

Aus dem Pathologischen Institut
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. H.K. Müller-Hermelink

**Immunhistochemische und
zellbiologische Analyse
humaner monoklonaler Antikörper
gegen kolorektale Karzinome**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Judith Lorenz
aus Fulda

Würzburg, Juni 2004

Referent: Professor Dr. rer. nat. Dr. med. H.P. Vollmers

Korreferent: Professor Dr. med. H.K. Müller-Hermelink

Dekan: Professor Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 21.01.2005

Die Promovendin ist Ärztin

meinen Eltern, Ulrich und Christian

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das kolorektale Karzinom	1
1.2	Monoklonale Antikörper	6
1.3	Ziel der Arbeit	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Material	12
2.1.1	Puffer, Lösungen und Medien	12
2.1.2	Chemikalien und Antikörper	13
2.1.3	Humane monoklonale Antikörper	14
2.1.4	Zelllinien	15
2.1.5	Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte	15
2.1.6	Soft- und Hardware	16
2.2	Methoden der Immunhistochemie	17
2.2.1	Herstellung von Gefrierschnitten	17
2.2.2	Ficoll-Gradient und Präparation von Zytospins	17
2.2.3	Immunperoxidasefärbung von Kryoschnitten und Zytospins	18
2.3	Methoden der Zellbiologie	20
2.3.1	Zellkultur	20
2.3.2	Proliferationstest (MTT-Assay)	20
2.3.3	Cell Death Detection ELISA ^{PLUS} (Roche, Mannheim)	21

3 Ergebnisse	23
3.1 Immunperoxidasefärbung	23
3.1.1 Kolorektale Karzinome	24
3.1.2 Normalgewebe	28
3.1.3 Fetale Gewebe	34
3.1.4 Tumorgewebe	35
3.2 Proliferationstest (MTT-Assay)	39
3.3 Cell Death Detection ELISA ^{PLUS} (Roche, Mannheim)	42
4 Diskussion	45
5 Zusammenfassung	58
6 Literaturverzeichnis	59
7 Abkürzungsverzeichnis	75
Danksagung	
Lebenslauf	

1 Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

Kolorektale Karzinome sind maligne Tumoren des Darmepithels, die mit einer hohen Morbidität und Mortalität assoziiert sind (Truninger et al., 2000).

Mit einer jährlichen Zahl neuer Erkrankungsfälle von 30 bis 40 pro 100000 Einwohner gehören sie in Deutschland zu den häufigsten malignen Neoplasien (Bokemeyer et al., 1997). In den Vereinigten Staaten stellten kolorektale Karzinome 1996 trotz sinkender Inzidenzraten seit Mitte der achtziger Jahre (Troisi et al., 1999) mit einer Inzidenz von 42,7 und einer Mortalität von 16,8 pro 100000 Einwohner (Garfinkel et al., 1999) die zweithäufigste Krebstodesursache dar (Markowitz et al., 1999).

Der Altersgipfel der Erkrankung liegt zwischen dem 6. und 7. Lebensjahrzehnt, so daß Personen unter 40 Jahren oder Kinder nur sehr selten betroffen sind (Fante et al., 1997). Inzidenz und Mortalität zeigen keine wesentlichen geschlechtsspezifischen Unterschiede (Parkin et al., 1999).

Obwohl die Ätiologie kolorektaler Karzinome noch weitgehend ungeklärt ist, geht man davon aus, daß multiple Ursachen zur Karzinogenese beitragen. Außer einer genetischen Prädisposition (familiäre adenomatöse Polypose, FAP; hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom, HNPCC; s.u.) und der Assoziation mit kolorektalen Adenomen (Emmrich et al., 1999) zählen hohes Alter sowie eine an Fett und tierischen Produkten reiche Ernährung zu den wichtigsten Risikofaktoren (Held-Warmkessel, 1998; Wilmink, 1997).

Die sog. Adenom-Karzinom-Sequenz gilt als die wahrscheinlichste Pathogenese kolorektaler Karzinome (Kronborg, 2000). Sie postuliert, daß sich bösartige Tumoren aus Adenomen, primär gutartigen epithelialen Veränderungen entwickeln, die jedoch aufgrund ihres malignen Entartungspotentials als präkanzeröse Läsionen eingestuft werden müssen (Cummings, 2000; Scheiden et al., 2000; Wehrmann et al., 2000).

Fakten, welche die Hypothese der Adenom-Karzinom-Sequenz stützen, sind unter anderem das häufig gemeinsame Auftreten von Adenomen und Karzinomen in gleichen Darmabschnitten (Scheiden et al., 2000) sowie der Nachweis benigner Adenomreste in invasiven Karzinomen (Bedenne et al., 1992).

Auch auf molekulargenetischer Ebene läßt sich der Weg vom Adenom zum Karzinom nachvollziehen. Es handelt sich um einen Vielstufenprozeß, der bei den hereditären und sporadischen Karzinomformen in ähnlicher Weise abläuft. Hierbei ist weniger die genaue Reihenfolge der Verluste oder Mutationen von Genen, welche Zellteilung, Apoptose und DNA-Reparatur kontrollieren (Rafter et al., 1998), entscheidend, vielmehr führen kumulative Alterationen zur Entstehung eines malignen Tumors (Cho et al., 1992; Stern et al., 1998; Vogelstein et al., 1988).

Etwa 7 % aller kolorektalen Karzinome sind auf hereditäre Syndrome zurückzuführen (Pistorius et al., 2000). Die autosomal-dominant vererbte familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), der eine Mutation des APC (adenomatous polyposis coli) - Gens zugrunde liegt (van der Luijt et al., 2000; Stern et al., 1998), gilt als obligate Präkanzerose. Bei dieser seltenen Erkrankung entwickeln Anlageträger multiple kolorektale Adenome (Bodmer et al., 1987), die, sofern nicht rechtzeitig eine prophylaktische Proktokolektomie erfolgt (Pistorius et al., 2000), nach dem zwanzigsten Lebensjahr zu invasiv wachsenden Karzinomen entarten (Stern et al., 1998). Personen mit auffälliger Familienanamnese sollten daher endoskopisch überwacht werden (Stern et al., 1998), damit bei der Diagnose polypöser Veränderungen der Darmschleimhaut frühestmöglich operativ interveniert werden kann.

Den ebenfalls autosomal-dominant vererbten hereditären nichtpolypösen kolorektalen Karzinomen (HNPCC) liegt der Ausfall wichtiger DNA-mismatch-repair-Enzyme zugrunde (Stern et al., 1998). Da die HNPCC im Gegensatz zur FAP nicht durch eine ausgeprägte Kolonadenomatose gekennzeichnet ist, hat die Koloskopie nur eine vergleichsweise geringe Bedeutung bei der Krebsvorsorge (Stern et al., 1998). Stattdessen sind eine sorgfältige Familienanamnese und gegebenenfalls molekulargenetische Analysen geeignet, um Anlageträger zu identifizieren (Pistorius et al., 2000; Stern et al., 1998).

Auch Patienten, die unter einer idiopathischen chronisch-entzündlichen Darmerkrankung wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa leiden, entwickeln häufiger als die Normalbevölkerung kolorektale Karzinome (Gillen et al., 1994; Mellemkjaer et al., 1995). Hierbei bestimmen neben dem Manifestationsalter sowohl die Dauer als auch die flächenmäßige Ausdehnung der Erkrankung das Risiko (von Herbay et al., 1999; Herfarth et al., 1998). Durch regelmäßige Koloskopien mit Biopsieentnahmen können dysplastische Epithelveränderungen rechtzeitig erkannt werden (von Herbay et al., 1999).

Etwa 60 % aller kolorektalen Karzinome befinden sich im Rektum, 20 % im Colon sigmoideum, 10 % im Caecum und Colon ascendens und 10 % im übrigen Kolon. Insgesamt wird seit einigen Jahren jedoch eine zunehmende Rechtsverschiebung der Tumorlokalisation beobachtet, d.h. Karzinome des rechten Kolons treten häufiger, die des linken seltener auf (Obrand et al., 1998).

Makroskopisch lassen sich plaqueartige, polypöse (Levine et al., 2000), schüsselförmig ulzerierende und diffus infiltrierende Läsionen unterscheiden.

Die WHO-Klassifikation unterscheidet histologisch acht verschiedene Typen kolorektaler Karzinome: vom Adenokarzinom, dem die Mehrzahl der Tumoren zuzuordnen sind (Held-Warmkessel, 1998), werden muzinöse Adenokarzinome, Siegelringzellkarzinome, kleinzellige, squamöse, adenosquamöse, medulläre sowie undifferenzierte Karzinome abgegrenzt.

Das Staging der Tumoren erfolgt meist mit Hilfe der TNM-Klassifikation oder der modifizierten Klassifikation nach Dukes von 1932. Beide Einteilungen beschreiben die Ausdehnung des Primärtumors auf die Darmwand sowie den Lymphknotenstatus und das Ausmaß der Fernmetastasierung.

Von besonderer prognostischer Bedeutung sind neben der TNM-Einstufung (Borner et al., 1998) zusätzlich der Differenzierungsgrad (Grading) der Neoplasie (Hermanek, 1998) und der Nachweis mikro- oder makroskopisch residuellen Tumorgewebes nach Resektion (R-Klassifikation) (Meyer, 1997).

Das Ausmaß der Metastasierung kolorektaler Karzinome steigt mit dem T- und N-Stadium des Tumors sowie dem Grad der Entdifferenzierung im histologischen Präparat (Okabe

et al., 1998). Ab dem Durchbruch der Lamina muscularis mucosae und Infiltration der Submukosa ist mit ersten Lymphknotenmetastasen zu rechnen (Mitooka, 2000).

Die hämatogene Streuung erfolgt aufgrund des sog. first-pass-Effekts bevorzugt über die Pfortader in die Leber (Mizuno et al., 1998). Danach werden Lunge, Skelett, Gehirn und weitere Organe des großen Kreislaufs befallen (Horton et al., 2000; Mezger et al., 1997).

Kolorektale Karzinome können lange Zeit klinisch stumm bleiben oder uncharakteristische Symptome verursachen. Die Befunde reichen von einer Verschlechterung des Allgemeinzustandes über Veränderungen der Stuhlgewohnheiten bis hin zu Bauchschmerzen, Erbrechen und rektalen Blutabgängen (Colecchia et al., 1999; Mezger et al., 1997; Sanner et al., 1997). Einige Tumoren fallen erst durch eine Eisenmangelanämie aufgrund okkultur Blutverluste auf (Colecchia et al., 1999; Ho et al., 1998). Als schwere Tumorkomplikationen treten chronische Blutungen (Ho et al., 1998), Ileus (Maurer et al., 1998) oder Perforationen mit nachfolgender Peritonitis auf (Chen et al., 2000; Iarumov et al., 1999).

Da sich kolorektale Karzinome in der Mehrzahl der Fälle aus prämaligen adenomatösen Vorläuferläsionen entwickeln, kann die frühe Diagnose und systematische Entfernung dieser Polypen entscheidend zur Verringerung von Inzidenz und Mortalität sowie zur Verbesserung der Prognose der Tumorerkrankung beitragen (Declan Fleming, 1998; Held-Warmkessel, 1998; Mueller et al., 1999; Truninger et al., 2000). Als Screeningoptionen stehen die digital-rektale Untersuchung, der Test auf okkultes Blut im Stuhl (Held-Warmkessel, 1998) sowie endoskopische (Declan Fleming, 1998; Truninger et al., 2000) und röntgenologische Verfahren (Levine et al., 2000) zur Auswahl.

Die endoskopische Polypektomie ist die Methode der Wahl zur Entfernung adenomatöser Läsionen der Darmmukosa und damit ein effektives Mittel zur Prävention kolorektaler Karzinome (Markowitz et al., 1999; Porschen et al., 1998; Wehrmann et al., 2000).

Die chirurgische Standardtherapie manifester Karzinome umfaßt die radikale Resektion des Primärtumors und des entsprechenden Lymphabflußgebietes verbunden mit der radi-

kulären Ligatur der Gefäße (Meyer, 1997). Ein Großteil der Patienten kann in kurativer Absicht (R0-Resektion) behandelt werden (Weitz et al., 1998).

Palliative Vorgehensweisen, die zum Einsatz kommen, wenn eine kurative Resektion nicht mehr möglich ist (bei ausgedehnter Fernmetastasierung, schlechtem Allgemeinzustand oder lokaler Inoperabilität), dienen der Beseitigung von Symptomen und der Verhinderung von Komplikationen. Durch Laserevaporisation (De Palma et al., 1996), Kryochirurgie (Meijer et al., 1999) oder endoskopische Stentimplantation (Desroches et al., 1999; Law et al., 2000) kann die Tumormasse reduziert bzw. eine behinderte Darmpassage wiederhergestellt werden.

Während beim Kolonkarzinom die Strahlentherapie abgesehen von der palliativen Behandlung metastasierter Tumoren praktisch keine Bedeutung hat (Macdonald, 1999), kann zusätzlich zur Resektion der mit einem relativ hohen Rezidivrisiko behafteten rektalen Karzinome prä- oder postoperativ eine Radio- bzw. Radiochemotherapie durchgeführt werden, wodurch die rezidivfreie Zeitspanne verlängert wird (Borner et al., 1998).

Unter den adjuvanten Therapieansätzen, die das Ziel haben, postoperativ das Auftreten von Metastasen zu verhindern, spielt insbesondere die Chemotherapie mit 5-Fluorouracil (5-FU) in Kombination mit Leucovorin[®] (Folinsäure), Levamisol oder Methotrexat (Bokemeyer et al., 1997; Macdonald, 1999) eine wichtige Rolle in der Behandlung lokal fortgeschrittener Tumoren.

Daneben rücken auch immer mehr immuntherapeutische Strategien in den Mittelpunkt des Interesses. So konnten Riethmüller et al. 1998 nachweisen, daß nach der Behandlung mit dem murinen monoklonalen Antikörper 17-1A (Edrecolomab, Panorex[®]), der gegen das sowohl auf normalen als auch auf entarteten Zellen exprimierte epitheliale Glykoprotein 40 (Ep-CAM) gerichtet ist (Litvinov et al., 1994), bei Patienten mit reseziertem kolorektalem Karzinom (Dukes C) eine Abnahme der Mortalität um 32 % und der Rezidivrate um 23 % zu verzeichnen war. Der Vertrieb dieses seit 1994 in Deutschland zur postoperativen adjuvanten Therapie des kolorektalen Karzinoms im Stadium Dukes C zugelassenen Antikörpers mußte jedoch im August 2000 eingestellt werden, da sich die Monotherapie mit Panorex[®] in einer internationalen Phase-III-Studie an mehreren tausend Patienten der Standardchemotherapie mit 5-FU/Folinsäure klinisch unterlegen gezeigt hatte (Pressemitteilung Glaxo Wellcome/Centocor, 2000).

1.2 Monoklonale Antikörper

Da der Kampf gegen bösartige Tumoren mit chemo- oder radiotherapeutischen Ansätzen nur um den Preis toxischer Schädigungen des Patienten erkaufte werden kann (Maloney et al., 1997), werden heute große Hoffnungen in die nebenwirkungsärmeren immuntherapeutischen Strategien gesetzt. Neben der aktiven Immuntherapie, deren Ziel es ist, die Immunantwort des Patienten spezifisch mit Vakzinen (Velders et al., 1998) oder unspezifisch - z.B. mit Zytokinen (Lode et al., 2000) - zu stimulieren, konnten passive immuntherapeutische Verfahren, insbesondere der Einsatz monoklonaler Antikörper, wichtige Erfolge in der Krebstherapie erzielen.

Bereits 1900 formulierte Paul Ehrlich die Idee, das Immunsystem des Menschen zur spezifischen antineoplastischen Therapie einzusetzen, jedoch erst die Entwicklung der Hybridomatechnologie durch Köhler und Milstein 1975, die ein Verfahren beschreibt, wie durch Fusion von B-Zellen mit Myelomzelllinien immortalisierte, Antikörper produzierende Zellklone geschaffen werden können, ermöglichte die relativ einfache Herstellung monoklonaler Antikörper und legte damit den Grundstein für die weitere Forschung.

Die ersten in der Therapie solider und nicht solider Tumoren erfolgreich eingesetzten monoklonalen Antikörper (Cheung et al., 1987; Frodin et al., 1986; Press et al., 1987) wurden durch Immunisierung von Mäusen mit humanen Antigenen gewonnen. Diese murinen Antikörper (z.B. Edrecolomab, Panorex[®]) sind jedoch nur begrenzt therapeutisch einsetzbar, da der immunkompetente Organismus Antikörper gegen diese Fremdproteine generiert, was bei wiederholter Applikation zur Neutralisation und Elimination der Antikörper führt und gravierende anaphylaktische Reaktionen zur Folge haben kann (Borchmann et al., 2001).

Daher war das nächste Ziel die Entwicklung von Strategien zur Chimärisierung bzw. Humanisierung muriner Antikörper. Mit Hilfe gentechnischer Methoden können große Teile des Antikörpermoleküls gegen humane Aminosäuresequenzen ausgetauscht werden, so daß lediglich die Antigenbindungsstellen (CDR; complementarity-determining regions) murinen Ursprungs bleiben (Dickman, 1998; Glennie et al., 2000). Der klinisch-therapeutische Vorteil dieser Mensch-Maus-Hybrid-Moleküle (z.B. Rituximab, Mabthera[®]; Trastuzumab, Herceptin[®]) besteht in ihrer im Vergleich zu den reinen

Mausantikörpern geringeren Immunogenität (von Mehren et al., 1996; Winter et al., 1993) und längeren Halbwertszeit (Lo Buglio et al., 1989).

Das Ideal der beschriebenen Entwicklung stellt die Verwendung vollständig humaner Antikörper dar, welche heute mit Hilfe verschiedener experimenteller Verfahren generiert werden können. So besteht z.B. die Möglichkeit, humane monoklonale Antikörper durch Immunisierung transgener bzw. trans-chromosomaler Mäuse (sog. „humAb-mouse“) zu produzieren, deren Immunglobulin kodierende DNA-Abschnitte inaktiviert und durch entsprechende humane Sequenzen ersetzt wurden (Tomizuka et al., 2000; Vaughan et al., 1998).

Weiterhin können Antikörperfragmente unter Umgehung der Hybridoma- und Immunisierungstechnologien in Bakterien exprimiert werden (sog. „phage display“) (Marks et al., 1991; McCafferty et al., 1990). Große Phagenbanken ermöglichen hierbei die Selektion von humanen Antikörpern gegen eine Vielzahl verschiedener Zielantigene (Griffiths et al., 1998).

Schließlich ist es möglich, durch somatische Hybridisierung von B-Lymphozyten eines Krebspatienten mit einer immortalisierten Heteromyelomzelle Zellklone zu schaffen, welche tumorspezifische monoklonale Antikörper produzieren. 1989 gelang es Vollmers et al., mit Hilfe dieser Methode einen apoptoseinduzierenden humanen monoklonalen Antikörper (SC-1) aus einem Magenkarzinompatienten zu isolieren, dessen Eignung als adjuvantes Immuntherapeutikum bei dieser Krebsart in klinischen Studien belegt werden konnte (Vollmers et al., 2000).

Damit monoklonale Antikörper erfolgreich therapeutisch eingesetzt werden können, müssen ihre Zielantigene bestimmte Kriterien erfüllen. Sie sollten spezifisch für die Zielzelle sein, in ausreichender Zahl exprimiert werden und nicht von ihrer Oberfläche abgegeben werden können (sog. Antigen-Shedding) (Borchmann et al., 2001).

Ein Verfahren zur serologischen Identifizierung tumorspezifischer Antigene stellt die 1995 von Sahin et al. beschriebene SEREX-Methode (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) dar. Sie beruht auf der Analyse von in E.coli exprimierten Tumor-cDNA-Banken mit Hilfe von Serumantikörpern und hat zur Entdeckung einer Vielzahl neuer Tumorantigene (z.B. sog. cancer/testis antigens) geführt (Chen et al., 1997).

Gegenwärtig befinden sich mehr als 70 monoklonale Antikörper in der klinischen Testphase (Glennie et al., 2000), und neun Antikörper wurden bereits von der FDA (US Food and Drug Administration) als Therapeutikum zugelassen (Borchmann et al., 2001). Es handelt sich hierbei um Präparate gegen die Transplantatabstoßung (z.B. Basiliximab, Simulect[®]), gegen die rheumatoide Arthritis und Morbus Crohn (Infliximab, Remicade[®]), zur koronaren Revaskularisation (Abciximab, ReoPro[®]) und zur antiviralen Prophylaxe (Pavilizumab, Synagis[®]). Weitere drei Antikörper wurden für die Krebstherapie zugelassen. Neben dem bei der rezidierten akuten myeloischen Leukämie indizierten Anti-CD33-Antikörper Gemtuzumab-Zogamicin (Mylotarg[®]) (Bernstein, 2000) handelt es sich einerseits um den in der Therapie des Non-Hodgkin-Lymphoms eingesetzten Antikörper Rituximab (Mabthera[®]) gegen das B-Zell-spezifische Antigen CD20 (Maloney et al., 1997; Schnell et al., 2001), sowie andererseits um den Antikörper Trastuzumab (Herceptin[®]) gegen das Onkogenprodukt HER2/neu, der bei der Behandlung von Mammakarzinomen eine Rolle spielt (Beuzebec et al., 1999; Dillman, 1999). Der Antikörper 17-1A (Edrecolomab, Panorex[®]) gegen kolorektale Karzinome (Riethmüller et al., 1998) wurde hingegen wie bereits beschrieben wieder vom Markt genommen.

Monoklonale Antikörper wirken über verschiedene Mechanismen auf ihre Zielzellen ein. So unterbricht beispielsweise der chimäre Antikörper Infliximab (Remicade[®]) den entzündlichen Prozeß bei der rheumatoiden Arthritis, indem er sein Zielantigen (humanes TNF- α) blockiert (Markham et al., 2000).

Daneben können monoklonale Antikörper sowohl über die Fc-Teil-vermittelte Aktivierung des Komplementsystems als auch durch die Auslösung einer sekundären zellulären Immunreaktion (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; ADCC) indirekt zytotoxisch auf die antigentragende Zelle einwirken (Goodman, 1990; Valerius et al., 1997).

Weiterhin ist ein Mechanismus beschrieben worden, bei dem Antikörper durch direkte Bindung an membranständige Rezeptoren wie z.B. APO-1/Fas (Trauth et al., 1989; Yonehara et al., 1989) eine intrazelluläre Signalkaskade induzieren, die schließlich zum apoptotischen Zelltod führt (Hensel et al., 1999). Die Antikörper Rituximab

(Mabthera[®]) und Trastuzumab (Herceptin[®]) scheinen über einen ähnlichen Mechanismus in die Regulation des Zellzyklus einzugreifen (Borchmann et al., 2001).

Eine andere Strategie der Antikörpertherapie besteht in der Konjugation monoklonaler Antikörper mit Radioisotopen (Griesinger et al., 2001), Immunotoxinen (Hertler et al., 1989) oder Zytostatika, wodurch ein zielgenauer Angriff des Tumorgewebes bei gleichzeitig geringer systemischer Toxizität möglich wird (Trail et al., 1999). So wurden beispielsweise erste vielversprechende Ergebnisse in der radioimmuntherapeutischen Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen (Kaminski et al., 2000), Nierenzell- (Steffens et al., 1997) und Kolonkarzinomen (Welt et al., 1996) beschrieben, und mit dem Antikörper Gemtuzumab-Zogamicin (Mylotarg[®]) steht bereits ein Zytostatikaimmunkonjugat für die Therapie der akuten myeloischen Leukämie zur Verfügung (Bernstein, 2000).

