruntersuchungen (3.5) die FACS-Analyse verwendet. Mit Hilfe der FACS-Analyse konnte der Anteil der MT110 abhängigen spezifischen Lyse der EpCAM+ Pleuraergusszellen nachgewiesen werden. Zusätzlich erfolgte der Nachweis der MT110 abhängigen Stimulation der Immunzellen im Pleuraerguss. Hierfür wurde auf den CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten der späte Aktivierungsmarker CD25 nachgewiesen und intrazellulär die Serinprotease Granzym B bestimmt.

3.6.1 Nachweis der antikörpervermittelten spezifischen Lyse

Die antikörperabhängige spezifische Lyse wurde für insgesamt sieben maligne Pleuraergüsse der Mammakarzinompatienten und für drei maligne Pleuraergüsse der Bronchialkarzinompatienten bestimmt. Die Kontrolle von MT110 erfolgte kongruent zu den Vorversuchen (3.5) mit den bispezifischen Antikörpern anti-human EpCAM (α EpCAM) und anti-human CD3 (Mec).

3.6.1.1 Mammakarzinom Patienten

Die Charakterisierung der sieben malignen Pleuraergüsse der Mammakarzinompatienten (3823, 3745, 3874, 3888, 3892, 3917, 3924) im FACS ergab eine anteilige EpCAM-Expression auf den Zytokeratin-positiven Pleuraergusszellen von durchschnittlich 78 % mit 30 % bis zu 100 % positiven Epithelzellen. Der Anteil der CD3+ T-Lymphozyten in Bezug zu der Gesamtleukozytenzahl im malignen Pleuraerguss betrug im Mittel 80 % (Streubreite 60-93 %). Das Verhältnis der CD3+ Effektorzellen und EpCAM+ Targetzellen (E:T Ratio) der sieben malignen Pleuraergüsse variierte von 1:4 (3745) bis 620:1 (3924, Tab. 14).

	E:T Ratio der ex vivo therapierten MPE beim Mammakarzinom						
Absolute Zellzahl in %	Patientenproben						
	3745	3892	3823	3874	3888	3917	3924
E: CD3+	4	18	28	24	70	69	62
T: EpCAM+	17.5	40	20	2.2	1.3	0.3	0.1
E:T ratio (CD3+/EpCAM+)	1:4	1:2	1:1	11:1	54:1	230:1	620:1

Tabelle 14: Bestimmung des E:T Ratios der malignen Pleuraergüsse. Das E (CD3+ Effektorzellen) zu T (EpCAM+ Targetzellen) Ratio wurde bestimmt, indem das Verhältnis des prozentual im MPE gemessenen Anteils an CD3+ und EpCAM+ Zellen berechnet wurde.

Mikroskopaufnahmen nach ex vivo Therapie der malignen Ergüsse zeigten einen sichtbaren Effekt von MT110 nach 48h und 72h. Bei fünf der sieben Ergussproben (71 %) konnte eine Opsonierung, d.h. Rosettenbildung der kleinen Immunzellen um die größeren Tumorzellen beobachtet werden (Abb. 11).

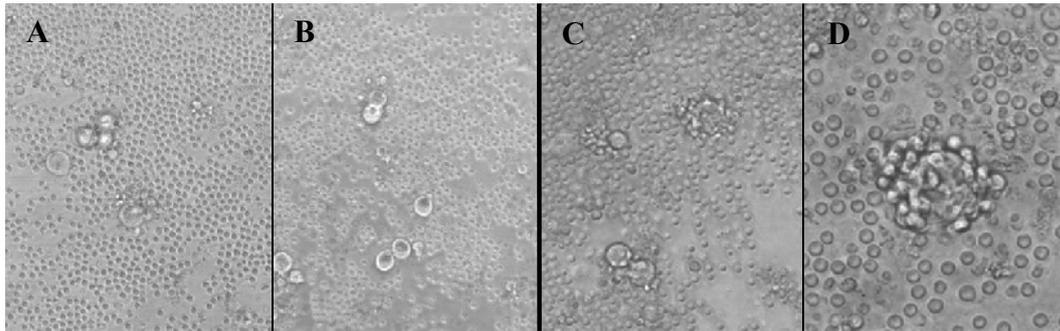


Abbildung 11: MT110 abhängige Opsonierung. Lichtmikroskopische Aufnahmen von einem malignen Pleuraerguss (3888) nach 72h ex vivo Therapie.

A. Kontrollantikörper Mecoprop, 1000 ng/ml(200x); **B.** Kontrollantikörper α EpCAM,1000 ng/ml (200x); **C.** bispezifischer Antikörper MT110, 1000 ng/ml (200x); **D.** MT110, 1000 ng/ml (400x).

Die spezifische Lyse der EpCAM+ Zellen nach MT110 Therapie, die sich im Mittel für die sieben Patientenproben nach 48h und 72h für 0,1, 1, 10 und 1000ng/ml MT110 ergab, ist in Abbildung 12 dargestellt.

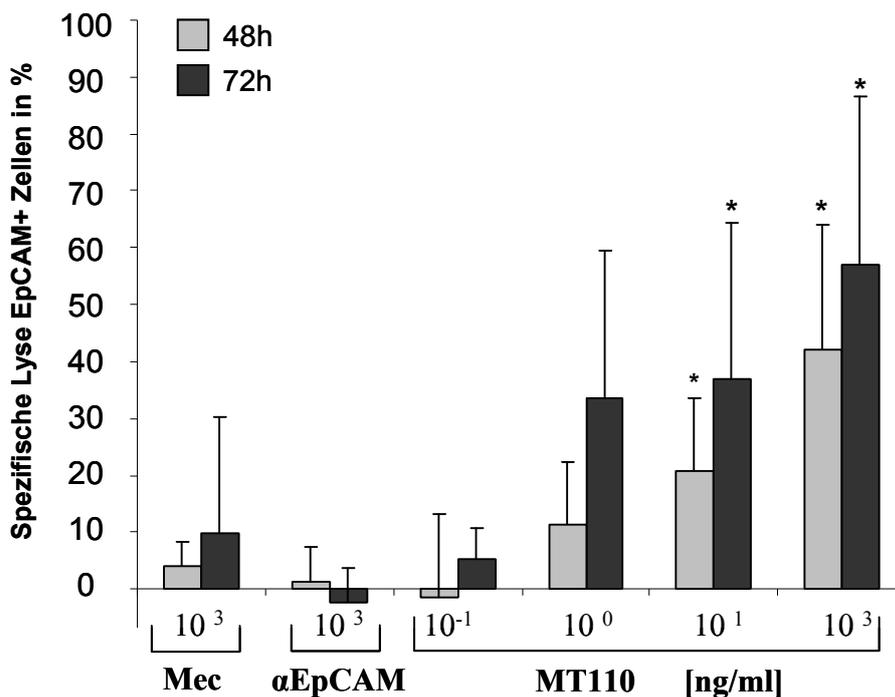


Abbildung 12: Spezifische Lyse der EpCAM+ Zellen mit MT110 (0,1, 1, 10, 1000 ng/ml) in malignen Pleuraergüssen beim Mammakarzinom im Mittel von n=7 Patientenproben. Die Kontrollantikörper Mecoprop (Mec) und anti-human EpCAM (α EpCAM) wurden in der höchsten verwendeten Antikörperdosis eingesetzt (1000 ng/ml) * $p \leq 0,05$.

Die Patientenprobe 3917 konnte nur für 72h mit den MT110 Konzentrationen 0,1, 1 und 1000 ng/ml therapiert werden, da nicht ausreichend Zellen für zwei Messzeitpunkte und vier Antikörper-Konzentrationen vorhanden waren. Im Vergleich zu den Kontrollantikörpern Mec und α EpCAM konnte MT110 eine signifikante und dosisabhängige spezifische Lyse der Targetzellen induzieren (Abb.12). Mit den Konzentrationen 0,1 und 1 ng/ml war zwar ein messbarer aber kein signifikanter Effekt von MT110 zu beobachten. Für die Konzentrationen 10 ng/ml und 1000 ng/ml jedoch erfolgte nach 48h und 72h ex vivo Therapie eine signifikante spezifische Lyse der EpCAM-positiven Pleurazellen von 21 % ($p=0,03$) und 42 % ($p=0,03$). Nach 72h konnte die Lyse der Zellen für 10 ng/ml auf 37 % ($p=0,03$) und für 1000 ng/ml auf durchschnittlich 57 % ($p=0,016$) gesteigert werden (Tab. 15).

3. ERGEBNISSE

Spezifische Lyse der EpCAM+ Zellen nach ex vivo Therapie mit MT110 in % (n=7)				
MPE beim Mammakarzinom	EpCAM+/7-AAD+ (48h)		EpCAM+/7-AAD+ (72h)	
	Lyse in% ± stabwn	p-Wert	Lyse in % ± stabwn	p-Wert
Kontrollantikörper				
Mecoprop	4 ± 4		9,9 ± 20	
α EpCAM	1,2 ± 6		-2,5 ± 6	
MT110				
0,1 ng/ml	-1,3 ± 14	n.s.	5 ± 5	n.s.
1 ng/ml	11 ± 11	n.s.	34 ± 26	n.s.
10 ng/ml	21 ± 13	0,03	37 ± 27	0,03
1000 ng/ml	42 ± 22	0,03	57 ± 29,5	0,016

Tabelle 15: Spezifische Lyse der EpCAM+ Zellen aus n=7 malignen Pleuraergüssen beim Mammakarzinom nach 48h und 72h MT110 ex vivo Therapie (0,1, 1, 10, 1000 ng/ml). stabwn = Standardabweichung; n.s.=nicht signifikant.

Die hohen Standardabweichungen (Stabwn) in Abb.12 zeigen, dass die spezifische Lyse individuell sehr unterschiedlich ausfiel (Abb. 13 A, B). Für die niedrigste eingesetzte MT110 Konzentration von 0,1 ng/ml zeigte der MPE 3823 den stärksten Effekt mit $13,15 \pm 5\%$ (Wert \pm Stabwn) nach 48h, der sich nach 72h nicht wesentlich steigern ließ ($13,5 \pm 4\%$). Die restlichen Patientenproben zeigten für 0,1 ng/ml MT110 nach 48h und 72h eine spezifische Lyse von $\leq 10\%$. Die MT110 Konzentration von 1 ng/ml führte bei 3823 im Vergleich zu den restlichen Patientenproben nach 48h zu der höchsten spezifischen Lyse mit $34 \pm 4\%$. Nach 72h ex vivo Therapie mit 1 ng/ml zeigte MT110 bei 3823 und 3917 mit $55 \pm 1\%$ und $78 \pm 2\%$ spezifischer Lyse die höchste Effizienz.

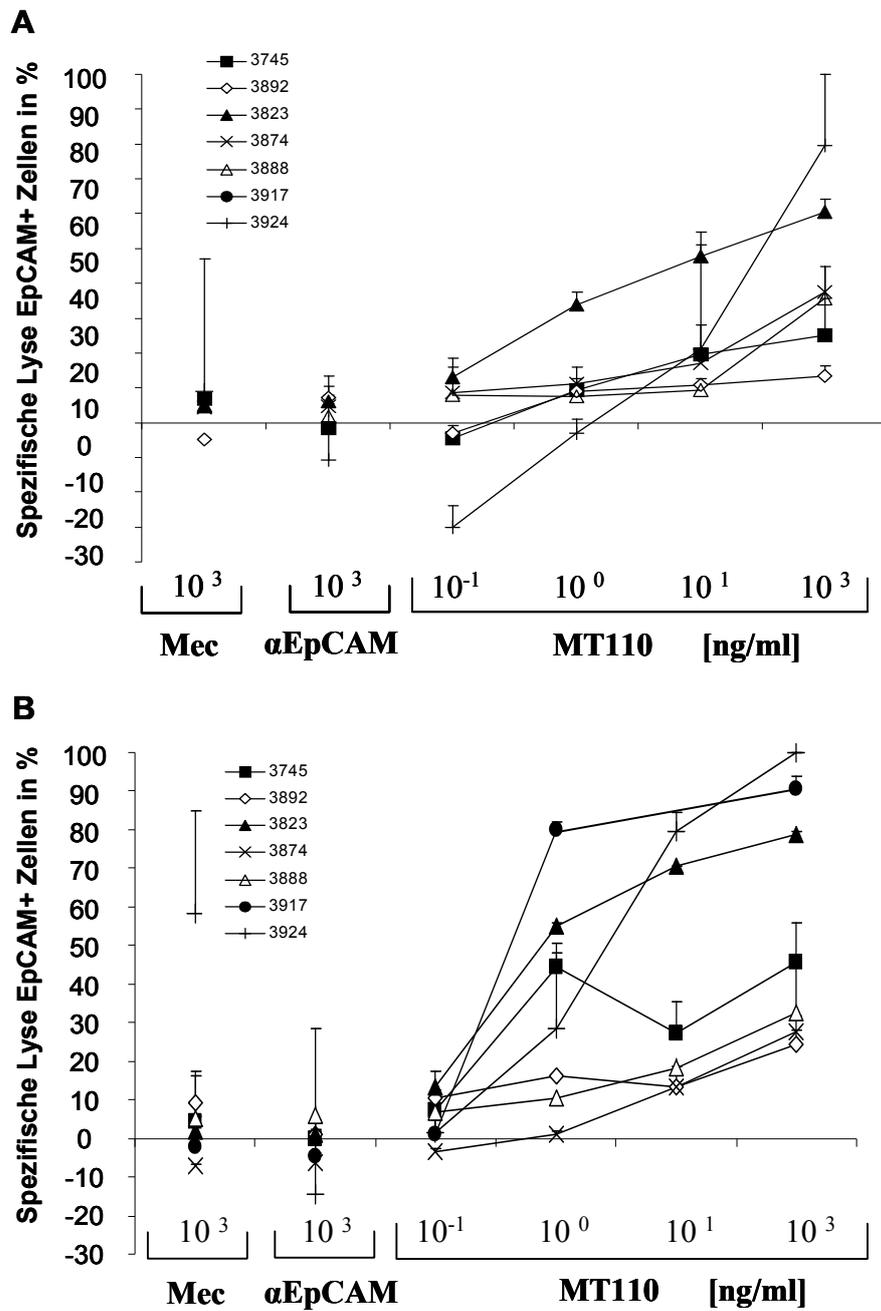


Abbildung 13: Spezifische Lyse der EpCAM+ Zellen im malignen Pleuraerguss beim Mammakarzinom. Einzelwerte nach 48h (A) und 72 (B) für die Kontrollantikörper Mecoprop (Mec) und anti-human EpCAM (αEpCAM) mit 1000 ng/ml und die MT110 behandelten Proben (0,1, 1,10, 1000 ng/ml).

3. ERGEBNISSE

Für die restlichen Patientenproben bewegte sich der Wert der spezifischen Lyse nach 48h und 1 ng/ml MT110 zwischen $-3 \pm 4\%$ (3924) und $11 \pm 5\%$ (3874) und nach 72h zwischen $1 \pm 0,9\%$ (3874) und $44,5 \pm 4\%$ (3745). Die MT110 Konzentration von 10 ng/ml erreichte vergleichbar mit 1 ng/ml die höchste spezifische Lyse für 3823 nach 48h ($48 \pm 3\%$) und für 3823 und 3924 nach 72h mit $70 \pm 0,3\%$ und $80 \pm 5\%$. Für die restlichen Ergussproben zeigte sich nach 48h eine Lyse der EpCAM+ Zellen von $9 \pm 0,6\%$ (3888) bis maximal $21 \pm 33,5\%$ (3924) und nach 72h von $13,5 \pm 5\%$ (3892) bis $27 \pm 17\%$ (3745). Nach 48h mit 1000 ng/ml konnte der größte Anteil lysierter EpCAM+ Zellen bei 3823 ($60,7 \pm 3\%$) und 3924 ($79 \pm 21\%$) beobachtet werden. Nach 72h mit 1000 ng/ml MT110 zeigte sich für 3823 ($79 \pm 1\%$), 3917 ($90,4 \pm 4$) und 3924 ($100 \pm 0\%$) im Vergleich zu den restlichen Proben die stärkste spezifische Lyse. Für die restlichen Ergussproben war nach 48h eine Lyse der EpCAM+ Zellen von $13,5 \pm 3\%$ (3892) bis maximal $37 \pm 7\%$ (3874) und nach 72h von $24 \pm 4\%$ (3892) bis maximal $45,5 \pm 6\%$ (3745) zu beobachten. Insgesamt war eine dosisabhängige Steigerung der spezifischen Lyse nach 48h bei allen Patientenproben außer 3892 zu beobachten. Nach 72h ex vivo Therapie zeigte sich eine Dosisabhängigkeit bei allen MPE außer 3745 (Abb. 13A,B). Eine Proliferation der EpCAM+ Zellen während der ex vivo Therapie mit MT110 konnte ausgeschlossen werden, da sich der Anteil der EpCAM+ Zellen in der Mediumkontrolle nicht veränderte (Tab. 16).

Patientennummer	Anteil EpCAM+ Zellen in Mediumkontrolle		
	0h	48h	72h
3745	17.5	7	6.5
3892	40	35	37
3823	20	15	11
3874	2.2	1.7	1.8
3888	1.3	1.1	1.05
3917	0.3	n.g.	0.29
3924	0.1	0.1	0.1

Tabelle 16: Proliferationsaktivität der EpCAM+ Zellen in der Mediumkontrolle. Anteil der EpCAM+ Zellen in der Mediumkontrolle der ex vivo therapierten malignen Pleuraergüsse beim Mammakarzinom in %. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der EpCAM+ Zellen vor (0h) und nach ex vivo Therapie (48h, 72h) mit MT110 (n.g. = nicht gemessen).

3.6.1.2 Bronchialkarzinom Patienten

Die Charakterisierung der drei malignen Pleuraergüsse der Bronchialkarzinompatienten im FACS ergab eine anteilige EpCAM-Expression auf den Zytokeratin-positiven Pleuraergusszellen von 98 % (Streubreite 95-100 %). Der Anteil der CD3+ T-Lymphozyten in Bezug zu der Gesamtleukozytenzahl im malignen Pleuraerguss betrug vergleichbar mit den malignen Ergüssen beim Mammakarzinom im Mittel 81 % (Streubreite 60-92 %). Das E:T Ratio der malignen Ergüsse beim Bronchialkarzinom variierte zwischen 1:2 (3879) und 7,5:1 (4124, Tab. 17).

	E:T Ratio der ex vivo therapierten MPE (Bronchialkarzinom)		
Absolute Zellzahl in %	Patientenproben		
	3878	3879	4124
E: CD3+	12	10,5	74
T: EpCAM+	4	21	9,9
E:T ratio (CD3+/EpCAM+)	3:1	1:2	7,5:1

Tabelle 17: Bestimmung des E:T Ratios der malignen Pleuraergüsse. Das E (CD3+ Effektorzellen) zu T (EpCAM+ Targetzellen) Ratio wurde bestimmt, indem das Verhältnis des prozentual im MPE gemessenen Anteils an CD3+ und EpCAM+ Zellen berechnet wurde.

In Abbildung 14 ist die spezifische Lyse der drei ex vivo therapierten Ergüsse (3878, 3879, 4124) nach 48h und 72h mit 0,1, 1, 10 und 1000 ng/ml im Mittel angegeben. Bei den malignen Ergüssen der Bronchialkarzinompatienten war sowohl nach 48h, als auch nach 72h eine schwache dosisabhängige, jedoch nicht signifikante spezifische Lyse der EpCAM+ Zellen im Vergleich zu den Kontrollantikörpern Mec und α EpCAM zu beobachten. Für die MT110 Konzentration von 0,1 ng/ml war nach 48h und 72h bei allen Patientenproben kein Effekt zu sehen. Mit 1 ng/ml konnte ein schwache spezifische Lyse der EpCAM+ Zellen von $8 \pm 7\%$ nach 48h und $4 \pm 5\%$ nach 72h detektiert werden. Nach 48h und 72h konnte mit 10 ng/ml eine durchschnittliche Zelllyse von $14 \pm 5\%$ (48h) und von $25 \pm 21\%$ (72h)

3. ERGEBNISSE

nachgewiesen werden. Diese wurde mit 1000 ng/ml MT110 nach 48h auf $17 \pm 22\%$ und nach 72h auf $30 \pm 38\%$ gesteigert (Abb. 14 A,B; Tab. 18).

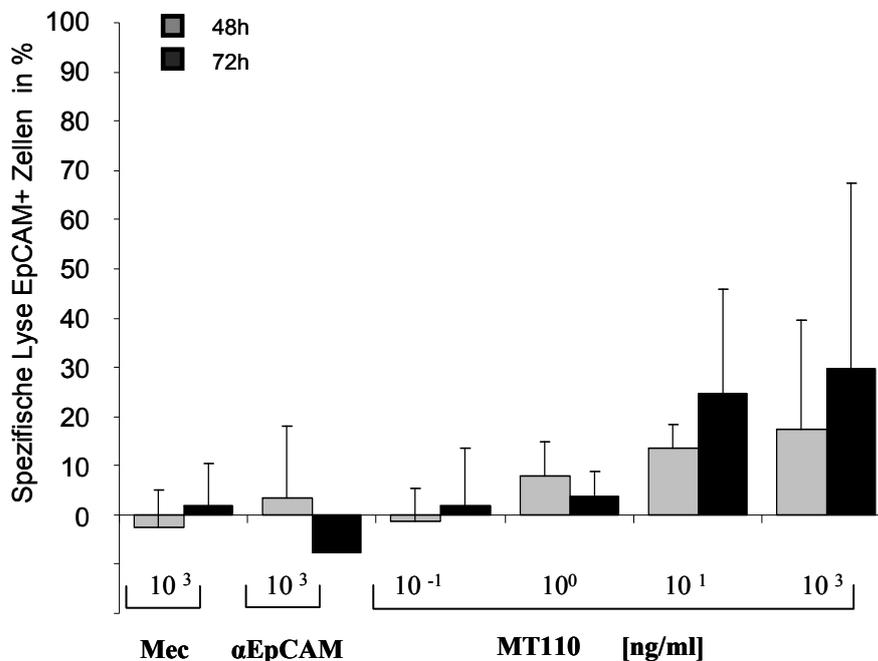


Abbildung 14: Spezifische Lyse der EpCAM+ Zellen mit MT110 (0,1, 1, 10, 1000 ng/ml) im malignen Pleuraerguss beim Bronchialkarzinom im Mittel von n=3 Patientenproben. Die Kontrollantikörper Mecoprop (Mec) und anti-human EpCAM (αEpCAM) wurden in der höchsten verwendeten Antikörperdosis eingesetzt (1000 ng/ml). Eine signifikante spezifische Lyse der EpCAM positiven Zellen war nicht zu beobachten.

Die hohen Standardabweichungen sind darauf zurückzuführen, dass die spezifische Lyse der Patientenproben 3878 und 3879 nach 48h und 72h im Vergleich zu 4124 für alle MT110 Konzentrationen sehr viel schwächer ausfiel (Abb. 15 A, B). Für die MT110 Konzentration von 0,1 ng/ml konnte nach 48h bei keiner der Patientenproben ein lytischer Effekt beobachtet werden. Nach 72h mit 0,1 ng/ml MT110 war ein schwacher Effekt bei 3878 mit $17 \pm 6\%$ spezifischer Lyse zu beobachten, der sich dosisabhängig nicht mehr steigern ließ. Nach der ex vivo Therapie mit 1 ng/ml MT110 konnte nach 48h ein schwacher Effekt für 3879 mit $7 \pm 1,9\%$ detektiert werden, der sich nach 72h nicht mehr steigern ließ. Nach 72h war der stärkste Effekt mit $11 \pm 2\%$ spezifischer Lyse bei 4124 zu beobachten. Die MT110 Therapie mit 10 ng/ml führte bei 3879 und 4124 nach 48h zu einer gesteigerten Lyse der EpCAM+ Zellen von $13 \pm 8\%$ (3879) und $20 \pm 3\%$ (4124).

3. ERGEBNISSE

	Spezifische Lyse der EpCAM+ Zellen nach ex vivo Therapie mit MT110 in % (n=3)			
MPE beim Bronchialkarzinom	EpCAM+/7-AAD+ (48h)		EpCAM+/7-AAD+ (72h)	
	Lyse in % ± stabwn	p-Wert	Lyse in % ± stabwn	p-Wert
Kontrollantikörper				
Mecoprop	-2,5 ± 8		2 ± 9	
α EpCAM	3 ± 15		-8 ± 7	
MT110				
0,1 ng/ml	-1,4 ± 7	n.s.	2 ± 11,5	n.s.
1 ng/ml	8 ± 7	n.s.	4 ± 5	n.s.
10 ng/ml	14 ± 5	n.s.	25 ± 21	n.s.
1000 ng/ml	17 ± 22	n.s.	30 ± 38	n.s.