Ein weiteres Therapieprinzip stellen sog. bispezifische Antikörper dar. Es handelt sich hierbei um Konstrukte, die zwei unterschiedliche Antigenbindungsstellen besitzen, von denen eine gegen ein tumorassoziiertes Antigen gerichtet ist, während die andere ein Triggermolekül einer zytotoxischen Immuneffektorzelle (z.B. T-Zellen, NK-Zellen) bindet, wodurch ein zur Tumorzelllyse führender Mechanismus ausgelöst wird (Repp et al., 2001). Dieser therapeutische Ansatz wird in klinischen Studien unter anderem beim Hodgkin-Lymphom untersucht (Hartmann et al., 1997).

Ein Problem bei der Therapie solider Tumoren mit monoklonalen Antikörpern ist die erschwerte Zugänglichkeit intratumoral gelegener Zellen. Dies beruht darauf, daß vollständige Antikörper aufgrund ihrer Größe (150 kD) die Blutbahn nur sehr langsam verlassen können (Borchmann et al., 2001), und darüber hinaus behindert der hohe intratumorale hydrostatische Druck eine Diffusion des Antikörpers in das Zentrum des Tumors (Jain et al., 1988). Zudem sind solide Tumorherde zumeist sehr schlecht vaskularisiert, so daß die Antikörper häufig nur die Randbereiche oder die gefäßnahen Tumorbezirke erreichen (Müller et al., 2001). Einzelne Tumorzellen sind hingegen für die Antikörper relativ gut zugänglich, so daß es sich anbietet, die antikörperbasierte Krebstherapie auf ein Stadium zu beschränken, in dem die Haupttumormasse eliminiert ist und nur wenige

disseminierte neoplastische Zellen vorhanden sind (minimal residual disease) (Riethmüller et al., 1993).

Schließlich kann das Problem auch durch die Generierung kleinerer antigenbindender Moleküle - sog. single-chain Antikörperfragmente - gelöst werden, die aufgrund ihrer geringen Größe (27 kD) schneller und tiefer in das Tumorgewebe penetrieren können (Thirion et al., 1996).

Nicht nur im therapeutischen, sondern auch im diagnostischen Bereich kommen Antikörper zum Einsatz. Beispielsweise ermöglichen immunhistochemische Methoden den Nachweis gewebspezifischer Antigene auf Gewebeschnitten und damit die exakte Klassifikation von Tumoren.

Ferner kann mit Hilfe radioaktiv markierter monoklonaler Antikörper gegen tumorassoziierte Antigene und szintigraphischer Verfahren ein Tumor erkannt und seine Ausdehnung sowie das Metastasierungsausmaß bestimmt werden (Mangili et al., 1996).

Ein weiterer Bereich des Einsatzes monoklonaler Antikörper umfaßt das sog. Purgung (Buske et al., 1998), d.h. das Auffinden und Eliminieren von Tumorzellen in Blut- und Knochenmarkstammzellpräparaten.

Aufgrund ihrer Spezifität und multiplen Effektorfunktionen stellen monoklonale Antikörper potentielle Krebstherapeutika dar (Motmans et al., 1996). Die Hybridomatechnologie, der gentechnologische Fortschritt (Motmans et al., 1996) sowie die immer bessere Definition einer wachsenden Anzahl tumorassoziierter Antigene (Illiger, 1997; Stockert et al., 1998) ermöglichen es heute, monoklonale Antikörper zu produzieren, die spezifisch, zellphasenunabhängig, nebenwirkungsärmer und deshalb effektiver ihre Anti-Tumor-Aktivität entfalten (Illiger, 1997).

Die bisherigen Erfolge in der Behandlung neoplastischer Erkrankungen lassen erwarten, daß insbesondere humane monoklonale Antikörper aufgrund ihrer hohen Antigenespezifität, ihrer geringen Immunogenität und guten Verträglichkeit ein potentes adjuvantes Tumorthapeutikum darstellen.

1.3 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit werden drei humane monoklonale Antikörper, die in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. H.P. Vollmers am Pathologischen Institut der Universität Würzburg mit Hilfe der Hybridomatechnologie (beschrieben in: Vollmers et al., 1989) aus einem Rektumkarzinompatienten isoliert wurden, hinsichtlich der Kreuzreaktivität mit gesundem und maligne entartetem Gewebe untersucht. Dazu wurden Immunperoxidasefärbungen auf Gefrierschnitten verschiedener normaler und fetaler Gewebe sowie auf zahlreichen Tumorarten durchgeführt.

Weiterhin wird mit Hilfe zweier funktioneller zellbiologischer Tests (MTT-Assay, Cell Death ELISA^{PLUS}) der Einfluß der Antikörper auf das Wachstumsverhalten verschiedener Kolonkarzinomzelllinien *in vitro* charakterisiert.

Die durch die vorliegende Arbeit erhaltenen Daten sollen erste Aufschlüsse über die Eignung der Antikörper als Therapeutikum maligner Dickdarntumoren geben und damit evtl. die Grundlage für weitergehende Forschungsansätze bilden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Puffer, Lösungen und Medien

- PBS: 8 g NaCl
0,2 g KCl
1,15 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O
0,2 g KH₂PO₄
1 l A. bidest.
- Tris/NaCl: Lösung 1: 4,5 l A. bidest.
40,5 g NaCl
Lösung 2: 1 l A. bidest.
6 g Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
auf pH 7,6 mit rauchender HCl einstellen
Lösung 1 und 500 ml von Lösung 2 auf pH 7,4 einstellen
- BSA/PBS: 5 mg BSA (Albumin bovine, fraction V; Roth, Karlsruhe) / ml PBS
- DAB-Reagenz: 5 ml Leitungswasser
1 DAB-Tablette, 1 Wasserstoffperoxid-Tablette (5 ml Sigma Fast
3,3'-Diaminobenzidine Tablet; Sigma, Steinheim)
- MTT-Reagenz: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (Sigma,
Steinheim) 5 mg/ ml PBS
- Magermilchpulver: aus dem Reformhaus, 3 bzw. 5 % in PBS

Trypanblau: 0,5 % Trypanblau (Sigma, Steinheim)
0,9 % NaCl

Kaninchenserum: Linaris, Wertheim-Bettingen

Humanserum: aus der Abteilung für Transfusionsmedizin der Universität Würzburg

RPMI 1640 : Basismedium (500 ml) (PAA Laboratories, Linz / Österreich)
1 % Glutamin (5 ml)
1 % Penicillin / Streptomycin (5 ml)
10 % FCS (Fetal Calf Serum) (50 ml)
vor Gebrauch auf 37°C vorwärmen

Trypsin/EDTA: PAA Laboratories, Linz / Österreich

2.1.2 Chemikalien und Antikörper

Die Chemikalien und Antikörper wurden von folgenden Firmen bezogen:

Aceton	Mallinckrodt Baker, Deventer / Niederlande
Cell Death Detection ELISA ^{PLUS}	Roche, Mannheim
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
Fico Lite H Trennmedium	Linaris, Wertheim-Bettingen
Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Hämalaun	Merck, München
Tissue-Tek	Sakura Finetek, Zoeterwoude / Niederlande
Anti-Cytokeratin (CAM 5.2) Reagent	Becton Dickinson, Belgien

Anti-Cytokeratin No. 7	Boehringer, Mannheim
Anti-Cytokeratin No. 8	Boehringer, Mannheim
Chrom Pure Human IgM	Dianova, Hamburg
Monoclonal Antibody CD95 Fas	Immunotech, Marseille / Frankreich
Rabbit Anti-Human IgM	Dako, Dänemark
Rabbit Anti-Human IgM F (ab') ₂	Dako, Dänemark
Rabbit Anti-Mouse Immunglobulins	Dako, Dänemark

Alle weiteren Chemikalien wurden von den Firmen Noras (Würzburg), Merck (Darmstadt), Ferak (Berlin) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.1.3 Humane monoklonale Antikörper

In den nachfolgend beschriebenen Färbungen und *in vitro* Experimenten wurden Zellkulturüberstände der humanen monoklonalen Antikörper HH 98/81-33-154, HH 99/71-81-149 und HH 101/99-14 eingesetzt, welche alle der Immunglobulinklasse M angehören. Sie werden von Zellklonen produziert, die durch somatische Hybridisierung von B-Zellen aus der Milz eines Rektumkarzinompatienten mit dem Heteromyelom HAB-1 entstanden sind. Bei dem Tumor handelte es sich um ein mäßig differenziertes Adenokarzinom des Stadiums pT2 pN0 pMx.

Zu Beginn der Arbeit war lediglich bekannt, daß sowohl HH 98/81-33-154 als auch HH 101/99-14 auf Zytospins der Kolonkarzinom-Zelllinien HT-29, CACO-2, COLO 206F und COLO 320 eine positive Färbung zeigen, wohingegen mit HH 99/71-81-149 auf keiner der Zelllinien eine Reaktion feststellbar ist.

Sowohl bei den Färbungen als auch bei einigen Assays wurde zum Aufdecken unspezifischer positiver Reaktionen durch humane IgM-Moleküle Hybridomüberstand des monoklonalen Antikörpers L11/64-28 (IgM) mitgeführt, der aus einem Patienten mit einem Adenokarzinom der Lunge isoliert worden war.

2.1.4 Zelllinien

Die Experimente wurden an den etablierten Linien HT-29, CACO-2, COLO 206F und COLO 320 durchgeführt. Außer COLO 320 zeigen alle ein adhärentes Wachstum in der Kulturflasche. Die Kultivierung erfolgte in RPMI 1640-Medium / 1 % Glutamin / 1 % Penicillin / Streptomycin / 10 % FCS bei 37°C und 7 % CO₂.

2.1.5 Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte

Die Verbrauchsmaterialien lieferten folgende Firmen:

Combitips-Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser	Interessengemeinschaft der Laborfachhändler
Neubauer-Zählkammer	Hartenstein, Würzburg
Objektträger	Menzel; Langenbrinck, Emmendingen
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen; Hartenstein, Würzburg
Reaktionsgefäße und Plastikbehälter	Greiner, Frickenhausen; Hartenstein, Würzburg
S-Monovetten und Kanülen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten und -flaschen	Greiner, Frickenhausen
Zytofilterkarten	Hartenstein, Würzburg

Die für die Arbeit verwendeten Geräte stammen von folgenden Firmen:

Aquabidest-Anlage Milli-Q Plus PF	Millipore, Molsheim
Brutschränke	Heraeus, Hanau
ELISA-Reader	Bio-Rad, München

Gefriertruhe (-70° C)	Heraeus, Hanau
Kryostat 2800 Frigocut N	Reichert-Jung, Nussloch
Kühl- und Gefrierschrank	Quelle, Fürth
Magnetrührer IKAMAG RTC	Janke & Kunkel, Staufen
Mikroskop DMLB	Leica, Wetzlar
Phasenkontrastmikroskop DMIL	Leica, Wetzlar
ph-Meter pH 525	WTW, Weilheim i. OB
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhelfer accu-jet	Brand, Wertheim / Main
Sterilbank Lamin Air	Heraeus, Hanau
Vortex-Genie	Bender & Hobein, Zürich / Schweiz
Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad Minitherm 2	Dinkelberg-Labortechnik, Neu-Ulm
Zentrifuge Minifuge T	Heraeus, Hanau
Zytospinzentrifuge Cytospin 2	Shandon, Großbritannien

2.1.6 Soft- und Hardware

Für die graphische Darstellung von Ergebnissen wurden die Programme EXCEL und POWERPOINT (Microsoft, USA) verwendet.

Die fotografischen Aufnahmen der Gewebeschnitte wurden mit Hilfe der Digitalkamera Nikon Coolpix 990 (Nikon, Japan) und des Mikroskops DMLB (Leica, Wetzlar) in 100-, 200- und 400facher Vergrößerung angefertigt, und der Ausdruck auf Fotopapier (Hewlett Packard, USA) erfolgte durch einen Farbdrucker derselben Marke.

2.2 Methoden der Immunhistochemie

2.2.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Nach der Entnahme wurde das Gewebe portioniert, mit Tissue-Tek-Gel eingedeckt, in flüssigem Stickstoff für 15 min schockgefrostet und bei -70°C gelagert. Mit dem Kryostat wurden bei -20° bis -23°C 4 μm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Die Objektträger wurden nach Möglichkeit über Nacht, mindestens aber für 2 Stunden an der Luft getrocknet, bevor sie weiterverarbeitet oder bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt wurden.

2.2.2 Ficoll-Gradient und Präparation von Zytospins

Blut- und Knochenmarklymphozyten wurden in Form von Zytospins gefärbt. Nach der Entnahme wurde das mit gerinnungshemmenden Substanzen versetzte Patientenmaterial zweimal mit je 20 ml RPMI 1640-Medium ohne Zusätze gewaschen (Zentrifugieren für 5 min bei 1500 rpm), das Zellpellet in 20 ml Medium aufgenommen und langsam auf 20 ml Trennmedium Fico Lite H in einem 50 ml Röhrchen aufgetropft. Nach 20 min Zentrifugieren bei 1500 rpm ohne Bremse konnten dann die entsprechend dem Dichtegradienten (Ficoll-Gradient) aufgetrennten Zellarten in Form verschieden breiter Banden im Trennmedium differenziert werden. Die Lymphozyten wurden abgenommen, erneut zweimal mit je 20 ml Medium gewaschen und das Pellet je nach Größe in 2 bis 10 ml Medium gelöst.

Zur Herstellung der Zytospins wurden Objektträger und Zytofilterkarten in das Zentrifugegehänge der Zytospinzentrifuge eingespannt und zwischen 80 und 150 μl der Zellsuspension 2 min bei 500 rpm aufzentrifugiert. Unter dem Mikroskop wurde die Zelldichte überprüft. Die fertigen Zytospins wurden wiederum über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und dann weiterverarbeitet oder bei -20°C tiefgefroren.

2.2.3 Immunperoxidasefärbung von Kryoschnitten und Zytospins

Immunperoxidasefärbungen ermöglichen die farbliche Kennzeichnung zellulärer Strukturen, deren antigene Epitope spezifisch von Primärantikörpern erkannt werden. Mit Hilfe Peroxidase konjugierter Sekundärantikörper, die gegen den Fc-Teil von Immunglobulinen gerichtet sind, stellen sich nach enzymatischer Substratumsetzung die von den Primärantikörpern gebundenen Gewebeareale braun dar.

Die immunhistochemische Färbung der Gefrierschnitte und Zytospinpräparate erfolgte nach demselben Färbeprotokoll:

Nachdem die berührtrockenen Objektträger 10 min in Aceton fixiert und anschließend 30 min an der Luft getrocknet worden waren, folgte dreimaliges Waschen mit Tris/NaCl (pH 7,4). Nach 5minütiger Inkubation in diesem Puffer wurden die Schnitte mit 100 µl einer dreiprozentigen Milchpulverlösung (in PBS) zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungen für 30 min in der Feuchtkammer inkubiert. Vor jedem der nun folgenden Inkubationsschritte wiederholte sich der Waschvorgang mit Tris/NaCl.

Zuerst wurden 100 µl des Primärantikörpers aufpipettiert. Hierfür wurden die gekauften Antikörperstammlösungen für die Positivkontrollen - Anti-Cytokeratin Nr. 7, 8 sowie CAM 5.2 - im Verhältnis 1:50, 1:50 bzw. 1:10 mit BSA/PBS-Lösung (5 mg/ml BSA in PBS; ebenfalls zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungen) angesetzt. Die Antikörper zur Kontrolle unspezifischer Bindungen humaner IgM (Chrom Pure, L11/64-28) sowie die Hybridomüberstände der Antikörper HH 98/81-33-154, HH 99/71-81-149 und HH 101/99-14 wurden mit BSA/PBS so verdünnt, daß sie in einer Konzentration von 10 µg/ml vorlagen. Als Negativkontrolle wurde ein Schnitt mit 100 µl RPMI 1640 mitgeführt.

Die Antikörperkonzentrationen der für die einzelnen Färbungen verwendeten Batches gehen aus *Tab. 1* hervor.

Tab. 1: Übersicht über die für die Färbung der einzelnen Gewebearten verwendeten Batches. Bis auf Chrom Pure (Dianova, Hamburg) handelt es sich um Hybridomüberstände, deren Konzentration nephelometrisch bestimmt worden war.

Gewebeart	Konz. Chrom Pure	Konz. L11/64-28	Konz. HH 98/81-33-154	Konz. HH 99/71-81-149	Konz. HH 101/99-14
kolorektale Karzinome	4,6 mg/ ml	23,0 µg/ ml 70,3 µg/ ml	59,0 µg/ ml	21,4 µg/ ml	55,1; 43,9; 79,7 µg/ ml
Normalgewebe	–	70,3 µg/ ml	59,0 µg/ ml 44,8 µg/ ml	21,4 µg/ ml	79,7 µg/ ml
fetales Gewebe	–	70,3 µg/ ml	44,8 µg/ ml	21,4 µg/ ml	79,7 µg/ ml
Tumoren	–	70,3 µg/ ml	44,8 µg/ ml	21,4 µg/ ml	79,7 µg/ ml

Nach 30 min Inkubation wurden 100 µl der gegen humane bzw. murine Antikörper gerichteten Peroxidase konjugierten Sekundärantikörper (Rabbit Anti-Human, Rabbit Anti-Mouse) aufgebracht. Hierfür waren die Antikörperstammlösungen zuvor im Verhältnis 1:50 mit 70 % PBS und 30 % Kaninchen- bzw. Humanserum angesetzt worden.

Nach weiteren 30 min wurden die Schnitte für 10 min in PBS-Puffer gestellt, woraufhin sie 10 min lang unter Lichtabschluß mit 100 µl der chromogenen Substratlösung DAB (1 Tablette 3,3' Diaminobenzidintetrahydrochloridsäure, 1 Tablette H₂O₂ in 5 ml Leitungswasser) inkubiert wurden. Nach Spülen mit A. bidest. und Gegenfärbung mit Hämalaun (5 min) wurden die Proben 15 min lang fließend gewässert (kaltes Leitungswasser) und schließlich zur Konservierung mit auf 60°C erwärmter Glyceringelatine eingedeckt.

Um besonders starke Hintergrundfärbungen aufgrund unspezifischer Bindungen humaner IgM zu dämpfen, wurden Absättigungen einiger Gewebe durchgeführt. Hierbei wurden die Schnitte nach der ersten Waschprozedur eine Stunde lang mit 100 µl Rabbit Anti-Human IgM F(ab')₂-Fragmenten (1:5 in BSA/PBS) inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit Tris/NaCl wurden dann 100 µl einer fünfprozentigen Milchpulverlösung für 30 min aufgebracht. Alle weiteren Schritte entsprachen dem zuvor beschriebenen Ablauf.

2.3 Methoden der Zellbiologie

2.3.1 Zellkultur

Die Kultivierung der verwendeten Kolonkarzinomzelllinien HT-29, CACO-2, COLO 206F und COLO 320 erfolgte in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS, 1 % Glutamin sowie den Antibiotika Penicillin und Streptomycin (1 %). Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 7 % im Brutschrank herangezogen.

Adhärenz Zellen (HT-29, CACO-2 und COLO 206F) wurden bei 70-80 % konfluentem Wachstum mit ca. 5 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung von der Unterlage abgelöst (37° C, 5 min), mit frischem Medium versetzt und bei 1500 rpm abzentrifugiert. Die größtenteils in Suspension wachsenden COLO 320-Zellen konnten dagegen bei einer ähnlichen Zelldichte ohne Inkubation mit Trypsin/EDTA durch bloßes Abschütteln gelöst und dann ebenfalls bei 1500 rpm zentrifugiert werden. Das in frischem Medium aufgenommene Zellpellet wurde schließlich im Verhältnis 1:10 auf neue Anzuchtgefäße aufgeteilt oder der Durchführung bestimmter Assays zugeführt.

2.3.2 Proliferationstest (MTT-Assay)

Der Einfluß der Antikörper HH 98/81-33-154, HH 99/71-81-149 und HH 101/99-14 auf die Proliferation von Zellen der Zelllinien HT-29, CACO-2, COLO 206F sowie COLO 320 wurde mit Hilfe eines quantitativen kolorimetrischen Tests untersucht. Es handelt sich um den 1983 von Mosmann und 1987 von Carmichael et al. beschriebenen MTT-Test, der in leicht veränderter Form durchgeführt wurde. Das Prinzip dieses Assays beruht auf dem Umsatz des farblosen Tetrazoliumsalzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid durch mitochondriale Dehydrogenasen, wodurch eine spektrophotometrisch auswertbare Farbreaktion entsteht. Da diese enzymatische Substratumsetzung nur in stoffwechselaktiven Mitochondrien erfolgen kann, weist dieser Test ausschließlich lebende Zellen nach.

50 µl einer auf 1×10^6 Zellen pro ml eingestellten Zellsuspension wurden in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte pipettiert, so daß pro Well eine Zellzahl von 5×10^4 Zellen vorlag. Die Vertiefungen einer Spalte wurden nur mit 100 µl RPMI 1640-Medium (mit Zusätzen) gefüllt (Blank). Als Negativkontrolle wurden Zellen mit 50 µl frischem bzw. in Zellkultur verbrauchtem Medium, das sowohl unverdünnt als auch im Verhältnis 1:1 mit frischem Medium eingesetzt wurde, inkubiert. Zu den übrigen Zellen wurden 50 µl der Antikörperüberstände - ebenfalls unverdünnt bzw. im Verhältnis 1:1 mit frischem Medium - pipettiert. Insgesamt lag jeder Ansatz in achtfacher Ausführung vor. Es wurden Batches mit den folgenden nephelometrisch bestimmten Antikörperkonzentrationen verwendet:

HH 98/81-33-154: 44,8 µg/ ml

HH 99/71-81-149: 18,1 µg/ ml

HH 101/99-14: 79,7 µg/ ml

Nach 24- bzw. 48stündiger Inkubation der Platten bei 37°C und 7 % CO₂ wurden 50 µl MTT-Lösung (5 mg/ ml 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid in PBS) pro Well zugegeben, die Zellen erneut für 20 min im Brutschrank inkubiert und anschließend 10 min lang bei 2800 rpm abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 150 µl DMSO, in welchem sich der kristallin ausgefallene Farbstoff löste, aufgenommen und resuspendiert. Die Farbintensität wurde im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von $\lambda = 540$ und $\lambda = 690$ nm bestimmt und aus der Differenz der Absorption bei 540 und 690 nm eine Aussage über die Proliferation der Zellen getroffen.

2.3.3 Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche, Mannheim)

Das Ausmaß der Apoptoseinduktion durch die Antikörper HH 98/81-33-154 und HH 101/99-14 auf Kolonkarzinomzellen der Zelllinie CACO-2 wurde mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA^{PLUS} analysiert. Dieser Test basiert auf dem Prinzip eines quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassays, bei dem Peroxidase konjugierte murine monoklonale Antikörper eingesetzt werden, die gegen die Histon- bzw. DNA-Komponente der beim

Vorgang der Apoptose entstehenden Mono- und Oligonukleosomen gerichtet sind. Nach enzymatischer Umsetzung eines farblosen Substrates kann dann anhand der Farbintensität des Reaktionsproduktes die Menge der vorhandenen Nukleosomen und damit die relative Anzahl apoptotischer Zellen photometrisch bestimmt werden.

Hierzu wurden 100 µl einer Zellsuspension (1×10^5 Zellen / ml) der Zelllinie CACO-2 mit 100 µl der unverdünnten Antikörperüberstände von HH 98/81-33-154 (Konzentration: 41,7 µg/ ml) und HH 101 /99-14 (Konzentration: 89,1 µg/ ml) in einer 96-Well-Platte 24 Stunden lang bei 37°C und 7 % CO₂ inkubiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen einerseits mit der gleichen Menge RPMI 1640-Medium (mit Zusätzen) und andererseits mit Überstand von L11/64-28 (Konzentration: 61,3 µg/ ml) versetzt. Für die Positivkontrolle wurden 100 µl der Verdünnung des Antikörpers CD95 Fas (1:250 in RPMI 1640; 2 µg/ ml) verwendet. Jeder Ansatz lag in doppelter Ausführung vor.

Die weitere Durchführung des Versuchs erfolgte mit geringfügigen Veränderungen nach den Angaben des Herstellers (Handbuch: Cell Death Detection ELISA^{PLUS}, Roche, Mannheim) unter Verwendung der mitgelieferten Reagenzien und Pufferlösungen.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen 10 min lang bei 200 x g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und 200 µl des Lysispuffers hinzugegeben, wodurch in den folgenden 30 min bei Raumtemperatur die Lyse der Zellen erfolgte. Nach erneutem Zentrifugieren wurden jeweils 20 µl des Überstands in Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten übertragen, bevor 80 µl des Immunoreagent (1/20 Anti-DNA-POD, 1/20 Anti-histonbiotin, 18/20 Inkubationspuffer) hinzupipettiert wurden. Zusätzlich wurden eine im Testkit enthaltene Positivkontrolle und ein Blank-Ansatz mitgeführt. Nachdem die Platten 2 Stunden lang bei ca. 250 rpm durchmischt worden waren, wurden nach dreimaligem Waschen mit Inkubationspuffer (250 µl) 100 µl der ABTS-Lösung (1 ABTS-Tablette in 5 ml Substratpuffer) in jedes Well pipettiert. Nach erneutem Durchmischen spiegelte sich dann die Intensität der antikörperinduzierten Apoptose in einem intensiven grünen Farbniederschlag wider, der mit Hilfe eines ELISA-Reader bei $\lambda = 415$ nm gegen die Referenzwellenlänge von 490 nm vermessen wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Immunperoxidasefärbung

Bei den Immunperoxidasefärbungen von Kryoschnitten bzw. Zytospinpräparaten wurden neben den humanen monoklonalen Antikörpern HH 98/81-33-154, HH 99/71-81 und HH 101/99-14 jeweils eine Negativkontrolle (RPMI 1640-Medium), ein oder mehrere Positivkontrollen (Anti-Cytokeratin 7, 8 oder CAM 5.2) sowie Chrom Pure bzw. L11/64-28 zur Kontrolle des durch humane IgM-Antikörper verursachten Hintergrundes mitgeführt. Dabei wurden aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit die zu untersuchenden Antikörper und die humanen IgM-Kontrollantikörper in gleichen Konzentrationen, nämlich 10 µg/ml, eingesetzt. Um die Gewebemorphologie besser beurteilen zu können, wurde zusätzlich von jedem Schnitt eine HE-Färbung angefertigt.

Die Auswertung der Präparate erfolgte mit Hilfe des Mikroskopes DMLB. Positive Areale im Gewebe stellen sich aufgrund der Peroxidase katalysierten Substratumsetzung als braun und negative wegen der Gegenfärbung mit Hämalaun als blau dar, wobei tatsächlich positive Ergebnisse jedoch von den durch zelluläre endogene Peroxidasen hervorgerufenen Braunfärbungsartefakten abgegrenzt werden müssen.

Ein Ergebnis wurde als positiv gewertet, wenn die Braunfärbung entweder umschrieben, d.h. auf eine Zelle (Membran-, Zytoplasma-, Kernfärbung) oder Zellformation begrenzt war oder aber sich das angefärbte Areal in seiner Intensität deutlich vom Hintergrund abhob.

Als negativ galten dagegen Areale, die keine Braunfärbung aufwiesen oder aber eine flächige homogene, jedoch nicht abgrenzbare Anfärbung zeigten. Auch Gewebe, bei denen Chrom Pure bzw. L11/64-28 positive Reaktionen aufwiesen, wurden als negativ gewertet. Gewebeschnitte, bei denen aufgrund einer starken Hintergrundfärbung keine eindeutige Aussage möglich war, wurden mit Rabbit Anti-Human IgM F(ab')₂-Fragmenten (1:5 in BSA/PBS) und einer fünf- statt dreiprozentigen Milchpulverlösung zur Absättigung unspezifischer Bindungen inkubiert. Tatsächlich positive Reaktionen persistierten nach dieser Absättigung, während Hintergrundfärbungen gedämpft wurden.

3.1.1 Kolorektale Karzinome

Kolorektales Tumorgewebe wurde gefärbt, um beurteilen zu können, auf wie vielen Karzinomen und in welcher Intensität die zu untersuchenden Antikörper eine Reaktion zeigen. Insgesamt standen hierfür 21 Tumoren zur Verfügung, von denen 10 (47,6 %) von weiblichen und 11 (52,4 %) von männlichen Patienten stammten. Unter den 21 Präparaten waren 20 Adenokarzinome, wovon 2 zusätzlich Siegelringzellen enthielten, und bei einem Tumor handelte es sich histologisch um ein Plattenepithelkarzinom. 3 Karzinome waren im Caecum, 2 im Colon sigmoideum, 5 im Rektum und 11 im Bereich des restlichen Kolons lokalisiert. Es zeigte sich aber, daß die Tumorlokalisation keinen Einfluß auf das Färbeverhalten der Antikörper hatte.

Die Ergebnisse der Färbungen wurden folgendermaßen differenziert:

- : negatives Ergebnis
- + : leichte bis mäßig positive Färbung
- ++ : stark positive Färbung

Die Anzahl gefärbter Tumoren sowie positiver bzw. negativer Ergebnisse verteilen sich auf die einzelnen Antikörper wie folgt:

Tab. 2: Färbungsergebnisse auf kolorektalen Karzinomen

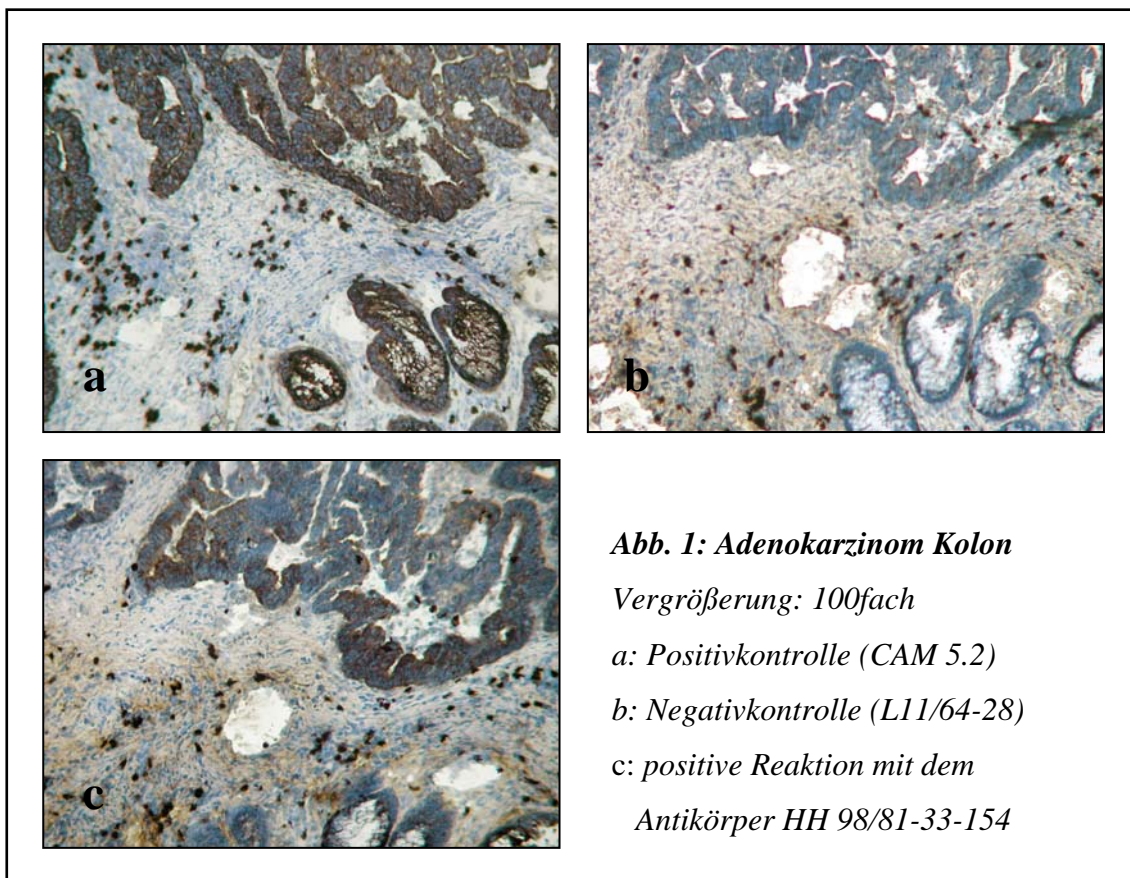
Antikörper	gefärbt	+	++	-	rel. Anz. pos. Tumore
HH 98/81-33-154	18	6	1	11	38,9 %
HH 99/71-81-149	18	6	1	11	38,9 %
HH 101/ 99-14	21	11	8	2	90,5 %

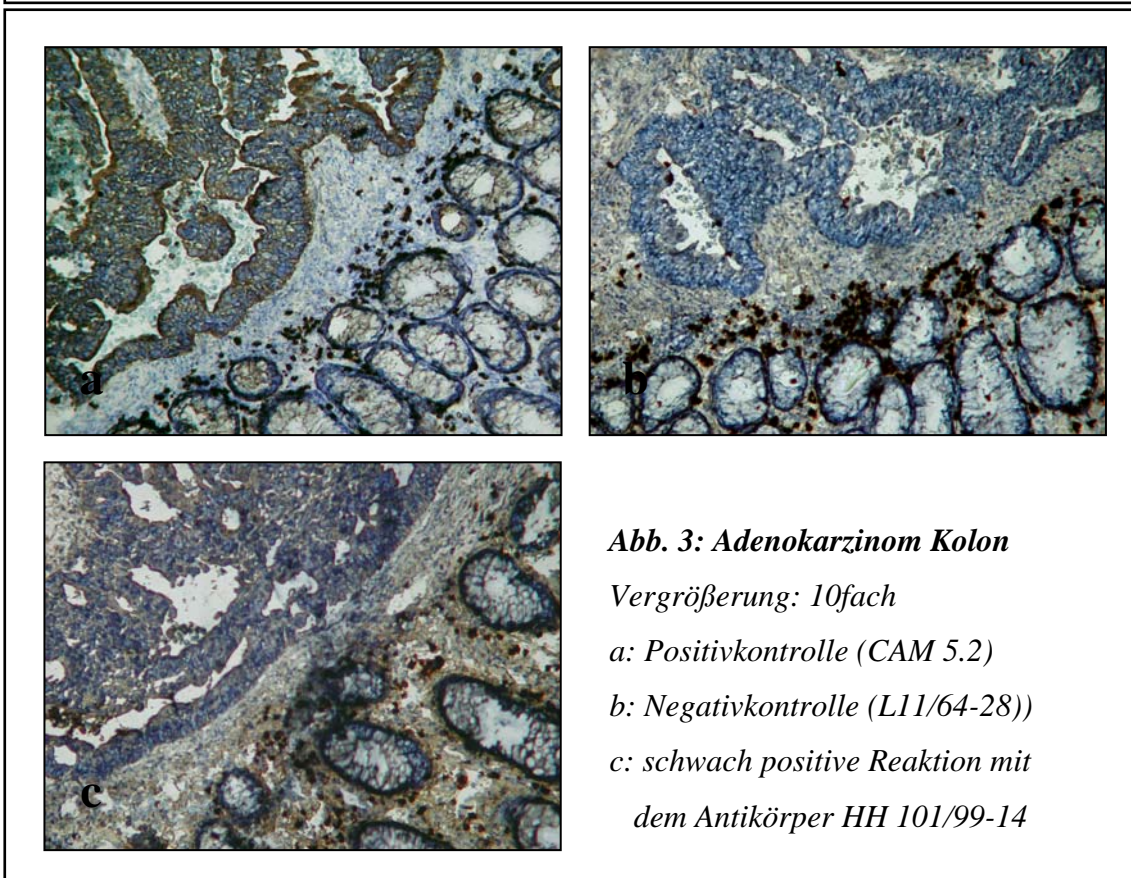
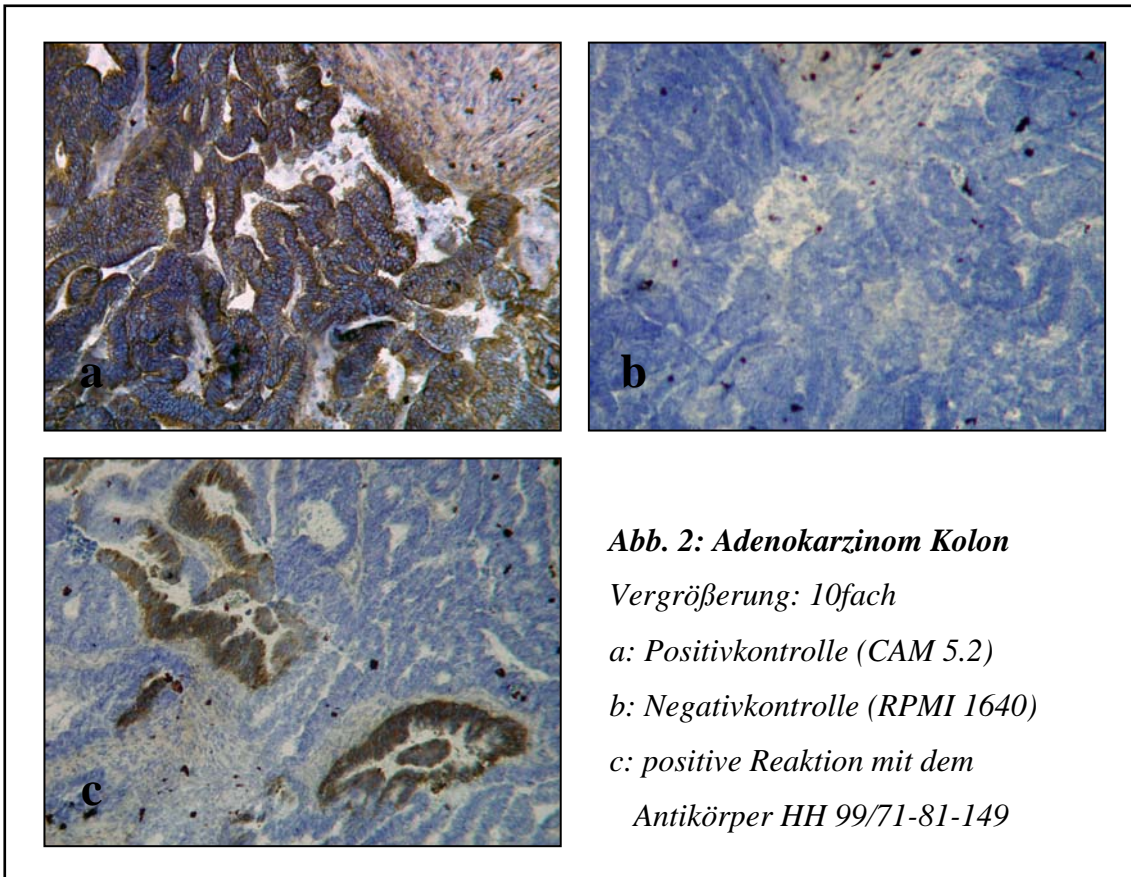
Auffällig war, daß nur Adenokarzinome von den drei Antikörpern angefärbt wurden. Selbst HH 101/99-14 zeigte auf dem plattenepithelialen Kolonkarzinom keine positive Reaktion.

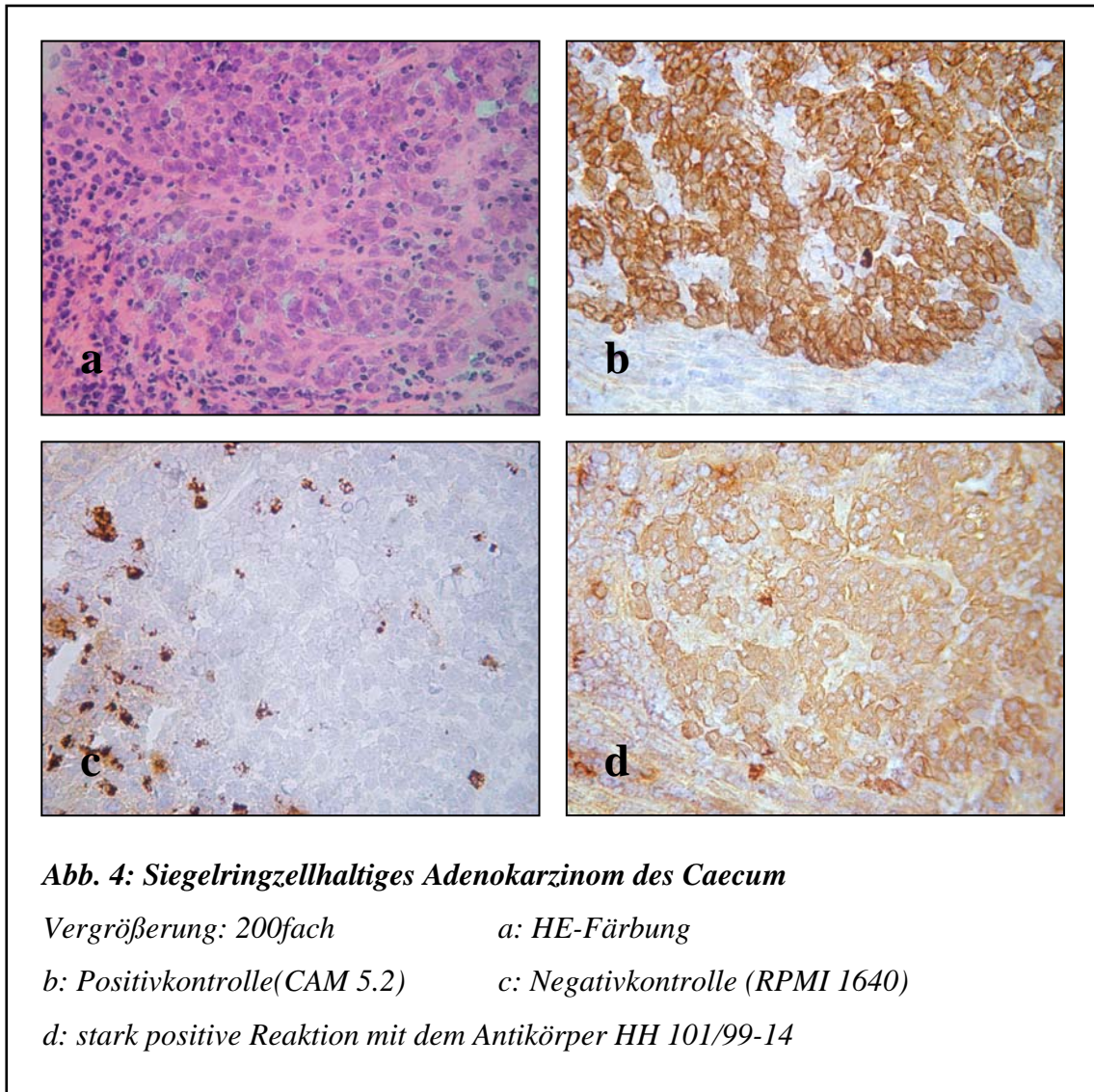
Eine deutliche perimembranöse Färbung zeigte sich bei HH 101/ 99-14 in zwei, bei den anderen beiden Antikörpern hingegen in keinem Fall. Scharf begrenzte Kernfärbungen wurden durch keinen der drei Antikörper hervorgerufen.

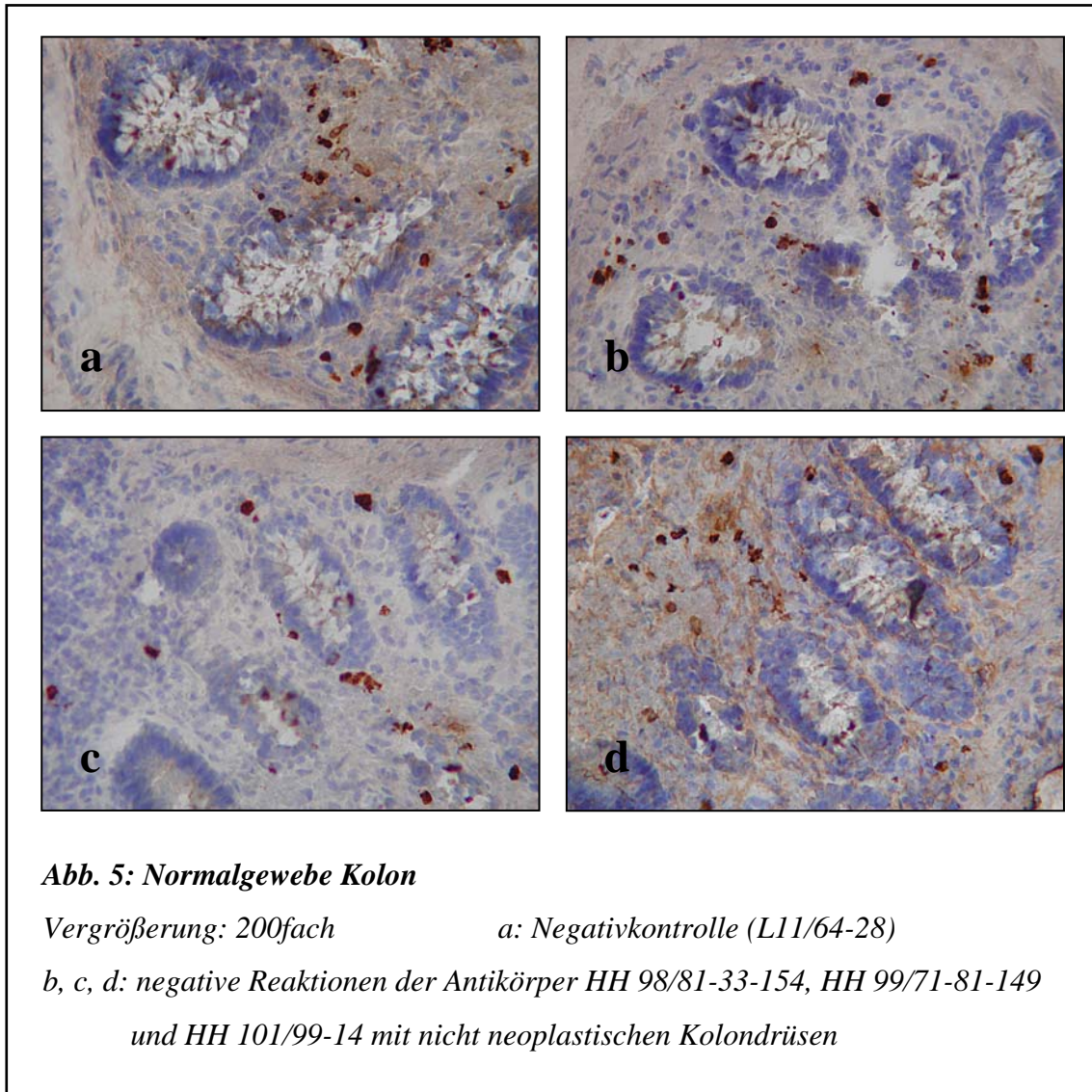
Die Ergebnisse der Färbungen mit HH 98/81-33-154 und HH 99/71-81-149 waren jeweils identisch, und wenn diese beiden Antikörper eine positive Reaktion zeigten, war auch die Färbung mit HH 101/99-14 positiv. Dies war insgesamt bei 7 Karzinomen der Fall.