Tabelle 18: Spezifische Lyse der EpCAM+ Zellen aus n=3 malignen Pleuraergüssen beim Bronchialkarzinom nach 48h und 72h MT110 ex vivo Therapie (0,1, 1, 10, 1000 ng/ml). stabwn = Standardabweichung; n.s.=nicht signifikant

Nach 72h war erneut der stärkste Effekt bei 4124 zu detektieren ($54 \pm 4\%$). Die restlichen Patientenproben zeigten keine Steigerung der Lyse und bewegten sich zwischen $6 \pm 18\%$ (3879) und $14 \pm 9\%$ (3878). Für die höchste MT110 Konzentration (1000 ng/ml) wurde bei 4124 eine spezifische Lyse von $48 \pm 5\%$ nach 48h und $81 \pm 3\%$ nach 72h festgestellt. Keine Veränderung zeigte sich für 3878 und 3879 (Abb. 15 A,B). Für die Patientenprobe 4124 mit einem E:T Ratio von 7,5:1 konnte ein dosisabhängiger Effekt für 10, 100 und 1000 ng/ml und eine zeitabhängige Wirkung von MT110 detektiert werden. Eine Proliferation der EpCAM+ Zellen während der MT110 Therapie war auch bei den malignen Ergüssen der Bronchialkarzinome nicht zu beobachten (Tab. 19).

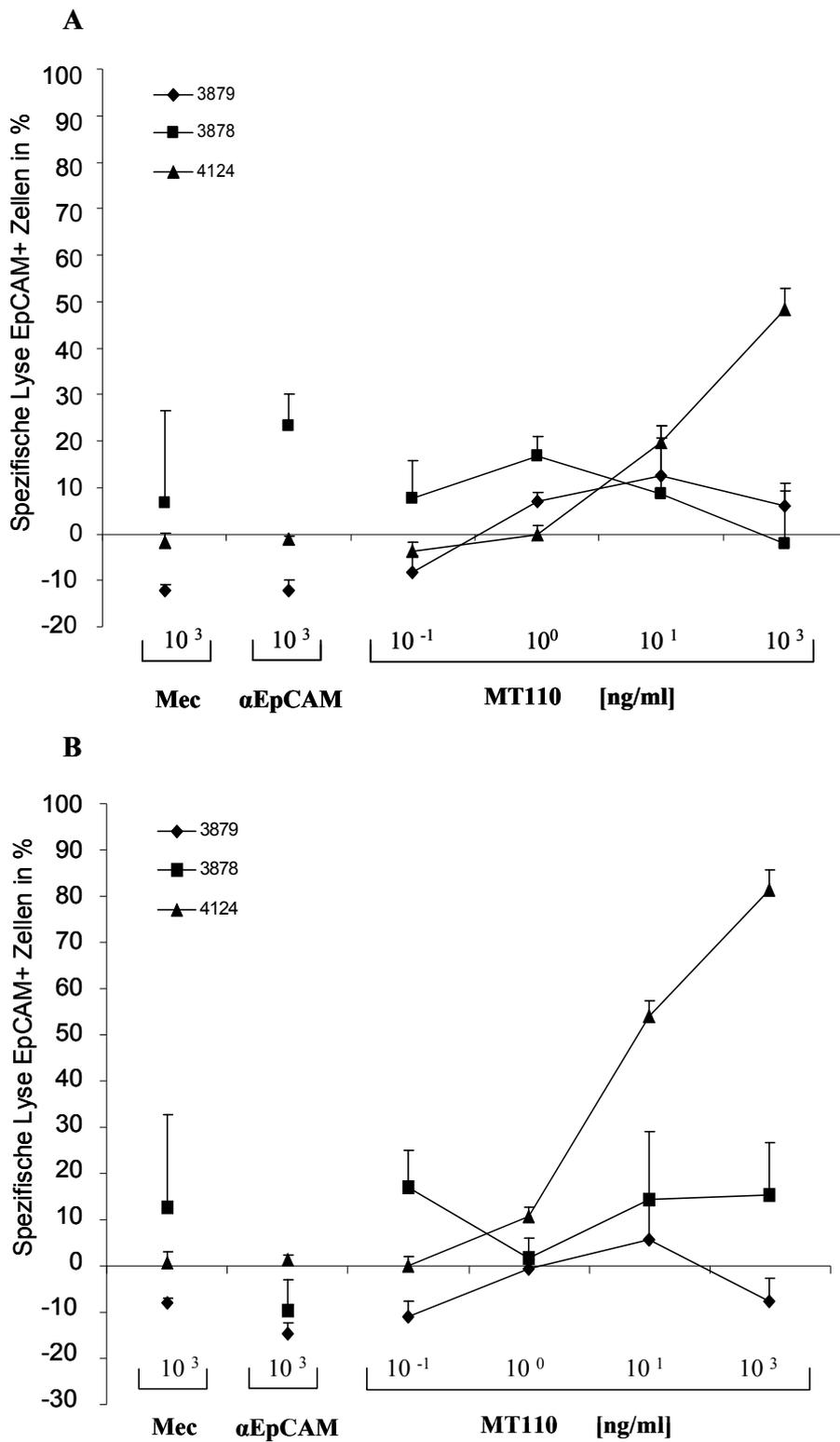


Abbildung 15: Einzelwerte nach 48h (A) und 72 (B) für die Kontrollantikörper Mecoprop (Mec) und anti-human EpCAM (α EpCAM) mit 1000 ng/ml und die MT110 behandelten Proben (0,1, 1,10, 1000 ng/ml).

Patientennummer	Anteil EpCAM+ Zellen in Mediumkontrolle in %		
	0h	48h	72h
3878	4	2,6	2,4
3879	21	19	20
4124	9,9	8,8	9

Tabelle 19: Proliferationsaktivität der EpCAM+ Zellen in der Mediumkontrolle. Anteil der EpCAM+ Zellen in der Mediumkontrolle der ex vivo therapierten malignen Pleuraergüsse beim Bronchialkarzinom in %. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der EpCAM+ Zellen vor (0h) und nach ex vivo Therapie (48h, 72h) mit MT110.

3.6.2 Nachweis der antikörpervermittelten Immunzellstimulation

Nach der ex vivo Therapie der Pleuraergussproben mit MT110 wurde die Aktivierung der T-Lymphozyten im FACS ermittelt. Als später Aktivierungsmarker wurde das Antigen CD25 ausgewählt. Ein funktioneller Mechanismus wurde über den Nachweis der Apoptose-induzierenden Serinprotease Granzym B bestimmt. Beide Antigene wurden auf den CD4+ und CD8+ Zellen nach ex vivo Therapie mit MT110 nachgewiesen. Nach der ex vivo Therapie wurden zusätzlich im Mediumüberstand eine Reihe von Zytokinen bestimmt (Interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-6, IL-10, TNF-alpha (TNF- γ) und Interferon-gamma (IFN- α), die einen Hinweis auf die Art der MT110 vermittelten Immunantwort geben sollten.

3.6.2.1 Mammakarzinom Patienten

Die Charakterisierung der Immunzellen im FACS ergab in Bezug auf die gesamte Leukozytenpopulation einen Anteil der T-Lymphozyten von durchschnittlich 80 % (Streubreite 60 -93 %). CD4-positive T- Zellen waren 2,8-fach häufiger vertreten (59 %, Streubreite 32 %-85 %) als zytotoxische T-Zellen (21 %, Streubreite 8 %- 27 %). In Abhängigkeit der Konzentration und Wirkungsdauer des Antikörpers MT110 konnte eine Stimulation der T-Zellsubpopulationen beobachtet werden. Dies äußerte sich in einer morphologischen Veränderung der Leukozyten und einer antikörperabhängigen Induktion von CD25 und Granzym B auf den CD4-positiven und CD8-positiven T-Zellen. Nach der ex vivo

3. ERGEBNISSE

Behandlung mit 1000 ng/ml MT110 nach 72h war eine durchschnittliche Größenzunahme der Leukozyten von $1,5 \pm 0,3$ (Streubreite 1,2 – 2,0) im Vergleich zu der Kontrolle K (Mittelwert aus Mediumkontrolle und muS110) bei allen (7 von 7) der Patientenproben zu beobachten. In Abbildung 16 ist die Größenzunahme der Leukozyten von Ergussprobe 3888 nach 48h und 72h mit 1000 ng/ml MT110 beispielhaft dargestellt. Die FACS-Messung gibt die Größe (FSC-H) und Granularität (SSC-H) der Zellen wider. Nach 72h Therapie war eine deutliche Größenzunahme der Leukozyten zu detektieren.

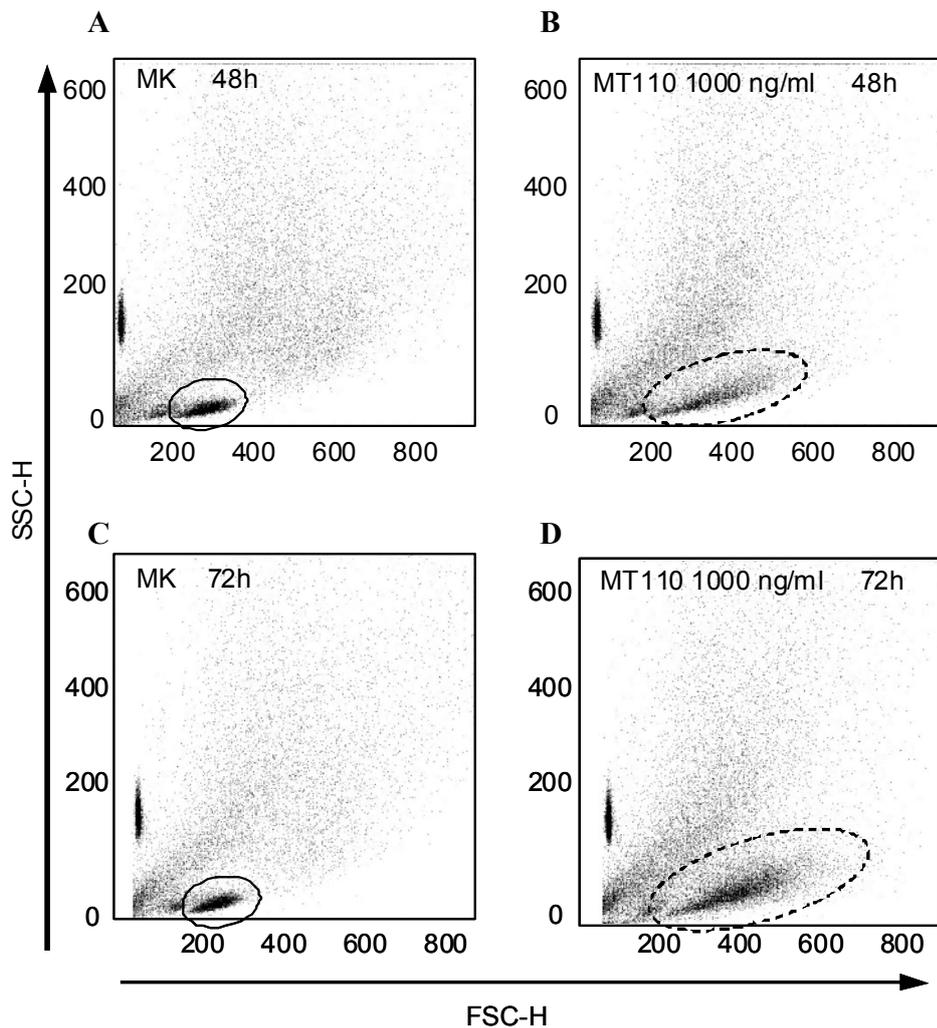


Abbildung 16: Größenzunahme der Leukozyten der Patientenprobe 3888 nach 1000 ng/ml MT110 Therapie (B,D) für 72h im Vergleich zu der Mediumkontrolle [MK] (A,C).

3. ERGEBNISSE

Eine Aktivierung der T-Zellen durch MT110 war nur in Anwesenheit des Zielmoleküls EpCAM möglich. Die Behandlung eines malignen Pleuraergusses mit Zytokeratin-positiven aber EpCAM negativen Zellen führte zu keiner Stimulation der Immunzellen und auch zu keiner lytischen Reaktion der Pleuraergusszellen (Abb. 17).

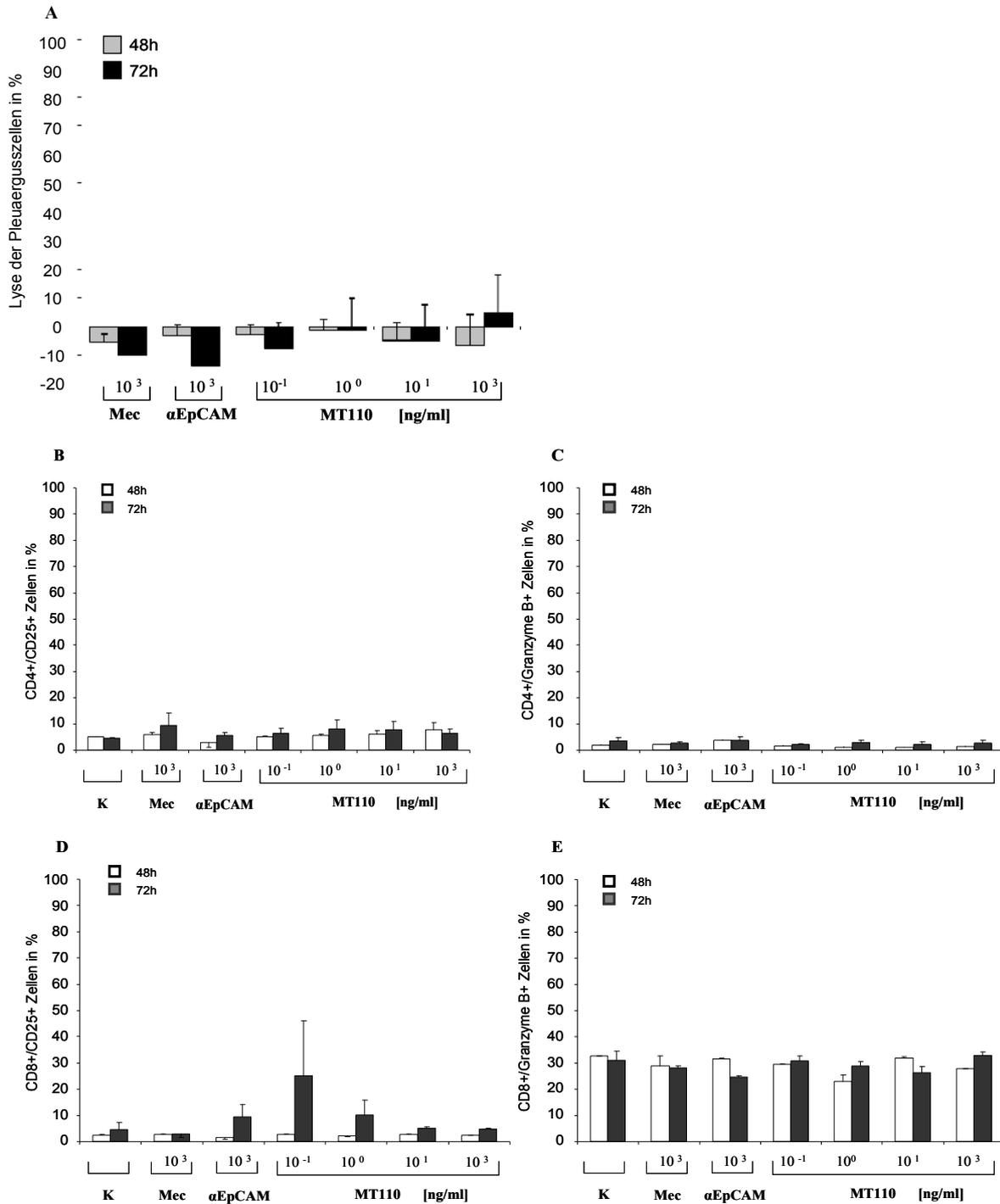


Abbildung 17: Ex-vivo Therapie eines malignen Pleuraergusses (4145) beim Mammakarzinom mit MT110, der EpCAM- negativen Pleuraergusszellen aufwies. **A.** Lyse der Pleuraergusszellen; **B,C.** Stimulation der CD4+ Zellen; **D,E.** Stimulation der CD8+ Zellen (K=Kontrolle)

3. ERGEBNISSE

Nach der ex vivo Therapie der sieben malignen Pleuraergüsse der Mammakarzinompatienten war ein signifikanter Anstieg der CD25-positiven T-Helfer und CD25-positiven zytotoxischen T-Zellen nach 48h ($p=0,03$) und 72h ($p=0,016$) mit 1000 ng/ml MT110 zu beobachten (Abb. 18 A-D, Tab. 20). Nach 48h MT110 Therapie (1000 ng/ml) wurden 18 ± 11 % der CD4+/CD25+ Zellen und nach 72h 21 ± 17 % der CD25-positiven T-Helfer Zellen detektiert (Abb. 18 A, Tab. 20). Der Anteil der CD8+/CD25+ T-Zellen lag nach 48h bei 33 ± 23 % ($p=0,03$) und ließ sich nach 72h nicht mehr steigern (29 ± 22 %; Abb. 18 B, Tab. 20). Der Anteil der CD4+ und CD8+ T-Zellen, der die Serinprotease Granzym B exprimierte, war durch die Behandlung mit MT110 nach 48h und 72h nicht signifikant erhöht nachweisbar (Abb. 18 C/D, Tab. 20). Auffällig war, dass Granzym B bereits ohne Behandlung mit MT110 in einem Großteil der CD8+ Zellen exprimiert wurde. Dieser Anteil lag im Mittel nach 48h für die Kontrolle (K) bei 28 % und nach 72h bei 25 % (Abb. 18 D) und war im Vergleich zu den CD4+ Zellen signifikant erhöht (48h: $p=0,03$; 72h: $p=0,016$; Abb. 18 C,D). Nach 72h MT110 Therapie (1000 ng/ml) waren 23 % der CD4+ Zellen positiv für Granzym B, das einer 5-fach erhöhten Fraktion entsprach (Abb. 18 C, Tab 20). Im Vergleich dazu lag der maximale Anstieg für die CD8+/Granzym B+ Zellen im Vergleich zur Kontrolle (K) bei 1,7 mit 44 % Granzym B-positiven zytotoxischen T-Zellen. (Abb. 18 D).

Zwischen dem 48h und 72h Zeitpunkt war kein signifikanter Unterschied der MT110 abhängigen Stimulation der CD4+ und CD8+ Zellen zu beobachten. In Abbildung 19 A,B ist die Stimulation der Immunzellfraktionen für jeden einzelnen Patienten nach 72h MT110 Therapie dargestellt. Die 48h Werte der individuellen Immunzellstimulation, die sich nicht signifikant von den 72h Werten unterschieden, sind im Anhang der Arbeit verzeichnet. Alle malignen Ergüsse außer 3745 zeigten einen dosisabhängigen Anstieg der CD4+/CD25+ Fraktion (Abb. 19 A). Die höchste anteilige MT110 induzierte Expression von CD25 auf den CD4+ Zellen zeigte der MPE 3823. Der Anstieg der CD25 Expression auf den zytotoxischen T-Zellen war für alle Pleuraergussproben dosisabhängig (Abb. 19 B).

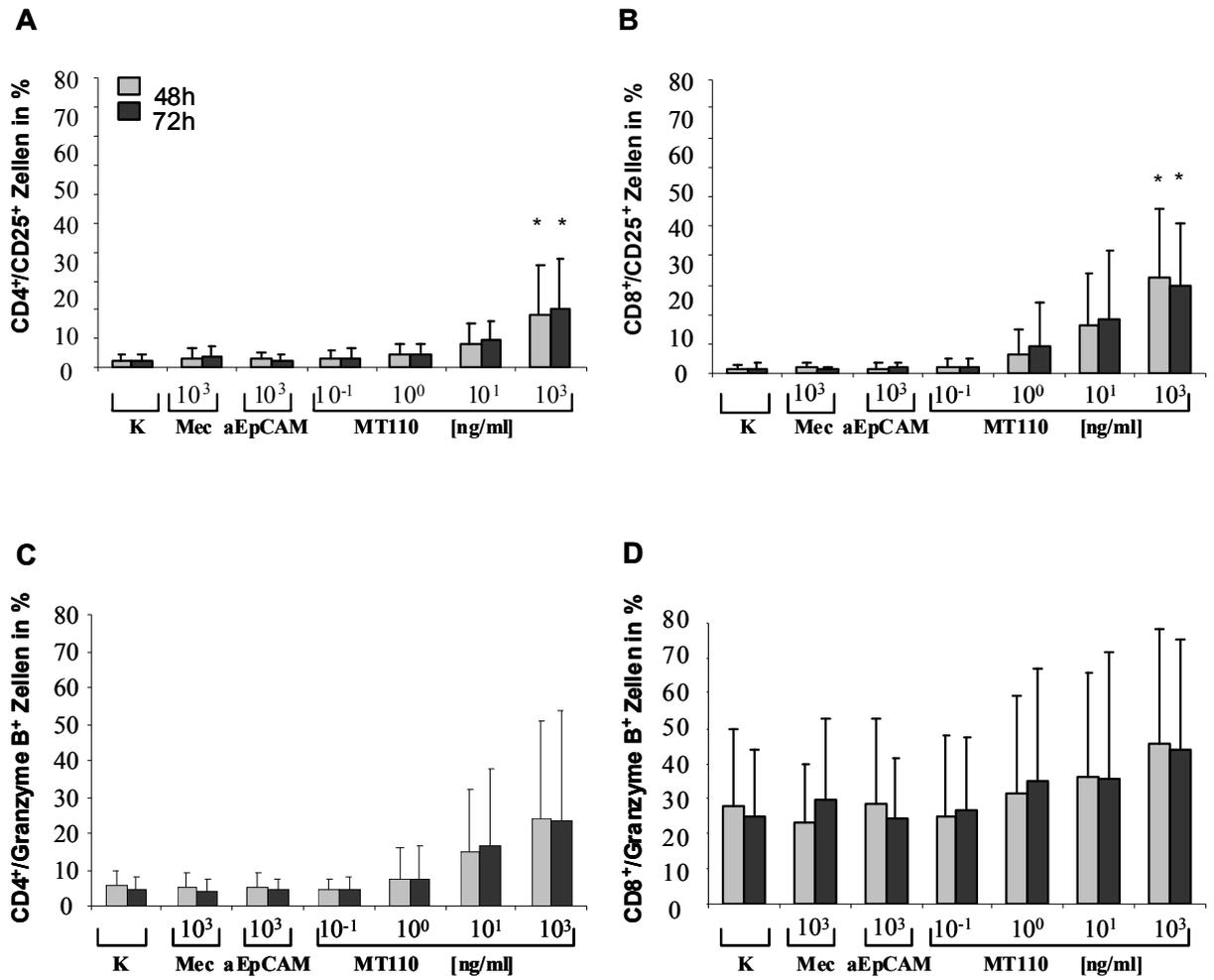


Abbildung 18: Stimulation der CD4⁺ und CD8⁺ Pleuraergusszellen beim Mammakarzinom (n=7) nach ex vivo Therapie mit MT110 (0,1, 1, 10, 1000 ng/ml) über 48h und 72h. Darstellung der Mittelwerte. K= Kontrolle (Mittelwert aus Mediumkontrolle und muS110), Kontrollantikörper Mec (Mecoprop) und αEpCAM mit 1000 ng/ml.

3. ERGEBNISSE

Die malignen Ergussproben 3745, 3823 und 3892 zeigten im Vergleich zu den restlichen Proben einen höheren Anteil CD8⁺/CD25⁺ Zellen mit $69 \pm 7\%$ (3745), $50 \pm 2\%$ (3823) und $39 \pm 1\%$ (3892). Die Serinprotease Granzym B wurde dosisabhängig am stärksten in den CD4⁺ Zellen der Patientenprobe 3823 exprimiert (Abb. 19 C). 3823 zeigte nach 72h MT110 Therapie (1000 ng/ml) eine Fraktion CD4⁺/Granzym B⁺ Zellen mit $96 \pm 0,7\%$. Bei den Pleuraergüssen 3892, 3874, 3888, 3917 und 3924 konnten nicht mehr als 20 % Granzym B positiver T-Helfer Zellen nachgewiesen werden. Die Abbildung 19 D zeigt, dass in den Ergussproben 3745, 3823 und 3917 von vorneherein ein Großteil der zytotoxischen T- Zellen Granzym B exprimierte. Für 3823 und 3745 konnte der Anteil der Granzym B positiven CD8⁺ Zellen auf $99 \pm 0,2$ und $81 \pm 4,5$ nach 72h MT110 Therapie mit 1000 ng/ml gesteigert werden (Abb. 19 D).

	Veränderung der Antigenexpression nach ex vivo Therapie mit MT110 in % beim Mammakarzinom (n=7)					
Antigenexpression	48h			72h		
	- MT110 [*]	+ MT110 [#]	p-Wert	- MT110 [*]	+ MT110 [#]	p-Wert
CD4 ⁺ /CD25 ⁺	2.7 ± 1.6	18 ± 11	0.03	2.5 ± 1.9	21 ± 17	0.016
CD8 ⁺ /CD25 ⁺	1.6 ± 1.3	33 ± 23	0.03	1.8 ± 1.9	29 ± 22	0.016
CD4 ⁺ /Granzym B ⁺	6 ± 4.3	24 ± 27	n.s.	4 ± 3.6	23 ± 31	n.s.
CD8 ⁺ /Granzym B ⁺	28 ± 22	46 ± 32	n.s.	25 ± 19	44 ± 32	n.s.