Abb. 1 bis 4 zeigen je ein Beispiel für eine positive Färbung mit HH 98/81-33-154 und HH 99/71-81-149 sowie eine schwächere und eine stärkere Reaktion von HH 101/99-14 auf kolorektalem Tumorgewebe. Zum Vergleich werden in Abb. 5 negative Reaktionen aller drei Antikörper mit nicht neoplastischem Kolongewebe dargestellt.









3.1.2 Normalgewebe

Da es sich bei den von den Antikörpern erkannten tumorassoziierten Antigenen um Moleküle handeln könnte, welche auch von gesunden Zellen exprimiert werden, ist es notwendig, durch die Färbung normalen Gewebes mögliche Kreuzreaktionen der Antikörper mit wichtigen Organen aufzudecken, um daraus erste Rückschlüsse hinsichtlich der Verträglichkeit der Antikörper bei einem späteren therapeutischen Einsatz ziehen zu können.

Insgesamt wurden 38 verschiedene Organe bzw. Gewebe für die Untersuchung herangezogen, wobei nach Möglichkeit jeweils Material von drei Patienten unterschiedlichen Geschlechts getestet wurde. Blut- und Knochenmarkpräparate lagen in Form von Zytospins vor.

Zwei Gewebearten, Milz und Leber, konnten nicht ausgewertet werden, da bei allen Antikörpern trotz Absättigung eine inhomogene unspezifische Färbung des Parenchyms mit starker Hintergrundreaktion vorlag, die keine eindeutige Aussage zuließ.

Bei allen Antikörpern, besonders aber bei HH 101/99-14 traten außerdem Kreuzreaktionen mit Bindegewebe (z.B. in Schilddrüse, Lunge oder Aorta), glatter Muskulatur (z.B. Blasenwand), Sekreten exokriner Drüsenepithelien (z.B. Prostata) sowie mukoiden Substanzen (z.B. in Magen, Dünndarm oder Kolon) auf.

Weiterhin zeigten alle Antikörper eine saumähnliche Färbung lumennaher abschlirfernder Epithelzellen auf den mehrschichtigen Plattenepithelien der Zunge, des Ösophagus sowie der Portio vaginalis der Cervix uteri, was jedoch als Artefakt gewertet wurde.

Bei der Auswertung der Färbungen wurde nur zwischen negativen (–) und positiven (+) Resultaten unterschieden.

Die Verteilung der insgesamt gefärbten sowie der positiven und der negativen Ergebnisse stellt sich wie folgt dar:

Tab. 3: Färbungsergebnisse auf Normalgeweben

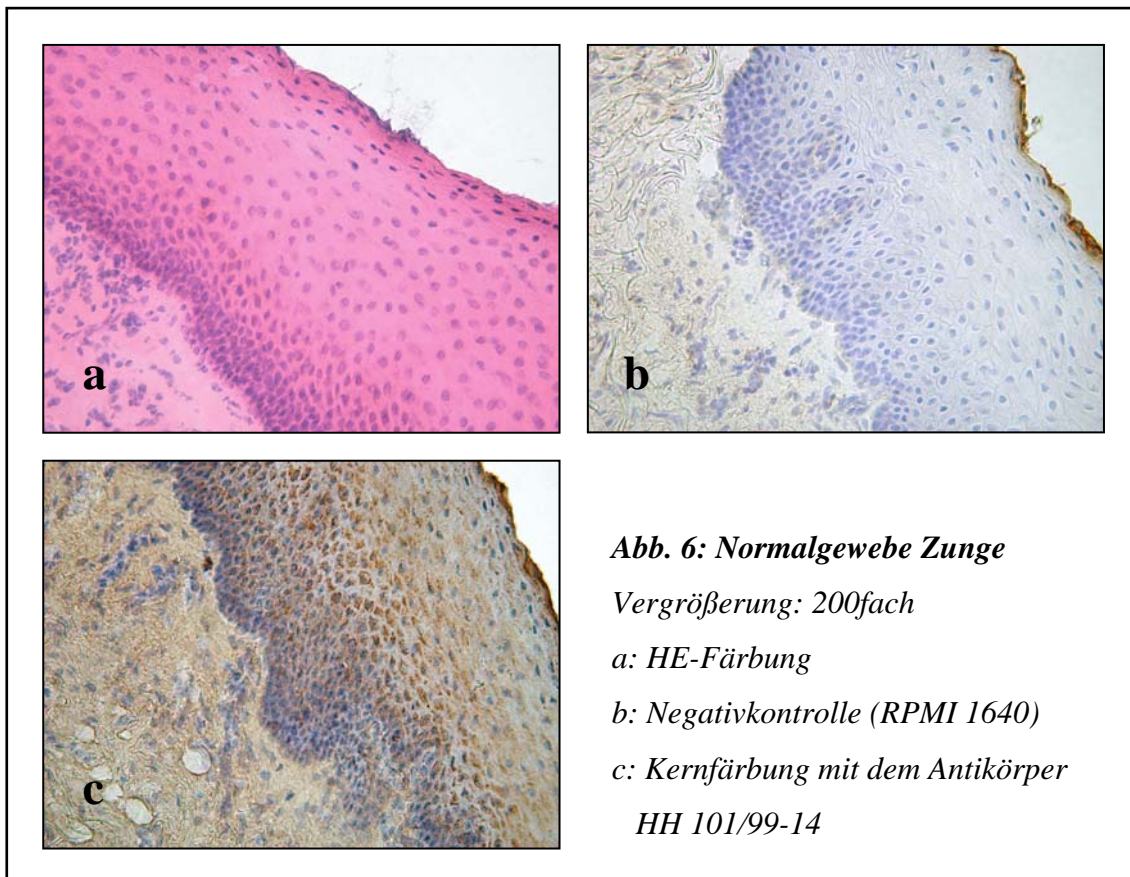
Organ	Anz. gef.	HH 98/81-33-154		HH 99/71-81-149		HH 101/99-14	
		+	–	+	–	+	–
Schilddrüse	3	0	3	0	3	0	3
Lunge	3	0	3	0	3	0	3
Aorta	3	0	3	0	3	0	3
Myokard	3	0	3	0	3	0	3
Herzbeutel	3	0	3	0	3	0	3
Zunge	3	0	3	0	3	3	0
Ösophagus	3	0	3	0	3	3	0
Magen	3	0	3	0	3	0	3
Dünndarm	3	0	3	0	3	0	3

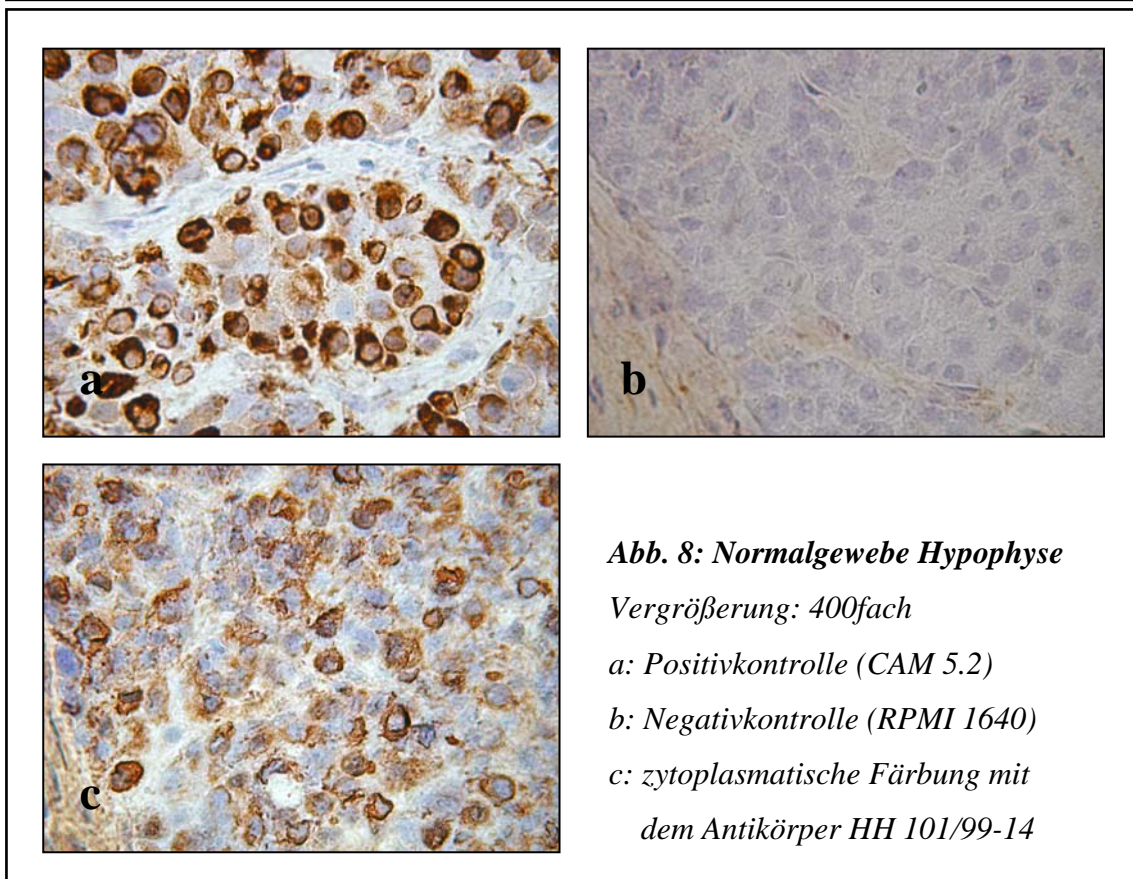
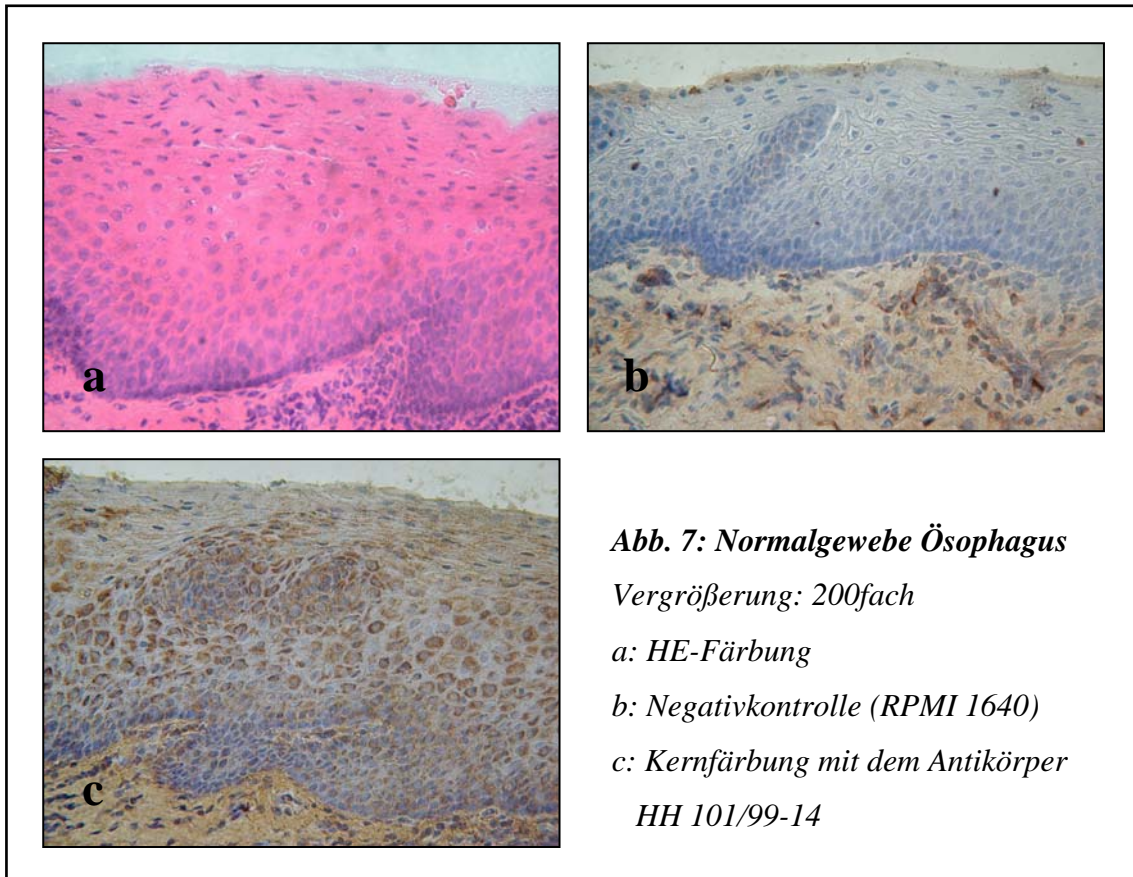
Organ	Anz. gef.	HH 98/81-33-154		HH 99/71-81-149		HH 101/99-14	
		+	-	+	-	+	-
Kolon	3	0	3	0	3	0	3
Rektum	3	0	3	0	3	0	3
Pankreas	2	0	2	0	2	0	2
Leber	3	nicht auswertbar					
Milz	3	nicht auswertbar					
Thymus	3	0	3	0	3	0	3
Tonsilla palatina	3	0	3	0	3	0	3
Lymphknoten	3	0	3	0	3	0	3
Nebenniere	3	0	3	0	3	0	3
Niere	3	0	3	0	3	0	3
Blase	3	0	3	0	3	0	3
Ductus deferens	3	0	3	0	3	0	3
Prostata	3	0	3	0	3	0	3
Hoden	3	0	3	0	3	0	3
Mamma	3	0	3	0	3	0	3
Ovar	3	0	3	0	3	0	3
Tuba uterina	3	0	3	0	3	0	3
Corpus uteri	2	0	2	0	2	0	2
Cervix uteri, Portio vag.	2	0	2	0	2	0	2
Haut	3	0	3	0	3	0	3
Skelettmuskel	3	0	3	0	3	0	3
Plazenta	1	0	1	0	1	0	1
Rückenmark	3	0	3	0	3	3	0
Großhirnrinde	3	0	3	0	3	1	2
Kleinhirn	3	0	3	0	3	3	0
Corpus pineale	2	0	2	0	2	2	0
Hypophyse	3	0	3	0	3	3	0
Knochenmark	2	0	2	0	2	0	2
Blut	2	0	2	0	2	0	2

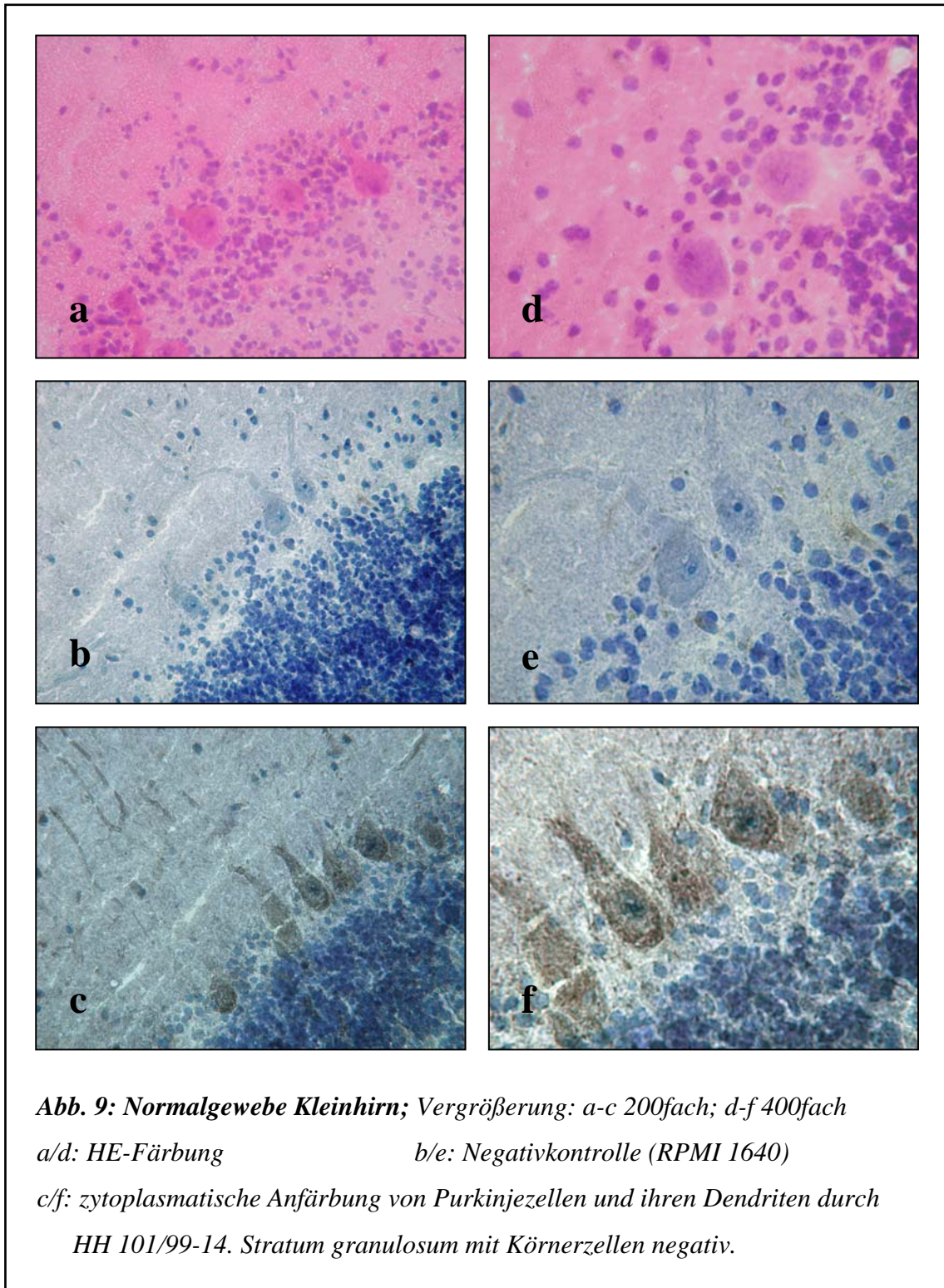
Während HH 98/81-33-154 und HH 99/71-81-149 auf keinem der untersuchten Gewebe eine positive Reaktion aufwiesen, zeigte HH 101/99-14 auf 7 der 38 Organe eine eindeutige Anfärbung zellulärer oder perizellulärer Strukturen.

Die einzigen Kernfärbungen betrafen die mehrschichtigen Plattenepithelien von Zunge und Ösophagus. Neben der besonders hervorgehobenen zytoplasmatischen Anfärbung von Purkinjezellen im Kleinhirn wurden außerdem positive Zellen in der Hypophyse gefunden. Zudem zeigten einzelne Neuronenfortsätze im Rückenmark und in der Großhirnrinde sowie interzelluläre filamentöse Strukturen im Corpus pineale eine Anfärbung.

In *Abb. 6 bis 9* werden einige positive Reaktionen von HH 101/99-14 auf verschiedenen Normalgeweben vorgestellt.







3.1.3 Fetale Gewebe

Mit Hilfe der Färbung verschiedener fetaler Gewebe soll untersucht werden, ob es sich bei den von den Antikörpern gebundenen tumorassoziierten Antigenen möglicherweise um Moleküle handelt, die normalerweise während der fetalen Differenzierungsphase zur Expression kommen.

Nachstehende Färbungsergebnisse wurden bei den 13 insgesamt getesteten verschiedenen fetalen Organen (16. bis 24. Schwangerschaftswoche; unterschiedliches Geschlecht) ermittelt:

Tab. 4: Färbungsergebnisse auf fetalen Geweben

Organ	Anz. gef.	HH 98/81-33-154		HH 99/71-81-149		HH 101/99-14	
		+	-	+	-	+	-
Lunge	1	0	1	0	1	1	0
Magen	1	0	1	0	1	0	1
Ileum	1	0	1	0	1	0	1
Pankreas	1	0	1	0	1	1	0
Leber	1	0	1	0	1	0	1
Milz	1	0	1	0	1	0	1
Thymus	1	0	1	0	1	0	1
Niere	1	0	1	0	1	0	1
Rückenmark	1	0	1	0	1	1	0
Großhirnrinde	1	0	1	0	1	1	0
Kleinhirn	1	0	1	0	1	0	1
Corpus pineale	1	0	1	0	1	0	1
Hypophyse	1	0	1	0	1	1	0

Wie schon bei den Normalgeweben zeigten sowohl HH 98/81-33-154 als auch HH 99/71-81-149 keinerlei positive Reaktion, wohingegen mit HH 101/99-14 auf 5 Geweben eine Anfärbung festgestellt wurde. So ließen sich im Lungen- und Pankreasgewebe einige positive Zellformationen nachweisen, und in der Großhirnrinde sowie in der Hypophyse traten abgegrenzte zytoplasmatische Anfärbungen auf. Im Rückenmarksgewebe wurden zwar

keine positiven Neurone oder Nervenzellfortsätze gefunden, jedoch war eine Färbung einzelner Zellen der ependymalen Auskleidung des Canalis centralis feststellbar.

3.1.4 Tumorgewebe

Da antigene Determinanten nicht auf eine einzige Tumorart beschränkt sein müssen, sondern entartete Zellen verschiedenen histologischen Ursprungs dasselbe Antigen exprimieren können, besteht die Möglichkeit, daß die zu untersuchenden Antikörper auch positive Reaktionen mit anderen Tumorgeweben zeigen. Um dies zu überprüfen, wurden 38 verschiedene solide sowie nicht solide Tumorarten gefärbt. Wenn möglich wurde wiederum Material von mehreren Patienten unterschiedlichen Geschlechts getestet.

Wie schon bei den Normalgeweben zeigte sich auch hier eine unspezifische Anfärbung von Bindegewebe und Sekreten.

Folgende Ergebnisse wurden ermittelt:

Tab. 5: Färbungsergebnisse auf Tumorgewebe

Tumortyp	Anz. gef.	HH 98/81-33-154		HH 99/71-81-149		HH 101/99-14	
		+	-	+	-	+	-
Schilddrüsenkarzinom	2	0	2	0	2	0	2
Bronchial-Ca, Adeno-Ca	3	0	3	0	3	2	1
Bronchial-Ca, plattenepith.	3	1	2	0	3	0	3
Bronchial-Ca, kleinzellig	1	0	1	0	1	0	1
Bronchial-Ca, großzellig	1	0	1	0	1	1	0
Bronchial-Ca, Karzinoid	1	0	1	0	1	0	1
Magen, Adenokarzinom	3	0	3	0	3	0	3
Ösophagus, Plattenep.-Ca	3	0	3	0	3	0	3
Pankreas, Adenokarzinom	2	0	2	0	2	0	2
Hepatozelluläres Karzinom	2	0	2	0	2	0	2
Cholangiozell. Karzinom	1	0	1	0	1	0	1

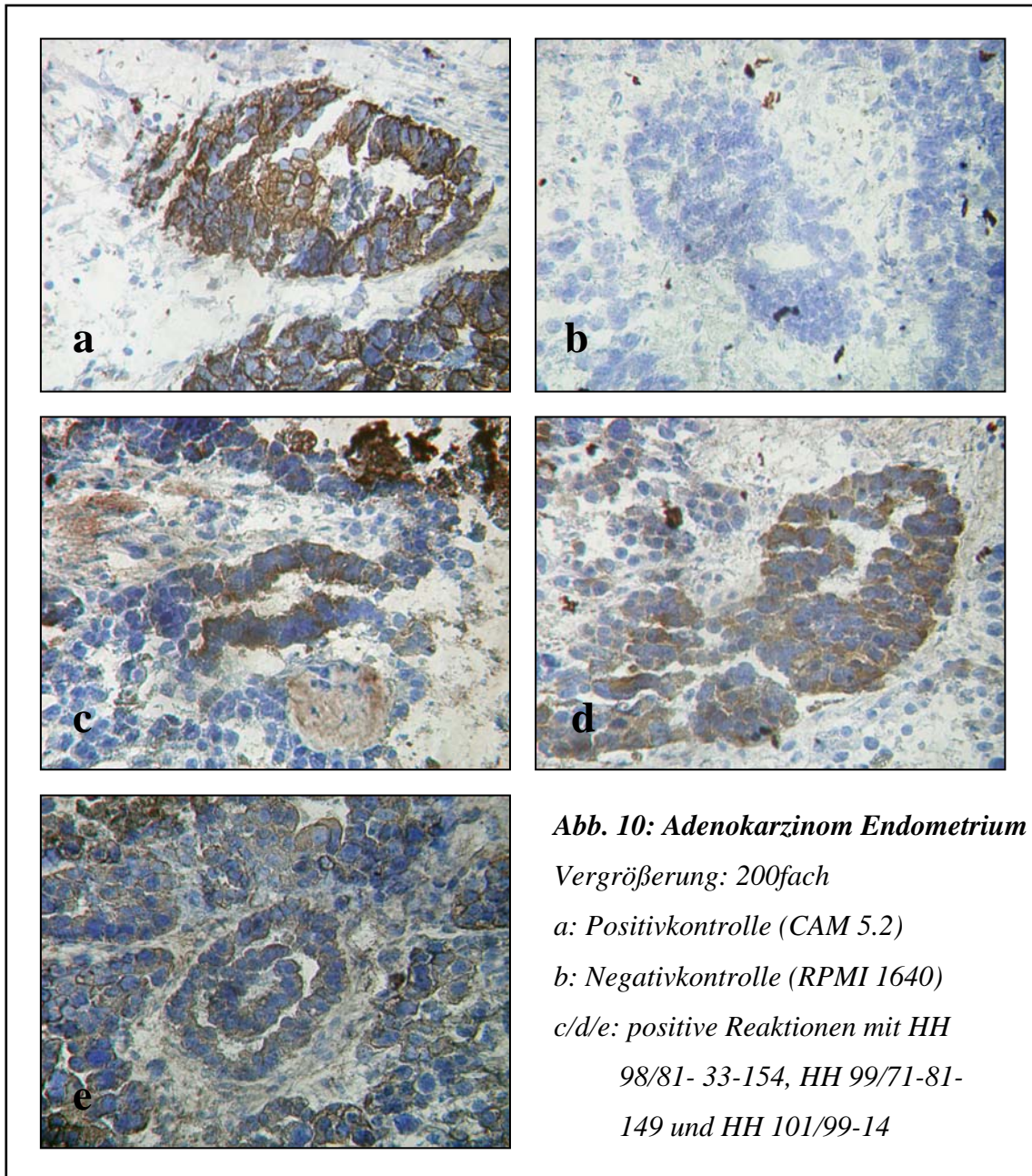
Tumortyp	Anz. gef.	HH 98/81-33-154		HH 99/71-81-149		HH 101/99-14	
		+	-	+	-	+	-
Nierenzellkarzinom	2	0	2	0	2	0	2
Nephroblastom	2	0	2	0	2	0	2
Blase, Urothelkarzinom	1	0	1	0	1	0	1
Mammakarzinom, duktal	3	0	3	0	3	2	1
Mammakarzinom, lobulär	1	0	1	0	1	0	1
Endometrium, Adeno-Ca	1	1	0	1	0	1	0
Ovar, Adenokarzinom	2	0	2	0	2	1	1
Prostata, Adenokarzinom	3	0	3	0	3	0	3
Seminom	1	0	1	0	1	0	1
Dottersacktumor (männl.)	1	0	1	0	1	0	1
Teratom (weibl.)	1	0	1	0	1	0	1
Teratokarzinom (männl.)	1	0	1	0	1	1	0
Melanom	3	0	3	0	3	0	3
Thymom	3	0	3	0	3	0	3
Fibrosarkom	1	0	1	0	1	0	1
Myxofibrosarkom	2	0	2	0	2	0	2
Rhabdomyosarkom	2	0	2	0	2	0	2
Leiomyosarkom	3	0	3	0	3	0	3
Neuroblastom	1	0	1	0	1	0	1
Plattenep.-Ca Oropharynx	1	0	1	0	1	0	1
Plattenep.-Ca Sinus sphen.	1	0	1	0	1	0	1
akute myel. Leukämie	1	0	1	0	1	0	1
chron. lymph. Leukämie	1	0	1	0	1	0	1
Foll. NHL Grad III	1	0	1	0	1	0	1
Burkitt-Lymphom	1	0	1	0	1	0	1
MALT-Lymphom	1	0	1	0	1	0	1

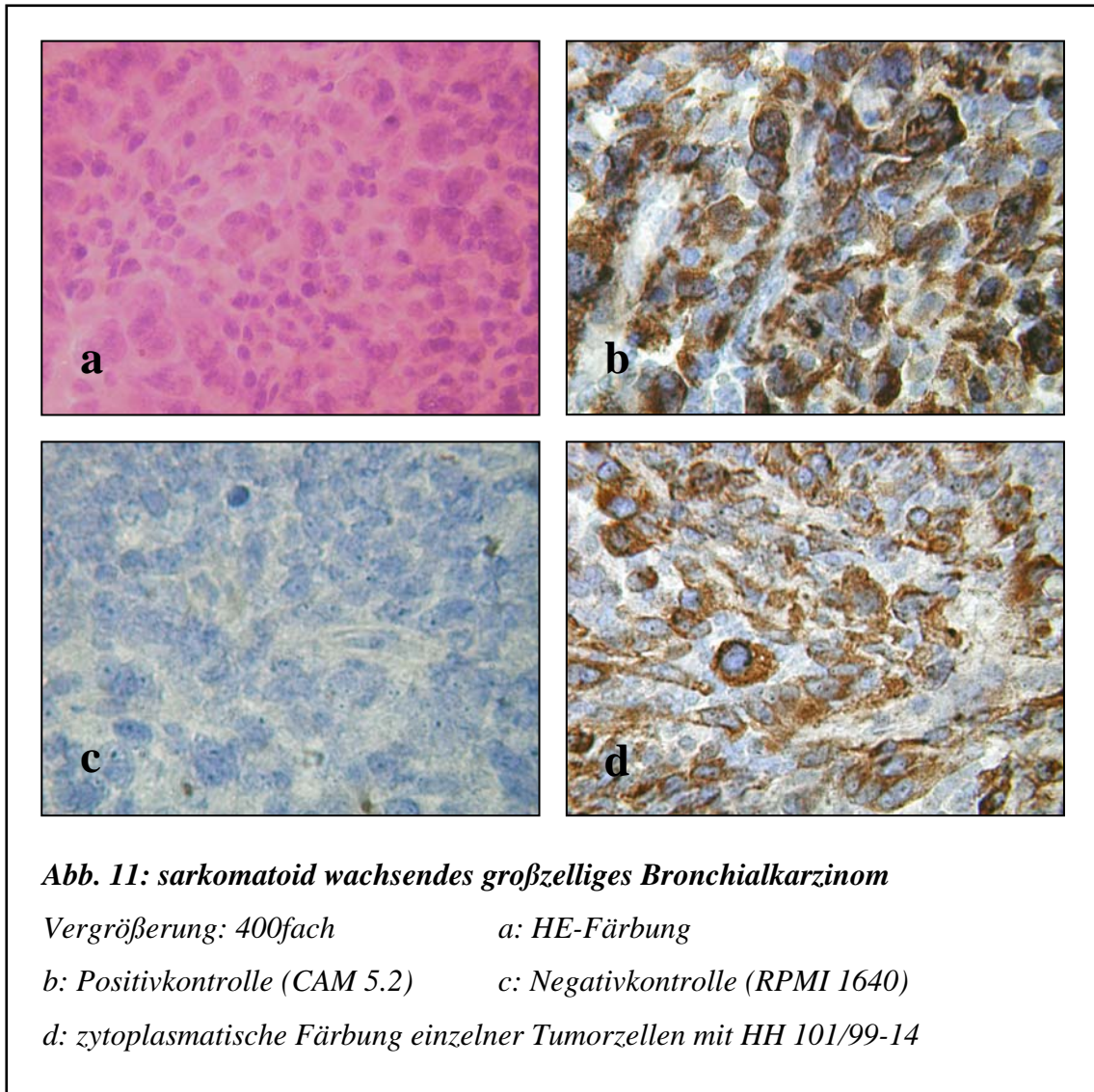
Mit HH 98/81-33-154 wurden bei einem von insgesamt drei plattenepithelialen Bronchialkarzinomen positive Tumorzellnester gefunden, die hingegen von keinem der anderen beiden Antikörper angefärbt wurden. Alle drei untersuchten Antikörper reagierten dagegen mit dem Adenokarzinom des Endometriums. Die größte Anzahl positiver Ergebnisse lieferte HH 101/99-14, der bei zwei von drei dukталen Mammakarzinomen eine Anfärbung lumennaher Epithelzellen zeigte sowie mit Tumorzellformationen in ebenfalls zwei von drei bronchialen Adenokarzinomen reagierte. Weiterhin konnte eine positive Reaktion mit einzelnen Tumorzellen eines undifferenzierten, z.T. sarkomatoid wachsenden großzelligen Bronchialkarzinoms sowie bei einem von zwei Adenokarzinomen des Ovars festgestellt werden, und schließlich war eine Anfärbung von Tumorzellformationen eines Teratokarzinoms erkennbar.

Bei den beschriebenen Färbungsergebnissen fiel auf, daß HH 98/81-33-154 und HH 99/71-81-149 im Unterschied zu den Färbungen der kolorektalen Karzinome nicht immer identische Ergebnisse aufwiesen, und weiterhin zeigte sich eine Akkumulation positiver Färbungen bei Karzinomen bronchialen Ursprungs.

Abb. 10 und 11 (s. S. 38, 39) zeigen zwei positive Reaktionen der Antikörper auf Tumorgewebe.

Nach Auswertung aller Ergebnisse wird deutlich, daß HH 98/81-33-154 und HH 99/71-81-149 nur relativ wenige positive Reaktionen mit kolorektalen Karzinomen und anderen Tumoren zeigen. Normale und fetale Gewebe werden hingegen nicht angefärbt. Positive Resultate sind sowohl auf plattenepithelial als auch auf drüsig differenzierten Tumoren zu beobachten. HH 101/99-14 reagiert dagegen mit einer Vielzahl von Geweben, wobei insgesamt eine Affinität zu Strukturen des ZNS (normales Rückenmark, Großhirn, Kleinhirn, Corpus pineale, Hypophyse; fetales Rückenmark, Großhirn, Hypophyse) erkennbar ist. Außerdem besteht die Tendenz, Tumoren mit drüsiger Differenzierung anzufärben (z.B. Adenokarzinome der Lunge, des Endometriums oder des Ovars). Insgesamt wurden 8 Tumoren von allen drei Antikörpern angefärbt. Neben 7 kolorektalen Karzinomen handelt es sich dabei um das Endometriumkarzinom.





3.2 Proliferationstest (MTT-Assay)

Mit Hilfe des MTT-Tests wurde die Proliferation von Kolonkarzinomzellen der Zelllinien HT-29, CACO-2, COLO 206F sowie COLO 320 in Abhängigkeit von der Anwesenheit der drei Antikörper HH 98/81-33-154, HH 99/71-81-149 und HH 101/99-14 untersucht. Hierbei wurden die Kontrollen bzw. die antikörperhaltigen Überstände sowohl unver-

dünnt als auch im Verhältnis 1:1 mit frischem Medium eingesetzt, so daß folgende Antikörperkonzentrationen erreicht wurden:

HH 98/81-33-154:	44,8 µg/ ml bzw. 22,4 µg/ ml
HH 99/71-81-149:	18,1 µg/ ml bzw. 9,05 µg/ ml
HH 101/99-14:	79,7 µg/ ml bzw. 39,85 µg/ ml

Auf den Zelllinien HT-29, COLO 206F und COLO 320 ließ sich sowohl nach 24- als auch nach 48ständiger Inkubation weder eine eindeutige Stimulation noch eine Hemmung der Zellproliferation verzeichnen, was *Abb. 12* veranschaulicht.

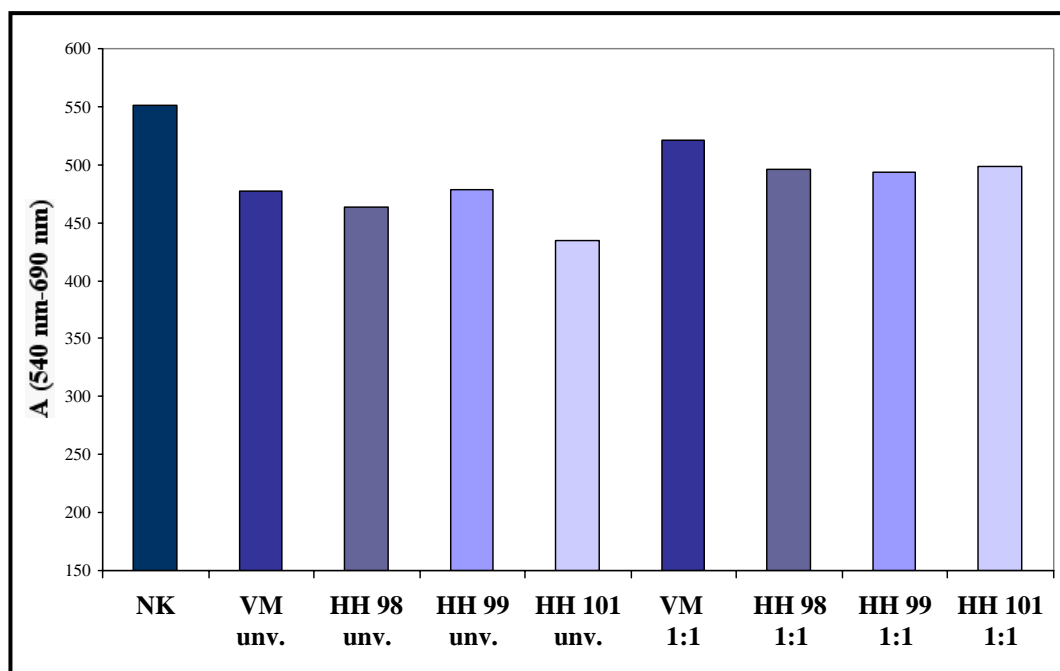


Abb. 12: MTT-Assay mit Zellen der Zelllinie COLO 206F; Auswertung nach 24 Stunden

Zellen der Zelllinie COLO 206F wurden für 24 Stunden in einer 96-Well-Platte im Brutschrank (37°C, 7% CO₂) mit 50 µl der unverdünnten bzw. im Verhältnis 1:1 verdünnten Antikörperüberstände HH 98/81-33-154, HH 99/71-81-149 und HH 101/99-14 inkubiert, mit 50 µl MTT-Lösung (5 mg/ ml 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid in PBS) versetzt, für weitere 20 min inkubiert und schließlich bei 2800 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 150 µl DMSO aufgenommen, die Farbintensität im ELISA-Reader bestimmt und aus der Differenz der Absorption bei $\lambda = 540$ und $\lambda = 690$ nm die Proliferationsrate errechnet. NK: Negativkontrolle (frisches RPMI 1640-Medium); VM: verbrauchtes RPMI 1640-Medium (unverdünnt und 1:1 verdünnt)

Dagegen zeigte sich auf der Zelllinie CACO-2 mit den unverdünnten Überständen der Antikörper HH 98/81-33-154 und HH 101/99-14 in den nach 24 Stunden ausgewerteten Ansätzen eine im Vergleich zur Negativkontrolle mit verbrauchtem Medium um das 0,76- bzw. 0,82fache verminderte Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen. Dieser Effekt war auch noch in den Auswertungen nach 48 Stunden zu beobachten, wobei hier die Dehydrogenaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle um das 0,87- bzw. 0,77fache abgenommen hatte. Mit unverdünntem HH 99/71-81-149 konnte zwar ebenfalls ansatzweise eine Hemmung der Zellproliferation gemessen werden, diese war jedoch weniger deutlich als bei den beiden anderen Antikörpern. Mit den im Verhältnis 1:1 verdünnten Überständen konnte hingegen weder nach 24- noch nach 48stündiger Inkubation eine vergleichbare Hemmung mitochondrialer Dehydrogenasen verzeichnet werden. *Abb. 13 und 14* verdeutlichen diesen Sachverhalt.

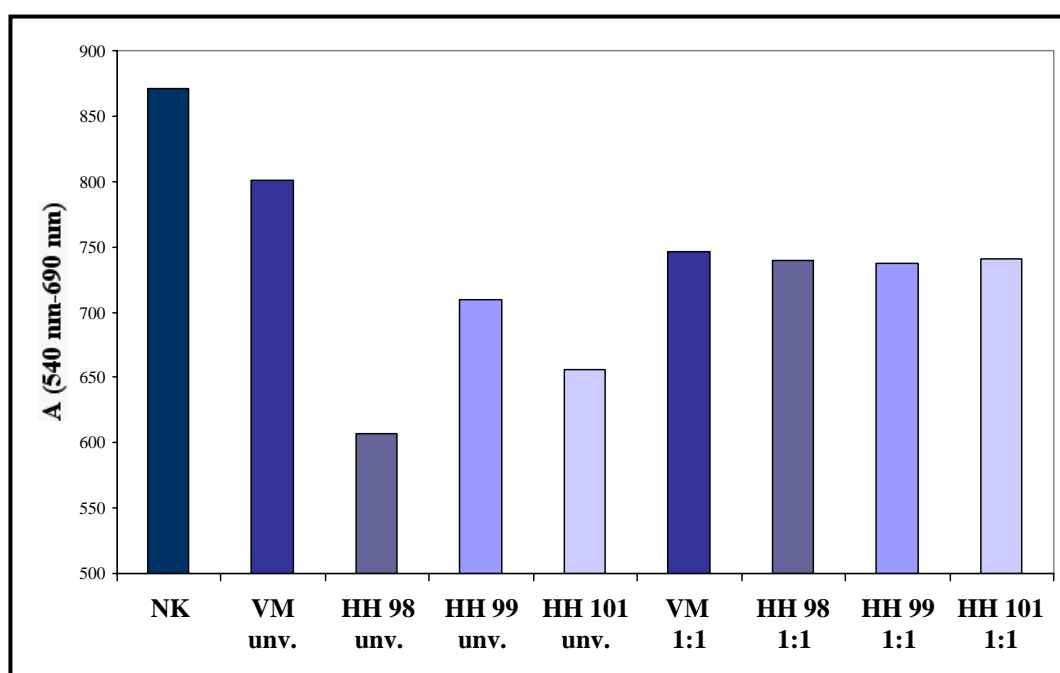


Abb. 13: MTT-Assay mit Zellen der Zelllinie CACO-2; Auswertung nach 24 Stunden

Zellen der Zelllinie CACO-2 wurden für 24 Stunden in einer 96-Well-Platte im Brutschrank (37°C, 7% CO₂) mit 50 µl der unverdünnten bzw. im Verhältnis 1:1 verdünnten Antikörperüberstände HH 98/81-33-154, HH 99/71-81-149 und HH 101/99-14 inkubiert, mit 50 µl MTT-Lösung (5 mg/ ml 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid in PBS) versetzt, für weitere 20 min inkubiert und schließlich bei 2800 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 150 µl DMSO aufgenommen, die Farbintensität im ELISA-Reader bestimmt und aus der Differenz der Absorption bei $\lambda = 540$ und $\lambda = 690$ nm die Proliferationsrate errechnet. NK: Negativkontrolle (frisches RPMI 1640-Medium); VM: verbrauchtes RPMI 1640-Medium (unverdünnt und 1:1 verdünnt)

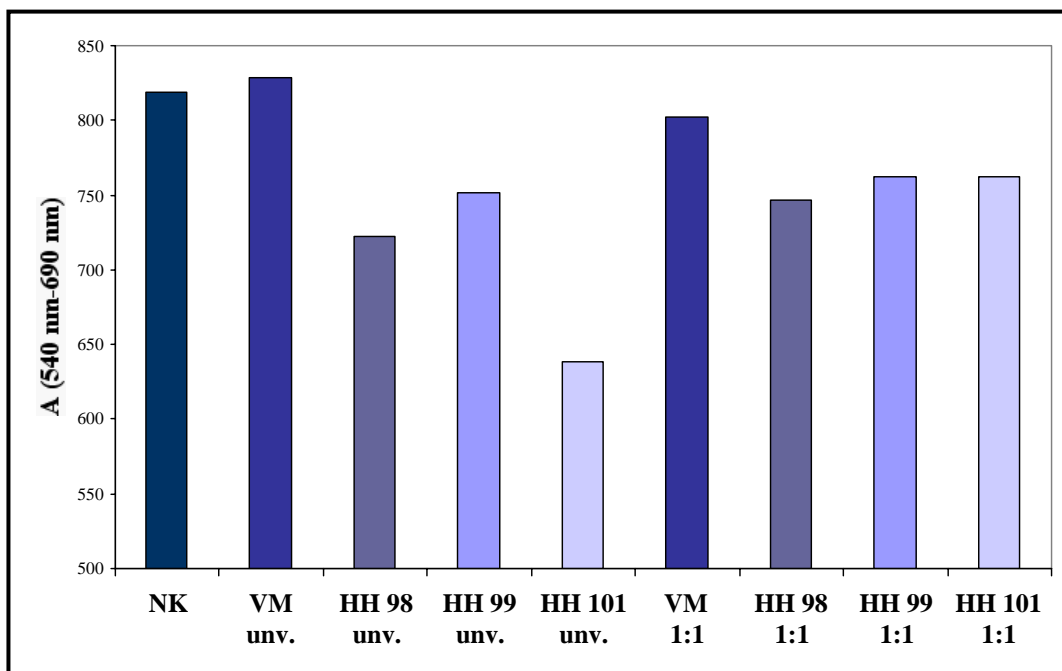


Abb. 14: MTT-Assay mit Zellen der Zelllinie CACO-2; Auswertung nach 48 Stunden

Zellen der Zelllinie CACO-2 wurden für 48 Stunden in einer 96-Well-Platte im Brutschrank (37°C, 7% CO₂) mit 50 µl der unverdünnten bzw. im Verhältnis 1:1 verdünnten Antikörperüberstände HH 98/81-33-154, HH 99/71-81-149 und HH 101/99-14 inkubiert, mit 50 µl MTT-Lösung (5 mg/ ml 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid in PBS) versetzt, für weitere 20 min inkubiert und schließlich bei 2800 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 150 µl DMSO aufgenommen, die Farbintensität im ELISA-Reader bestimmt und aus der Differenz der Absorption bei $\lambda = 540$ und $\lambda = 690$ nm die Proliferationsrate errechnet. NK: Negativkontrolle (frisches RPMI 1640-Medium); VM: verbrauchtes RPMI 1640-Medium (unverdünnt und 1:1 verdünnt)

3.3 Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche, Mannheim)

Die Durchführung des Cell Death Detection ELISA^{PLUS} hatte die Intention, mit Hilfe dieses Assays eine Aussage darüber treffen zu können, ob einer der beiden Antikörper HH 98/81-33-154 oder HH 99/71-81-149 auf Zellen der Zelllinie CACO-2 Apoptose induziert. Der als Positivkontrolle verwendete käuflich erworbene Antikörper CD95 Fas bzw. die antikörperhaltigen Zellkulturüberstände wurden hierbei in den folgenden Konzentrationen eingesetzt:

CD95 Fas:	2 µg/ ml
L11/64-28:	61,3 µg/ ml
HH 98/81-33-154:	41,7 µg/ ml
HH 101/99-14:	89,1 µg/ ml

Nach 24stündiger Inkubation zeigten beide zu untersuchenden Antikörper im Vergleich zu den Negativkontrollen eine ausgeprägte Apoptose-Induktion, wobei der Effekt bei HH 98/81-33-154 und bei HH 101/99-14 den der Kontrolle mit L11/64-28 um das 1,58- bzw. um das 1,46fache überstieg (*Abb. 15*).