Tabelle 20: Veränderung der CD25 und Granzym B Expression der CD4⁺ and CD8⁺ T-Zellen im malignen Erguss beim Mammakarzinom, während der ex vivo Therapie (48h, 72h). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm stabwn (Standardabweichung); n.s. = nicht signifikant. * - MT110 = Kontrolle, siehe Material und Methoden. # +MT110 = 1000 ng/ml MT110.

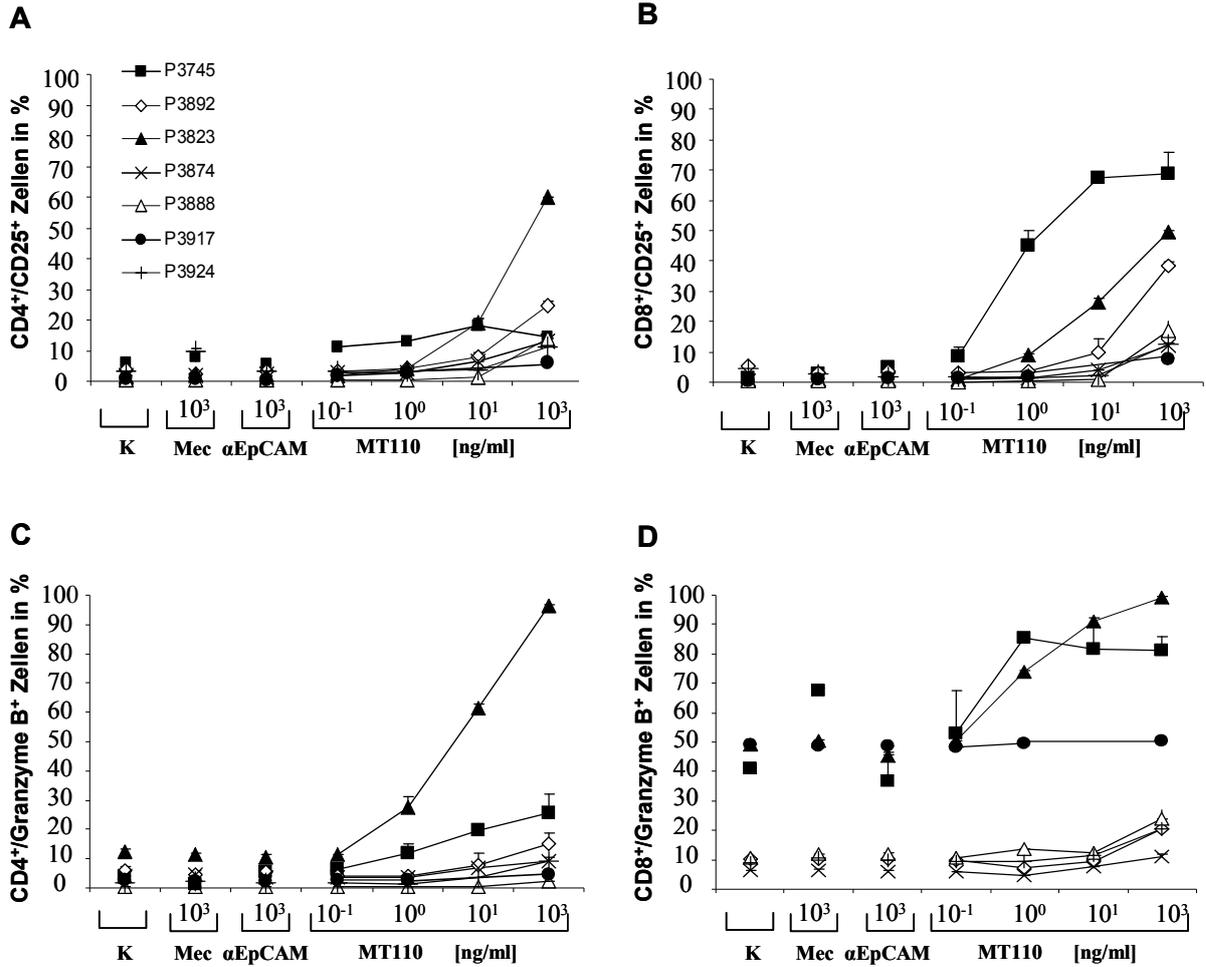


Abbildung 19: Stimulation der CD4⁺ und CD8⁺ Pleuraergusszellen beim Mammakarzinom nach ex vivo Therapie mit MT110 (0,1, 1, 10, 1000 ng/ml) über 72h. Darstellung der Individualwerte. K= Kontrolle (Mittelwert aus Mediumkontrolle und muS110), Kontrollantikörper Mec (Mecoprop) und αEpCAM mit 1000 ng/ml.

3. ERGEBNISSE

In Abbildung 20 ist das E:T Ratio jeder Ergussprobe, die spezifische Lyse in % und der Aktivierungsstatus nach jeweils 72h und 1000 ng/ml MT110 bezüglich der CD25 Expression (Abb. 20 A) und Granzym Expression (Abb. 20 B) der CD4+ und CD8+ Zellen dargestellt.

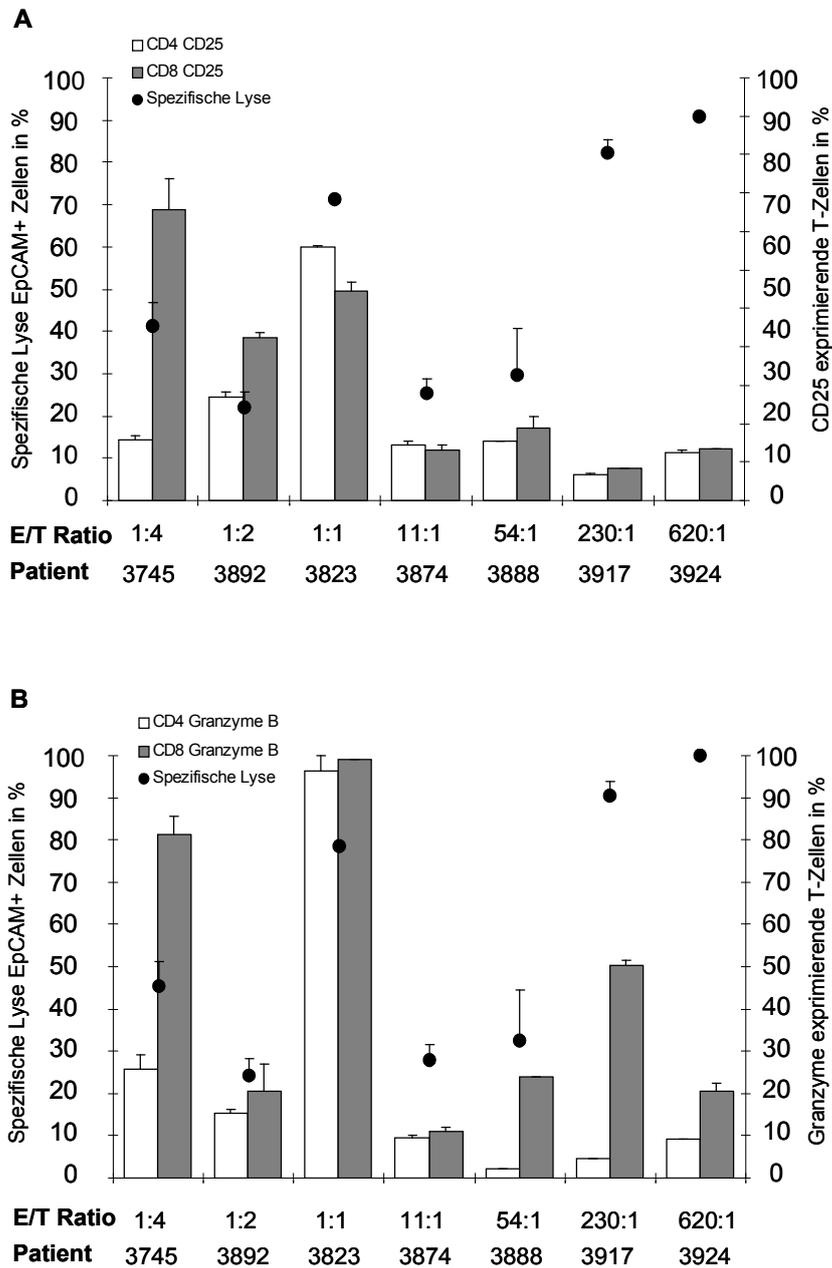


Abbildung 20: Gegenüberstellung des E:T Ratios, des Aktivierungsstatus der Immunzellen CD4+ (A) und CD8+ Zellen (B) und der spezifischen Lyse der MPE beim Mammakarzinom nach 72h mit 1000 ng/ml MT110.

3. ERGEBNISSE

Eine Korrelation des E:T Ratios und der spezifischen Lyse nach 72h mit 1000 ng/ml MT110 war nicht signifikant ($p=0,1$; $R=0,67$). Ebenfalls konnte keine Korrelation zwischen dem Aktivierungsstatus der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen und dem Ausmaß der spezifischen Lyse identifiziert werden, nachdem 72h mit 1000 ng/ml ex vivo therapiert wurde (CD4⁺/CD25⁺: $p=0,3$, $R= -0,5$; CD8⁺/CD25⁺: $p= 0,6$, $R= -0,3$; CD4⁺/Granzym B⁺: $p= 0,9$, $R= -0,045$; CD8⁺/Granzym B⁺: $p= 0,39$, $R= 0,4$). Die höchste spezifische Lyse war für die malignen Pleuraergüsse 3917 (90 ± 4 %) und 3924 (100 ± 0 %) zu beobachten, die ein hohes E:T Ratio mit 230:1 und 620:1 zu verzeichnen hatten. Außerdem zeigten maligne Pleuraergüsse mit einem eher ungünstigen E:T Ratio von 1:4 (3745) und 1:1 (3823) und einem hohen Anteil lysierter Zellen (3745: 46 ± 6 %; 3823: $79 \pm 0,9$ %) auch gleichzeitig eine starke Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen bezüglich CD25 (3745: 69 ± 7 %; 3823: 49 ± 2 %; Abb. 20 A) und Granzym B (3745: 81 ± 5 %; 3823: $99 \pm 0,1$ %; Abb. 20 B). Der MPE 3823 zeigte zusätzlich eine starke Stimulation der CD4⁺ Zellen nach MT110 Behandlung (72h, 1000 ng/ml), die sich in $60 \pm 0,1$ % CD4⁺/CD25⁺ Zellen und in 96 ± 4 % CD8⁺/Granzym B⁺ Zellen äußerte. Maligne Ergussproben mit günstigeren E:T Ratios wie z.B. 11:1 (3874) und 54:1 (3888), die aber eine schwache spezifische Lyse der EpCAM⁺ Zellen mit 28 ± 4 % (3874) und 33 ± 12 % (3888) zeigten, wiesen auch eine geringere Fraktion von Granzym B⁺/CD8⁺ Zellen auf (3874: 11 ± 1 %; 3888: 24 ± 0 %; Abb. 20 B).

3.6.2.2 Bronchialkarzinom Patienten

Die Charakterisierung der Immunzellen der drei ex vivo therapierten Ergussproben beim Bronchialkarzinom im FACS ergab in Bezug auf die gesamte Leukozytenpopulation einen durchschnittlichen Anteil der T-Lymphozyten von 59 % (Streubreite 24-78 %). CD4⁺ T-Helfer Zellen waren in diesem Kollektiv 2,7-fach häufiger vertreten (59 %, Streubreite 24-78 %) als CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (22 % ; Streubreite 13-38 %). Diese Werte waren mit dem Kollektiv der Mammakarzinompatientinnen vergleichbar. Die Charakterisierung der CD4- und CD8-positiven Zellen bezüglich CD25 nach ex vivo Therapie mit MT110 ergab eine dosis- (100 ng/ml, 1000 ng/ml MT110) und zeitabhängig induzierte CD25 Expression, die jedoch im Vergleich zu den MPE der Mammakarzinompatientinnen nicht signifikant war (Abb. 21 A/B, Tab. 21). Nach 48h MT110 Behandlung (1000 ng/ml) konnte auf 44 ± 19 % der T-Helfer Zellen und 53 ± 15 % der zytotoxischen T-Zellen der Aktivierungsmarker CD25

3. ERGEBNISSE

nachgewiesen werden. Nach 72 h waren 51 ± 20 % der CD4+/CD25+ Zellen und 64 ± 18 % der CD8+/CD25+ Zellen zu detektieren (Abb. 21 A/B, Tab. 21).

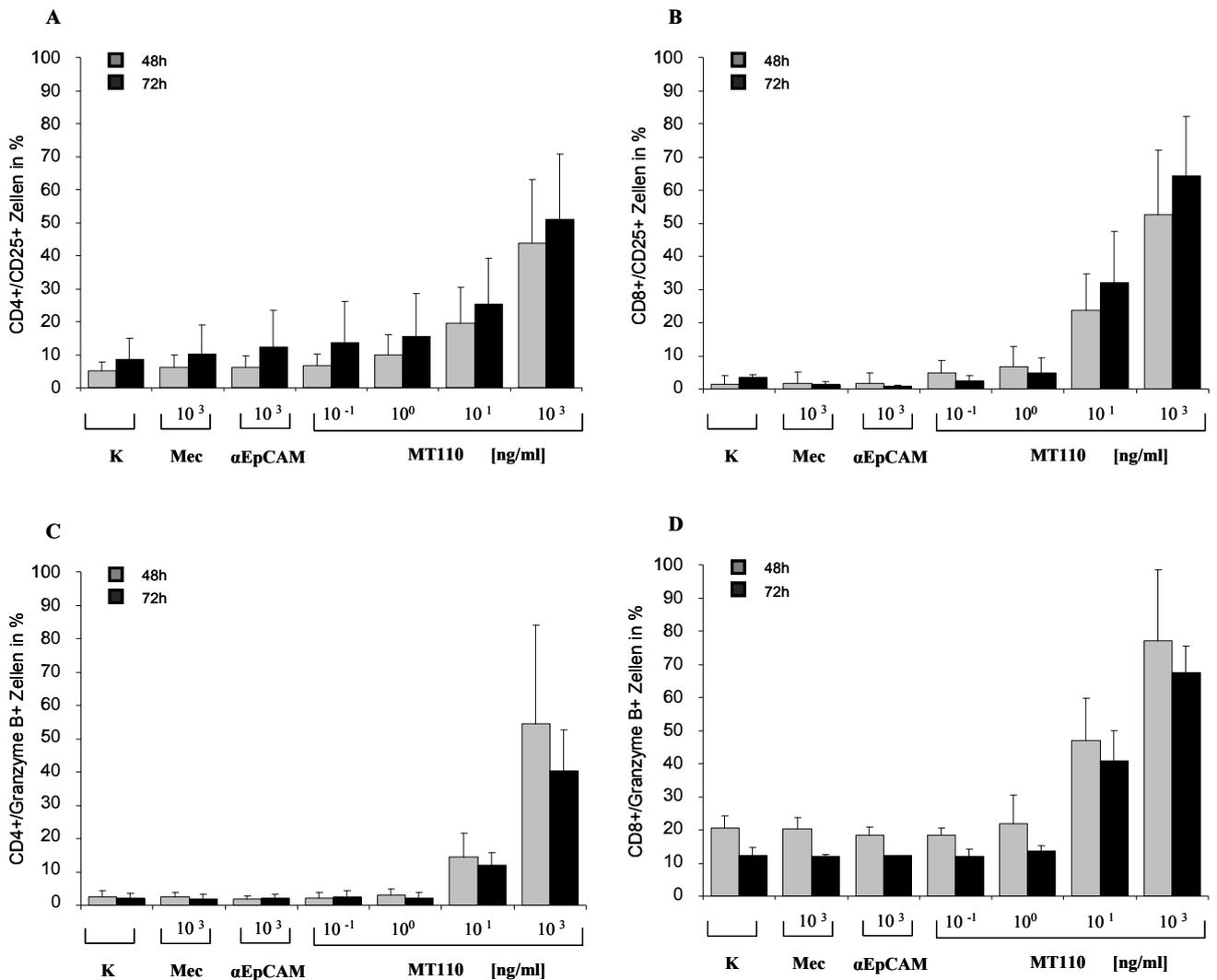


Abbildung 21: Stimulation der CD4+ und CD8+ Pleuraergusszellen beim Bronchialkarzinom (n=3) nach ex vivo Therapie mit MT110 (0,1, 1, 10, 1000 ng/ml) über 48h und 72h. Darstellung der Mittelwerte. K= Kontrolle (Mittelwert aus Mediumkontrolle und muS110), Kontrollantikörper Mec (Mecoprop) und αEpCAM mit 1000 ng/ml. Nach ex vivo Therapie mit MT110 war keine signifikante Immunzellstimulation zu beobachten ($p < 0,05$).

	Veränderung der Antigenexpression nach ex vivo Therapie mit MT110 in % beim Bronchialkarzinom (n=3)					
Antigenexpression	48h			72h		
	- MT110 [*]	+ MT110 [#]	p-Wert	- MT110 [*]	+ MT110 [#]	p-Wert
CD4 ⁺ /CD25 ⁺	5 ± 3	44 ± 19	n.s.	8,4 ± 6,4	51 ± 20	n.s.
CD8 ⁺ /CD25 ⁺	1,3 ± 1	53 ± 15	n.s.	3,4 ± 1	64 ± 18	n.s.
CD4 ⁺ /Granzym B ⁺	2,4 ± 2	54 ± 30	n.s.	2 ± 1	40 ± 12	n.s.
CD8 ⁺ /Granzym B ⁺	20,5 ± 4	77 ± 21	n.s.	12,4 ± 2	67 ± 8	n.s.

Tabelle 21: Veränderung der CD25 und Granzym B Expression der CD4⁺ and CD8⁺ T-Zellen im malignen Erguss beim Bronchialkarzinom, während der ex vivo Therapie (48h, 72h). Dargestellt sind die Mittelwerte ± stabwn (Standardabweichung); n.s. = nicht signifikant. ^{*} - MT110 = Kontrolle, siehe Material und Methoden. [#] +MT110 = 1000 ng/ml MT110.

Nach 72h war eine verstärkte Expression von CD25 auf den CD4-positiven Zellen (Abb. 21 A) in der Kontrolle (K) (8 %) und bei den Kontrollantikörpern Mec (10 %) und α EpCAM (12 %) zu beobachten. Dies war für die zytotoxischen T-Zellen nicht der Fall (Abb. 21 B). Ein MT110-abhängig verstärkter Nachweis von Granzym B in den CD4- und CD8-positiven Zellen war für die MT110 Dosen von 100 und 1000 ng/ml messbar (Abb. 21 C/D). Es ließ sich für diese Konzentrationen eine Dosis-, aber keine Zeitabhängigkeit beobachten. Die höchsten Werte wurden nach 48h mit 1000 ng/ml MT110 erzielt. Die Standardabweichungen in Abb. 21 A-D verdeutlichen die interindividuellen Unterschiede innerhalb der drei Patientenproben (Abb. 22 A-D).

3. ERGEBNISSE

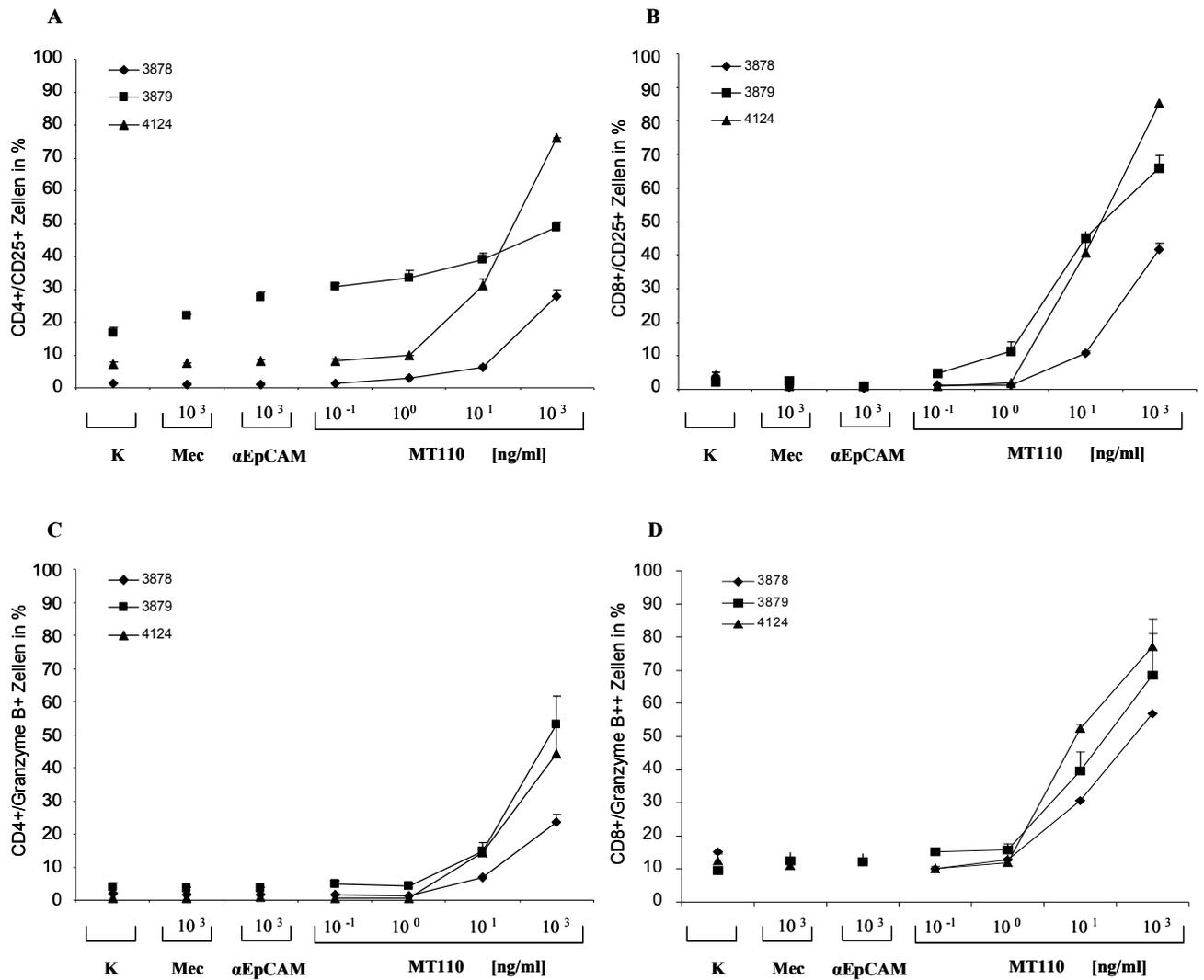


Abbildung 22: Stimulation der CD4+ und CD8+ Pleuraergusszellen der malignen Pleuraergüsse 3878, 3879, 4124 beim Bronchialkarzinom nach ex vivo Therapie mit MT110 (0,1, 1, 10, 1000 ng/ml) nach 72h. 72h. Darstellung der Individualwerte. K= Kontrolle (Mittelwert aus Mediumkontrolle und muS110), Kontrollantikörper Mec (Mecoprop) und α EpCAM mit 1000 ng/ml.

3. ERGEBNISSE

Vergleichbar mit den Proben der Mammakarzinompatienten wurde auf Grund des nicht signifikanten Unterschieds der beiden Messpunkte (48h, 72h) der 72h Messzeitpunkt der Einzelwerte der drei MPE der Bronchialkarzinompatienten dargestellt. Die 48h Werte sind im Anhang einsehbar. Bei allen Ergussproben der Bronchialkarzinompatienten kam es zu einer MT110 abhängigen Aktivierung der Immunzellen. Die Pleuraergussprobe 3878 zeigte eine verstärkte Expression von CD25 und Granzym B auf CD4- und CD8-positive Zellen für 100 und 1000 ng/ml MT110 (Abb. 22 A-D). CD4+/CD25+ Zellen waren zu $28 \pm 2\%$, CD8+/CD25+ Zellen zu $42 \pm 2\%$, CD4+/Granzym B+ Zellen zu $24 \pm 2\%$ und CD8+/Granzym B+ Zellen zu $57 \pm 1\%$ nach 1000 ng/ml MT110 zu detektieren. 3879 wies bereits in den Kontrollen nach 72h (K, Mec, α EpCAM) CD25-positive T-Helfer Zellen auf ($17 \pm 2\%$, $22 \pm 0,3\%$, $28 \pm 1,4\%$, Abb. 22 A). Dieser Wert ließ sich um das ca. 2-fache auf $49 \pm 2\%$ mit 1000 ng/ml MT110 (72h) steigern. Des Weiteren waren CD8+/CD25+ Zellen zu 66 %, CD4+/Granzym B+ Zellen zu 53 % und CD8+/Granzym B+ Zellen zu 68 % nach 1000 ng/ml MT110 (72h) nachweisbar (Abb. 22 B-D). Der maligne Erguss, der die höchste spezifische Lyse in diesem Kollektiv zeigte (4124), wies auch den größten Anteil an CD4+/CD25+ Zellen von $76 \pm 0,2\%$ (Abb. 22 A), CD8+/CD25+ Zellen von $85 \pm 1\%$ (Abb. 22 B) und CD8+/Granzym B+ Zellen von $77 \pm 4\%$ auf (Abb. 22 D). Im Gegensatz zu den Pleuraergüssen der Mammakarzinompatientinnen war die initiale Expression (Kontrolle K) von Granzym B in den CD8+ Zellen bei allen drei Proben vergleichbar niedrig (Abb. 22 D) mit 10 % (3879), 13% (4124) und 15 % (3878).