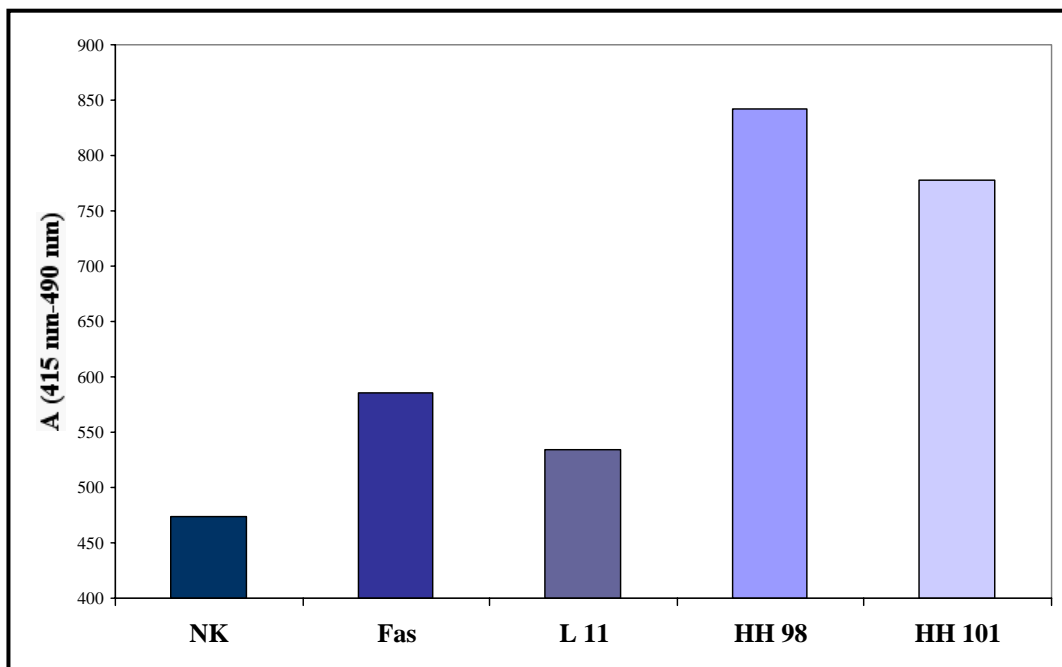


Abb. 15: Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche, Mannheim) mit Zellen der Zelllinie CACO-2; Auswertung nach 24 Stunden

Zellen der Zelllinie CACO-2 wurden mit je 100 µl der unverdünnten Antikörperüberstände von HH 98/81-33-154, HH 101 /99-14 und L11/64-28 sowie CD95 Fas (1:250 in RPMI 1640; 2 µg/ ml) für 24 Stunden in einer 96-Well-Platte im Brutschrank (37°C, 7% CO₂) inkubiert. Nach Zentrifugieren bei 200 x g, Lyse der Zellen bei Raumtemperatur und erneutem Zentrifugieren wurden jeweils 20 µl des Überstands in Streptavidinbeschichtete Mikrotiterplatten übertragen und 80 µl Immunoreagent hinzupipettiert. Die Platten wurden 2 Stunden lang durchmischt und daraufhin jedes Well mit 100 µl ABTS-Lösung (1 ABTS-Tablette in 5 ml Substratpuffer) versetzt. Die Farbintensität wurde im ELISA-Reader bei λ = 415 gegen die Referenzwellenlänge von 490 nm vermessen und daraus die Intensität der antikörperinduzierten Apoptose errechnet. NK: Negativkontrolle (RPMI 1640-Medium); Fas: Positivkontrolle mit Antikörper CD95 Fas

Somit hemmen sowohl HH 98/81-33-154 als auch HH 101/99-14 nicht nur die Proliferation von Kolonkarzinomzellen der Zelllinie CACO-2, was mit Hilfe des MTT-Assay nachgewiesen werden konnte, sondern sie wirken - wie die Ergebnisse des Cell Death ELISA^{PLUS} zeigen - überdies apoptoseinduzierend auf die Zellen ein. Dabei fällt auf, daß HH 98/81-33-154, obwohl er in beiden Tests in einer geringeren Konzentration als HH 101/99-14 eingesetzt wurde, trotzdem vergleichbare und teilweise sogar stärkere Effekte als letzterer hervorrief.

4 Diskussion

Die humanen monoklonalen Antikörper HH 98/81-33-154, HH 99/71-81-149 und HH 101/99-14 wurden in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. H.P. Vollmers am Pathologischen Institut der Universität Würzburg mit Hilfe der Hybridomatechnologie aus immortalisierten B-Zellen eines Rektumkarzinompatienten isoliert. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse der immunhistochemischen und zellbiologischen Charakterisierung dieser Antikörper sollen Aufschluß über eine mögliche Eignung der Antikörper für die Therapie kolorektaler Karzinome geben und einen Beitrag zur Definition neuer tumorspezifischer bzw. tumorassoziierter Antigene leisten.

Während tumorspezifische Antigene auf einen bestimmten Tumorzelltyp beschränkt sind und weder auf gesunden noch auf anderen neoplastischen Zellen gefunden werden können (Old, 1981), handelt es sich bei tumorassozierten Antigenen um Moleküle, die auf Tumorzellen in höherer Dichte als auf normalen Zellen vorkommen oder in früheren Entwicklungsstufen exprimiert wurden (Müller et al., 2001). Um eine befriedigende Effektivität der Antikörper zu gewährleisten und unerwünschte Nebenwirkungen an anderen Geweben zu vermeiden, sollten die Zielantigene der Antikörper in ausreichender Dichte auf der Zelloberfläche exprimiert werden und möglichst spezifisch für die Tumorzellen sein (Borchmann et al., 2001).

Die Resultate der Gewebefärbungen lassen erste Rückschlüsse auf die Art und Verteilung des spezifischen Antigens der einzelnen Antikörper zu, wobei bedacht werden muß, daß für die Arbeit nur eine Auswahl der wichtigsten Gewebetypen getestet werden konnte und deshalb weitere positive Reaktionen möglicherweise unentdeckt geblieben sind.

Bei der Auswertung der Ergebnisse fiel auf, daß die Antikörper HH 98/81-33-154 und HH 99/71-81-149 bis auf wenige Abweichungen bei der Färbung einzelner Nicht-Kolon-Tumoren identische Reaktionen mit den verschiedenen Gewebetypen zeigen. Es ist daher denkbar, daß sich beide Antikörper gegen Antigene richten, die nur geringe Unterschiede in der molekularen Struktur und Verteilung auf den Geweben aufweisen.

HH 98/81-33-154 und HH 99/71-81-149 zeigen im Vergleich zu HH 101/99-14 deutlich weniger positive Resultate auf kolorektalen Karzinomen und Tumoren anderen histologi-

schen Ursprungs und reagieren weder mit nicht neoplastischem adultem noch mit fetalem Gewebe. Daraus könnte man schließen, daß es sich bei den von HH 98/81-33-154 und HH 99/71-81-149 erkannten antigenen Determinanten um vergleichsweise selten vorkommende Moleküle handeln muß, die zudem weder auf gesunden Zellen noch während der fetalen Entwicklungsphase exprimiert werden. Es wäre denkbar, daß es sich um relativ spezifische, nur von einigen kolorektalen Karzinomen exprimierte Antigene handelt, die sich nicht von Molekülen gesunder Zellen ableiten, so daß die gegen sie gerichteten Antikörper keinerlei Kreuzreaktionen mit gesundem Gewebe aufweisen. Insbesondere die fehlende Reaktion mit normaler Kolon-, Rektum- und Dünndarmmukosa stützt diese Vermutung. Allerdings exprimieren auch einige andere Tumoren (platteneitheliale Bronchialkarzinome, Adenokarzinome des Endometriums) dieses Antigen, so daß man nicht von einem echten tumorspezifischen, d.h. nur auf eine einzige Tumorart beschränkten Antigen (Old, 1981) sprechen kann.

Da die Zahl der Antikörper-Antigen-Bindungen nicht nur davon abhängt, in welcher Kopienzahl ein Antigen auf einem Gewebe exprimiert wird, sondern auch davon, welche Affinität der Antikörper zu seinem Antigen aufweist, könnte auch eine geringe Affinität von HH 98/81-33-154 und HH 99/71-81-149 zu ihren Antigenen die Ursache dafür sein, daß insgesamt nur wenige positive Färberesultate zu beobachten waren.

Die Anfärbung einer relativ großen Anzahl verschiedener Gewebe durch HH 101/99-14 deutet dagegen darauf hin, daß der Antikörper entweder eine sehr hohe Affinität zu seinem Antigen haben, oder aber daß das Antigen ein auf verschiedenen Zellen diverser Gewebe vorkommendes Molekül sein muß. Es wird offenbar nicht nur von zahlreichen kolorektalen Karzinomen und vielen anderen Tumoren (z.B. duktales Mammakarzinome, Bronchialkarzinome, Adenokarzinome des Ovars oder des Endometriums) exprimiert, sondern ist auch auf verschiedenen normalen Geweben (s.u.) nachweisbar.

Wie HH 98/81-33-154 und HH 99/71-81-149 färbt auch HH 101/99-14 weder normale Kolon- noch Rektum- oder Dünndarmmukosa an, was darauf hindeutet, daß es sich bei dem Antigen nicht um einen Bestandteil gesunder Dick- und Dünndarmepithelien handelt. Da die Expression fetaler Antigene durch neoplastische Zellen ein bekanntes Phänomen ist (Cariani et al., 1991), läßt die Anfärbung fetaler Organe (Pankreas, Lunge, Großhirn, Hypophyse, Rückenmark) durch HH 101/99-14 ferner den Schluß zu, daß dieser Antikörper ein onkofetales Antigen erkennt.

Die Kreuzreaktionen von HH 101/99-14 mit Normalgewebe betreffen zum einen die mehrschichtigen Plattenepithelien von Zunge und Ösophagus und zum anderen zentralnervöse Strukturen (Purkinjezellen im Kleinhirn, hypophysäre Zellen, Neuronenfortsätze im Rückenmark und in der Großhirnrinde, interzelluläre Filamente des Corpus pineale).

Die Anfärbung von Kernen der Plattenepithelzellen von Zunge und Ösophagus weist darauf hin, daß das von HH 101/99-14 erkannte Antigen im Zellkern mehrschichtiger Epithelverbände des Verdauungstraktes lokalisiert sein muß, wohingegen auf dem unverhornten mehrschichtigen Plattenepithel der Portio vaginalis der Cervix uteri und auf dem verhornten mehrschichtigen Plattenepithel der Epidermis keine derartige Kernfärbung beobachtet wurde. Die Nebenwirkungen infolge dieser Kreuzreaktion dürften jedoch bei therapeutischem Einsatz des Antikörpers vernachlässigbar sein, da nukleäre Antigene für das Immunsystem offenbar nicht zugänglich sind (Giometto et al., 1999 b) und somit HH 101/99-14 seine Wirkung an seinem spezifischen Antigen nicht entfalten kann.

Bei den starken Hintergrundreaktionen auf adultem Milz- und Lebergewebe handelt es sich wahrscheinlich um unspezifische Bindungen des Antikörpers, die sich therapeutisch ebenfalls nicht negativ auswirken sollten.

Die Affinität von HH 101/99-14 zu zentralnervösen und dabei vor allem zu zerebellären Strukturen kann unter dem Aspekt der sog. paraneoplastischen Syndrome betrachtet werden. Es handelt sich hierbei um Symptomkomplexe, die mit neoplastischen Erkrankungen assoziiert sind, aber weder durch das lokale noch durch das metastatische Wachstum des Tumors erklärt werden können (Wagner, 1990). Die Syndrome werden vielmehr auf eine gestörte Bildung und Abgabe von Wirkstoffen (z.B. Zytokine, Hormone, Hormonvorläufersubstanzen oder Antikörper) durch die Tumorzellen zurückgeführt (Odell, 1997; Patel et al., 1993). Bei etwa 10 bis 15 % der Patienten mit Tumorleiden werden paraneoplastische Syndrome beobachtet. Man unterscheidet hierbei Endokrinopathien (Odell, 1997) wie z.B. das Cushing-Syndrom, hämatologische Manifestationen (z.B. Hyperkoagulabilität) (Patel et al., 1993), dermatologische Störungen (Cohen et al., 1997) sowie neurologische und muskuläre Syndrome.

Paraneoplastische neurologische Syndrome können sich in jedem Anteil des Nervensystems manifestieren (Posner et al., 1997), und neben zentralen und peripheren Störungen

kann auch die neuromuskuläre Verbindung betroffen sein (Scaravilli et al., 1999). Zu den Krankheitsbildern des Gehirns zählen unter anderem die subakute zerebelläre Degeneration, das Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom oder die limbische Enzephalitis. Im Rückenmark werden eine Myelitis, die Motoneuronenerkrankung sowie das Stiff-man-Syndrom beobachtet, und periphere paraneoplastische Störungen treten als subakute sensible Polyneuropathie, autonome Neuropathie oder Neuromyotonie in Erscheinung. Zu den Erkrankungen des neuromuskulären Übergangs zählen schließlich das Lambert-Eaton-Syndrom und die Myasthenia gravis (Kaiser, 1999). Am häufigsten treten die insgesamt sehr seltenen paraneoplastischen neurologischen Syndrome in Assoziation mit kleinzelligen Bronchial-, Mamma- und Ovarialkarzinomen auf (Kaiser, 1999). Obwohl die genaue Pathogenese der meisten Krankheitsbilder noch weitgehend ungeklärt ist (Kaiser, 1999), konnten bei einigen Syndromen spezifische Antikörper in Serum und Liquor der Tumorpatienten nachgewiesen werden (Dalmau et al., 1999), die Teil einer sowohl gegen den Tumor als auch gegen das Nervensystem gerichteten Immunantwort sind (Posner et al., 1997). Man vermutet, daß es sich um Antikörper gegen Tumorantigene handelt, die mit Proteinen des Nervensystems kreuzreagieren (Giometto et al., 1999 b). Eine pathogenetische Relevanz von Antikörpern ist bisher allerdings nur für das Lambert-Eaton-Syndrom, die Myasthenia gravis sowie die Neuromyotonie gesichert (Dalmau et al., 1999). Bisher wurden mehr als zehn verschiedene Antikörper isoliert (z.B. Anti-Hu, -Ri, -Yo, -Tr etc.), die bestimmten Tumorerkrankungen und klinischen Syndromen zugeordnet werden können (Kaiser, 1999) und deren spezifische Antigene größtenteils bekannt sind (Giometto et al., 1999 b).

Da paraneoplastische Syndrome häufig schon vor der Manifestation tumorbedingter Symptome auftreten (Giometto et al., 1999 a), können die in Serum und Liquor nachweisbaren Antikörper zur Detektion der zugrundeliegenden Neoplasie herangezogen werden (Dalmau et al., 1999). Trotz der gravierenden immunologisch bedingten Schädigung des Nervensystems (Giometto et al., 1999 b) konnte bei vielen Patienten mit paraneoplastischen Syndromen ein günstigerer Verlauf der Tumorerkrankung im Vergleich zu Krebspatienten ohne paraneoplastische Immunantwort beobachtet werden, was auf die spezifische immunologische Reaktion gegen die Tumorantigene zurückgeführt wird (Dalmau et al., 1999).

Im Hinblick auf die zytoplasmatische Anfärbung von Purkinjezellen der Kleinhirnrinde durch den Antikörper HH 101/99-14 lohnt es sich, das Krankheitsbild der subakuten zerebellären Kleinhirndegeneration etwas genauer zu betrachten. Bei Patienten mit diesem klinisch unter anderem durch Gangataxie, Nystagmus, Dysarthrie, Pyramidenbahnzeichen und weiteren neurologischen Erscheinungen gekennzeichneten paraneoplastischen Syndrom (Kaiser, 1999) konnten verschiedene gegen gesundes Kleinhirngewebe gerichtete Antikörper (Anti-Yo, -Hu, -Tr, -Ri, -VGCC) nachgewiesen werden (Kaiser, 1999), die teilweise wie HH 101/99-14 eine zytoplasmatische Färbung von Purkinjezellen zeigen (Scaravilli et al., 1999). Obwohl dieses paraneoplastische Syndrom, das bei weniger als 1 % der Tumorpatienten auftritt (Kaiser, 1999), prinzipiell mit jeder Tumorart assoziiert sein kann (Scaravilli et al., 1999), wurden bisher bei den meisten Erkrankten gynäkologische Tumoren, Lungentumoren und Hodgkin-Lymphome diagnostiziert (Scaravilli et al., 1999).

Die beschriebene Anfärbung von Purkinjezellen durch HH 101/99-14 ist demnach möglicherweise ein Indiz für das Vorliegen eines zerebellären paraneoplastischen Syndroms bei dem Tumorpatienten, aus dem der Antikörper isoliert worden ist. Es liegen allerdings keine Informationen über den neurologischen Status dieses Patienten vor.

Für die Einsetzbarkeit des Antikörpers in der Behandlung kolorektaler Karzinome könnte seine Affinität zu Kleinhirngewebe eine große Bedeutung haben, da die Patienten nach therapeutischer Applikation möglicherweise unter neurologischen Symptomen leiden und schlimmstenfalls makro- und mikroskopische Zeichen einer Kleinhirndegeneration (Kleinhirnatrophie, Purkinjezellverlust, Axonschwellung, Mikroglia proliferation etc.; Scaravilli et al., 1999) entwickeln könnten. Diese unerwünschten Nebenwirkungen lassen sich jedoch nicht mit Sicherheit voraussagen, und nur durch tierexperimentelle Tests und klinische Studien ließen sich erste Aussagen über die Verträglichkeit des Antikörpers machen. Da noch keine Untersuchungen über die Verteilung des Antikörpers auf die verschiedenen Lösungsräume des Körpers wie z.B. Plasma und Liquor vorliegen und vollständige Antikörper aufgrund ihrer Größe die Blutbahn nur sehr träge verlassen (Borchmann et al., 2001), wäre es sogar denkbar, daß HH 101/99-14 die Blut-Hirn-Schranke nur schwer überwinden und deshalb kaum Affektionen des ZNS hervorrufen kann.

Diese Überlegungen deuten an, daß der therapeutische Erfolg der Antikörper stark von ihren pharmakokinetischen Eigenschaften abhängt. Neben der Verteilung im Organismus müssen hierbei auch die Faktoren Metabolismus, Elimination sowie die Plasmaeiweißbindung der Antikörper berücksichtigt werden.

Bei der Auswertung der verschiedenen Tumorgewebe zeigte sich, daß die histologische Differenzierung der Tumoren Einfluß auf das Färbeverhalten der drei Antikörper hat. Besonders auffällig war die Affinität von HH 101/99-14 zu drüsig differenzierten Tumoren wie z.B. Adenokarzinomen von Lunge, Endometrium oder Ovar. Das mag damit zusammenhängen, daß der Antikörper ursprünglich selbst aus einem Patienten mit einem Adenokarzinom stammt. Weiterhin zeigt sich eine Anfärbung verschiedener Lungenkarzinome (platteneitheliale, großzellige, Adenokarzinome) durch HH 98/81-33-154 und HH 101/99-14, was vermuten läßt, daß insbesondere Tumoren bronchialen Ursprungs die jeweiligen Antigene der Antikörper exprimieren.

Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse der Immunperoxidasefärbung der verschiedenen Gewebetypen lassen sich erste Prognosen für die Eignung der Antikörper als adjuvantes Tumorthapeutikum stellen. Da HH 98/81-33-154 und HH 99/71-81-149 gar keine und HH 101/99-14 nur wenige Kreuzreaktionen mit gesundem Gewebe zeigen, ist anzunehmen, daß alle drei Antikörper gut verträglich sein werden. Die Kernfärbungen durch HH 101/99-14 können dabei wie bereits erwähnt vernachlässigt werden, und nur die Kreuzreaktionen mit Nervengewebe stellen ein mögliches Risiko dar, dem mit Hilfe von Untersuchungen *in vivo* nachgegangen werden muß. Obwohl HH 98/81-33-154 und HH 99/71-81-149 keine Reaktionen mit Normalgewebe aufweisen, was auf eine gute Verträglichkeit schließen läßt, bleibt abzuwarten, wie groß die Ansprechraten unter den Patienten mit kolorektalen Karzinomen sein werden. Da die Antikörper nur etwa 39 % der getesteten kolorektalen Karzinome anfärben, könnte man vermuten, daß insgesamt mehr als die Hälfte aller Tumorpatienten für eine solche Therapie nicht geeignet sind. Bei HH 101/99-14, der mit rund 90 % der getesteten Tumoren reagierte, sind hingegen höhere Ansprechraten zu erwarten.

Mit Hilfe des MTT-Tests konnte gezeigt werden, daß die Antikörper HH 98/81-33-154 und HH 101/99-14 auf Zellen der Kolonkarzinomzelllinie CACO-2 sowohl nach 24- als auch nach 48stündiger Inkubation eine deutliche Hemmung mitochondrialer Dehydrogenasen bewirken. Dieses Ergebnis ist schon allein deswegen bemerkenswert, weil für die Versuche kein gereinigter Antikörper, sondern lediglich Zellkulturüberstand mit relativ geringen Antikörperkonzentrationen verwendet wurde. Es verwundert deshalb auch nicht, daß mit verdünntem Überstand in den Tests kein Effekt beobachtet werden konnte, da hier die Antikörperkonzentrationen zu gering waren, um eine nennenswerte Hemmung der Zellproliferation zu bewirken. Die durch die einzelnen Antikörper erzielten Resultate sind jedoch nur bedingt vergleichbar, da Batches unterschiedlicher Konzentration (HH 98/81-33-154: 44,8 µg/ ml; HH 99/71-81-149: 18,1 µg/ ml; HH 101/99-14: 79,7 µg/ ml) eingesetzt wurden. Umso bemerkenswerter ist es daher, daß HH 98/81-33-154 in der Auswertung nach 24 Stunden eine stärkere Hemmung der Zellproliferation als HH 101/99-14 hervorruft, wohingegen dieser, der ja in nahezu zweifach höherer Konzentration als HH 98/81-33-154 vorlag, anscheinend erst nach weiteren 24 Stunden seine volle Aktivität entfaltet (siehe auch *Abb. 13* und *14*).

Die Tatsache, daß mit HH 99/71-81-149 nur eine schwache Hemmung mitochondrialer Dehydrogenasen zu verzeichnen war, ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß der Antikörper in einer wesentlich geringeren Konzentration als die beiden anderen zum Einsatz kam. Um konzentrationsbedingte Einflüsse auf das Testergebnis ausschalten und eine endgültige Aussage über die proliferationshemmende Aktivität von HH 98/81-33-154, HH 99/71-81-149 und HH 101/99-14 treffen zu können, sollten Versuche mit gereinigten Antikörpern und vergleichbaren Konzentrationen durchgeführt werden.