In Abbildung 23 ist das E:T Ratio jeder Ergussprobe, die spezifische Lyse in % und der Aktivierungsstatus nach jeweils 72h und 1000 ng/ml MT110 bezüglich der CD25 Expression (Abb. 23 A) und Granzym Expression (Abb. 23 B) der CD4+ und CD8+ Zellen dargestellt. Eine Korrelation des E:T Ratios und der spezifischen Lyse nach 72h mit 1000 ng/ml MT110 war nicht signifikant ($p=0,3$; $R=1$), obwohl mit steigender Effektorzahl die Lyse zunahm. Da jeweils nur drei Werte für die statistische Analyse standen ist diese als kritisch zu bewerten. Ebenfalls konnte keine Korrelation zwischen dem Aktivierungsstatus der CD4+ und CD8+ Zellen und dem Ausmaß der spezifischen Lyse identifiziert werden, nachdem 72h mit 1000 ng/ml ex vivo therapiert wurde (CD4+/CD25⁺: $p= 1$, $R= 0,5$; CD8+/CD25⁺: $p= 1$, $R= 0,5$; CD4+/Granzym B⁺: $p= 1$, $R= -0,5$; CD8+/Granzym B⁺: $p= 1$, $R= 0,5$).

3. ERGEBNISSE

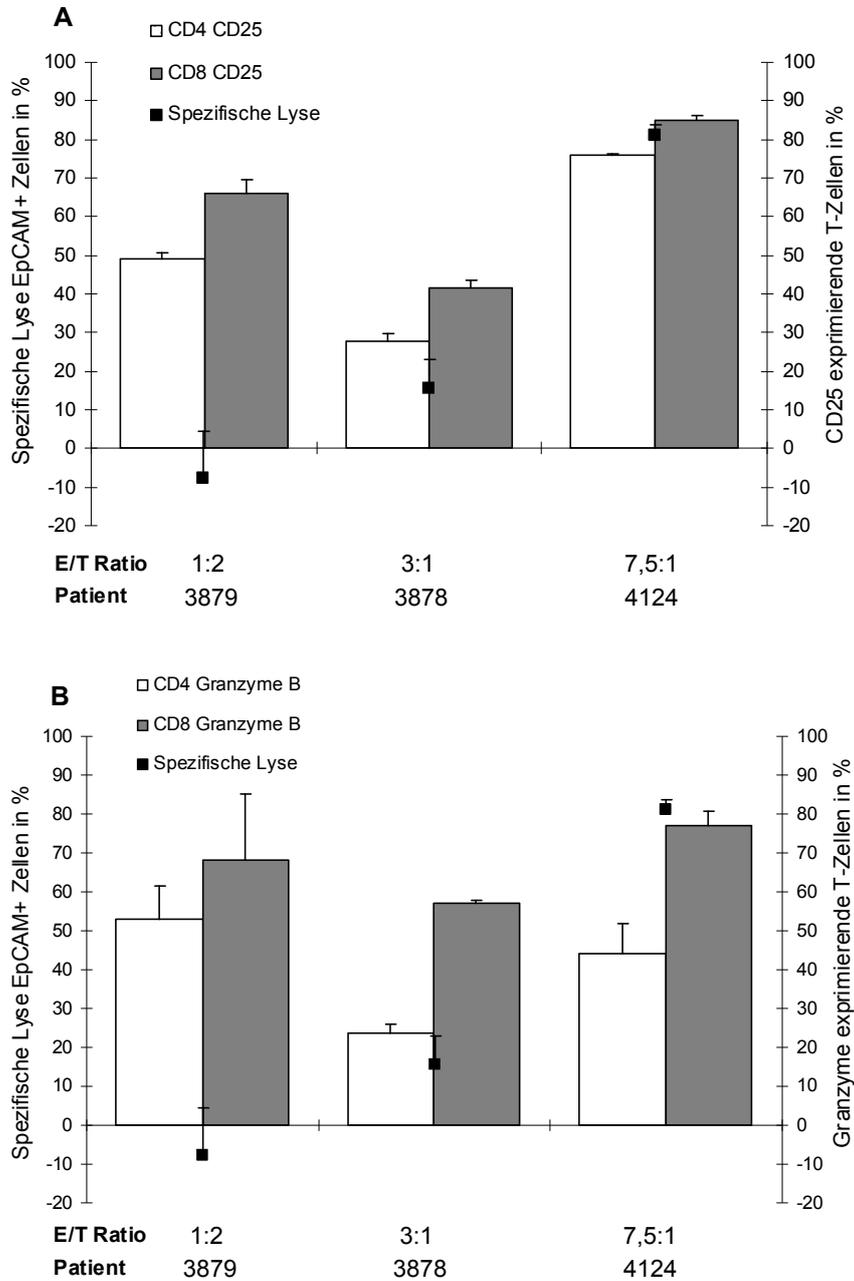


Abbildung 23: Gegenüberstellung des E:T Ratios, des Aktivierungsstatus der Immunzellen CD4+ (**A**) und CD8+ (**B**) und der spezifischen Lyse der MPE beim Bronchialkarzinom (n=3) nach 72h mit 1000 ng/ml MT110.

3.6.3 Zytokinnachweis nach Antikörpertherapie maligner Pleuraergüsse beim Mammakarzinom

Nach 48h MT110 ex vivo Therapie der MPE (n=6) mit 0,1, 1, 10 und 1000 ng/ml wurde im Mediumüberstand die Konzentration verschiedener Zytokine mittels FACS-Analyse bestimmt (Tab. 22). Mit Hilfe des verwendeten Kits konnten Zytokinkonzentrationen ab 20 pg/ml gemessen werden. Mit einer MT110 Konzentration von 1000 ng/ml konnte die Konzentration von TNF- α und IFN- γ signifikant gesteigert werden (p=0,03). Im Mittel wurde das Zytokin TNF- α 22-fach (426 ± 366 pg/ml) und IFN- γ 230-fach (4634 ± 8589 pg/ml) stärker im Vergleich zu den Kontrollantikörpern Mec und α EpCAM exprimiert. Eine positive Korrelation ergab die MT110 induzierte IFN- γ Sezernierung und der Anteil CD4+/Granzym B + Zellen nach 48h MT110 Therapie mit 1000 ng/ml (p=0,03, R=0,88). Die individuellen Daten zeigen für den MPE 3823 die höchste Ausschüttung der Zytokine TNF- α (59-fach) und IFN- γ (1186-fach) in Relation zu den Kontrollantikörpern. IL-10 konnte im Mittel 13-fach (485 ± 883 pg/ml) und IL-2 7-fach verstärkt (141 ± 193 pg/ml) nachgewiesen werden im Vergleich zu Mec und α EpCAM. Die höchste IL-10 Sekretion zeigte der MPE 3823 (55-fach). Den größten Wert bezüglich IL-2 konnte für 3745 (28-fach) detektiert werden. Das Interleukin 6 veränderte sich bei allen malignen Ergussproben unter MT110 Therapie nicht. Jedoch waren hohe Werte von IL-6 bei vier der sechs MPE (3745, 3892, 3823 und 3924) bereits in den Kontrollen (Mec, α EpCAM) nachweisbar. Im Mittel lag die Konzentration bei 5738 pg/ml mit einer Streubreite von 2400 bis 10757 pg/ml. Die gemessene Konzentration für IL-4 war größtenteils so gering, dass diese nur bei einem Patienten (3823) detektiert werden konnte.

3. ERGEBNISSE

Zytokinkonzentration im Überstand nach ex vivo Therapie mit MT110												
Patient Nr.	IL-2		IL-4		IL-6		IL-10		TNF α		IFN γ	
	pg/ml	-fach	pg/ml	-fach	pg/ml	-fach	pg/ml	-fach	pg/ml	-fach	pg/ml	-fach
3745	565 ± 34	28	<20*	1	14043 ± 1689	1.3	137 ± 7	6	344 ± 15	17	2985 ± 115	149
3892	124 ± 4	6	<20	1	5371 ± 267	1	95 ± 19	5	34 ± 3	2	359 ± 19	18
3823	23 ± 2	1	185 ± 6	9	3345 ± 71	1.4	2458 ± 76	55	1170 ± 45	59	23711 ± 912	1186
3874	74 ± 7	4	<20	1	151 ± 5	1.4	<20	1	153 ± 3	8	228 ± 10	11
3888	<20	1	<20	1	642 ± 8	2	74 ± 12	4	510 ± 1	26	208 ± 42	10
3924	42 ± 4	2	<20	1	2412 ± 90	1	127 ± 8	6	342 ± 2	17	311 ± 2	4
MW \pm SD	141 ± 193		48 ± 61		4327 ± 4675		485 ± 883		426 ± 366		4634 ± 8589	
p-Werte	0,06		1		0,5		0,06		0,03		0,03	

Tabelle 22: Zytokinmessung in pg/ml im Überstand nach MT110 ex vivo Therapie der malignen Pleuraergüsse (1000 ng/ml , 48h) beim Mammakarzinom. Der x-fache Nachweis jedes Zytokins wurde in Relation zu den Kontrollantikörpern Mec und α EpCAM bestimmt. MW=Mittelwert; SD=Standardabweichung.

4 Diskussion und Ausblick

Die zelluläre Charakterisierung der MPE beim Mamma- und Bronchialkarzinom ergab eine individuelle und tumorabhängige heterogene Zusammensetzung bezüglich der Epithelzellen sowie Immunzellen im Erguss. Die molekulare Antigencharakterisierung der Epithelzellen für prognose-, therapie- und chemoresistenzvermittelnde Antigene zeigte individuelle und tumorbedingte Unterschiede sowohl für ihren Nachweis als auch für ihre anteilige Expression auf den Pleurakarzinomzellen. Die Antigenexpression therapierrelevanter Proteine wie z.B. des Östrogen- und Progesteronrezeptors war im Vergleich zum korrespondierenden Primärtumor auf den Pleurakarzinomzellen der Mammakarzinompatienten signifikant reduziert. Andere therapieassoziierte Antigene wie z.B. EpCAM, MUC-1 und EGF-R waren bei beiden Tumorentitäten stark vertreten. Das prognose- und therapierrelevante epitheliale Antigen EpCAM wurde als geeignetes Zielantigen der Therapie der Pleurakarzinose mit dem bispezifischen Antikörper MT110 ex vivo an malignen Ergussproben der Mamma- und Bronchialkarzinompatienten getestet. Die ex vivo Therapie der MPE ergab für die MPE beim Mamma- und Bronchialkarzinom eine spezifische Lyse der EpCAM-positiven Pleurakarzinomzellen, sowie eine antikörperabhängige Aktivierung der autologen T-Lymphozyten. Immunmodulierenden Zytokine wurden nach ex vivo Therapie der MPE der Mammakarzinome im Mediumüberstand nachgewiesen. Es zeigte sich ein verstärkter Nachweis der Zytokine wie IFN- γ und TNF- α .

4.1 Methodendiskussion

4.1.1 Zelllinie HT29 als Etablierungsgrundlage für primäre Ergussproben

Die malignen Pleuraergüsse wurden für die Etablierung der Analyseverfahren Toxilight- und Caspase Glo mit Hilfe der stark EpCAM-positiven Zelllinie HT-29 und Effektorzellen von zwei gesunden Spendern imitiert. Hierfür wurden in Annäherung an die immunzytologischen Ergebnisse der n=17 charakterisierten Pleuraergussproben auf den Zytospins verschiedene E:T Ratios aus den Target – und Effektorzellen gebildet (E:T 1:5 bis E:T 25:1). Nach dem Auftauen der malignen Ergussproben zeigte sich jedoch auf Grund des Verlusts von

Epithelzellen eine verstärkte Verschiebung der E:T Ratios zu Gunsten der Effektorzellen. Es ergaben sich somit wider Erwarten nach Auftauen der Ergussproben E:T Ratios mit $E > 25$. Auf Grund des hohen Verlusts der Epithelzellen ist in Zukunft eine ex vivo Therapie und Auswertung frischer Pleuraergüsse zu empfehlen. Vorversuche mit der Zelllinie HT-29 zeigten, dass der Toxilight und Caspase Glo-Assay mit ≥ 10.000 Targetzellen sensitiv war. Bei einem hohen E:T Ratio mit $E \geq 5$ waren beide Assays bei den malignen Pleuraergussproben jedoch nicht sensitiv genug. Bei einem E:T Ratio mit $E \geq 25$ müssten ≥ 250.000 Pleuraergusszellen in einem 96-well eingesät werden. Um die optimale Versorgung der Zellen zu ermöglichen und Zelltod im Zellkulturwell zu vermeiden wurde aber die Zellzahl von 250.000 Zellen/96 Kavität nicht überschritten. Folglich nahm die Anzahl der Targetzellen, die ein messbares Signal liefern konnten ab. Des Weiteren war bei den malignen Ergüssen mit $E < 5$ kein Effekt mit dem Toxilight- und Caspase Glo-Assay zu detektieren. Bei der Etablierung der Assays mit der stark proliferativen Zelllinie HT-29 konnte davon ausgegangen werden, dass diese stärker proliferierte als die Pleurakarzinomzellen, die nur anteilig KI-67 exprimierten (siehe Tabelle 11 und 12). Die Sensitivität der Assays wurde dadurch für die imitierten Ergüsse mit HT-29 erhöht. Außerdem war nach dem Auftauen der Zelllinie HT29 kein Verlust von Epithelzellen zu beobachten und somit auch keine Verschiebung des E:T Ratios zu Ungunsten der signalfreisetzenden Zielzellen. Die Menge der freigesetzten Adenylatkinase aus den Effektorzellen und den im Pleuraerguss vorhandenen Stromazellen konnte nicht wie bei den imitierten Pleuraergüssen als Einzelwert bestimmt werden und somit nicht von dem Gesamtsignal abgezogen werden. Somit war es nicht möglich das Signal, das ausschließlich durch die Targetzellen im MPE bedingt war, zu erhalten. Die Spezifität von MT110 konnte so nicht eindeutig bestimmt werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Toxilight- und Caspase Glo Assay mit der Zelllinie HT29 und PBMCs von gesunden Spendern für die E:T Ratios 1:5 bis 25:1 auswertbare Ergebnisse zeigten. Die Assays waren für die imitierten Pleuraergüsse sensitiv und spezifisch. Eine Sensitivität und Spezifität konnte sich für diese Assays bei den MPE der Patienten jedoch nicht bestätigen. Der Toxilight- und Caspase Glo Assay war somit für die MPE der Patienten nicht geeignet. Die Etablierung des Toxilight- und Caspase Glo Assays mit einer Zelllinie ließ sich nicht auf primäre Patientenproben übertragen. Als alternative Methode wurde die Analyse der Pleuraergusszellen im FACS herangezogen.

4.1.2 Vorteile der FACS Analytik

Insgesamt ergaben sich folgende Vorteile der FACS Analyse gegenüber dem Toxilight und Caspase Assay:

1. Eine genaue und erneute Bestimmung des E:T Ratios nach dem Auftauen der Ergussproben konnte am FACS durchgeführt werden. Dies war durch eine gezielte Färbung der EpCAM-positiven und CD3-positiven Zellen im FACS möglich. Eine Differenzierung der zellulären Subtypen im heterogenen Pleuraerguss war mit dem Toxilight- und Caspase Glo Assay nicht möglich gewesen.
2. Die Sensitivität des Assays war mit 100.000 Zellen pro Probe gewährleistet. Die Messung von 100.000 Pleuraergusszellen nach ex vivo Therapie ist für eine Auswertung am FACS ausreichend, da jede einzelne Zelle im FACS erfasst und abgebildet wird.
3. Der Nachweis der spezifischen Lyse der Pleurakarzinomzellen war durch die Verwendung geeigneter Isotypkontrollen und Antikörper-Kontrollen möglich.
4. Die FACS Analyse ermöglichte die gezielte Detektion der vitalen und toten EpCAM – positiven Zellen nach ex vivo Therapie (Lyse) mit einem Antikörper gegen das Targetantigen EpCAM und einem DNA-interkalierenden Vitalfarbstoff (7-AAD).
5. Des Weiteren konnten mit Hilfe der FACS Analyse die T-Helfer und zytotoxischen T-Zellen im MPE erfasst werden, sowie ihre Aktivierung und Funktionalität nach ex vivo Therapie (Stimulation) mittels der Antikörper anti-CD25 und anti-Granzym B.
6. Die Möglichkeit einer Doppelfärbung (Bestimmung der Lyse) bzw. Vierfachfärbung (Bestimmung der Immunzellstimulation) war jeweils in einer Probe möglich und führte somit zu einer Materialeinsparung.

4.1.3 Auswertemethode A und B der FACS Analytik

Die Auswertemethode B ergab für zwei der Ergussproben aus dem Kollektiv der sieben ex vivo therapierten MPE beim Mammakarzinom eine durchschnittlich 3- fach verstärkte Lyse im Vergleich zu der Auswertemethode A. Bei diesen zwei Patientenproben kann davon ausgegangen werden, dass die ex vivo Therapie mit MT110 zu einer vollständigen Zerstörung der EpCAM-positiven Zellen durch die T-Zellen geführt hat. Das Signal der toten EpCAM-positiven Zellen erfolgt über den Vitalfarbstoff 7-AAD der in den Zellkern der lysierten

Zellen diffundiert. Ist der Zellkern jedoch auf Grund der vollständigen Zerstörung der Zielzelle nicht mehr vorhanden, so kann diese auch nicht mehr als „tot“ im FACS-Gerät erkannt werden. Diese Information geht somit verloren. Eine alternative Auswertemethode stellt die Methode B dar, die ausschließlich den Verlust der EpCAM-positiven Zellen nach der ex vivo Therapie bestimmt. Für alle sieben Ergussproben war diese Art der Auswertung jedoch nicht geeignet. Die Auswertemethode B führte vor allem nach 72h für die Ergussproben 3745 und 3892 mit einem E:T Ratio von 1:2 und 1:4 zu keinem Ergebnis. Für die restlichen fünf Ergussproben ergaben sich höhere Standardabweichungen als mit der Auswertemethode A. Da mit der Auswertemethode A für alle Ergussproben ein auswertbares Ergebnis zu detektieren war, fiel die Entscheidung auf die Auswertemethode A, bei der der Anteil der 7-AAD positiven Zellen eingerechnet wird. Nachteilig für diese Auswertemethode ist, dass bei einer vollständigen Lyse der Targetzellen diese nicht erfasst werden und die spezifische Lyse geringer ausfallen kann. Mit der Erweiterung des Patientenkollektivs werden in Zukunft nach wie vor die Auswertemethoden A und B bei der Analyse der Lyse nach der ex vivo Therapie herangezogen und kritisch diskutiert werden.

4.2 Pleuraergussheterogenität

4.2.1 Zelluläre Heterogenität

Der Epithelzellanteil lag für die MPE beim Mammakarzinom im Mittel bei 32 % und variierte für n=17 Patienten zwischen 3 % und 80 %. Der Epithelzellanteil der MPE beim Bronchialkarzinom war im Vergleich doppelt so hoch mit durchschnittlich 65 % und einer Streubreite bei n=3 Patienten von 20 % bis 95 %. Malignen Zellen des Bronchialkarzinoms können über pulmonale arterielle Kapillaren und der viszeralen Pleura oder direkt in die Pleurahöhle dissimulieren (Lynch TJ et al. 1993, Sahn SA et al. 1997, Antunes G et al. 2003). Der MPE trat bei den Patienten nach der Diagnose des Bronchialkarzinoms (n=3) innerhalb von durchschnittlich 36 Tagen (Streubreite 28-44 Tage) auf. Bei den Mammakarzinompatienten zeigte sich erst nach durchschnittlich 64 Monaten (Streubreite 7-200 Monate) nach Diagnose des Primärtumors der MPE. Hier erfolgt die Metastasierung der Pleurahöhle über den lymphogenen und bei Metastasen der Leber über den hämatogenen Weg (Sahn SA et al. 1997, Antony VB et al. 2001, Antunes G et al. 2003). Inwieweit eine direkte

Invasion der Pleurahöhle mit der Menge der nachgewiesenen Tumorzellen eine Rolle spielt ist nicht geklärt. Jedoch kann die erhöhte Menge der in den MPE der Bronchialkarzinompatienten nachgewiesenen Epithelzellen darauf zurückzuführen sein, dass diese innerhalb kürzester Zeit nach Diagnose des Primärtumors direkt in die Pleurahöhle dissiminierten. Eine Erweiterung des Patientenkollektivs der Bronchialkarzinompatienten wäre in Zukunft hilfreich um diese Hypothese zu untermauern.

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass im MPE der Mammakarzinompatienten der Anteil der mit dem Mesothelzellmarker Calretinin positiv gefärbten Zellen mit im Mittel 14 % und einer Streubreite von 2-90 % deutlich höher war als bei den Bronchialkarzinompatienten mit durchschnittlich 5 % (Streubreite 1-8%). Dies ist darauf zurückzuführen, dass neben der Detektion der Mesothelzellen im MPE bei vier von 17 (23,5 %) der Mammakarzinompatienten (3736, 3848, 3766, 3862) auch eine Positivfärbung der Epithelzellen mit dem Mesothelzellmarker zu beobachten war. Bei diesen Patientenproben (n=4) war mit einem Durchschnitt von 62,5 % (SB 5-85 %) ebenso ein hoher Anteil an Vimentin-positiven Zellen ggf. Fibroblasten im MPE zu detektieren. Bei 2 Patienten dieser Gruppe (50 %) konnte außerdem auf Grund der hohen Anzahl Vimentin-positiver Zellen mit 85 % (3862) und 90 % (3848) im Erguss eine zusätzliche Positivfärbung der Epithelzellen nicht ausgeschlossen werden. Lebet SC konnte zeigen, dass die Kokultivierung von tumorassozierten Fibroblasten mit einer hochdifferenzierten stabilen epithelialen Zelllinie aus einem MPE beim Mammakarzinom (PMCA-42-LA) zu einer starken Expression von mesenchymalen Markern wie z.B. Vimentin in den Zellen führte. Des Weiteren konnte er eine Reduktion der Expression von E-Cadherin auf den Zellen beobachten. E-Cadherin war nach Kokultivierung mit tumorassozierten Fibroblasten ausschließlich im Zytoplasma und nicht mehr an den Grenzzonen der Zellen zu detektieren (Lebet SC et al. 2007). In unserem Kollektiv (n=4) exprimierten zwei der vier Patienten kein E-Cadherin (3736, 3766) und bei einem der vier Patienten konnten nur 20 % E-Cadherin positive Zellen detektiert werden (3848). Ein Patient jedoch exprimierte E-Cadherin auf 100 % der im MPE detektierten Epithelzellen (3862). Davidson B konnte auf den Pleurakarzinomzellen seines Kollektivs von Ovarialkarzinompatienten eine hohe Expression von E-Cadherin und auch eine gleichzeitige Expression von N-Cadherin feststellen. In seinem Patientenkollektiv diskutierte er E-Cadherin als ein Molekül, das möglicherweise im MPE im Gegensatz zu seiner Rolle im Primärtumor eher als Tumorpromoter wirkt (Davidson B et al. 2007). Dieser epitheliale-mesenchymale

Übergang der Tumorzellen ist mit einem erhöhten Potential an Migration und Invasivität der malignen Pleurakarzinomzellen assoziiert (Hugo H et al. 2007). Thompson EW führte mit verschiedenen Mammakarzinomzelllinien Migrationsassays in einer Boyden-Kammer durch. Die Vimentin-positiven und Östrogenrezeptor-negativen Zelllinien Hs578T, BT549 aus einem Primärtumor und MDA-MB-231 und MDA-435 aus einem MPE beim Mammakarzinom, zeigten eine signifikant erhöhte Invasivität als z.B. die Zelllinien T47D und MCF-7 (beide aus MPE), die Vimentin-negativ waren und den Östrogenrezeptor exprimierten. Alle Patienten unseres Kollektivs mit verfügbaren Primärtumordaten (3736, 3766, 3848) zeigten interessanterweise im Vergleich zum Primärtumor einen Verlust des Östrogenrezeptors in den Pleurakarzinomzellen. Mani SA beobachtete zudem, dass in Zusammenhang mit der epithelialen-mesenchymalen Transition einer Mammakarzinomzelllinie diese Stammzellmarker (CD44^{high} CD24^{low}) exprimierte und unter speziellen Kulturbedingungen leichter sogenannte „Mammosphären“ ausbildete. Diese Mammosphären sind kompakte Aggregate aus 30-150 Zellen, die in nicht adhäsiven Platten aus jeweils einer einzelnen Zelle nach 7-10 Tagen in Kultur entstanden sind (Mani SA et al 2008). Die zelluläre Charakterisierung unseres Kollektivs ergab, dass in allen vier Pleuraergüssen Aggregate zu identifizieren waren. In drei Ergüssen konnten kompakte Erguss-Sphäroide identifiziert werden.

In Zukunft soll anhand eines erweiterten Patientenkollektivs geklärt werden, ob Patienten, die eine epitheliale-mesenchymale Transition im MPE zeigen eine schlechtere Prognose als das Restkollektiv zeigen und welche Rolle die E-Cadherin Expression einnimmt. Unser kleines Kollektiv (n=4) zeigte sich bezüglich Rezidivhäufigkeit und Überlebenszeit nach dem Auftreten von einem MPE sehr heterogen. Zwei Patienten zeigten bis zur Entwicklung der MPE ein Rezidiv (3736, 3766), zwei Patienten entwickelten zeitlich versetzt zwei Rezidive (3848, 3862, Tabelle 3). Die Patientin mit 100 % E-Cadherin-positiven Epithelzellen verstarb ein Tag nach Diagnose des malignen Ergusses. Die Patienten 3736 und 3848 sind am Leben, Patient 3766 verstarb 410 Tage nach dem erstmaligen Auftreten eines Ergusses. Ein weiterer interessanter Aspekt wäre die Klärung der Frage zu welchem Zeitpunkt die Transition stattgefunden haben kann und ob diese bereits im Primärtumor nachzuweisen ist. Weitere zu klärende Punkte wären der zusätzliche Nachweis von N-Cadherin und die Untersuchung inwieweit das Tumorenvironment eine Rolle bei der Entwicklung eines epithelialen-mesenchymalen Switches spielt. Eine Möglichkeit ist die Charakterisierung der

Pleuraergussflüssigkeit nach löslichen Faktoren wie z.B. FGF (Fibroblast growth factor), IGF (Insulin-like growth factor), IL-6 (Interleukin 6) und NGF (nerve growth factor), die von tumorassoziierten Fibroblasten ausgeschüttet werden und die die Transition fördern (Bhowmick NA et al. 2004). Eine genaue Charakterisierung der Fibroblasten im MPE nach z.B. Antigenen wie das "smooth muscle actin" oder das Fibroblasten-Aktivator-Protein, das von tumorassoziierten Fibroblasten exprimiert wird, wäre aufschlussreich (Hugo H et al. 2008).

Die Charakterisierung der Immunzellen im Pleuraerguss zeigte, dass sowohl in den MPE der Mammakarzinompatienten als auch der Bronchialkarzinompatienten sehr wenig T-Zellen den späten Aktivierungsmarker CD25 mit im Durchschnitt 3 % beim Mammakarzinom (SB 1-6%) und 8 % (SB 6-9 %) beim Bronchialkarzinom exprimierten. Aguiar LM beobachtete auch einen geringeren Anteil an CD3+/CD25+ Zellen im malignen Erguss im Vergleich zum Peripherblut von Patienten mit einem malignen Pleuraerguss (Aguiar LM. et al. 2008). Die Aktivierung der T-Zellen erfolgt normalerweise über den Kontakt mit antigen-präsentierenden Zellen (APCs). Eine Aktivierung der T-Zellen kommt nur zustande wenn die APCs ein erregerspezifisches Antigen bzw. tumorassoziierten Antigen (Peptid) in Assoziation mit Molekülen der MHC Klasse I und II und kostimulatorischen Molekülen (B7.1, B7.2, CD26, CD44, CD54) präsentieren. Des Weiteren müssen die T-Zellen über einen passenden T-Zellrezeptor verfügen, der das Peptid in Verbindung mit den MHC-Molekülen erkennt. Eine Interaktion des kostimulatorischen Moleküls und des dazugehörigen Liganden auf der T-Zelle (z.B. CD28 für die B7-Familie) führt zu einer Proliferation der T-Zelle, zu einer erhöhten Expression des IL-2 Rezeptors (CD25), sowie von CTLA-4, CD40L auf den T-Zellen. Die Aktivierung einer naiven T-Zelle, ihrer anschließenden Proliferation und Differenzierung ist nur dann möglich, wenn beide Signale (MHC/Peptid und kostimulatorisches Molekül) auf derselben Antigen-präsentierenden Zelle zur Verfügung stehen. Diese Voraussetzung wird nur von den professionellen APCs erfüllt. Die wichtigsten bekannten APCs sind dendritische Zellen, aber auch B-Lymphozyten und Makrophagen können als Antigen-präsentierende Zellen wirken (Neumann, Jürgen; Berlin, Springer, 2008). Die Charakterisierung der Immunzellen im Erguss beinhaltete in dieser Arbeit nicht den Nachweis von Makrophagen oder dendritischen Zellen. In jeder untersuchten Ergussprobe konnten jedoch CD14+ Monozyten nachgewiesen werden, die das Potential besitzen sich in Makrophagen oder dendritische Zellen zu differenzieren. Makrophagen und dendritische Zellen konnten von

anderen Arbeitsgruppen in malignen Ergüssen nachgewiesen werden (Surdacka A et al. 2003, Gjomarkaj M et al. 1997, Hamburger AW et al. 1985, Hammerstrom J. et al 1980). Gleichzeitig stellt sich die Frage warum trotz im MPE vorhandener APCs eine Immunantwort gegen die malignen Zellen im Erguss nicht stattfindet. Tumorzellen im Erguss können über die Ausschüttung von immunsupprimierenden Zytokinen wie z. B. IL-10 indirekten Einfluss auf die Immunantwort nehmen (Groux H 1996, Schwartz RH et al 1996). In MPE unterschiedlicher Tumore wurde, unabhängig von mehreren Wissenschaftlern, das Zytokin IL-10 verstärkt im Vergleich zu gutartigen Ergüssen nachgewiesen (Sikora JJ et al 2004, Antony VB et al. 2003, Chen YM et al 1996). IL-10 ist ein antiinflammatorisches Zytokin, das die Immunantwort über eine Herunterregulation der MHC I und II Klasse Moleküle, sowie kostimulatorischen Moleküle auf den Makrophagen bewirken kann. Folglich werden die Peptide von den Rezeptoren auf den T-Zellen nicht erkannt und die T-Zelle wird nicht aktiviert.

Der Nachweis von NK-Zellen im Erguss zeigte, dass in den MPE beim MK mit durchschnittlich 12 % der Leukozyten im Pleuraerguss ähnlich viele NK-Zellen nachgewiesen werden konnten, wie sie z.B. im Peripherblut mit anteilig 15 % der Blut-Lymphozyten zu erwarten sind (Blut-Physiologie des Menschen; W. Kaboth und H. Begemann, Urban und Schwarzenberg Verlag). Bei den MPE der Bronchialkarzinompatienten zeigte sich ein höherer Anteil an NK-Zellen mit durchschnittlich 20 % der Leukozyten im Erguss. Oka M untersuchte die immunologische Funktion von Immunzellen aus dem Peripherblut und aus malignen Pleuraergüssen von Patienten mit einer malignen Grunderkrankung. Er konnte eine geringere Aktivität der NK-Zellen im MPE im Vergleich zu den NK-Zellen aus dem Peripherblut derselben Patienten feststellen. Die NK-Zellen aus dem Peripherblut konnten in einem zytotoxischen Assay durchschnittlich $50 \pm 10,3$ % der Targetzellen (Zelllinie K562) lysieren. Die NK-Zellen aus dem malignen Erguss aber nur durchschnittlich $20 \pm 10,4$ % der Zielzellen (Oka M et al 1993). Uchida A. konnte bereits 1984 zeigen, dass Tumorzellen aus einem malignen Pleuraerguss entscheidenden Einfluss hatten auf die Aktivität von NK-Zellen. Wurden die NK-Zellen aus Peripherblut von gesunden Spendern vor ihrer Zugabe zu der Zelllinie K562 mit Tumorzellen aus einem malignen Pleuraerguss für 20 h kokultiviert, so wurden die K562 Zellen nicht mehr von den NK- Zellen lysiert. (Uchida A et al. 1984). Inwieweit die autologen Pleurakarzinomzellen einen hemmenden Einfluss auf die NK-Zellen

im Erguss haben und welche Mechanismen die NK-Zellenergie fördern muss in Zukunft genauer untersucht werden.

Die Charakterisierung der Immunzellen in den malignen Pleuraergüssen der Mamma- und Bronchialkarzinompatienten zeigte außerdem, dass das Verhältnis der im MPE vorhandenen T-Helfer zu zytotoxischen T Zellen bei 2,5:1 lag. Insgesamt waren im Erguss mit einer Streubreite von 8-30 % weniger zytotoxische T-Zellen zu detektieren als diese mit einer Streubreite von 19-42 % im Peripherblut zu erwarten sind (Blut-Physiologie des Menschen; W. Kaboth und H. Begemann, Urban und Schwarzenberg Verlag). Der Anteil der T-Helfer Zellen bewegte sich mit einer Streubreite von 18-85 % in einem normalen Rahmen. Eine verminderte Anzahl von zytotoxischen T-Zellen im MPE konnte auch Atanackovic D in den von ihm untersuchten malignen Pleuraergüssen beobachten (Atanackovic D et al 2004). Er bestimmte den Anteil von CD3+/CD8+ Zellen aus dem Peripherblut gesunder Probanden (n=17) und verglich diese mit dem Anteil zytotoxischer T-Zellen aus malignen Pleuraergüssen (n=16). Er detektierte 30 % CD8+ T-Zellen im Peripherblut im Vergleich zu 24 % CD8+ T-Zellen in den MPE. Zytotoxische T-Lymphozyten sind spezifische Effektorzellen, die die Fähigkeit der Lyse besitzen. Die Zerstörung der Zielzelle durch die CD8+ Zellen erfolgt normalerweise über das Auslösen der Apoptose durch den Fas-Liganden (Russell JH et al. 2002), der an den Fas-Rezeptor (CD95) der Zielzelle bindet. Jedoch kann eine Präsentation des Fas-Liganden auf den Tumorzellen zu einer Interaktion mit Fas-exprimierenden Effektorzellen führen. Dies führt zu einer Apoptose der Effektorzellen. Sikora J konnte zeigen, dass auf den Tumorzellen aus malignen Pleuraergüssen ein Verlust von CD95 und erhöhte Level des Fas Liganden zu detektieren waren. Im Vergleich dazu exprimierten die tumorassoziierten Lymphozyten (TALs) im malignen Erguss den Fas-Rezeptor und in deutlich vermindertem Maße den Fas Liganden (Sikora J et al. 1998). Dies könnte ein Grund dafür sein, warum die zytotoxischen T-Zellen im MPE unterrepräsentiert sind. Inwieweit eine Expression der Fas-Liganden auf den Pleurakarzinomzellen unseres Kollektivs vorliegt und ob die CD8+ Effektorzellen im MPE CD95 präsentieren, muss in Zukunft auf den MPE Proben gezeigt werden.

4.2.2 Molekulare Heterogenität

Die molekulare Charakterisierung der Epithelzellen im Erguss erfolgte mit ausgewählten therapie- prognose-, sowie chemoresistenz-assoziierten Antigenen. Es wurden bereits für die Therapie des Mammakarzinoms etablierte Zielantigene wie z.B. der Östrogen-/und Progesteronrezeptor (antihormonelle Therapie mit Tamoxifen/Fulvestrant) sowie das HER2/neu Antigen (Antikörpertherapie mit Trastuzumab/Herceptin) ausgewählt. Weitere Antigene, wie z.B. EGF-R, CD44 v6, CEA und das UPA-System, die als Zielantigene verschiedener Tumorentitäten diskutiert werden, wurden ebenso auf den Pleurakarzinomzellen analysiert (siehe Tabelle 11). Der monoklonale Antikörper Cetuximab, gegen den EGF-Rezeptor, ist für die Therapie des kolorektalen Karzinoms, sowie für Plattenepithelkarzinome des Kopf und des Halses in der EU, Schweiz und USA zugelassen. Der Antikörper Bevatuzumab mertansine wurde bereits in einer Phase I Studie gegen das Antigen CD44 v6 beim metastasierten Mammakarzinom getestet (Rupp U et al. 2007). Der monoklonale Antikörper Labetuzumab gegen das Antigen CEA befindet sich in der präklinischen Phase und unterdrückte das Wachstum von Lungenmetastasen kolorektaler Tumorzellen im Mausmodell (Blumenthal RD et al. 2005). Ein Inhibitor gegen UPA (WX-671) wird für die Therapie des fortgeschrittenen Mammakarzinoms in einer Phase II Studie getestet (Wilex AG, Pressemitteilung am 24.7.2008, Artikelnummer: 304124). Der Nachweis chemoresistenz-vermittelnden Antigenen wie z.B. P-Glykoprotein oder Topoisomerase Ia auf den Pleurakarzinomzellen sollten Aufschluss über bereits existierende Resistenzmechanismen geben und auf diese Weise den Einsatz molekularer Therapiestrategien bei der Behandlung MPE unterstreichen.

Die molekulare Charakterisierung der Epithelzellen im MPE der Patienten zeigte, dass die therapie relevanten Antigene ER und PgR bei den MPE der Mammakarzinompatienten mit nur 24 % (ER) und 6 % (PgR) anteilig positiven Ergussproben deutlich unterrepräsentiert waren. Auf den Epithelzellen der MPE beim Bronchialkarzinom waren die Hormonrezeptoren nicht detektierbar. Die vergleichende Analyse des Hormonrezeptorstatus auf den MPE Zellen und dem korrespondierenden Primärtumor der Mammakarzinompatienten zeigte einen signifikanten Verlust der Hormonrezeptoren auf den disseminierten Pleurakarzinomzellen. Eine Veränderung des Hormonrezeptorstatus von Metastasen im Knochen (n=11), im Weichteilgewebe (n=9), der Leber (n=3), im MPE (n=4), der Lunge (n=1) und der Gehirn-

Rückenmarksflüssigkeit (n=1) im Laufe eines progredienten Mammakarzinoms konnte auch C. Simmons bei 40 % der untersuchten Patienten (n=29) im Vergleich zum korrespondierenden Primärtumor beobachten (Simmons C et al. 2008). E. Amir konnte bei der Untersuchung von neun Mammakarzinompatienten feststellen, dass sechs der Patienten (67 %), die einen Östrogenrezeptor-positiven (ER+) Primärtumor aufwiesen, Östrogenrezeptor-negative (ER-) Metastasen im Knochen hatten. Neun von 19 Mammakarzinompatienten (47 %) wiesen einen ER- Primärtumor auf, zeigten aber ER+ Metastasen im Knochen. Als Erklärung hierfür wird die Art der Therapie (Chemotherapie oder Hormontherapie) während des Intervalls beider Biopsieentnahmen genannt (Amir E et al. 2008). T. Fehm zeigte, dass nur 14 % (12 von 88) der Patienten aus einem Patientenkollektiv von n= 88 Patienten, die einen ER α + Primärtumor aufwiesen auch ER α + dissimierte Tumorzellen im Knochenmark zeigten (Fehm T et al. 2008). Diese Daten unterstreichen erneut, dass ER- Tumorzellen hochinvasiv sind. Des Weiteren zeigen diese Ergebnisse deutlich, dass für die Therapie des metastasierten Mammakarzinoms der Hormonrezeptorstatus des Primärtumors nicht herangezogen werden kann.

Die weitere molekulare Charakterisierung der MPE zeigte, dass die Antigene EpCAM, MUC-1, CEA, CD44 v6, EGFR, E-Cadherin, KI-67 und UPAR von jeweils über der Hälfte der MPE beim Mamma- und Bronchialkarzinompatienten auf den Epithelzellen im MPE exprimiert wurden. Für die Diagnose und Unterscheidung von MPE der Adenokarzinome und Mesotheliome werden die Antigene CEA, EpCAM, E-Cadherin und MUC-1 herangezogen (Grefte JM et al. 2008, Pu RT et al. 2008, Li Q et al. 2006, Davidson B et al. 1999). Die Expression der Antigen CEA und EpCAM korrelierte bei den MPE der Mammakarzinome signifikant positiv mit der prognostisch ungünstigsten Patientengruppe des Gesamtkollektivs. Eine EpCAM und CEA Expression konnte bei allen Bronchialkarzinom-Patienten nachgewiesen werden. Erhöhte Serumspiegel des löslichen Tumormarkers CEA werden bei 40-50 % der Patienten mit einer Metastasierung diagnostiziert (Duffy MJ et al. 2006, Jäger W et al. 2000, Hayes DF et al 1994). Das Antigen CEA ist ein bei MPE von Adenokarzinomen häufig nachgewiesenes Oberflächenmolekül, das hauptsächlich bei der Differentialdiagnose der MPE eingesetzt wird (Marchevsky AM et al. 2007, Grefte JM et al 2008). Das Antigen CEA wird in der Literatur jedoch nicht als Zielantigen bei der Therapie von MPE beim metastasierten Mammakarzinom und Bronchialkarzinom diskutiert. Monoklonale Antikörper (Labetuzumab, hPR1A3) die gegen das Antigen CEA gerichtet sind wurden jedoch bereits in

in vitro an CEA-positiven Zelllinien und in vivo im Mausmodell getestet (Blumenthal RD et al. 2008; Conaghan P et al. 2008, Kuroki M et al. 2005). CEA könnte somit für die Therapie von Patienten mit einem fortgeschrittenen Mamma- und Bronchialkarzinom ein geeignetes Zielantigen darstellen. Wie CEA wird auch das epitheliale Antigen EpCAM als wichtiger diagnostischer Marker für die Identifizierung von Adenokarzinomen diskutiert. Die ex vivo Therapie von malignen Pleuraergüssen mit einem bispezifischen Antikörper gegen EpCAM und CD3 zeigte nach 72 h eine durchschnittliche spezifische Lyse der EpCAM-positiven Ergusszellen von $57 \pm 29,5$ % bei sieben Ergussproben. Das Antigen EpCAM kann somit auch als ein geeignetes Zielantigen bei der Therapie der MPE gesehen werden (Witthauer J et al. 2008). Der Wachstumsfaktorrezeptor EGF (Her-1) war mit 82 % bei den MPE der Mammakarzinome und mit 100 % bei den MPE der Bronchialkarzinome ähnlich stark wie das epitheliale Antigen EpCAM vertreten. Der deutliche Nachweis des EGF-Rezeptors sowohl bei den MPE des Mamma- und Bronchialkarzinoms eröffnet die Möglichkeit einer Therapie mit monoklonalen Antikörpern wie z.B. Cetuximab und oder niedermolekulare Tyrosinkinaseinhibitoren (small molecules). In Zukunft muss die Ansprechrate der malignen Ergüsse ex vivo für die aufgeführten molekularen Therapiestrategien mit Antikörpern oder small molecules gegen CEA, EpCAM und EGFR getestet werden. Des Weiteren soll untersucht werden, inwieweit die Molekülstruktur der Oberflächenantigene CEA, EpCAM und EGFR und das Tumorenvironment bei einem Nichtansprechen auf die Therapie eine Rolle spielen.

Unterschiede bei der Charakterisierung der Epithelzellen im MPE der Mammakarzinom- und Bronchialkarzinom- Patienten waren für die Antigene EphrinA2 und KI-67 zu beobachten. Der Tyrosinkinaserzeptor Ephrin A2 war nur bei einem der 17 untersuchten MPE beim Mammakarzinom zu detektieren. Die MPE beim Bronchialkarzinom hingegen waren zwei von drei positiv für EphrinA2 mit einem außerdem hohen Anteil von >70% positiven Epithelzellen. Der EphrinA2 Rezeptor wird von verschiedenen Tumoren der z.B. Brust, Lunge, des Pankreas und Kolon exprimiert und wird deswegen als therapeutisches Zielantigen diskutiert (Ireton RC et al. 2005). Der Nachweis des EphrinA2 Rezeptors auf den Pleurakarzinomzellen von MPE wurde bis jetzt noch nicht in der Literatur beschrieben. Jantz MA konnte eine Expression von EphrinA2 auf den Mesothelzellen eines Mesothelioms nachweisen (Jantz MA et al. 2008). Auf nicht reaktiven benignen Mesothelzellen konnte der Rezeptor nicht detektiert werden. EphrinA2 hatte einen entscheidenden Einfluss auf die

Migration und Proliferation der Mesothelzellen. Wurde die EphrinA2 Rezeptor Expression mit Hilfe von siRNAs herunterreguliert, so verloren die Zellen ihre migratorische Eigenschaft, stellten ihre Proliferation ein und wurden über eine Aktivierung der Capsase-9 apoptotisch (Nasreen N et al. 2006). Inwieweit der EphrinA2 Rezeptor eine Rolle bei der Migration und der Apoptose der Tumorzellen beim Bronchialkarzinom im Vergleich zum MPE beim Mammakarzinom spielt muss in Zukunft an Hand eines größeren Patientenkollektivs geklärt werden. Neben einer im Vergleich zum Mammakarzinom verstärkten EphrinA2 Expression der Epithelzellen beim Bronchialkarzinom konnte auch auf diesen mittels Ki-67 ein doppelt so hoher Anteil an proliferierenden Zellen im Vergleich zum MPE beim Mammakarzinom nachgewiesen werden. EphrinA2 stellt somit neben CEA, EpCAM und EGFR ein weiteres geeignetes Zielantigen bei der molekularen Therapie maligner Pleuraergüsse beim Bronchialkarzinom dar.

Der Proliferationsmarker Ki-67 war bei 13 von 17 MPE der Mammakarzinompatienten und allen MPE der Bronchialkarzinompatienten nachzuweisen. Der Anteil der positiv gefärbten Epithelzellen jedoch war bei den Bronchialkarzinompatienten doppelt so hoch wie bei den Mammakarzinompatienten. Ein weiterer Grund der geringen Anzahl proliferierender Epithelzellen im MPE beim Mammakarzinom kann sein, dass die Patienten nach Entfernung des Primärtumors im Gegensatz zu den Bronchialkarzinompatienten über einen sehr viel längeren Zeitraum bis zur Entwicklung des MPE chemotherapeutisch behandelt wurden (36 Tage versus 64 Monate). Neubauer H konnte beobachten, dass nach einer systemischen Chemotherapie bei 87 Patienten die Expression des mittleren Ki-67 Index von 30 % auf 13 % zurückging ($p \leq 0,01$) (Neubauer H et al. 2008). Die multimodalen Therapiestrategien der Mammakarzinompatienten (Chemotherapie, antihormonelle Therapie und Antigen-therapie) über einen durchschnittlichen Zeitraum von 64 Monaten (SB 7-200 Monaten) können zu einer gezielten Selektion der Tumorzellen im Laufe der Erkrankung führen. Des Weiteren kann eine verminderte Ki-67 Expression mit einer Resistenz bezüglich des Chemotherapeutikums 5-FU assoziiert sein. Cabibi D konnte zeigen, dass 16 % der Patienten aus ihrem Kollektiv von n=80 Patienten das Zellzyklusenzym Thymidilatsynthase in den befallenen Lymphknoten schwächer exprimierten als im korrespondierenden Primärtumor. Der Verlust des Enzyms Thymidilatsynthase ist mit einem schlechten Ansprechen auf eine 5-FU Therapie assoziiert (Cabibi D et al 2007). Gleichzeitig konnten sie zeigen dass in diesen Lymphknoten auch weniger Ki-67 positive Zellen im Vergleich zum korrespondierenden PT zu detektieren

waren. Der Nachweis des Enzyms Thymidilatsynthase und des Proliferationsmarkers KI-67 in den Pleurakarzinomzellen könnte Aufschluss über mögliche Resistenzmechanismen ermöglichen. Inwieweit diese Marker ein prädiktives Potential besitzen muss in Zukunft geklärt werden.

Die Untersuchung weiterer möglicher Resistenzmechanismen ergab, dass die Topoisomerase Ia nur 2 von 17 (12 %) der untersuchten Mammakarzinompatienten auf den Pleurakarzinomzellen der MPE exprimierten. Eine Therapie mit den Chemotherapeutika Irinotecan oder Topotecan kommt somit für 88 % der Patienten des untersuchten Kollektivs nicht in Frage. Das P-Glykoprotein wurde wider Erwarten auf nur 29 % der untersuchten Proben der Mammakarzinome exprimiert und ließ sich des Weiteren auf nur durchschnittlich 25 % der Epithelzellen nachweisen. Bei den MPE der Bronchialkarzinome war jeweils ein Patient positiv für Topoisomerase Ia und P-Glykoprotein. In Zukunft werden weitere Moleküle, die in chemoresistenzvermittelnde Prozesse involviert sind wie z.B. die MRP-Familie auf den MPE nachgewiesen werden, um die Komplexität der Chemoresistenz bei malignen Ergüssen vollständig zu erfassen und analysieren zu können.