Die durch den MTT-Assay belegte Proliferationshemmung der Tumorzellen ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA^{PLUS} nachgewiesene antikörperinduzierte Apoptose (s.u.) zurückzuführen. Die Frage, warum nur auf der Zelllinie CACO-2, nicht jedoch auf anderen Kolonkarzinomzellen eine Proliferationshemmung zu beobachten war (siehe *Abb. 12*), kann allerdings nicht erschöpfend beantwortet werden. Die Resistenz dieser Karzinomzellen gegen die antikörpervermittelte Hemmung des Zellwachstums könnte z.B. auf eine verminderte Expression oder den Verlust antigen wirksamer Determinanten (Beatty et al., 2000) zurückgeführt werden.

Obwohl die Bedingungen in Zellkultur nicht den physiologischen Gegebenheiten entsprechen und deshalb die vorliegenden Ergebnisse nicht ohne weiteres auf ein anderes System übertragbar sind, könnte diese Tatsache ein Hinweis dafür sein, daß auch *in vivo* nicht alle Tumoren in gleicher Weise auf die Antikörperbehandlung ansprechen werden.

Auch für die Durchführung des Cell Death Detection ELISA^{PLUS} wurde kein gereinigter Antikörper, sondern wiederum nur Hybridomüberstand verwendet. Dennoch zeigen die Ergebnisse dieses Assays, daß sowohl HH 98/81-33-154 als auch HH 101/99-14 nicht nur die Proliferation von Kolonkarzinomzellen (CACO-2) hemmen, sondern darüber hinaus Apoptose induzieren. Wie schon beim MTT-Test war auch hier ein stärkerer Effekt durch den niedriger konzentrierten (41,7 µg/ ml) Antikörper HH 98/81-33-154 im Vergleich zu HH 101/99-14 (89,1 µg/ ml) zu beobachten.

Apoptose, programmierter Zelltod, beschreibt einen physiologischen Vorgang, mit dessen Hilfe nicht mehr benötigte, defekte oder prämaligne Zellen aus dem Organismus entfernt werden können. Auf diese Weise wird das Gleichgewicht zwischen Zellneubildung und – untergang gewahrt (Kerr et al., 1972). Zellkern- und Chromatinfragmentation, Zellschrumpfung sowie Membranveränderungen stellen charakteristische morphologische Korrelate des Zelltodes dar (Wyllie et al., 1980 a, Wyllie et al., 1984; Cohen, 1992). Apoptose kann unter anderem durch zytotoxische T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen, Zytokine oder Glukokortikoide (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1980 a, b; Wyllie et al., 1984), aber auch durch physikalische Noxen wie Hyperthermie (Takano et al., 1991) induziert werden. Der programmierte Zelltod stellt die effektivste und sicherste Methode dar, um Tumorzellen aus dem Organismus zu entfernen. Da neoplastische Zellen jedoch häufig aufgrund genetischer Alterationen auf die bekannten Apoptosemechanismen nicht mehr ansprechen, wird nach Möglichkeiten gesucht, solche entarteten Zellen mit Hilfe eines externen apoptotischen Signals gezielt angreifen zu können (Hensel et al., 1998). Zwar konnte *in vitro* mit verschiedenen Liganden und monoklonalen Antikörpern gegen den Fas- (APO-1/ CD95) Rezeptor (Gratas et al., 1998) Apoptose auf Tumorzelllinien induziert werden (Suda et al., 1994; Trauth et al., 1989), aber diese Antikörper eignen sich nicht für die Anwendung als Immuntherapeutikum, da ihr Antigen auch von einer Vielzahl nicht neoplastischer Zellarten exprimiert wird (Leithauser et al., 1993) und bei Experimenten *in vivo* toxische Kreuzreaktionen mit Lebergewebe beobachtet wurden

(Ogasawara et al., 1993; Rensing-Ehl et al., 1995). Der erstmals 1989 von Vollmers et al. beschriebene humane monoklonale Antikörper SC-1 hingegen, der durch Bindung an eine Magenkarzinom-assoziierte Isoform von CD55/DAF-B eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert, wodurch schließlich der apoptotische Zelltod eingeleitet wird (Hensel et al., 1998), hat bereits in klinischen Studien seine gute Verträglichkeit bewiesen und stellt ein potentes adjuvantes Immuntherapeutikum für die Behandlung von Magenkarzinomen dar (Vollmers et al., 2000).

Im Hinblick auf diese Ergebnisse läßt der Nachweis der apoptoseinduzierenden Aktivität von HH 98/81-33-154 und HH 101/99-14 darauf hoffen, daß diese beiden Antikörper zukünftig ebenfalls in der Tumorthapie Verwendung finden werden. Besonders der Antikörper HH 98/81-33-154 scheint aufgrund seiner hohen Aktivität auch bei niedriger Konzentration hierfür gut geeignet zu sein.

Da die Antikörper bei der Immunperoxidasefärbung außer mit kolorektalen Karzinomen noch mit einigen anderen Tumorgeweben eine positive Reaktion zeigten, ist weiterhin nicht auszuschließen, daß auch andere Tumorzellpopulationen durch die Antikörper in ihrer Proliferation gehemmt werden oder ebenfalls ein apoptotisches Signal erhalten. Weitere physiologische Tests mit anderen Tumorzelllinien könnten hierüber Aufschluß geben. Um aufdecken zu können, über welchen Mechanismus die Antikörper zum Zelltod führen, ob sie beispielsweise mit zellulären Adhäsionsmolekülen interferieren oder wie SC-1 über ein membrangebundenes Protein ihre Wirkung entfalten, sind weitere funktionelle, molekularbiologische sowie biochemische Untersuchungen notwendig. Insbesondere die Isolierung und Charakterisierung der spezifischen Antigene könnte zur Klärung dieser Frage einen wesentlichen Beitrag leisten. Möglicherweise vermitteln HH 98/81-33-154 und HH 101/99-14 ihre Wirkung über Rezeptormoleküle, die ebenfalls einer Proteinfamilie wie CD55/DAF angehören.

Für die Herstellung monoklonaler Antikörper stehen gegenwärtig zahlreiche Verfahren zur Verfügung, die sich durch charakteristische Vor- und Nachteile unterscheiden.

Die ersten therapeutisch einsetzbaren Antikörper wurden durch Immunisierung von Mäusen mit humanen Antigenen gewonnen (z.B. Edrecolomab, Panorex[®]). Diese murinen Moleküle werden jedoch vom menschlichen Immunsystem als fremd erkannt und mit der Bildung von Anti-Antikörpern (HAMA; human anti-mouse antibody) beantwortet

(Borchmann et al., 2001), was bei wiederholter Applikation zur Neutralisation und Elimination der Antikörper führt und mit einem erhöhten Risiko für allergische bzw. anaphylaktische Reaktionen assoziiert ist. Darüber hinaus binden murine Antikörper nicht an humane Fc-Rezeptoren, so daß sie keine indirekten Wirkungen auf ihre Zielzellen ausüben können (Borchmann et al., 2001).

Um diese unerwünschten Effekte zu vermeiden, können mit Hilfe gentechnischer Methoden Mausantikörper humanisiert werden, indem große Teile des murinen Moleküls mit Ausnahme der Antigenbindungsstellen durch humane Aminosäuresequenzen ersetzt werden (Dickman, 1998; Glennie et al., 2000). Diese chimären Antikörper (z.B. Rituximab, Mabthera[®]; Trastuzumab, Herceptin[®]) zeichnen sich zwar durch eine im Vergleich zu den reinen Mausantikörpern geringere Immunogenität (von Mehren et al., 1996; Winter et al., 1993) und längere Halbwertszeit aus (Lo Buglio et al., 1989), aber auch sie können die Bildung von Anti-Maus-Antikörpern induzieren (Markham et al., 2000).

Die neuesten Forschungsansätze konzentrieren sich auf die Herstellung rein humaner Antikörper, die zur Identifikation tumorspezifischer Antigene und zur Therapie neoplastischer Erkrankungen eingesetzt werden können. Ein Vorteil dieser humanen Antikörper liegt in ihrer im Vergleich zu den murinen Molekülen wirksameren Aktivierung immunologischer Effektormechanismen (Müller et al., 2001), wodurch sie die physiologische Antikörperfunktion besser imitieren (Vaughan et al., 1998). Da sie weder toxische Nebenwirkungen (Vaughan et al., 1998) noch ein immunogenes Potential aufweisen, sind zudem wiederholte Therapiezyklen möglich (Müller et al., 2001).

Humane monoklonale Antikörper können unter anderem durch die Immunisierung transgener Mäuse (sog. „humAb-mouse“) generiert (Tomizuka et al., 2000) oder unter Verwendung großer Phagenbanken (Griffiths et al., 1998) in Prokaryonten exprimiert werden (sog. „phage display“) (Marks et al., 1991; McCafferty et al., 1990). Beide Strategien setzen jedoch das Vorhandensein gereinigter Antigene voraus, so daß sie sich nicht zur Identifizierung neuer Tumorantigene eignen.

Die 1995 von Sahin et al. beschriebene SEREX-Methode (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) beruht auf der Analyse von Tumor-cDNA-Banken mit Hilfe von Serumantikörpern. Sie ermöglicht zwar die systematische Identifikation tumorspezifischer Antigene auf einer Vielzahl neoplastischer Gewebe

(Pfreundschuh, 2000), aber es müssen in der Folge weitere Techniken angewendet werden (z.B. humAb-mouse, phage display), bis als Endprodukt monoklonale Antikörper vorliegen. Somit eignet sich diese Methode weniger zur Herstellung therapeutisch einsetzbarer Antikörper, sie dient vielmehr der tumorbiologischen Forschung und Serodiagnose maligner Tumoren und bildet die molekulare Grundlage für Vakzinierungsstrategien (Türeci et al., 1999).

Die erfolgreichste Methode zur Generierung humaner monoklonaler Antikörper stellt die klassische Hybridomatechnologie dar.

Tumorzellen unterscheiden sich von gesunden Zellen durch die Neu- oder Überexpression bestimmter Moleküle oder Strukturen, die vom Immunsystem als fremd erkannt und mit der Bildung tumorspezifischer T-Zellen und reaktiver Antikörper beantwortet werden. (Vollmers, 2000). Die Bildung solcher Autoantikörper in Patienten mit malignen Erkrankungen (Faiderbe et al., 1991) ist ein häufig beobachtetes Phänomen. Dieses Potential kann therapeutisch genutzt werden, indem durch somatische Hybridisierung von B-Lymphozyten eines Krebspatienten mit einer immortalisierten Heteromyelomzelle Zellklone geschaffen werden (beschrieben in: Vollmers et al., 1989), die tumorspezifische monoklonale Antikörper produzieren. Dieses technisch relativ einfach zu handhabende Verfahren ermöglicht die Herstellung größerer Mengen einzelner Antikörper (Vollmers, 2000) unter Umgehung der xenogenen Immunisierung und gentechnischer Ansätze.

Die auf diesem Weg entstandenen vollständigen Antikörpermoleküle weisen alle Vorteile humaner Immunglobuline auf. Sie ermöglichen nicht nur die Identifizierung tumorspezifischer Antigene, sondern können gleichzeitig als Immuntherapeutikum eingesetzt werden. Es ist daher zu erwarten, daß diese vielversprechende Technologie in Zukunft einen festen Platz in der Herstellung humaner monoklonaler Antikörper für die adjuvante Immuntherapie neoplastischer Erkrankungen einnehmen wird (Vollmers, 1999).

Bereits 1989 isolierten Vollmers et al. mit Hilfe der Hybridomatechnologie einen apoptoseinduzierenden humanen monoklonalen Antikörper (SC-1) aus einem Magenkarzinompatienten. Die bisherigen Ergebnisse einer klinischen Phase-I/II-Studie mit SC-1 zeigen, daß es möglich ist, die im Verlauf der gegen den Tumor gerichteten Immunantwort generierten Antikörper risikoarm immuntherapeutisch einzusetzen, ohne dadurch die klassische Tumorthherapie zu beeinträchtigen (Vollmers, 1999).

Auch die in dieser Arbeit untersuchten Antikörper, die ebenfalls unter Verwendung der Hybridomatechnologie aus einem Patienten mit Dickdarmkrebs isoliert wurden, entstammen einer immunologischen Reaktion auf die als fremd erkannten neoplastischen Zellen und sind damit potentiell als Immuntherapeutikum für die adjuvante Therapie maligner Dickdarntumoren geeignet.

Die Bedeutung tumorspezifischer Antikörper für die immunologische Abwehr maligne entarteter Zellen *in vivo* ist noch weitgehend unklar. Obwohl Tumorzellen vom Immunsystem erkannt und mit der Bildung zytotoxischer Antikörper und T-Lymphozyten beantwortet werden, ist bei vielen Patienten dennoch eine Progredienz des Tumorleidens zu beobachten. Es stellt sich somit die Frage, warum die immunologische Zerstörung dieser Tumorzellen *in vivo* nur unzureichend funktioniert. Neben der Vermutung, daß gegen tumorassoziierte Antigene gerichtete Antikörper erst in einem Stadium der Erkrankung gebildet werden, in dem die Tumormasse schon so groß ist, daß intratumoral gelegene Zellen nicht mehr für die Immunglobuline zugänglich sind, können bestimmte „Immune-escape“-Mechanismen des Tumors als Erklärung für dieses Phänomen herangezogen werden. Zu diesen Fähigkeiten, mit deren Hilfe sich der Tumor der Immunantwort entziehen kann, indem entweder spezifische Immunzellen inaktiviert werden oder die Aktivierung potentieller Effektormechanismen verhindert wird (Velders et al., 1998), zählen unter anderem der Verlust von Tumorantigenen (Beatty et al., 2000) bzw. MHC-Molekülen (Zheng et al., 1999), das sog. Antigen-Shedding (Gopalkrishna et al., 1998) sowie die konstitutive Expression immunsuppressiver Substanzen wie z.B. Zytokine (Real et al., 2001). Ferner sind solide Tumoren durch Antigenheterogenität und eine verminderte Zahl immunologischer Effektorzellen innerhalb des Tumors vor der antikörpervermittelten Immunreaktion geschützt (Müller et al., 2001).

Das Problem der für den Antikörper erschwert zugänglichen intratumoral gelegenen Zellen kann gelöst werden, indem nur Patienten mit minimal residueller Tumorerkrankung einer Antikörpertherapie zugeführt werden (Riethmüller et al., 1993).

Mit den monoklonalen Antikörpern HH 98/81-33-154, HH 99/71-81-149 und HH 101/99-14 stehen drei potentielle Immuntherapeutika für die adjuvante Behandlung kolorektaler Karzinome zur Verfügung. Der Nachweis der Proliferationshemmung sowie die

Apoptose-Induktion auf Tumorzellen *in vitro* bei gleichzeitig geringer Kreuzreaktion mit normalem adultem Gewebe sind vielversprechende Ergebnisse, welche die Basis für weitergehende Untersuchungen darstellen. Da es sich bei den Antikörpern um Immunglobuline humanen Ursprungs handelt, sind Unverträglichkeitsreaktionen, die durch die Gabe von Fremdeiweißen einer anderen Spezies entstehen, nicht zu erwarten.

5 Zusammenfassung

Drei verschiedene mit Hilfe der Hybridomatechnologie aus einem Rektumkarzinompatienten isolierte humane monoklonale Antikörper wurden immunhistochemisch und mit Hilfe zellbiologischer Tests untersucht. Die Ergebnisse der Immunperoxidasefärbung geben erste Hinweise auf die Art und Verteilung der von den Antikörpern erkannten Antigene.

HH 98/81-33-154 und HH 99/71-81-149 färben nur wenige kolorektale Karzinome sowie einige Tumoren verschiedenen histologischen Ursprungs an und zeigen keine Reaktion mit normalen adulten oder fetalen Geweben. HH 101/99-14 reagiert dagegen außer mit zahlreichen Dickdarmkarzinomen auch mit einigen fetalen Geweben, was auf die Expression des spezifischen Antigens während der Fetalperiode schließen läßt. Neben den Kreuzreaktionen mit verschiedenen zentralnervösen Strukturen adulter Normalgewebe, die im Hinblick auf paraneoplastische neurologische Krankheitsbilder von Interesse sind, zeigt der Antikörper weiterhin eine Affinität zu drüsig differenzierten Tumoren.

Im MTT-Assay auf Zellen der Kolonkarzinomzelllinie CACO-2 bewirkte unverdünnter Zellkulturüberstand der Antikörper HH 98/81-33-154 und HH 101/99-14 eine starke Proliferationshemmung. Dieser Effekt konnte sowohl nach 24- als auch nach 48stündiger Inkubation, nicht jedoch mit verdünntem Überstand nachgewiesen werden. Mit Überstand von HH 99/71-81-149 war hingegen nur eine schwache Hemmung mitochondrialer Dehydrogenasen zu verzeichnen. Zellen der Linien HT-29, COLO 206F sowie COLO 320 zeigten sich hingegen resistent gegen die antikörpervermittelte Wachstumshemmung. Mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA^{PLUS} konnte weiterhin belegt werden, daß HH 98/81-33-154 und HH 101/99-14 nicht nur das Wachstum von Tumorzellen hemmen, sondern überdies auf der Zelllinie CACO-2 Apoptose induzieren. In beiden funktionellen Tests überstieg die gemessene Aktivität des niedriger konzentrierten HH 98/81-33-154 die von HH 101/99-14.

Die relativ geringe Anzahl von Kreuzreaktionen mit gesundem Gewebe sowie die apoptoseinduzierende Aktivität von HH 98/81-33-154 und HH 101/99-14 unterstreichen die Eignung der Antikörper als potentielle Immuntherapeutika für die adjuvante Behandlung des kolorektalen Karzinoms, einer weltweit zu den häufigsten Krebsarten zählenden Tumorerkrankung.

6 Literaturverzeichnis

Beatty, G.L., Paterson, Y., 2000: IFN-gamma can promote tumor evasion of the immune system in vivo by down-regulating cellular levels of an endogenous tumor antigen. *J. Immunol.* 165 (10), 5502-5508

Bedenne, L., Faivre, J., Boutron, M.C., Piard, F., Cauvin, J.M., Hillon, P., 1992: Adenoma-carcinoma sequence or „de novo“ carcinogenesis? A study of adenomatous remnants in a population-based series of large bowel cancers. *Cancer* 69 (4), 883-888

Bernstein, I.D., 2000: Monoclonal antibodies to the myeloid stem cells: therapeutic implications of CMA-676, a humanized anti-CD33 antibody calicheamicin conjugate. *Leukemia* 14 (3), 474-475

Beuzeboc, P., Scholl, S., Garau, X.S., Vincent-Salomon, A., Cremoux, P.D., Couturier, J., Palangie, T., Pouillart, P., 1999: Herceptin, a monoclonal humanized antibody anti-HER2: a major therapeutic progress in breast cancers overexpressing this oncogene? *Bull. Cancer* 86 (6), 544-549

Bodmer, W.F., Bailey, C.J., Bodmer, J., Bussey, H.J., Ellis, A., Gorman, P., Lucibello, F.C., Murday, V.A., Rider, S.H., Scambler, P., et al., 1987: Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 328 (6131), 614-616

Bokemeyer, C., Hartmann, J.T., Kanz, L., 1997: Current aspects of adjuvant and palliative chemotherapy in colorectal carcinoma. *Schweiz. Rundsch. Med. Prax.* 86 (39), 1510-1516

Borchmann, P., Riethmüller, G., Engert, A., 2001: Monoklonale Antikörper: Entwicklung und klinische Perspektiven. *Der Internist* 42, 803-814

Borner, M., Maurer, C., 1998: Adjuvant therapy of colorectal carcinoma - 1998 status. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 128 (20), 763-769

Buske, C., Engert, A., Schnell, R., Diehl, V., Hiddemann, W., 1998: Monoclonal antibodies in therapy of malignant lymphomas. *Internist* 39 (12), 1205-1214

Cariani, E., Lasserre, C., Kemeny, F., Franco, D., Brechot, C., 1991: Expression of insulin-like growth factor II, alpha-fetoprotein and hepatitis B virus transcripts in human primary liver cancer. *Hepatology* 13 (4), 644-649

Carmichael, J., DeGraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D., Mitchell, J.B., 1987: Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47, 936-942

Chen, J.H., Shen, W.C., 2000: Rectal carcinoma with stercoral ulcer perforation. *Hepatogastroenterology* 47 (34), 1018-1019

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

Cheung, N.K., Lazarus, H., Miraldi, F.D., Abramowsky, C.R., Kallick, S., Saarinen, U.M., Spitzer, T., Strandjord, S.E., Coccia, P.F., Berger, N.A., 1987: Ganglioside GD2 specific monoclonal antibody 3F8: a phase I study in patients with neuroblastoma and malignant melanoma. *J. Clin. Oncol.* 5, 1430-1440

Cho, K.R., Vogelstein, B., 1992: Genetic alterations in the adenoma-carcinoma sequence. *Cancer* 70 (Suppl. 6), 1727-1731

Cohen, J.J., 1992: Glucocorticoid-induced apoptosis in the thymus. *Semin. Immunol.* 4 (6), 363-369

- Cohen, P.R., Kurzrock, R.**, 1997: Mucocutaneous paraneoplastic syndromes. *Semin. Oncol.* 24 (3), 334-359
- Colecchia, G., Nardi, M.**, 1999: Colorectal cancer in pregnancy. A case report. *G. Chir.* 20 (4), 159-161
- Cummings, O.W.**, 2000: Pathology of the adenoma-carcinoma sequence: from aberrant crypt focus to invasive carcinoma. *Semin. Gastrointest. Dis.* 11 (4), 229-237
- Dalmau, J., Gultekin, H.S., Posner, J.B.**, 1999: Paraneoplastic neurologic syndromes: pathogenesis and physiopathology. *Brain Pathology* 9, 275-284
- De Palma, G.D., Di Matteo, E., Monaco, A., Abbruzzese, P., Belardo, A., Catanzano, C.**, 1996: Results of endoscopic Nd-Yag laser treatment of inoperable colorectal carcinoma. *Minerva Chir.* 51 (3), 87-91
- Declan Fleming, R.Y.**, 1998: Colorectal cancer screening and follow-up. *Surg. Oncol.* 7 (3-4), 125-137
- Desroches, E., Faucheron, J.L., Sengel, C., Lachachi, F., Risse, O., Delannoy, P., Arvieux, C., Rolachon, A., Letoublon, C.**, 1999: Self-expandable metal stent in the treatment of obstructive cancer of the left colon. Preliminary results and review of the literature. *Ann. Chir.* 53 (10), 1029-1032
- Dickman, S.**, 1998: Antibodies stage a comeback in cancer treatment. *Science* 280, 1196-1197
- Dillman, R.O.**, 1994: Antibodies as cytotoxic therapy. *J. Clin. Oncol.* 12, 1497-1515
- Dillman, R.O.**, 1999: Perceptions of Herceptin: a monoclonal antibody for the treatment of breast cancer. *Cancer Biother. Radiopharm.* 14 (1), 5-10

Emmrich, P., Holzer, H., 1999: Tumor genesis and prognostic factors in colorectal carcinoma with special consideration of tumor localization. *Zentralbl. Chir.* 124 (12), 1079-1086

Faiderbe, S., Chagnaud, J.L., Charrier, M.C., Peyron, M.A., Wafflart, J., Geffard, M., 1991: Autoantibodies directed against lipid membrane components in sera of patients with malignant tumors. *Cancer Detect. Prev.* 15 (3), 199-203

Fante, R., Benatti, P., di Gregorio, C., De Pietri, S., Pedroni, M., Tamassia, M.G., Percesepe, A., Rossi, G., Losi, L., Roncucci, L., Ponz de Leon, M., 1997: Colorectal carcinoma in different age groups: a population-based investigation. *Am. J. Gastroenterol.* 92 (9), 1505-1509