4.3 Effektivität von MT110

Die ex vivo Therapie der sieben malignen Ergussproben der Mammakarzinompatienten führte zu einer signifikanten Lyse der EpCAM positiven Zellen nach 48h und 72h für die beiden höchsten Konzentrationen 10 ($p=0,03$) und 1000 ng/ml ($p=0,016$) MT110. Aus dem Kollektiv der drei ex vivo therapierten malignen Ergüsse der Bronchialkarzinompatienten, konnte nur bei einem Erguss eine Lyse der EpCAM positiven Ergusszellen festgestellt werden. Für beide Tumorentitäten war sowohl nach 48h als auch nach 72h eine schwache Lyse für die niedrigsten Konzentrationen (0,1 ng/ml und 1 ng/ml) zu sehen. K. Brischwein therapierte die EpCAM positiven Zelllinien Kato III, MCF-7, MDA-MB 453 und SKBR2, die in einem 1:5 Verhältnis mit PBMCs von gesunden Spendern versetzt waren für 48h mit unterschiedlichen Konzentrationen von MT110. Die Zelllinien unterschieden sich bezüglich ihrer Bindungsstellen für EpCAM. Kato III zeigte mit 900.000 Bindungsstellen/Zelle die höchste Anzahl, SKBR3 mit 125.000 Bindungsstellen/Zelle die kleinste Anzahl auf der Zelle. Die Zelllinie SKBR3 zeigte für die beiden Konzentrationen 0,1 und 1 ng/ml eine konstante Lyse von 40%. Bei den Kato III Zellen hingegen konnte die Lyse der EpCAM positiven Zellen

nach 1 ng/ml MT110 von 40 % (0,1 ng/ml) auf 70 % gesteigert werden. Je mehr Bindungsstellen des Antigen EpCAM zur Verfügung stehen, desto mehr CD3-positive Zellen können aktiviert werden (Brischwein et al. 2006). Gleichzeitig ist auch mit einer steigender MT110 Konzentration, die Menge an bispezifischen Antikörpern, die EpCAM positive und CD3 positive Zellen binden und somit die T-Zellen aktivieren, erhöht. Für die beiden niedrigsten Konzentrationen 0,1 und 1 ng/ml war in unserem Kollektiv neben der schwachen Lyse der EpCAM positiven Zellen ein im Vergleich zu den Konzentrationen 10 ng/ml und 1000 ng/ml auch geringerer Anteil an stimulierten T-Zellen zu detektieren. Gleichzeitig war eine erhöhte Zytokinausschüttung von TNF- α im Vergleich zu den Kontrollantikörpern für die MT110 Konzentrationen von 0,1 und 1 ng/ml nach 48h nur für einen Patienten (3823) zu detektieren. Dieser Patient zeigte aber auch nach 48h mit 13 % und mit 33 % die höchste spezifische Lyse des Kollektivs nach MT110 ex vivo Therapie mit 0,1 ng/ml und 1 ng/ml. Für das Zytokin INF- γ war dasselbe Phänomen zu beobachten. Lediglich für Patient 3745 war ebenso für 1 ng/ml MTT10 eine im Vergleich zu den Kontrollen erhöhte IFN- γ Konzentration nachzuweisen. Die spezifische Lyse war für diesen Patienten mit dem ungünstigstem E:T Ratio 1:4 des Kollektiv mit 9 % die dritthöchste aller therapierten Patientenproben für diese Konzentration (48h). Die Zytokine TNF- α und IFN- γ haben einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivierung und Rekrutierung von immunkompetenten Zellen, wie z.B. Makrophagen, B-Zellen und T-Zellen und spielen somit eine große Rolle bei der gezielten Aktivierung der Effektorzellen gegen die Zielzellen (Barber GN et al. 2001, Guidotti LG et al. 1996). Interessanterweise konnte nur auf diesen malignen Pleuraergüssen (3823 und 3745) mittels Immunzytologie auf Zytospins eine gleichzeitige Expression der Chemoresistenzmarker bcl2, Topoisomerase Ia und P-Glykoprotein für 3823 und Topoisomerase Ia und P-Glykoprotein für 3745 nachgewiesen werden. Diese Beobachtung verdeutlicht umso mehr die Wichtigkeit gezielter molekularer Therapiestrategien unter Einbezug autologer Effektorzellen bei der Behandlung maligner Pleuraergüsse des fortgeschrittenen Mammakarzinoms.

Ein weiterer Grund für die schwache Ansprechrate der MPE für die beiden niedrigsten eingesetzten Konzentrationen von MT110 kann sein, dass auf Grund der Kultivierung der Zellen in 96 Well Platten eine Migration der immunkompetenten Zellen zu der Zielzelle nötig ist. Vor allem bei Patientenproben mit einem E:T Ratio $T > 1$ bedeutet dies, dass die Immunzellen auf Grund des Überschusses von Tumorzellen nicht in unmittelbarer Nachbarschaft der Zielzellen liegen und es einer Migration der Immunzellen zur Zielzelle

bedarf (Hoffmann P et al. 2005). Ein E:T Ratio von $T > 1$ bedeutet für die Effektorzelle, dass diese mehrere Zielzellen angreifen und lysieren muss um alle Zielzellen zerstören zu können. Bei den Patienten 3745, 3892 und 3879, die ein E:T Ratio mit $T=4$ (3745) und $T=2$ (3892, 3879) aufwiesen, konnte mit der höchsten Konzentration von MT110 nach 72h eine spezifische Lyse von 46 % (3745) und 24 % (3892) sowie keinerlei lytische Wirkung bei der Patientenprobe 3879 erreicht werden. Eine interessante Frage, die es zu beantworten gilt ist, ob eine MT110 Behandlung mit höheren Konzentrationen über einen Zeitraum von $> 72h$ eine Steigerung der spezifischen Lyse auf Grund einer z.B. verstärkten Immunzellaktivierung und ggf. einer induzierten Immunzellproliferation hätte bewirken können.

Ein weiterer Aspekt ist die zelluläre Charakterisierung der Zielzellen im Erguss. Die Ergusszytologie ergab für die Patienten 3745 und 3892 beim Mammakarzinom, sowie 3879 beim Bronchialkarzinom das Vorhandensein von sehr kompakten Zellaggregaten (Erguss-Sphäroide). Für die Patientenprobe 3878 (Bronchialkarzinom) konnten lockere Zellaggregate im Erguss festgestellt werden. Den Nachweis von Aggregaten im Erguss von MPE bei Mamma- und Bronchialkarzinom konnten auch andere Arbeitsgruppen zeigen (Davidson B et al. 2004, Michael CW et al 1997, Dieterich M et al. 1994, Wiley EL et al. 1990, Danner DE et al 1975). Für die Ergussproben 3878 und 3879 konnte nach ex vivo Therapie mit MT110 keine Lyse der EpCAM positiven Zellen detektiert werden. Die Patientenprobe 3892 zeigte nach 72h mit 1000 ng/ml MT110 eine 24 prozentige spezifische Lyse und die Patientenprobe 3745 46 % lysierte EpCAM positive Zellen. Interessanterweise konnte für alle diese Ergussproben eine Aktivierung der Immunzellen über den Nachweis von CD25 und Granzym B festgestellt werden. Eine interessante Frage in diesem Zusammenhang ist, ob die Erguss-Sphäroide und Kluster im MPE zum einen eine Penetration des Antikörpers erschweren oder gar verhindern, und zum anderen in wieweit die Effektorzellen an die Zielzellen im Aggregat ihre lytische Wirkung entfalten können. Garcia de Palazzo I inkubierte vergleichsweise eine Monolayer der Zelllinie SW948 sowie Sphäroide dieser Zelllinie über 4 h und 24 h mit Il-2 stimulierten Lymphozyten (E:T Ratio 25 :1) und dem bispezifischen Antikörper CL158. Nach 4h waren $90,7 \pm 7,2$ % der SW948 Zellen in Monolayer lysiert. Im Vergleich dazu waren nach 4h erst $8,1 \pm 1,3$ % der Zellen der Sphäroide durch die Lymphozyten lysiert. Nach 24h waren $64,3 \pm 22,3$ % der Zielzellen im Sphäroid lysiert (Garcia de Palazzo I et al. 1992). Dieser Versuch zeigte deutlich, dass für die Lyse von Sphäroiden eine längere Therapiedauer als für die Lyse von Monolayerzellen benötigt wird und vergleichsweise weniger Zellen im

Sphäroid zerstört werden können. Olabiran Y zeigte, dass das Ausmaß der Diffusion in Sphäroiden auch von der eingesetzten Antikörper-Konzentration abhängt (Olabiran Y et al. 1994). Die Arbeit von Langmuir VK zeigte, dass eine hohe Expression des Zielantigens die Penetration eines Antikörpers in das Sphäroid verlangsamt (Langmuir VK et al. 1991). Hjelstuen MH belegte, dass ein Antikörper umso langsamer in ein Sphäroid gelangt, je höher seine Affinität zu dem spezifischen Antigen ist (Hjelstuen MH et al. 1998).

Ein weiterer möglicher Grund für die schwache lytische Aktivität durch MT110 vor allem für die Ergussproben 3892, 3878 und 3879 könnte das Vorhandensein von regulatorischen T-Zellen sein, die neben CD25 den Transkriptionsfaktor FoxP3 exprimieren. Diese Subpopulation von T-Zellen können die Immunantwort gegen die Zielzellen hemmen, indem sie die Aktivierung der T-Zellen direkt über einen Zell-Zellkontakt oder indirekt über die Ausschüttung immunsupprimierender Zytokine (IL-10, TGF-beta) hemmen (Mao C et al. 2008, Gajewski TF et al. 2006). Ein gezielter Nachweis dieser regulatorischen T-Zellen nach ex vivo Therapie im MPE könnte Aufschluss darüber geben ob diese Zellen ein möglicher Grund für die fehlende bzw. geringe lytische Aktivität der T-Zellen sind.

Dass die Anzahl der Effektorzellen im Erguss sowie die zelluläre Beschaffenheit der Zielzellen einen Einfluss auf den Grad der spezifischen Lyse haben, zeigen exemplarisch die Ergussproben 3917 und 3924. Diese Ergussproben bestanden ausschließlich aus Einzelzellen und zeigten bei einem E:T Ratio von 320:1 (3917) und 630:1 (3924) eine spezifischer Lyse der EpCAM-positiven Zellen von 90 % (3917) und 100 % (3924) nach 72h MT110 ex vivo Therapie mit 1000 ng/ml.

In Zukunft gilt es zu klären, ob es individuell für jeden Patienten eine Schwellendosis für die Wirkung des Antikörpers MT110 gibt. Gleichzeitig muss diskutiert werden von welchen Faktoren die Festlegung der Schwellendosis bestimmt sein kann. Hierfür soll die Wirkung von MT110 in Zusammenhang mit der Überwindung von möglichen Tumorescape- (z.B. Ausschüttung immunsuppressiver Zytokine) oder Schutzmechanismen (z.B. Aggregatbildung der Zielzellen) sowie der Aktivierung von anergen Immunzellen und deren Proliferations- und Migrationsverhalten in Abhängigkeit von MT110 diskutiert werden.

4.4 Limitationen für den Einsatz bispezifischer Antikörper

Bei der klinischen Anwendung der bispezifischen Antikörper zeigten z.B. die trifunktionellen bispezifischen Antikörper zum Teil ernst zu nehmende Herz-Kreislauf-Wirkungen, die auf die Freisetzung ungewöhnlich hoher Zytokinmengen bei der Immunzellaktivierung zurückgeführt werden („cytokine release syndrome“). In schweren Fällen resultiert daraus der Sepsis ähnlicher Symptomenkomplex, der als SIRS („systemic inflammatory release syndrome“) bezeichnet wird. Für das Auftreten solcher systemisch-toxischer Nebenwirkungen wurde insbesondere der Fc-Teil kompletter Antikörper verantwortlich gemacht (McCall AM et al. 1999). Zur Vermeidung dieser Effekte wurden bispezifische Antikörper entwickelt, die keinen Fc-Teil besitzen wie z.B. single-chain-Antikörper (Brischwein K et al. 2006, Kufer P et al. 2004, Dreier T et al. 2002). Da es auf Grund des nicht vorhandenen Fc-Teils zu keiner weiteren Aktivierung und Rekrutierung akzessorischer Immunzellen (z.B. Makrophagen) kommt, sollte das Ausmaß der Zytokin-Sekretion und damit das Risiko systemischer Nebenwirkungen niedrig gehalten werden. Trotzdem kommt es auch bei den sogenannten BiTE-Molekülen zu einer gezielten Aktivierung der T-Zellen und einer Freisetzung von Zytokinen (Brischwein K et al. 2006). Blinatumomab (MT103/MEDI-538) ist ein bispezifischer Antikörper der erfolgreich in Phase I und II bei der Therapie des Non-Hodgkin-Lymphoms und bei der akuten lymphatischen Leukämie eingesetzt wird. Blinatumomab kann als klinisches „Proof of Concept“ der bispezifischen Antikörper ohne Fc-Teil gesehen werden. Dieser Antikörper, der sich in einer Phase II-Studie befindet führte in einer Phase I Studie nach kontinuierlicher intravenöser Verabreichung mit $0,06 \text{ mg/m}^2$ pro Tag für 4-8 Wochen bei 7 von 7 Patienten zu einem kompletten bzw. teilweisen Ansprechen des Tumors. Die Remissionen in dieser Dosierungskohorte hielten in allen Patienten an, wobei die am längsten beobachtete Remission länger als ein Jahr andauerte (letzter Stand Juni 2008). Häufigste Nebenwirkungen waren bislang Lymphopenie, Fieber und Leukopenie. Weniger häufig wurden eine transiente Neutropenie und Thrombozytopenie, ein vorübergehender Anstieg der Leberenzymwerte und ZNS-Ereignisse beobachtet, die jedoch alle vollständig reversibel waren (Bargou R et al 2008).

Die intraperitoneale Gabe des trifunktionalen Antikörpers Catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) führte bei Patienten mit Aszites in Folge verschiedener Tumorerkrankungen zu deutlichen Vorteilen gegenüber einer alleinigen Punktion. Die Phase-II/III-Studie umfasste

258 Patienten mit malignem Aszites infolge von epithelialen Tumoren. 129 von ihnen waren an einem Ovarialkarzinom (OC) erkrankt; weitere 129 litten an nicht-ovariellen Karzinomen (nonOC). Das mediane punktionsfreie Überleben nach Catumaxomab-Behandlung betrug 46 Tage, verglichen mit 11 Tagen in der Kontrollgruppe, die lediglich punktiert wurden. Der sekundäre Endpunkt „punktionsfreie Zeit“ betrug in der Catumaxomab-Gruppe 77 Tage im Median gegenüber 13 Tagen im Kontrollarm. Das mediane Gesamtüberleben betrug nach der Behandlung mit Catumaxomab 72 Tage im Vergleich zu 68 Tagen in der Kontrollgruppe. Eine Analyse der Patienten, die die Studie protokollgemäß durchlaufen haben, zeigte eine Verlängerung des medianen Gesamtüberlebens (86 vs. 68 Tage). Häufigste Nebenwirkungen waren Fieber, Übelkeit und Erbrechen. Diese Symptome resultieren aus der Zytokinfreisetzung, die mit der Wirkweise von Catumaxomab verbunden ist. Im Allgemeinen waren die Nebenwirkungen limitiert, gut kontrollierbar und meist reversibel. Vorübergehende Erhöhungen der Leberwerte und der Zahl weißer Blutkörperchen wurden unter Catumaxomab regelmäßig beobachtet, aber selten als klinisch signifikant eingestuft. Der trifunktionelle bispezifische Antikörper Catumaxomab steht kurz vor seiner klinischen Zulassung (Fresenius Biotech, Trion, Journal Onkologie 2008).

In Zukunft muss geklärt werden ob für die Therapie maligner Pleuraergüsse beim Mamma- und Bronchialkarzinom eine intravenöse Therapie oder eine intrapleurale Therapie angestrebt werden soll. Eine wichtige Frage, die sich stellt ist, wie abschätzbar und wie hoch die Nebenwirkungen des bispezifischen Antikörpers MT110 sind, wenn dieser bei der Therapie maligner Pleuraergüsse in die Pleurahöhle verabreicht wird.

4.5 Zusammenfassung

Über die Hälfte aller malignen Pleuraergüsse sind durch solide Tumore des Mamma- und Bronchialkarzinoms bedingt und stellen eine Fernmetastasierung dar. Trotz therapeutischer Maßnahmen wie der Pleurodese mit Talkum ist die Prognose der Patienten schlecht und ihre mittlere Überlebenszeit beträgt nur wenige Monate. Deswegen sind innovative und effiziente Therapiestrategien für die Therapie der Pleurakarzinose dringend notwendig.

In dieser Arbeit wurden maligne Pleuraergüsse (MPE) von Mamma- und Bronchialkarzinompatienten auf zellulärer und molekularer Ebene charakterisiert. Die zelluläre Zusammensetzung der malignen Pleuraergüsse und die Expression prognose-, therapie- und

chemoresistenzassoziiertes Antigen wurden mittels immunhistochemischer Methoden nachgewiesen. Die Charakterisierung der Ergüsse zeigte eine patienten- und tumorbedingte zelluläre und molekulare Heterogenität. Dabei unterschieden sich die malignen Pleuraergüsse bezüglich der Ergussmenge, der aus den Ergüssen isolierten Zellzahl, ihrer zellulären Zusammensetzung, der Beschaffenheit der Pleurakarzinomzellen (Einzelzellen, Aggregate) und ihrer Antigenexpression.

Die Analyse des Hormonrezeptorstatus ergab einen signifikanten Verlust des Östrogen- ($p=0,002$) und Progesteronrezeptors ($p=0,0005$) auf den Pleurakarzinomzellen im Vergleich zum korrespondierenden Primärtumor. Therapierelevante Antigene aber wie z.B. das epitheliale Antigen EpCAM, das Glykoprotein MUC-1 und der Wachstumsfaktorrezeptor EGF-R waren auf mehr als 70 % der MPE beim Mamma- und Bronchialkarzinom vertreten. In dieser Arbeit wurde daraufhin in einer ex vivo Studie die Wirksamkeit des bispezifischen Antikörpers MT110 gegen das Antigen EpCAM und den T-Zellrezeptor CD3 als Therapiestrategie für die Behandlung maligner Pleuraergüsse getestet. Der Anteil der antikörpervermittelnden spezifischen Lyse der EpCAM-positiven Pleurakarzinomzellen wurde mit Hilfe der Durchflußzytometrie (FACS) bestimmt. Die MT110 abhängige Aktivierung der CD4- und CD8-positiven T-Zellen wurde über die Antigene CD25, Granzym B und die Ausschüttung immunmodulierender Zytokine nachgewiesen (FACS). Die ex vivo Therapie der MPE beim Mammakarzinom ergab eine dosisabhängige signifikante spezifische Lyse der Targetzellen nach 48 h und 72 h mit 10 ng/ml und 1000 ng/ml MT110 (48 h, $p = 0,03$; 72 h, $p = 0,016$). Bei einer Behandlungsdauer von 72 h erzielte MT110 in einer Konzentration von 1000 ng/ml eine spezifische Lyse der EpCAM-positiven Zellen von $57 \% \pm 29,5 \%$ (MW \pm stabwn).

Die ex vivo Therapie der MPE beim Bronchialkarzinom führte zu einer durchschnittlichen spezifischen Lyse von $30 \pm 38 \%$, die nicht signifikant war (72h, 1000 ng/ml). Der späte Aktivierungsmarker CD25 war nach 48h und 72h mit 1000 ng/ml MT110 auf den CD4- und CD8-positiven Pleuraergusszellen der Mammakarzinompatienten ($p=0,03$; $p=0,016$) und Bronchialkarzinompatienten (nicht signifikant) verstärkt exprimiert. Der erhöhte Nachweis von TNF- α ($p = 0,016$) und IFN- γ ($p = 0,03$) in den Mediumüberständen der MPE beim Mammakarzinom deutete auf eine TH-1 vermittelte Immunantwort hin.

Die ex vivo Therapie der MPE mit MT110 zeigte, dass das epitheliale Antigen EpCAM ein geeignetes Zielantigen für die molekulare Therapie der Pleurakarzinose darstellt. Der

bispezifische Antikörper MT110 bewirkte eine zielgerichtete spezifische Lyse der Pleurakarzinomzellen durch die Stimulation der autologen Immunzellen im malignen Erguss. Mögliche Einflüsse auf die Höhe der antikörperspezifischen Lyse sind das Vorhandensein von Aggregaten im Erguss, das Verhältnis der Effektor- und Targetzellen, sowie die Stimulierbarkeit der T-Lymphozyten. Die Wirkungsweise des Antikörpers MT110 muss in Zukunft für ein größeres Patientenkollektiv getestet werden. Der Antikörper befindet sich seit April 2008 in einer klinischen Phase I und wird bei Patienten mit EpCAM-positiven, lokal fortgeschrittenen, rezidierten oder metastasierten Karzinomen auf Verträglichkeit und Antitumoraktivität hin untersucht. Zukünftige klinische Studien sind nötig, um die Wirksamkeit von MT110 bei Patientinnen mit MPE beim Mamma- und Bronchialkarzinom zu bestätigen.

5 Literaturverzeichnis

Agostoni E (1972) Mechanics of the pleural space. *Physiol Rev* 52(2): 57-128

Aguiar LM, Antonangelo L, Vargas FS, et al (2008) Malignant and tuberculous pleural effusions: immunophenotypic cellular characterization. *Clinics* 63(5): 637-44

Al-Hajj M (2007) Cancer stem cells and oncology therapeutics. *Curr Opin Oncol* 19:61-64

Amir E, Ooi WA, Simmons C, et al (2008) Discordance between receptor status in primary and metastatic breast cancer: an exploratory study of bone and bone marrow biopsies. *Clin oncol* 20: 763-768

Antony V.B, Loddenkemper R, Astoul P, et al (2001) Management of malignant pleural effusions. *Eur Respir J* 18:402-419

Antony VB (1999) Pathogenesis of malignant pleural effusions and talc pleurodesis. *Pneumologie* 53(10): 493-498

Antony VB (2003) Immunological mechanisms in pleural disease. *Eur Respir J* 21(3): 539-544

Antony VB, Loddenkemper R, Astoul P, et al (2001) Management of malignant pleural effusions. *Eur Respir J* 18: 402-419

Antony VB, Nasreen N, Mohammed KA, et al (2004) Talc pleurodesis: basic fibroblast growth factor mediates pleural fibrosis. *Chest* 126(5):1522-1528.

Antunes G, Neville E, Duffy J, Ali N (2003) BTS guidelines for the management of malignant pleural effusions. *Thorax* 58(Suppl II):ii29-ii38

Astoul P, Viallat JR, Laurent JC, Brandely M, Boutin C (1993) Intrapleural recombinant IL-2 in passive immunotherapy for malignant pleural effusion. *Chest* 103(1): 209-213

Atanackovic D, Block A, De Weerth A, et al (2004) Characterization of effusion-infiltrating T cells: benign versus malignant effusions. *Clin Cancer Res* 10(8): 2600-2608

Athanassiadou P, Gonidi M, Liossi A, et al (2000) Moc-31, fibronectin and CEA in the differential diagnosis of malignant effusions: an immunocytochemical study. *Pathol Oncol Res* 6(2): 100-1003

Auvinen P, Tammi R, Tammi M, Johansson R, Kosma VM (2005) Expression of CD44s, CD44 v3 and CD44 v6 in benign and malignant breast lesions: correlation and colocalization with hyaluronan. *Histopathology* 47(4): 420-428

5. LITERATURVERZEICHNIS

- Baeuerle PA, Gires O (2007) EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer* 96:417-423
- Barber GN (2001) Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ* 8(2): 113-126
- Barbetakis N, Antoniadis T, Tsilikas C (2004) Results of chemical pleurodesis with mitoxantrone in malignant pleural effusion from breast cancer. *World J Surg* 2:16
- Bargou R, Leo E, Zugmaier G, et al (2008) Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T-cell engaging antibody. *Science* 321: 974 977
- Beano A, Signorino E, Evangelista A, Brusa D, Mistrangelo M (2008) Correlation between NK function and response to trastuzumab in metastatic breast cancer patients. *J Transl Med Epub*. Doi: 10.1186/1479-5876-6-25.
- Bennett R, Maskell N (2005) Management of malignant pleural effusions. *Curr Opin Pulm Med* 11(4): 296-300
- Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL (2004) Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432(7015): 332-337
- Blumenthal RD, Hansen HJ, Goldenberg DM (2008) In vitro and in vivo anticancer efficacy of unconjugated humanized anti-CEA monoclonal antibodies. *Br J Cancer* 99(5): 837-838
- Blumenthal RD, Osorio L, Hayes MK, et al (2005) Carcinoembryonic antigen antibody inhibits lung metastasis and augments chemotherapy in a human colonic carcinoma xenograft. *Cancer Immunol Immunother* 54: 315-327
- Bonetti A, Zaninelli M, Leone R, et al (1998) Bcl-2 but not p53 expression is associated with resistance to chemotherapy in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 4(10): 2331-2336
- Brischwein K, Schlereth B, Guller B, et al (2006) MT110: A novel bispecific single-chain antibody construct with high efficacy in eradicating established tumors. *Mol Immunol* 43:1129-1143
- Brown RW, Clark GM, Tandon AK, Allred DC, et al (1993) Multiple-marker immunohistochemical phenotypes distinguishing malignant pleural mesothelioma from pulmonary adenocarcinoma. *Hum Pathol*. 24(4):347-54
- Buo L, Meling GI, Karlsrud TS, Johansen HT, Aasen AO (1995) Antigen levels of urokinase plasminogen activator and its receptor at the tumor-host interface of colorectal adenocarcinomas are related to tumor aggressiveness. *Hum Pathol* 26(10): 1133-1138
- Burges A, Wimberger P, Kümper C, Gorbounova V, Sommer H, Schmalfeldt B (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: 3899-905

5. LITERATURVERZEICHNIS

Cabibi D, Calascibetta A, Martorana A, et al (2007) Different expression of thymidylate synthase in primary tumour and metastatic nodes in breast cancer patients. *Anticancer Res* 27(4B): 2227-2230.

Chang GC, Lan HC, Juang SH, et al (2005) A pilot clinical trial of vaccination with dendritic cells pulsed with autologous tumor cells derived from malignant pleural effusion in patients with late-stage lung carcinoma. *Cancer* 103(4): 763-771

Chaudry MA, Sales K, Ruf P, Lindhofer H, Winslet MC (2007) EpCAM an immunotherapeutic target for gastrointestinal malignancy: current experience and future challenges. *Br J Cancer* 96:1013-1019

Chen H, Brahmer J (2008) Management of malignant pleural effusion. *Curr Oncol Rep* 10(4): 287-293

Chen YM, Yang WK, Whang-Peng J, Kuo BI, Perng RP (1996) Elevation of interleukin-10 levels in malignant pleural effusion. *Chest* 110(2): 433-436

Conaghan P, Ashraf S, Tytherleigh M, et al (2008) Targeted killing of colorectal cancer cell lines by a humanised IgG1 monoclonal antibody that binds to membrane-bound carcinoembryonic antigen. *Br J Cancer* 98(7): 1217-1225

D'Argouges S, Wissing S, Brandl C, et al (2008) Combination of rituximab with blinatumomab (MT103/MEDI-538), a T-cell-engaging CD19-/CD3-bispecific antibody, for highly efficient lysis of human B lymphoma cells. *Leuk Res Epub ahead of print*

Danner DE, Gmelich JT (1975) A comparative study of tumor cells from metastatic carcinoma of the breast in effusions. *Acta Cytol* 19(6):509-518

Davidson B (2004) Malignant effusions: from diagnosis to biology. *Diagn Cytopathol* 31:246-254

Davidson B (2007) Biological characteristics of cancers involving the serosal cavities. *Crit Rev Oncog* 13(3): 189-227

Davidson B, Risberg B, Kristensen G, et al (1999) Detection of cancer in effusions from patients diagnosed with gynaecological malignancies. *Virchows Arch* 435:43-49

Davies HE, Gary Lee YC, O Davies RJ (2008) Pleurodesis for malignant pleural effusion: talc, toxicity and where next? *Thorax* 63: 572-574

Di Costanzo F, Mazzone F, Mela MM, et al (2008) Bevacizumab in non-small cell lung cancer. *Drugs* 68(6): 737-746

Dieterich M, Goodman SN, Rojas-Corona RR, et al (1994) Multivariate analysis of prognostic features in malignant pleural effusions from breast cancer patients. *Acta Cytol* 38:945-952

5. LITERATURVERZEICHNIS

Dittrich C, Schmidt M, Awada A, et al (2007) Highly reduced incidence of new breast cancer metastases during treatment with adecatumumab appears to be the major factor for longer time to tumor progression in patients with high-level EpCAM expression. Annual Meeting of AACR-NCI-EORTC Abstract No. A71

Dowsett M, Dunbier AK (2008) Emerging biomarkers and new understanding of traditional markers in personalized therapy for breast cancer. *Clin Cancer Res* 14(24): 8019-8026

Dreier T, Lorenczewski G, Brandl C, et al (2002) Extremely potent, rapid and costimulation-independent cytotoxic T-cell response against lymphoma cells catalyzed by a single chain bispecific antibody. *Int J Cancer* 100:690-697

Duffy MJ (1990) Plasminogen activators and cancer. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1(6): 681-687

Duffy MJ (2006) Serum tumor markers in breast cancer: are they of clinical value? *Clin Chem* 52(3): 345-351

Duffy MJ, Crown J (2008) A personalized approach to cancer treatment: how biomarkers can help. *Clin Chem* 54(11):1770-9

Dupont VN, Gentien D, Oberkamp M, De Rycke Y, Blin N, et al (2007) A gene expression signature associated with metastatic cells in effusions of breast carcinoma patients. *Int J Cancer* 121: 1036-1046

Ebeling FG, Stieber P, Untch M, et al (2002) Serum CEA and CA 15-3 as prognostic factors in primary breast cancer. *Br J Cancer* 86(8): 1217-1222

Engelmann K (2008) MCF7 side population cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the tumor antigen MUC1. *Cancer Res* 68(7): 2419-2426

Fang WB, Brantley-Sieders DM, Parker MA, Reith AD, Chen J (2005) A kinase-dependent role for EphA2 receptor in promoting tumor growth and metastasis. *Oncogene* 24(53): 7859-7868

Fehm T, Krawczyk N, Solomayer EF, et al (2008) ERalpha-status of disseminated tumour cells in bone marrow of primary breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 10(5): R76

Fentiman IS, Millis R, Sexton S, Hayward JL (1981) Pleural effusion in breast cancer: a review of 105 cases. *Cancer* 47(8) 2087-2092

Fischgräbe J, Wülfing P (2008) Targeted therapies in breast cancer: established drugs and recent developments. *Curr Clin Pharmacol* 3(2): 85-98

Foekens JA, Dall P, Klijn JG, et al (1999) Prognostic value of CD44 variant expression in primary breast cancer. *Int J Cancer* 84(3): 209-215

5. LITERATURVERZEICHNIS

- Foekens JA, Peters HA, Look MP, et al (2000) The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. *Cancer Res* 60(3): 636-43
- Fontanini G, Vignati S, Boldrini L, et al (1997) Vascular endothelial growth factor is associated with neovascularization and influences progression of non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 3(6): 861-5
- Fox SB, Fawcett J, Jackson DG, et al (1994) Normal human tissues, in addition to some tumors, express multiple different CD44 isoforms. *Cancer Res* 54(16): 4539-4546
- Gajewski TF, Meng Y, Harlin H (2006) Immune suppression in the tumor microenvironment. *J Immunother* 29:233-240
- Garcia de Palazzo I, Holmes M, Gercel-Taylor C, Weiner LM (1992) Antitumor effects of a bispecific antibody targeting CA19-9 antigen and CD16. *Cancer Res* 52(20): 5713-5719
- Gasparri R, Leo F, Veronesi G, et al (2006) Video-assisted management of malignant pleural effusion in breast carcinoma. *Cancer* 106(2):271-6
- Gjomarkaj M, Pace E, Melis M, et al (1997) Dendritic cells with a potent accessory activity are present in human exudative malignant pleural effusions. *Eur Respir J* 10(3): 592-597
- Grefte JM, de Wilde PC, Salet-van de Pol MR, et al (2008) Improved identification of malignant cells in serous effusions using a small, robust panel of antibodies on paraffin-embedded cell suspensions. *Acta Cytol* 52(1): 35-44
- Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG (1996) Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med* 184(1): 19-29
- Guidotti LG, Chisari FV (1996) To kill or to cure: options in host defense against viral infection. *Curr Opin Immunol* 8(4): 478-483
- Hamburger AW, White CP, Dunn FE (1985) Cultivation of macrophages derived from human malignant effusions. *Exp Hematol* 13(8): 776-781
- Hammerstrom J (1980) Structure and function of human effusion macrophages from patients with malignant and benign disease. 2. In vitro cytostatic and cytolytic effect on human tumour cell lines. *Acta Pathol Microbiol Scand [C]* 88(4): 201-209
- Hayashi SI, Eguchi H, Tanimoto K, et al (2003) The expression and function of estrogen receptor alpha and beta in human breast cancer and its clinical application. *Endocr Relat Cancer* 10(2): 193-202
- Hayes DF (1994) Tumor markers for breast cancer. Current utilities and future prospects. *Hematol Oncol Clin North Am* 8(3): 485-506
- Heffner JE, Klein JS (2008) Recent advances in the diagnosis and management of malignant pleural effusion. *Mayo Clin Proc* 83(2): 235-250

- Heist RS, Christiani D (2009) EGFR-targeted therapies in lung cancer: predictors of response and toxicity. *Pharmacogenomics* 10(1): 59-68
- Hjelstuen MH, Rasch-Halvorsen K, Bruland O, De L Davies C (1998) Uptake, penetration, and binding of monoclonal antibodies with increasing affinity in human osteosarcoma multicell spheroids. *Anticancer Res* 18(5A): 3153-3161
- Hoffmann P, Hofmeister R, Brischwein K, et al (2005) Serial killing of tumor cells by cytotoxic T cells redirected with a CD19-/CD3-bispecific single-chain antibody construct. *Int J Cancer* 115:98-104
- Horst D, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung A (2008) CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer. *Br J Cancer* 99(8): 1285-1289
- Hugo H, Ackland ML, Blick T, et al (2007) Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol* 213(2): 374-383
- Ireton RC, Chen J (2005) EphA2 receptor tyrosine kinase as a promising target for cancer therapeutics. *Curr Cancer Drug Targets* 5(3): 149-157
- Jäger W, Eibner K, Löffler B, Gleixner S, Krämer S (2000) Serial CEA and CA 15-3 measurements during follow-up of breast cancer patients. *Anticancer Res* 20(6D): 5179-5182
- Jänicke F, Schmitt M, Pache L, et al (1993) Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 24(3): 195-208
- Jantz MA, Antony VB (2008) Pathophysiology of the pleura. *Respiration* 75(2): 121-33
- Jones RL, Salter J, A'hern R, et al (2008) The prognostic significance of Ki67 before and after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* Jul 1
- Kaboth W, Begemann H, *Physiologie des Menschen-Band 5-Blut* (1971), Urban & Schwarzenberg Verlag ISBN: 354105171X
- Kaufmann M, Heider KH, Sinn HP, von Minckwitz G, Ponta H, Herrlich P (1995) CD44 isoforms in prognosis of breast cancer. *Lancet* 346(8973): 502
- Klein CA, Blankenstein TJ, Schmidt-Kittler O, et al (2002) Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet* 360(9334): 683-689
- Kolschmann S, Ballin A, Gillissen A (2005) Clinical efficacy and safety of thoracoscopic talc pleurodesis in malignant pleural effusions. *Chest* 128(3):1431-5
- Kroesen BJ, ter Haar A, Spakman H, et al (1993) Local antitumor treatment in carcinoma patients with bispecific-monoclonal-antibody-redirected T cells. *Cancer Immunol Immunother* 37(6): 400-407

- Kufer P, Lutterbuese R, Baeuerle PA (2004) A revival of bispecific antibodies. *Trends Biotechnol* 22:238-244
- Kurian S, Khan M, Grant M (2008) CA 27-29 in patients with breast cancer with pulmonary fibrosis. *Clin Breast Cancer* 8(6): 538-40
- Kuroki M, Hachimine K, Huang J, et al (2005) Re-targeting of cytotoxic T lymphocytes and/or natural killer cells to CEA-expressing tumor cells with anti-CEA antibody activity. *Anticancer Res* 25(6A): 3725-3732
- Lai-Fook SJ (2004) Pleural mechanics and fluid exchange. *Physiol Rev* 84(2): 385-410
- Langmuir VK, McGann JK, Buchegger F, Sutherland RM (1991) The effect of antigen concentration, antibody valency and size, and tumor architecture on antibody binding in multicell spheroids. *Int J Rad Appl Instrum B* 18(7):753-764
- Lebret SC, Newgreen DF, Thompson EW, Ackland ML (2007) Induction of epithelial to mesenchymal transition in PMC42-LA human breast carcinoma cells by carcinoma-associated fibroblast secreted factors. *Breast Cancer Res* 9(1): 19
- Lee JS, Nam JH, Lee MC, Park CS, Juhng SW (1996) Immunohistochemical panel for distinguishing between carcinoma and reactive mesothelial cells in serous effusions. *Acta Cytol* 40(4): 631-636
- Lee YC, Light RW (2004) Management of malignant pleural effusion. *Respirology* 9(2): 148-156
- Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al (2007) Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 67(3): 1030-1037
- Li Q, Bavikatty N, Michael CW (2006) The role of immunohistochemistry in distinguishing squamous cell carcinoma from mesothelioma and adenocarcinoma in pleural effusion. *Semin Diagn Pathol* 2006 23(1): 15-19
- Lissoni P, Mandala M, Curigliano G et al (2001) Progress report on the palliative therapy of 100 patients with neoplastic effusions by intracavitary low-dose interleukin-2. *Oncology* 60:308-312
- Loddenkemper R (2008) Pleuraerkrankungen. *Pneumologie* 5: 209-210
- Löffler A, Kufer P, Lutterbüse R, et al (2000) A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood* 95(6): 2098-103
- Longatto Filho A, Alves VA, Kanamura CT, et al (2002) Identification of the primary site of metastatic adenocarcinoma in serous effusions. *Acta Cytol* 46:651-658

- Lynch TJ (1993) Management of malignant pleural effusion. *Chest* 103: 385-389
- Mani SA, Guo W, Liao M, et al (2008) The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell* 133(4): 704-715
- Mao C, Wang S, Jiang Q, et al (2008) Increased CD4CD25+FOXP3+ regulatory T cells in cancer patients from conversion of CD4+CD25- T cells through tumor-derived factors. *Onkologie* 31(5): 243-248
- Marchevsky AM, Wick MR (2007) Evidence-based guidelines for the utilization of immunostains in diagnostic pathology: pulmonary adenocarcinoma versus mesothelioma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 15(2): 140-144
- Mattern J, Koomägi R, Volm M. (1997) Coexpression of VEGF and bFGF in human epidermoid lung carcinoma is associated with increased vessel density. *Anticancer Res* 17(3C): 2249-52
- McCall AM, Adams GP, Amoroso AR, et al (1999) Isolation and characterization of an anti-CD16 single-chain Fv fragment and construction of an anti-HER2/neu/anti-CD16 bispecific scFv that triggers CD16-dependent tumor cytotoxicity. *Mol Immunol* 36(7): 433-445
- Michael CW, King JA, Hester RB (1997) Confocal laser scanning microscopy and three-dimensional reconstruction of cell clusters in serous fluids. *Diagn Cytopathol* 17(4): 272-9
- Moldenhauer G, Momburg F, Möller P, Schwartz R, Hämmerling GJ (1987) Epithelium-specific surface glycoprotein of Mr 34,000 is a widely distributed human carcinoma marker. *Br J Cancer* 56(6): 714-721
- Morecki S, Lindhofer H, Yacovlev E, Gelfand Y, Ruf P (2008) Induction of a long-lasting antitumor immunity by concomitant cell therapy with allogeneic lymphocytes and trifunctional bispecific antibody. *Exp Hematol* Epub. Doi: 10.1016/j.exphem.2008.03.005
- Morgan RL, De Young BR, McGaughey VR, et al (1999) MOC-31 aids in the differentiation between adenocarcinoma and reactive mesothelial cells. *Cancer* 87(6): 390-394
- Moulder S, Valkov N, Neuger A, et al (2008) Phase 2 study of gemcitabine and irinotecan in metastatic breast cancer with correlates to determine topoisomerase I localization as a predictor of response. *Cancer* 113(10): 2646-2654
- Münz 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* 23:5748-5758
- Najmunnisa N, Mohammed KA, Brown S, et al (2007) Talc mediates angiostasis in malignant pleural effusions via endostatin induction. *Eur Respir J* 29: 761-769
- Nasreen N, Mohammed KA, Antony VB (2006) Silencing the receptor EphA2 suppresses the growth and haptotaxis of malignant mesothelioma cells. *Cancer* 107(10): 2425-2435

- Neragi-Miandoab S (2006) Malignant pleural effusion, current and evolving approaches for its diagnosis and management. *Lung Cancer*. 54(1):1-9
- Neragi-Miandoab S (2008) Surgical and other invasive approaches to recurrent pleural effusion with malignant etiology. *Support Care Cancer Epub*. Doi: 10.1007/s00520-008-0405-5
- Neubauer H, Gal C, Vogel U, et al (2008) Changes in tumor biological markers during primary systemic chemotherapy (PST). *Anticancer Res* 28(3B): 1797-1804
- Neumann J (2008) *Immunbiologie: eine Einführung*, Springer Lehrbuch, ISBN: 978-3-540-72568-8
- O'Shaughnessy J, Blackwell KL, Burstein A, et al (2008) A randomized study of lapatinib alone or in combination with trastuzumab in heavily pretreated HER2+ metastatic breast cancer progressing on trastuzumab therapy. *J Clin Oncol* 26: abstract 1015
- Oates J, Edwards C (2000) HBME-1, MOC-31, WT1 and calretinin: an assessment of recently described markers for mesothelioma and adenocarcinoma. *Histopathology* 36(4): 341-347
- Oka M, Yoshino S, Hazama S, Shimoda K, Suzuki T (1993) The characterization of peritoneal and pleural exudate cells from malignant effusions. *Surg Today* 23(6): 500-503
- Olabiran Y, Ledermann JA, Marston NJ, et al (1994) The selection of antibodies for targeted therapy of small-cell lung cancer (SCLC) using a human tumour spheroid model to compare the uptake of cluster 1 and cluster w4 antibodies. *Br J Cancer* 69(2): 247-252
- Osta WA, Chen Y, Mikhitarian K, et al (2004) EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res* 64:5818-5824
- Overmoyer B (2008) Options for the treatment of patients with taxane-refractory metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer Suppl* 2: 61-70
- Park BW, Oh JW, Kim JH, et al (2008) Preoperative CA 15-3 and CEA serum levels as predictor for breast cancer outcomes. *Ann Oncol* 19(4): 675-681
- Park D, Karsen R, Axcrone U, Noren T, Sauer T (2007) Expression pattern of adhesion molecules (E-cadherin, alpha-, beta-, gamma-catenin and claudin-7), their influence on survival in primary breast carcinoma, and their corresponding axillary lymph node metastasis. *APMIS* 115(1): 52-65
- Passeboc-Faure K, Li G, Lambert C, et al (2005) Evaluation of a panel of molecular markers for the diagnosis of malignant serous effusions. *Clin Cancer Res* 11: 6862-6867
- Payne RE, Yagüe E, Slade MJ, et al (2009) Measurements of EGFR expression on circulating tumor cells are reproducible over time in metastatic breast cancer patients. *Pharmacogenomics* 10(1): 51-57

- Pedersen H, Br nner N, Francis D, et al (1994) Prognostic impact of urokinase, urokinase receptor, and type 1 plasminogen activator inhibitor in squamous and large cell lung cancer tissue. *Cancer Res* 54(17): 4671-4675
- Pirker R, Szczesna A, von Pawel J, et al (2008) FLEX: A randomized, multicenter, phase III study of cetuximab in combination with cisplatin/vinorelbine (CV) versus CV alone in the first-line treatment of patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 26: abstract 3
- Price BA, Ehya H, Lee JH (1992) Significance of pericellular lacunae in cell blocks of effusions. *Acta Cytol* 36:333-337
- Pu RT, Pang Y, Michael CW (2008) Utility of WT-1, p63, MOC31, mesothelin, and cytokeratin (K903 and CK5/6) immunostains in differentiating adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, and malignant mesothelioma in effusions. *Diagn Cytopathol* 36(1): 20-25
- Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, et al (2007) Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer*. 2007 Jan 1;109(1):25-32
- Rha SY, Yang WI, Gong SJ, et al (2000) Correlation of tissue and blood plasminogen activation system in breast cancer. *Cancer Lett* 150(2): 137-145
- Risberg B, Davidson B, Dong HP, Nesland JM, Berner A (2000) Flow cytometric immunophenotyping of serous effusions and peritoneal washings: comparison with immunocytochemistry and morphological findings. *J Clin Pathol* 53:513-517
- Rodriguez-Panadero F, Antony VB (1997) Pleurodesis: state of the art. *Eur Respir J* 10: 1648-1654
- Rodriguez-Panadero F, Janssen JP, Astoul P (2006) Thoracoscopy: general overview and place in the diagnosis and management of pleural effusion. *Eur Respir J* 28(2): 409-422
- Ruf P, Lindhofer H, et al (2001) Induction of a long-lasting antitumor immunity by a trifunctional bispecific antibody. *Blood* 98:2526-2534
- Rupp U; Schoendorf-Holland E; Eichbaum M; et al (2007) Safety and pharmacokinetics of bivatuzumab mertansine in patients with CD44v6-positive metastatic breast cancer: final results of a phase I study. *Anticancer Drugs* 18: 477-485
- Russell JH, Ley TJ (2002) Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 20: 323-3270
- Sahn SA (1997) Pleural diseases related to metastatic malignancies. *Eur Respir J* 10: 1907-1913
- Sahn SA (2001) Malignant pleural effusions. *Semin Respir Crit Care Med* 22(6): 607-616

5. LITERATURVERZEICHNIS

Schuler M, Hanusch C, Steger GG, et al (2008) First results from a phase Ib study of the anti-EpCAM antibody adecatumumab (MT201) in combination with docetaxel in patients with metastatic breast cancer, Annual Meeting of ESMO, Abstract No. 485p

Schwartz RH (1996) Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J Exp Med* 184(1): 1-8

Sebastian M, Schuette W, Schneller F, et al (2006) Treatment of malignant pleural effusion with the trifunctional antibody catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3): Results of a phase I/II study. *J Clin Oncol* 24: 2548

Sikora JJ, Dworacki GT, Kaczmarek MT, Jenek RE, Zeromski JO (2004) Immunosuppressive mechanisms in the microenvironment of malignant pleural effusions. *Cancer Detect Prev* 28(5): 325-3230

Sikora J, Dworacki G, Zeromski J (1998) Expression of Fas and Fas ligand and apoptosis in tumor-associated lymphocytes and in tumor cells from malignant pleural effusions. *Nat Immun* 16(5-6): 244-255

Simmons C, Miller N, Geddie W, et al (2008) Changes in breast tumor receptor status with time: A prospective study assessing the impact of obtaining confirmatory biopsy at metastatic recurrence on patient management. ASCO 2008 Breast Cancer Symposium, Abstract No. 147

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344(11):783-92

Spizzo G, Went P, Dirnhofner S, et al (2004) High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 86:207-213

Steger V, Mika U, Heikki T, et al (2007) Who gains most? A 10-year experience with 611 thoroscopic talc pleurodeses. *Ann Thorac Surg* 83:1940-1945

Sterman DH, Recio A, Carroll RG, et al (2007) A phase I clinical trial of single-dose intrapleural IFN-beta gene transfer for malignant pleural mesothelioma and metastatic pleural effusions: high rate of antitumor immune responses. *Clin Cancer Res* 13: 4456-4466

Surdacka A, Krawczyk P, Dańko M, Jastrzebska I, Milanowski J, Roliński J (2003) Presence of dendritic cells in malignant pleural effusion: pilot study. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska [Med]* 58(1): 204-210

Tan C, Sedrakyan A, Browne J, et al (2006) The evidence on the effectiveness of management for malignant pleural effusion: a systematic review. *Eur J Cardiothorac Surg* 29(5): 829-838

Thommsom C, Jänicke F, Harbeck N (2003) Clinical relevance of prognostic factors in axillary node-negative breast cancer. *Onkologie* 26: 438-445