Frodin, J.E., Biberfeld, P., Christensson, B., Philstedt, P., Sundelius, S., Sylven, M., Wahren, B., Koprowski, H., Mellstedt, H., 1986: Treatment of patients with metastasizing colo-rectal carcinoma with mouse monoclonal antibodies (Moab 17-1A): a progress report. *Hybridoma* 5 (Suppl. 1), 151-161

Garfinkel, L., Mushinski, M., 1999: U.S. cancer incidence, mortality and survival: 1973-1996. *Stat. Bull. Metrop. Insur. Co.* 80 (3), 23-32

Gillen, C.D., Walmsley, R.S., Prior, P., Andrews, H.A., Allan, R.N., 1994: Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut* 35 (11), 1590-1592

Giometto, B., Scaravilli, F., 1999: Paraneoplastic syndromes. *Brain Pathology* 9, 247-250 (a)

Giometto, B., Taraloto, B., Graus, F., 1999: Autoimmunity in paraneoplastic neurological syndromes. *Brain Pathology* 9, 261-273 (b)

Glennie, M.J., Johnson, P.W.M., 2000: Clinical trials of antibody therapy. *Immunology today* 21(8), 403-411

Goodman, G.E., Hellstrom, I., Brodzinski, L., Nicaise, C., Kulander, B., Hummel, D., Hellstrom, K.E., 1990: Phase I trial of murine monoclonal antibody L6 in breast, colon, ovarian and lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 8, 1083-1092

Gopalkrishna, P., Begum, Z., Khar, A., 1998: Stress induced shedding of a tumor antigen by a rat histiocytic cell line AK-5: a possible mechanism of immune evasion. *Cell. Mol. Biol.* 44 (4), 563-569

Gratas, C., Tohma, Y., Barnas, C., Taniere, P., Hainaut, P., Ohgaki, H., 1998: Up-regulation of Fas (APO-1/CD95) ligand and down-regulation of Fas expression in human esophageal cancer. *Cancer Res.* 58 (10), 2057-2062

Griesinger, F., Trümper, L., Becker, W., 2001: Radioimmunkonjugate: Therapie von Non-Hodgkin-Lymphomen und kolorektalen Karzinomen. *Der Internist* 42, 860-873

Griffiths, A.D., Duncan, A.R., 1998: Strategies for selection of antibodies by phage display. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9 (1), 102-108

Hartmann, F., Renner, C., Jung, W., Deisting, C., Juwana, M., Eichertopf, B., Kloft, M., Pfreundschuh, M., 1997: Treatment of refractory Hodgkin' s disease with an anti-CD16/CD30 bispecific antibody. *Blood* 89 (6), 2042-2047

Held-Warmkessel, J., 1998: Colon cancer. Prevention and detection strategies. *Adv. Nurse Pract.* 6 (7), 42-45

Hensel, F., Hermann, R., Schubert, C., Abé, N., Schmidt, K., Franke, A., Shevchenko, A., Mann, M., Müller-Hermelink, H.K., Vollmers, H.P., 1999: Characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked molecule CD55/Decay-

accelerating factor as the receptor for antibody SC-1-induced apoptosis. *Cancer Res.* 59, 5299-5306

Herfarth, C., Heuschen, G., Heuschen, U.A., 1998: Malignant transformation in ulcerative colitis and surgical implications. *Chirurg* 69 (10), 1020-1027

Hermanek, P., 1998: A critical analysis of different outcomes in surgery of colon carcinoma. *Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Kongressbd.* 115, 323-326

Hertler, A.A., Frankel, A.E., 1989: Immunotoxins: a clinical review of their use in the treatment of malignancies. *J. Clin. Oncol.* 7, 1932-1942

Ho, S., Jackson, J., 1998: The angiographic diagnosis of colonic carcinoma. *Clin. Radiol.* 53 (5), 345-349

Horton, K.M., Abrams, R.A., Fishman, E.K., 2000: Spiral CT of colon cancer: imaging features and role in management. *Radiographics* 20 (2), 419-430

Iarumov, N., Viiachki, I., Korukov, B., Kolarov, E., Ivanov, A., Viiachki, D., Gachev, N., 1999: Large-intestine perforations caused by primary colorectal cancer. *Khirurgiia (Sofia)* 54 (1), 29-31

Illiger, H.J., 1997: Monoclonal antibody 17-1A (Panorex). A new approach to adjuvant therapy of colonic carcinoma. *Internist* 38 (10), 1001-1006

Jain, R.K., Baxter, L.T., 1988: Mechanisms of heterogeneous distribution of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors: significance of elevated interstitial pressure. *Cancer Res.* 48 (24), 7022-7032

Kaiser, R., 1999: Paraneoplastische neurologische Syndrome. Diagnostische und pathogenetische Bedeutung von Autoantikörpern. *Nervenarzt* 70, 688-701

Kaminski, M.S., Estes, J., Zasadny, K.R., Francis, I.R., Ross, C.W., Tuck, M., Regan, D., Fisher, S., Gutierrez, J., Kroll, S., Stagg, R., Tidmarsh, G., Wahl, R.L., 2000: Radioimmunotherapy with iodine (131)I tositumomab for relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma: updated results and long-term follow-up of the University of Michigan experience. *Blood* 96 (4), 1259-1266

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257

Köhler, G., Milstein, C., 1975: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497

Kronborg, O., 2000: Colon polyps and cancer. *Endoscopy* 32 (2), 124-130

Law, W.L., Chu, K.W., Ho, J.W., Tung, H.M., Law, S.Y., Chu, K.M., 2000: Self-expanding metallic stent in the treatment of colonic obstruction caused by advanced malignancies. *Dis. Colon Rectum* 43 (11), 1522-1527

Leithauser, F., Dhein, J., Mechtersheimer, G., Koretz, K., Bruderlein, S., Henne, C., Schmidt, A., Debatin, K.M., Krammer, P.H., Moller, P., 1993: Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab. Invest.* 69 (4), 415-429

Levine, M.S., Rubesin, S.E., Laufer, I., Herlinger, H., 2000: Diagnosis of colorectal neoplasms at double-contrast barium enema examination. *Radiology* 216 (1), 11-18

Litvinov, S.V., Velders, M.P., Bakker, H.A., Fleuren, G.J., Warnaar, S.O., 1994: Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J. Cell Biol.* 125,437-446

Lo Buglio, A.F., Wheeler, R.H., Trang, J., Haynes, A., Rogers, K., Harvey, E.B., Sun, L., Ghrayeb, J., Khzaeli, M.B., 1989: Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: kinetics and immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (11), 4220-4224

Lode, H.N., Reinfeld, R.A., 2000: Targeted cytokines for cancer immunotherapy. *Immunol. Res.* 21 (2-3), 279-288

Macdonald, J.S., 1999: Adjuvant therapy of colon cancer. *CA Cancer J. Clin.* 49, 202-219

Maloney, D.G., Grillo-Lopez, A.J., White, C.A., Bodkin, D., Schilder, R.J., Neidhart, J.A., Janakiraman, N., Foon, K.A., Liles, T.M., Dallaire, B.K., Wey, K., Royston, I., Davis, T., Levy, R., 1997: IDEC-C2B8 (Rituximab) Anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade Non-Hodgkin' s Lymphoma. *Blood* 90 (6), 2188-2195

Mangili, F., Sassi, I., Di Rocco, M., Leone, B.E., Garancini, P., Santambrogio, G., 1996: Breast carcinoma detection with a combination of radiolabeled monoclonal antibodies. Promising results from immunohistochemistry studies. *Cancer* 78 (11), 2334-2339

Markham, A., Lamb, H.M., 2000: Infliximab: a review of ist use in the management of rheumatoid arthritis. *Drugs* 59 (6), 1341-1359

Markowitz, A.J., Winawer, S.J., 1999: Screening and surveillance for colorectal cancer. *Semin. Oncol.* 26 (5), 485-498

Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Bonnert, T.P., McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G., 1991: By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.* 222 (3), 581-597

Maurer, C.A., Renzulli, P., Naef, M., Seiler, C.A., Uhl, W., Klippel, U., Buchler, M.W., 1998: Surgical therapy of ileus of the large intestine. *Zentralbl. Chir.* 123 (12), 1346-1354

McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G., Chiswell, D.J., 1990: Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552-554

Meijer, S., Rahusen, F.D., van der Plas, L.G., 1999: Palliative cryosurgery for rectal carcinoma. *International Journal of Colorectal Disease* 14 (3), 177-180

Mellemkjaer, L., Olsen, J.H., Frisch, M., Johansen, C., Gridley, G., McLaughlin, J.K., 1995: Cancer in patients with ulcerative colitis. *Int. J. Cancer* 60 (3), 330-333

Meyer, H.J., 1997: Oncologic surgery of colon carcinoma. *Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Kongressbd.* 114, 159-163

Mezger, J., Löcherbach, U., Hagenhoff, B., Funken, O., Gallkowski, U., Hahn, C., Pfeifer, U., Sauerbruch, T., 1997: Symptomatik, Tumorstadium und primäre Therapie bei Patienten mit kolorektalem Karzinom. *Dtsch. med. Wschr.* 122, 703-708

Mitooka, H., 2000: Flat neoplasms in the adenoma-carcinoma sequence in Japan. *Semin. Gastrointest. Dis.* 11 (4), 238-247

Mizuno, N., Kato, Y., Izumi, Y., Irimura, T., Sugiyama, Y., 1998: Importance of hepatic first-pass removal in metastasis of colon carcinoma cells. *J. Hepatol.* 28 (5), 865-877

Mosmann, T., 1983: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65 (1-2), 55-63

Motmans, K., Thirion, S., Heyligen, H., Janssen, J., Raus, J., Vandevyver, C., 1996: Immunotherapy for cancer: construction, expression and functional characterization of chimeric antibodies. *Eur. J. Cancer Prev.* 5 (6), 512-519

Mueller, J., Mueller, E., Keller, G., Bethke, B., Stolte, M. Hofler, H., 1999: Are there differences between ex adenoma and de novo colorectal carcinomas? *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* 83, 139-147

Müller, P., Schlimok, G., 2001: Entwicklung und Einsatz antiepithelialer Antikörper bei soliden Tumoren. *Der Internist* 42, 827-834

Obrand, D.I., Gordon, P.H., 1998: Continued change in the distribution of colorectal carcinoma. *Br. J. Surg.* 85 (2), 246-248

Odell, W.D., 1997: Endocrine/metabolic syndromes of cancer. *Semin. Oncol.* 24 (3), 299-317

Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T., Nagata, S., 1993: Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 364 (6440), 806-809

Okabe, S., Arai, T., Maruyama, S., Murase, N., Tsubaki, M., Endo, M., 1998: A clinicopathological investigation on superficial early invasive carcinomas of the colon and rectum. *Surg. Today* 28 (7), 687-695

Old, L.J., 1981: Cancer immunology: the search for specificity – G.H.A. Clowes Memorial lecture. *Cancer research*, 41 (2), 361-375

Parkin, D.M., Pisani, P., Ferlay, J., 1999: Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 49, 33-64

Patel, A.M., Davila, D.G., Peters, S.G., 1993: Paraneoplastic syndromes associated with lung cancer. *Mayo Clin. Proc.* 68 (3), 278-287

Pfreundschuh, M., 2000: Exploitation of the B cell repertoire for the identification of human tumor antigens. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 46, Suppl. 3-7

Pistorius, S., Schackert, H.K., Nagel, M., Saeger, H.D., 2000: Surgery of hereditary colorectal carcinoma. *Zentralbl. Chir.* 125 (Suppl. 1), 23-27

Porschen, R., Schmiegel, W., 1998: Prevention and early detection of colorectal carcinoma by endoscopic examinations. *Z. Gastroenterol.* 36 (5), 403-414

Posner, J.B., Dalmau, J.O., 1997: Paraneoplastic syndromes affecting the central nervous system. *Annu. Rev. Med.* 48, 157-166

Press, O.W., Appelbaum, F., Ledbetter, J.A., Martin, P.J., Zarling, J., Kidd, P., Thomas, E.D., 1987: Monoclonal antibody 1F5 (anti-CD20) serotherapy of human B cell lymphomas. *Blood* 69 (2), 584-591

Pressemitteilung Glaxo Wellcome/Centocor, Juli 2000

Rafter, J., Glinghammar, B., 1998: Interactions between the environment and genes in the colon. *Eur. Cancer Prev.* 7 (Suppl. 2), 69-74

Real, L.M., Jiminez, P., Kirkin, A., Serrano, A., Garcia, A., Canton, J., Zeuthen, J., Garrido, F., Ruiz-Cabello, F., 2001: Multiple mechanisms of immune evasion can coexist in melanoma tumor cell lines derived from the same patient. *Cancer Immunol. Immunother.* 49 (11), 621-628

Rensing-Ehl, A., Frei, K., Flury, R., Matiba, B., Mariani, S.M., Weller, M., Aebischer, P., Krammer, P.H., Fontana, A., 1995: Local Fas/APO-1 (CD95) ligand-mediated tumor cell killing in vivo. *Eur. J. Immunol.* 25 (8), 2253-2258

Repp, R., Valerius, T., Bargou, R., 2001: Bispezifische Antikörper in der Hämatologie und Onkologie. *Der Internist* 42, 854-859

Riethmüller, G., Holz, E., Schlimok, G., Schmiegel, W., Raab, R., Hoffken, K., Gruber, R., Funke, I., Pichlmaier, H., Hirche, H., Buggisch, P., Witte, J., Pichelmayr, R., 1998: Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J. Clin. Oncol.* 16, 1788-1794

Riethmüller, G., Schneider-Gadicke, E., Johnson, J.P., 1993: Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Curr. Opin. Immunol.* 5 (5), 732-739

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

Sanner, B., Doberauer, C., Wienand, B., 1997: Hereditary nonpolyposis colonic carcinoma with primary extra-colic manifestation. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 127 (33), 1329-1333

Scaravilli, F., An, S.F., Groves, M., Thom, M., 1999: The neuropathology of paraneoplastic syndromes. *Brain Pathology* 9, 251-260

Scheiden, R., Sand, J., Pandin, M., Wagener, Y., Capesius, C., 2000: Colorectal high-grade adenomas: incidence, localization and adenoma-adenocarcinoma ratio in a retrospective and comparative population-based study of 225 consecutive cases between 1988 and 1996. *Int. J. Colorectal Dis.* 15 (1), 29-34

Schnell, R., Hiddemann, W., Diehl, V., Engert, A., 2001: Klinischer Einsatz monoklonaler Antikörper bei malignen Lymphomen. *Der Internist* 42, 815-826

Steffens, M.G., Boerman, O.C., Oosterwijk-Wakka, J.C., Oosterhof, G.O., Witjes, J.A., Koenders, E.B., Oyen, W.J., Buijs, W.C., Debruyne, F.M., Corstens, F.H.,

Oosterwijk, E., 1997: Targeting of renal cell carcinoma with iodine-131-labeled chimeric monoclonal antibody G250. *J. Clin. Oncol.* 15, 1529-1537

Stern, H., Lagarde, A., 1998: Genetics of hereditary colon cancer: a model for prevention. *Can. J. Surg.* 41 (5), 345-350

Stockert, E., Jäger, E., Chen, Y.T., Scanlan, M.J., Gout, I., Karbach, J., Arand, M., Knuth, A., Old, L.J., 1998: A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *J. Exp. Med.* 187 (8), 1349-1354

Suda, T., Nagata, S., 1994: Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J. Exp. Med.* 179 (3), 873-879

Takano, Y.S., Harmon, B.V., Kerr, J.F., 1991: Apoptosis induced by mild hyperthermia in human and murine tumour cell lines: a study using electron microscopy and DNA gel electrophoresis. *J. Pathol.* 163 (4), 329-336

Thirion, S., Motmans, K., Heyligen, H., Janssens, J., Raus, J., Vandevyver, C., 1996: Mono- and bispecific single-chain antibody fragments for cancer therapy. *Eur. J. Cancer Prev.* 5 (6), 507-511

Tomizuka, K., Shinohara, T., Yoshida, H., Uejima, H., Ohguma, A., Tanaka, S., Sato, K., Oshimura, M., Ishida, I., 2000: Double trans-chromosomic mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2), 722-727

Trail, P.A., Bianchi, A.B., 1999: Monoclonal antibody drug conjugates in the treatment of cancer. *Curr. Opin. Immun.* 11, 584-588

Trauth, B.C., Klas, C., Peters, A.M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K.M., Krammer, P.H., 1989: Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245 (4915), 301-305

Troisi, R.J., Freedman, A.N., Devesa, S.S., 1999: Incidence of colorectal carcinoma in the U.S.: an update of trends by gender, race, age, subsite, and stage, 1975-1994. *Cancer* 85 (8), 1670-1676

Truninger, K., Blum, H.E., 2000: Screening for prevention and early detection of colorectal carcinoma. *Ther. Umsch.* 57 (1), 26-32

Türeci, O., Sahin, U., Zwick, C., Neumann, F., Pfreundschuh, M., 1999: Exploitation of the antibody repertoire of cancer patients for the identification of human tumor antigens. *Hybridoma* 18 (1), 23-28

Valerius, T., Stockmeyer, B., van Spriël, A.B., Graziano, R.F., van den Herik-Oudijk, I.E., Repp, R., Deo, Y.M., Lund, J., Kalden, J.R., Gramatzki, M., van de Winkel, J.G.J., 1997: Fc α RI (CD 89) as a novel trigger molecule for bispecific antibody therapy. *Blood* 90 (11), 4485-4492

van der Luijt, R.B., Tops, C.M., Vasen, H.F., 2000; From gene to disease; the APC gene and familial adenomatous polyposis coli. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 144 (42), 2007-2009

Vaughan, T.J., Osbourn, J.K., Tempest, P.R., 1998: Human antibodies by design. *Nat. Biotechnol.* 16 (6), 535-539

Velders, M.P., Schreiber, H., Kast, W.M., 1998: Active immunization against cancer cells: impediments and advances. *Semin. Oncol.* 25 (6), 697-706

Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M., Bos, J.L., 1988: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* 319 (9), 525-532

Vollmers, H.P., 1999: Monoklonale Antikörper in der Tumorthherapie. Die neue Generation. *Medizin im Bild, Therapie aktuell Onkologie* 2/1999, 68-70

Vollmers, H.P., 2000: Magenkarzinom: Humaner monoklonaler Antikörper bewirkt tumorspezifische Apoptose. *Forum komplementäre Onkologie & Forum Immunologie* 1/2000, 19-21

Vollmers, H.P., O' Connor, R., Müller, J., Kirchner, T., Müller-Hermelink, H.K., 1989: SC-1, a functional human monoclonal antibody against autologous stomach carcinoma cells. *Cancer Res.* 49 (9), 2471-2476

Vollmers, H.P., Timmermann, W., Hensel, F., Illert, B., Thiede, A., Müller-Hermelink, H.K., 2000: Adjuvant immunotherapy of stomach carcinoma with antibody-induced apoptosis. *Zentralbl. Chir.* 125 (Suppl. 1), 37-40

von Herbay, A., Schmid, R.M., Adler, G., 1999: Kolorektale Karzinome bei Morbus Crohn. *Dtsch. med. Wschr.* 124, 940-944

von Mehren, M., Weiner, L.M., 1996: Monoclonal antibody-based therapy. *Curr. Opin. Oncol.* 8 (6), 493-498

Wagner, T.O., 1990: Paraneoplastische Syndrome – Endokrinium und Lunge. *Pneumologie* 44 (Suppl. 1), 150-152

Wehrmann, K., Fruhmorgen, P., 2000: Removing adenomas reduces colon carcinoma risk up to 90 %. Effective cancer prevention with the endoscope. *MMW Fortschr. Med.* 142 (8), 26-29

Weitz, J., Kienle, P., Lacroix, J., Willeke, F., Benner, A., Lehnert, T., Herfarth, C., von Knebel Doeberitz, M., 1998: Dissimination of tumor cells in patients undergoing surgery for colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 4 (2), 343-348

Welt, S., Scott, A.M., Divgi, C.R., Kemeny, N.E., Finn, R.D., Daghighian, F., Germain, J.S., Richards, E.C., Larson, S.M., 1996: Phase I/II study of iodine 125-

labeled monoclonal antibody A33 in patients with advanced colon cancer. *J. Clin. Oncol.* 14 (6), 1787-1797

Wilmink, A.B., 1997: Overview of the epidemiology of colorectal cancer. *Dis. Colon Rectum* 40 (4), 483-493

Winter, G., Harris, W.J., 1993: Humanized antibodies. *Trends Pharmacol. Sci.* 14 (5), 139-143

Wyllie, A.H., 1980: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284 (5756), 555-556 (a)

Wyllie, A.H., Kerr, J.F., Currie, A.R., 1980: Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68, 251-306 (b)

Wyllie, A.H., Morris, R.G., Smith, A.L., Dunlop, D., 1984: Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.* 142 (1), 67-77

Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., 1989: A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 169 (5), 1747-1756

Zheng, P., Sarma, S., Guo, Y., Liu, Y., 1999: Two mechanisms for tumor evasion of preexisting cytotoxic T-cell responses: lessons from recurrent tumors. *Cancer Res.* 59 (14), 3461-3467

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
A. bidest.	Aqua bidestillata
ABTS	Substrat der Enzymreaktion im Cell Death Detection ELISA ^{PLUS} (Roche, Mannheim)
BSA	Bovines Serumalbumin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetal Calf Serum
HE	Hämatoxylin-Eosin
IgM	Immunglobulin M
MTT	Assay zur Untersuchung der Zellproliferation (3-(4,5- Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)
PBS	Phosphate buffered saline
rpm	rounds per minute
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
λ	Wellenlänge
μg	Mikrogramm
mg	Milligramm
g	Gramm
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
l	Liter
nm	Nanometer
μm	Mikrometer
min	Minute
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2000 bis Juli 2001 im Pathologischen Institut der Universität Würzburg in der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. H.P. Vollmers angefertigt. Bei allen beteiligten Personen möchte ich mich hiermit herzlich bedanken:

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. H.P. Vollmers für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie die freundliche Unterstützung während der Erstellung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H.K. Müller-Hermelink, Direktor des Pathologischen Instituts, danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Ein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern der AG Vollmers für ihren freundschaftlichen Beistand im Laboralltag und die angenehme Arbeitsatmosphäre:

Ganz besonders herzlich danke ich Dr. rer. nat. Stephanie Brändlein dafür, daß sie mir in jeder Notlage kompetent mit Rat und Tat zur Seite stand, für ihre Motivationskünste sowie für die Korrektur des Manuskripts.

Dr. rer. nat. Frank Hensel danke ich für die Hilfe bei computertechnischen Problemen aller Art und das Ausdrucken zahlloser Fotodateien.

Nele Ruoff, Tina Pohle und Ewa Wozniak danke ich für die geduldige Einarbeitung in die immunhistochemischen und zellbiologischen Techniken.

Ich möchte mich weiterhin bei allen Mitarbeitern des Pathologischen Instituts bedanken, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben. Insbesondere danke ich Herrn Dr. R. Klein für die Beratung auf dem Gebiet der Neuropathologie und Herrn E. Schmitt für die Bearbeitung der Fotografien.

Allen meinen Freunden danke ich für ihren „moralischen Beistand“ und ihr immer „offenes Ohr“.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern dafür bedanken, daß sie mir Studium und Promotion ermöglichten und mich in jeder Hinsicht unterstützen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank Christian, der nicht nur sein Blut für diese Arbeit zur Verfügung gestellt hat, sondern mich mit unendlicher Geduld in jeder Lebenslage begleitet, aufgemuntert und beraten hat.