- Uchida A, Colot M, Micksche M (1984) Suppression of natural killer cell activity by adherent effusion cells of cancer patients. Suppression of motility, binding capacity and lethal hit of NK cells. *Br J Cancer* 49(1): 17-23
- Uehara M, Kinoshita T, Hojo T, et al (2008) Long-term prognostic study of carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate antigen 15-3 (CA 15-3) in breast cancer. *Int J Clin Oncol* 13(5): 447-451
- Walker-Renard PB, Vaughan LM, Sahn SA (1994) Chemical pleurodesis for malignant pleural effusion. *Ann Intern Med* 120(1): 56-64
- Went P, Lugli A, Meier S, et al (2004) Frequent EpCAM protein expression in human carcinoma. *Hum Pathol* 35:122-128
- Wiley EL, Roenn JV (1990) Metastatic breast carcinoma in pleural fluid. *Acta Cytol* 34: 169-174
- Witthauer J, Schlereth B, Brischwein K, et al (2008) Lysis of cancer cells by autologous T cells in breast cancer pleural effusates treated with anti-EpCAM BiTE antibody MT110. *Breast Cancer Res Treat* 2008 Sep 26
- Wolf E, Hofmeister R, Kufer P, Schlereth B, Baeuerle PA (2005) BITEs: bispecific antibody constructs with unique anti-tumor activity. *Drug Discov Today* 10:1237-1244
- Wykosky J, Debinski W (2008) The EphA2 Receptor and EphrinA1 Ligand in Solid Tumors: Function and Therapeutic Targeting. *Mol Cancer Res* 6(12):1795-1806
- Yamashita H (2008) Current research topics in endocrine therapy for breast cancer. *Int J Clin Oncol* 13(5):380-383
- Yildirim H, Metintas M, Ak G, Metintas S, Erginel S (2008) Predictors of talc pleurodesis outcome in patients with malignant pleural effusions. *Lung Cancer* 62: 129-144
- Yoshida K, Sugiura T, Takifuji, et al (2007) Randomized phase II trial of three intrapleural therapy regimens for the management of malignant pleural effusion in previously untreated non-small cell lung cancer: JCOG 9515. *Lung Cancer* 58(3):362-8
- Yuan JH, Cheng JQ, Jiang LY, et al (2008) Breast cancer resistance protein expression and 5-fluorouracil resistance. *Biomed Environ Sci* 21(4): 290-295

6 Anhang

6.1 Tabellen

Patient	Diagnose PT	Histologie	T	N	M	UICC Stadium	Differenzierung	ER	PgR	Her2/neu
P3736	1/04	Invasiv duktal	T2	N0	M0	Ib	G1	6/12	12/12	negativ
P3745	3/2003	Invasiv duktal	T1	N2	Mx	-	G2	positiv	positiv	negativ
P3766	1994	k.A.	T4	N0	M0	IIb	G2	21	830	negativ
P3815	09/99	k.A.	T4c	N1	M1	IV	G2	12/12	4/12	2+
P3823	5/2002	Invasiv duktal	T1c	N1b	Mx	-	G3	12/12	12/12	2+
P3824	1/2004	Invasiv duktal	T2	N3a	M0	IIIb	G3	negativ	negativ	negativ
P3826	1/88	k.A.	T2	N1 b	M0	IIIa	G3	20	173	negativ
P3834	7/90	Invasiv duktal	T4b	N1b	M0	IIIa	G2	124	51	k.A.
P3841	3/2003	Invasiv duktal	T1c	N1a	M0	IIIa	G2	2 /12	6/12	3+
P3848	3/99	Invasiv lobulär	T4	N1 b	M0	IIIa	G3	positiv	positiv	3+
P3862	12/02	k.A.	T1c	N1a	M1	IV	G2	k.A.	k.A.	negativ
P3866	1/94	Invasiv duktal	T2	N2	M0	IIIb	G2	k.A.	k.A.	k.A.
P3874	7/90	k.A.	T1c	N1b	M0	IIIa	G2	58	10	k.A.
P3882	99	Invasiv duktal	T2	N1	M0	IIIa	G2	4 /12	2 /12	2+
P3888	6/04	Invasiv lobulär	T3	N1	M1	IV	G2	4/12	negativ	1+
P3892	12/04	Invasiv duktal	T2	N0	M0	Ib	G3	negativ	negativ	negativ
P3917	9/2005	k.A.	T4b	N1	M1	IV	G2	12/12	6 /12	negativ
P3924	1998	Invasiv duktal	T3	N1b	M0	IIIa	G 1	3/12	12/12	1+

Tabelle 6.1.1: Klinisch pathologische Daten der Primärtumore der einzelnen Mammakarzinompatienten (n=18)
 (PT=Primärtumor; T=Tumorgöße; N=Nodalstatus; M=Metastasierungsstatus; ER=Östrogenrezeptorstatus;
 PgR=Progesteronrezeptorstatus; k.A.=keine Angaben)

Patient	Diagnose PT	Histologie	T	N	M	Differenzierung
P3878	04/2005	NCSLC	2	k.A.	1	gering differenziert
P3879	04/2003	NCSLC	Plattenepithelkarzinom	k.A.	1	gering differenziert
P3972	12/2005	NCSLC	1	3	1	mäßig differenziert
P4124	7/2007	NCSLC	4	0	1	gering differenziert

Tabelle 6.1.2: Klinisch pathologische Daten der Primärtumore der einzelnen Bronchialkarzinompatienten (n=4) (PT=Primärtumor; NSCLC= Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom; T=Tumorgröße; N=Nodalstatus; M=Metastasierungsstatus; k.A.=keine Angaben)

Patient	Antigenexpression auf Pleuraergusszellen in %				
	KL-1	Caletin	Vimentin	CD45	CD3
P3736	10	10	50	80	75
P3745	70	5	25	20	5
P3766	80	90	25	20	10
P3815	5	3	90	95	85
P3823	60	5	50	55	40
P3824	5	5	5	90	75
P3826	50	5	40	50	40
P3834	25	5	15	75	75
P3841	5	5	20	65	10
P3848	15	10	90	85	65
P3862	75	75	85	5	3
P3866	40	5	55	60	60
P3874	8	5	5	80	45
P3882	3	2	75	90	80
P3888	10	5	80	85	70
P3892	80	5	20	15	10
P3924	1	5	80	65	65

Tabelle 6.1.3: Zelluläre Zusammensetzung der MPE der einzelnen Mammakarzinompatienten (n=17, da nicht ausreichend Zellmaterial für 3917)

Patient	Antigenexpression auf Pleuraergusszellen in %				
	KL-1	Calectinin	Vimentin	CD45	CD3
3878	20	5	5	75	25
3879	95	8	40	5	5
3972	80	1	75	30	15

Tabelle 6.1.4: Zelluläre Zusammensetzung der MPE der einzelnen Bronchialpatienten (n=3, da nicht genug Zellmaterial für 4124)

Patient	Zelluläre Zusammensetzung der Immunzellen in %					
	CD45 ⁺ /CD14 ⁺	CD3 ⁺	CD3 ⁺ /CD4 ⁺	CD3 ⁺ /CD8 ⁺	CD3 ⁺ /CD25 ⁺	CD3 ⁻ CD56 ⁺ /CD16 ⁺
3736	10,5	100	66	25	6	3
3745	4	60	32	23	5	26
3766	41	45	18	30	5	12
3815	1	79	58	21	5	14
3823	15	78	59	15	4	14
3824	1	81	57	24	3	4
3826	3	68	45	23	4	22
3834	9	66	45	19	1	27
3841	53	35	30	10	1,4	12
3848	5	85	63	16	3	0,5
3866	5	82	56	27	1	23
3874	3	91	65	26	7	4
3888	3	93	85	8	1	1,4
3892	10	76	50	27	2	8
3917	n.d.	85	69	17	n.g.	n.g.
3924	4	78	50	27	0,4	3

Tabelle 6.1.5: Zelluläre Zusammensetzung der Immunzellen der MPE der einzelnen Mammakarzinompatienten (n=16, da nicht ausreichend Zellmaterial für 3882, 3862, n.g.=nicht gemessen)

Patient	Zelluläre Zusammensetzung der Immunzellen in %					
	CD45 ⁺ /CD14 ⁺	CD3 ⁺	CD3 ⁺ /CD4 ⁺	CD3 ⁺ /CD8 ⁺	CD3 ⁺ /CD25 ⁺	CD3 ⁻ CD56/CD16 ⁺
3878	5	91	78	13	9	11
3879	4	60	24	38	9	27
3972	8	97	72	31	n.g.	41
4124	2	92	75	16	6	2

Tabelle 6.1.5: Zelluläre Zusammensetzung der Immunzellen der MPE der einzelnen Bronchialkarzinompatienten (n=4) (n.g.=nicht gemessen)

Patient	Antigenexpression der Epithelzellen im MPE beim Mammakarzinom in %																	
	EpCAM	CEA	EphA2	E-Cadh	MUC1	CD44 v6	UPA	UPA-R	PAI-1	ER	PgR	Her2	EGF-R	Ki-67	Bcl2	TopoIa	P-Glyko- protein	BCRP
P3736	0	0	0	0	5	0	0	100	0	0	0	0	50	5	0	0	0	0
P3745	90	0	0	100	60	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	65	75	0
P3766	0	0	0	0	100	90	0	100	5	0	0	0	100	13	0	0	0	0
P3815	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	1	0	0	0	0
P3823	100	100	0	100	15	90	0	70	0	100	0	65	10	50	85	40	15	0
P3824	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	20	0
P3826	100	80	0	100	100	60	0	20	0	100	10	0	0	40	30	0	2	0
P3834	100	100	0	40	100	80	0	80	40	0	0	0	40	0	0	0	0	0
P3841	0	0	0	0	0	0	0	75	60	0	0	0	60	0	0	0	0	0
P3848	20	20	0	20	20	100	0	100	0	0	0	20	100	30	0	0	15	0
P3862	100	5	0	100	100	100	0	50	0	0	0	50	45	85	0	0	0	0
P3866	80	50	0	50	100	0	0	100	0	25	0	80	0	5	0	0	0	0
P3874	70	100	0	0	80	35	0	0	0	10	0	0	0	5	0	0	0	0
P3882	0	0	0	10	10	0	0	100	0	0	0	0	100	7	0	0	0	0
P3888	100	80	0	65	95	20	0	0	45	0	0	35	50	5	0	0	0	0
P3892	100	5	40	85	90	40	40	65	0	0	0	35	90	65	0	0	0	30
P3924	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0

Tabelle 6.1.6: Antigen-Charakterisierung der Epithelzellen der einzelnen malignen Ergüsse der Mammakarzinompatienten (n=17, da nicht genug Zellmaterial für 3917)

Patient	Antigenexpression der Epithelzellen im MPE beim Bronchialkarzinom in %																	
	EpCAM	CEA	EphA2	E-Cadh	MUC1	CD44 v6	UPA	UPA-R	PAI-1	ER	PgR	Her2	EGF-R	Ki-67	Bcl2	TopoIa	P-Glyko-protein	BCRP
3878	100	100	50	50	50	35	20	0	20	0	0	0	75	15	0	0	0	0
3879	95	30	0	80	90	25	0	70	0	0	0	0	100	80	0	70	0	0
3972	100	65	90	10	100	80	0	100	0	0	0	0	90	45	0	0	75	0

Tabelle 6.1.7: Antigen-Charakterisierung der Epithelzellen der einzelnen malignen Ergüsse der Bronchialkarzinompatienten (n=3, da nicht genug Zellmaterial für 4124

6.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
7-AAD	7-Aminoactinomycin
A	Antikörpertherapie
Abb.	Abbildung
ADCC	<i>Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity</i>
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäuren
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AT	aktivierte T-Lymphozyten
bcl-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>
Bd	Bindungen
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
BiTE	<i>bispecific T-cell Engager</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Chemotherapie
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDC	<i>Complement-Dependent Cytotoxicity</i>
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CK	Cytokeratin
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Effektor
E _T	endokrine Therapie
E:T Ratio	Effektor zu Target Ratio
E-Cadherin	endotheliales Cadherin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EGP-2	<i>Epithelial-Glycoprotein-2</i>

EpCAM	<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i>
ER	<i>Estrogen Receptor</i> Östrogenrezeptor
et al.	und andere
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> Durchflußzytometrie
Fc-Rezeptor	<i>Fragment crystallizable Receptor</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FGF	<i>Fibroblast Growth Faktor</i>
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridisation</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
ggf	gegebenenfalls
h	Stunde(n)
HER	<i>Human EGFR-related gene</i>
i.v.	intravenous
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IL	Interleukin
IU	<i>International Units</i>
K	Kontrolle
k.A.	keine Angabe
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	molar
Mec	Mecoprop
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minute
MK	Mediumkontrolle
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MPE	maligner Pleuraerguss maligne Pleuraergüsse
n.g.	nicht gemessen
n.s.	nicht signifikant

NCSLC	<i>Non Cell Small Lung Cancer</i>
ng	Nanogramm
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NK Zellen	<i>Natural Killer Zellen</i> Natürliche Killerzellen
NOD/SCID	<i>Non-Obese Diabetic/ Severe immunodeficient mice</i>
OP	Operation
Ok-432	Streptococcus pyogenes, hitzeinaktiviert
P	Pleurodese mit Talkum
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor
PBMCs	<i>Peripher Blood Mononuclear Cells</i> periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PDGF	<i>Plateleted Derived Growth Factor</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
pER-DHFR	Plasmid Dihydrofolate Reductase
pg	Picogramm
PgR	<i>Progesterone Receptor</i> Progesteronrezeptor
PT	Primärtumor
R	Radiotherapie
RAT	<i>redirected activated T-Lymphocytes</i>
RNA	<i>Ribonucleid acid</i>
RT	Raumtemperatur
SB	Streubreite
scFvs	<i>single chain variable fragments</i>
stabwn	Standardabweichung
T	Target
Tab.	Tabelle
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Facto- alpha</i>
TT	tumorbedingter Tod
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
UPA	Urokinase Plasminogen Aktivator

UPA-R	Urokinase Plasminogen Aktivator-Rezeptor
VEGF-R	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
w/v	Gewicht pro Volumenanteil
ZNS	Zentralnervensystem
α EpCAM	anti humanes Epitheliales Antigen

6.3 Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1.4:	Ausgewählte Antigene für die Charakterisierung der Pleurakarzinomzellen
Tabelle 2.2.6:	Ausgewählte Zelllinien als Positivkontrollen für den Antigennachweis
Tabelle 2.2.8:	Antikörper für die ex vivo Therapie der malignen Pleuraergüsse
Tabelle 1:	Klinisch-pathologische Charakterisierung des Primärtumors und Tumorprogression beim Mammakarzinom
Tabelle 2:	Hormonrezeptor- und Her2/neu-Status des Primärtumors, der zeitlich nachfolgenden Rezidive und der Epithelzellen in malignen Pleuraerguss beim Mammakarzinom
Tabelle 3:	Therapieverfahren nach Diagnose des Primärtumors bis zum malignen Pleuraerguss beim Mammakarzinom
Tabelle 4:	Klinisch-pathologische Charakterisierung des Primärtumors und Tumorprogression beim Bronchialkarzinom
Tabelle 5:	Therapieverfahren nach Diagnose des Primärtumors bis zum malignen Pleuraerguss beim Bronchialkarzinom
Tabelle 6:	Zytomorphologie der malignen Pleuraergüsse beim Mammakarzinom
Tabelle 7:	Zytomorphologie der malignen Pleuraergüsse beim Bronchialkarzinom
Tabelle 8:	Zytomorphologie der benignen Pleuraergüsse
Tabelle 9:	Zelluläre Charakterisierung der malignen Pleuraergüsse
Tabelle 10:	Charakterisierung des Immunzellstatus der malignen Pleuraergüsse

Tabelle 11:	Molekulare Charakterisierung der malignen Pleuraergüsse beim Mammakarzinom
Tabelle 12:	Molekulare Charakterisierung der malignen Pleuraergüsse beim Bronchialkarzinom
Tabelle 13:	Vitalität der Gesamtheit der Pleuraergusszellen beim Mammakarzinom
Tabelle 14:	Bestimmung des E:T Ratios der MPE beim Mammakarzinom
Tabelle 15:	Spezifische Lyse der Targetzellen der MPE beim Mammakarzinom nach ex vivo Therapie mit MT110
Tabelle 16:	Proliferationsaktivität der EpCAM+ Zellen der MPE beim Mammakarzinom in der Mediumkontrolle
Tabelle 17:	Bestimmung des E:T Ratios der MPE beim Bronchialkarzinom
Tabelle 18:	Spezifische Lyse der Targetzellen der MPE beim Bronchialkarzinom nach ex vivo Therapie mit MT110
Tabelle 19:	Proliferationsaktivität der EpCAM+ Zellen der MPE beim Bronchialkarzinom in der Mediumkontrolle
Tabelle 20:	MT110-abhängige Aktivierung der T-Zellen im MPE beim Mammakarzinom
Tabelle 21:	MT110-abhängige Aktivierung der T-Zellen im MPE beim Bronchialkarzinom
Tabelle 22:	Zytokinbestimmung im Überstand nach ex vivo Therapie der MPE beim Mammakarzinom mit MT110
Abbildung 2.2.8.3:	Prinzip des Toxilight-Assays
Abbildung 2.2.8.4:	Prinzip des Caspase Glo-Assays
Abbildung 1:	Zusammenfassende Darstellung der Zytomorphologie der benignen und malignen Pleuraergüsse beim Mamma- und Bronchialkarzinom
Abbildung 2:	Kluster und Sphäroide im malignen Pleuraerguss
Abbildung 3:	Lichtmikroskopische Aufnahmen der zellulären Charakterisierung des malignen Pleuraergusses 3736 beim Mammakarzinom
Abbildung 4:	Vergleichende Charakterisierung des Hormonrezeptor- und Her2/neu-Status zwischen Primärtumor und malignem Pleuraerguss beim Mammakarzinom

- Abbildung 5: Ex vivo Therapie der imitierten Pleuraergüsse mit MT110
- Abbildung 6: Ex vivo Therapie der imitierten Pleuraergüsse mit MT110
- Abbildung 7: Ex vivo Therapie des malignen Pleuraergusses 3826
- Abbildung 8: Ex vivo Therapie des malignen Pleuraergusses 3823
- Abbildung 9: Ex vivo Therapie des malignen Pleuraergusses 3874
- Abbildung 10: Ex vivo Therapie des malignen Pleuraergusses 3888
- Abbildung 11: MT110 abhängige Opsonierung der Targetzellen für den MPE beim Mammakarzinom 3888
- Abbildung 12: Spezifische Lyse der Targetzellen der MPE beim Mammakarzinom nach ex vivo Therapie mit MT110 (Mittelwerte)
- Abbildung 13: Spezifische Lyse der Targetzellen der MPE beim Mammakarzinom nach ex vivo Therapie mit MT110 (individuelle Werte)
- Abbildung 14: Spezifische Lyse der Targetzellen der MPE beim Bronchialkarzinom nach ex vivo Therapie mit MT110 (Mittelwerte)
- Abbildung 15: Spezifische Lyse der Targetzellen der MPE beim Bronchialkarzinom nach ex vivo Therapie mit MT110 (Einzelwerte)
- Abbildung 16: Größenzunahmen der Leukozyten nach MTT10 ex vivo Therapie
- Abbildung 17: Ex vivo Therapie von EpCAM-negativen MPE mit MT110
- Abbildung 18: MT110-abhängige Stimulation der T-Zellen der MPE beim Mammakarzinom (Mittelwerte)
- Abbildung 19: MT110-abhängige Stimulation der T-Zellen der MPE beim Mammakarzinom (Einzelwerte)
- Abbildung 20: Gegenüberstellung des E:T Ratios, des Aktivierungsstatus der T-Zellen und der spezifischen Lyse der MPE beim Mammakarzinom nach MT110 ex vivo Therapie
- Abbildung 21: MT110-abhängige Stimulation der T-Zellen der MPE beim Bronchialkarzinom (Mittelwerte)
- Abbildung 22: MT110-abhängige Stimulation der T-Zellen der MPE beim Bronchialkarzinom (Einzelwerte)

Abbildung 23: Gegenüberstellung des E:T Ratios, des Aktivierungsstatus der T-Zellen und der spezifischen Lyse der MPE beim Bronchialkarzinom nach MT110 ex vivo Therapie

6.4 Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

Name: Juliane Witthauer

Wohnort: Ortlindestrasse 6
81927 München

Geburtsdatum: 12. Juni 1978

Geburtsort: 83684 Tegernsee

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Studium

02/2008-12/2008 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Klinikum Großhadern in München (AG Regeneration und adulte Stammzellen, Prof. Dr. C. Heeschen)

01/2004-12/2007 Naturwissenschaftliche Doktorandin am Klinikum Großhadern in München (AG Metastasierung, PD Dr. B. Mayer)

seit 01/2004 Promotionsstudiengang an der LMU München

01/2003 bis 06/2003 Diplomhauptprüfung (Abschlussnote: 1,2)

04/2002 bis 01/2003 Diplomandin in der Chirurgischen Klinik Innenstadt in München (AG Tissue Tec, Dr. Peter Neth)

11/1997 bis 06/2003 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München

Schulbildung

09/1988 bis 06/1997 Gymnasium Tegernsee (Abschlußnote 2,1)

09/1984 bis 07/1988 Volksschule in Gmund am Tegernsee

6.5 Publikationsliste

Neth P, Witthauer J, Ciccarella M, Geißler C, Rößner B, Gülkan H, Schieker M, Mutschler W, Jochum M; Molecular Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells and Human Osteoblasts by Microarray Analysis; Symposium "From Stem Cells to Therapy"; Keystone, Colorado, USA, March 29 - April 3, 2003 (Poster).

Witthauer J, Ciccaralla M, Hölters J, Geißler C, Roeßner B, Guelkan H, Schieker M, Mutschler W, Jochum M, Neth P; Stem cell differentiation: molecular characterization of human mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation process using microarray analysis; 20th Winter School on Proteinases and Their Inhibitors - Recent Developments; Tiers, France, March 5 - 9, 2003 (Lecture).

Witthauer J, Funke I, Paasche V, Jauch KW, Mayer B; The multicellular breast cancer spheroid model, but not the common monolayer cultures, represents a valid test system for new anti-cancer strategies; Breast Cancer Research and Treatment (Suppl.) 88, 2004 (Poster).

Witthauer J, Mayer B, Ditsch N, Engel J, K.-W. Jauch, Funke I; Individualisierte molekulare Therapie der Pleurakarzinose beim Mammakarzinom; Senolo 3: 150, 2006 (Lecture).

Witthauer J, Mayer B, Ditsch N, Engel J, K.-W. Jauch, Funke I. Individualisierte molekulare Therapie der Pleurakarzinose beim Mammakarzinom, Plastische Chirurgie (Suppl.), 2006 (Poster).

Witthauer J, Ditsch N, Engel J, K.-W. Jauch, Funke I, Mayer B; Individualized targeted therapy of metastatic breast cancer patients with malignant pleural effusion, Breast Cancer Research and Treatment (Suppl.), 1, 2006 (Poster).

Maria-Theresa Mueller, Patrick C. Hermann, Stephan Huber, Simon F. Leicht, Juliane Witthauer, Mona Mustafa, Peter Bartenstein, Frank Berger, Joachim W. Ellwart, Jan G. D'Haese, Michael H. Schoenberg, Tanja Herrler, Christopher Heeschen; Combined targeted treatment to eliminate tumorigenic cancer stem cells in human pancreatic cancer, Cell Stem Cell (paper submitted).

Witthauer J, Schlereth B, Brischwein K, Winter H, Funke I, Jauch K.-W., Baeuerle P, Mayer B; Lysis of cancer cells by autologous T Cells in breast cancer pleural effusates treated with anti-EpCAM BiTE antibody MT110. 12, Chirurgische Forschungstage, Freiburg i. Breisgau, September 25 – 27, 2008 (Poster); Langenbeck's Archives of Surgery, Volume 393, Number 5, 2008.

Witthauer J, Schlereth B, Brischwein K, Winter H, Funke I, Jauch K.-W., Baeuerle P, Mayer B; Lysis of cancer cells by autologous T Cells in breast cancer pleural effusates treated with anti-EpCAM BiTE antibody MT110, Breast Cancer Research and Treatment, September 2008 (DOI 10.1007/s10549-008-0185-0)

6.6 Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. K.-W. Jauch und Frau PD Dr. B. Mayer, die mir ermöglicht haben in der experimentellen klinischen Forschung Chirurgie auf dem spannenden Gebiet der Onkologie zu forschen und meine Promotion abzuschließen.

Des Weiteren danke ich Frau PD Dr. B. Mayer für Ihre Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Dr. B. Schlereth und Herrn Dr. K. Brischwein der Firma Micromet möchte ich für Ihre Mitbetreuung dieser Arbeit und regelmäßige fachliche Unterstützung danken.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. C. Heeschen, der mir ermöglichte in seiner Arbeitsgruppe zu arbeiten und an seiner Forschung teilzuhaben. Außerdem danke ich ihm für sein offenes Ohr und seinen geschätzten Rat.

Herrn Prof. Dr. P. Baeuerle der Firma Micromet danke ich für seine fachliche Unterstützung.

Meinen lieben ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe „Metastasierung“ und den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Regeneration und adulte Stammzellen“ möchte ich ganz herzlich für die bereichernde gemeinsame Zeit und Ihre Unterstützung in jeder Hinsicht danken. Ich wünsche allen auf ihrem weiteren Weg viel Glück und Erfolg!

Mein letzter Dank gilt meinen Eltern. Ich danke Ihnen für Ihren unerschütterlichen Glauben an meine Fähigkeiten und Ihre liebevolle Unterstützung.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig angefertigt habe und mich außer den angegebenen Hilfsmitteln keiner weiteren Hilfsmittel bedient habe. Des Weiteren habe ich alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen wurden, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen.

München,

Datum

Unterschrift