



Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
Abteilung für experimentelle Radioonkologie
Klinikum Rechts der Isar, Technische Universität München

Validierung von extrazellulärem Hsp70 als Tumorbiomarker

Definition des Hsp70-Schwellenwertes im Blut eines gesunden
Kontrollkollektivs

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades (Dr. med.)

an der Medizinischen Fakultät

der Technischen Universität München

vorgelegt von

Clemens Knappe

Wangen im Allgäu

2017



Fakultät für Medizin

Validierung von extrazellulärem Hsp70 als Tumorbiomarker -
Definition des Hsp70-Schwellenwertes im Blut eines gesunden Kontrollkollektivs

Clemens Knappe

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfende/-r der Dissertation:

1. Prof. Dr. Gabriele Multhoff
2. Prof. Dr. Stephanie E. Combs

Die Dissertation wurde am 19.12.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 02.05.2018 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	ii
Abbildungsverzeichnis	iv
1 Einleitung.....	1
1.1 Krebs.....	1
1.1.1 Definition und Epidemiologie.....	1
1.1.2 Tumorgenese.....	4
1.1.3 Diagnostik.....	5
1.1.4 Therapie.....	6
1.2 Kolorektales Karzinom.....	9
1.3 Hitzeschockproteine.....	12
1.3.1 Hitzeschockprotein 70 (Hsp70)	13
2 Material und Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1 Materialien zur venösen Blutentnahme	23
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien	23
2.1.3 Antikörper	24
2.1.4 Kit: Human/Mouse/Rat Total HSP70/HSPA1A DuoSet IC ELISA	25
2.1.5 Weitere Materialien	25
2.1.6 Technische Geräte.....	26
2.1.7 Statistische Auswertung.....	26
2.2 Methoden.....	27
2.2.1 Venöse Blutentnahme und Weiterverarbeitung	27
2.2.2 Herstellung von rekombinantem Hsp70	28
2.2.3 Herstellung von Lipidvesikeln.....	28
2.2.4 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	30
2.2.5 Erstellen der Kalibrierungskurve und Bestimmung der Intra- und Interassay-Präzision, der Linearität sowie des Detektionslimits	40

2.2.6	Bestimmung der „Recovery“	41
2.2.7	Methode zur Bestimmung des Normbereichs für Hsp70-Serumwerte eines gesunden Kontrollkollektivs	41
2.2.8	Receiver-Operating-Characteristic-Kurve	43
3	Ergebnisse	45
3.1	Beschreibung des gesunden Kontrollkollektivs	45
3.2	Beschreibung des Patientenkollektivs mit kolorektalem Karzinom	46
3.3	Validierung des ELISAs.....	49
3.4	Bestimmung der „Recovery“	52
3.5	Einfluss von Störfaktoren auf den lipHsp70-ELISA.....	54
3.6	Vergleich der Messung von Plasma- und Serumproben.....	57
3.7	Messung von an Lipidvesikel gebundenem Hsp70	58
3.8	Hsp70-Serumwerte im gesunden Kontrollkollektiv und Bestimmung des Schwellenwertes für Hsp70.....	59
3.9	Hsp-70-Serumwerte bei Patienten mit kolorektalem Karzinom.....	63
4	Diskussion	66
4.1	Vorteile der Verwendung des cmHsp70.1–Antikörpers im lipHsp70-ELISA	66
4.2	Beurteilung des Validierungsprozesses.....	67
4.3	Praktikabilität des lipHsp70-ELISAs als diagnostisches Werkzeug.....	69
4.4	Ausblick und Einordnung der Arbeit	72
5	Zusammenfassung	74
6	Literaturverzeichnis	76
7	Danksagung	84

Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Top 5 der Todesursachen in der Gruppe der bösartigen Neubildungen in Deutschland 2015.....	2
Tabelle 2: Klassifikation der HSP nach Kampinga und mittels Molekulargewicht	13
Tabelle 3: Materialien zur venösen Blutentnahme	23
Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien	24
Tabelle 5: Antikörper	24
Tabelle 6: Weitere Hilfsmaterialien	25
Tabelle 7: Technische Geräte.....	26
Tabelle 8: Reagenzien für den ELISA von R&D-Systems	33
Tabelle 9: Reagenzien für den lipHsp70-ELISA	37
Tabelle 10: TNM-Klassifikation und Grading der Patienten mit kolorektalem Karzinom	48
Tabelle 11: Validierungsparameter eines Immunoassays	68
Abbildung 1: Todesursachen in Deutschland im Jahr 2015.....	1
Abbildung 2: Jährliche Neuerkrankungs- und Sterbefälle von 1980 bis 2004 (Krebserkrankungen).....	3
Abbildung 3: Die fünf Säulen zur Diagnose von Krebserkrankungen.....	5
Abbildung 4: Therapieoptionen bei Krebserkrankungen	7
Abbildung 5: Adenom-Karzinom-Sequenz bei kolorektalen Karzinomen	9
Abbildung 6: Diagnostik beim kolorektalen Karzinom	11
Abbildung 7: Struktur von Hsp70.....	14
Abbildung 8: Transkription und Funktion von Hsp70 in Zellen	15
Abbildung 9: Entstehung und Freisetzung von Exosomen	18
Abbildung 10: Eigenschaften des Antikörpers cmHsp70.1.....	22
Abbildung 11: Mini Extruder von Avanti Polar Lipids.....	28
Abbildung 12: Schematische Darstellung eines direkten und indirekten ELISAs.....	31
Abbildung 13: Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISAs und eines kompetitiven ELISAs.....	32

Abbildung 14: Graphische Darstellung der Arbeitsschritte bei der Durchführung des Hsp70-ELISAs von R&D-Systems.....	34
Abbildung 15: Graphische Darstellung der Arbeitsschritte bei der Durchführung des lipHsp70-ELISAs.....	38
Abbildung 16: Schematische Darstellung einer ROC-Kurve	44
Abbildung 17: Altersverteilung des gesunden Kontrollkollektivs.....	45
Abbildung 18: Altersverteilung der Patienten mit kolorektalem Karzinom.....	46
Abbildung 19: Eine Kalibrierungskurve, wie sie in den Versuchen verwendet wurde.....	49
Abbildung 20: Linearität des lipHsp70-ELISAs	50
Abbildung 21: Recovery des lipHsp70-ELISAs und des R&D-ELISAs	52
Abbildung 22: Durchschnittliche "Recovery" des lipHsp70-ELISAs und des ELISAs von R&D-Systems.....	53
Abbildung 23: Relativer Anstieg des Hsp70-Serumwerts nach Zugabe von lysierten Erythrozyten.....	54
Abbildung 24: Auswirkung von wiederholtem Auftauen und Einfrieren der Proben auf den Hsp70-Serumwert	55
Abbildung 25: Auswirkung von Nahrungsaufnahme auf den Hsp70-Serumwert	56
Abbildung 26: Hsp70-Serumwerte in Serum und Plasma	57
Abbildung 27: Hsp70-Konzentration der mit rekombinantem Hsp70 beimpften POPC/POPS-Lipidvesikel	58
Abbildung 28: Hsp70-Serumwerte des gesunden Kontrollkollektivs	59
Abbildung 29: Korrelation von Alter und Hsp70-Serumwert	60
Abbildung 30: Vergleich der Hsp70-Serumwerte des gesunden Kontrollkollektivs mit den Hsp70-Serumwerten von Patienten mit kolorektalem Karzinom.....	63
Abbildung 31: Gegenüberstellung von Hsp70-Serumwerten von Patienten mit kolorektalem Karzinom bei Messung mit dem ELISA von R&D-Systems und mit dem lipHsp70-ELISA	64
Abbildung 32: Receiver Operating Characteristic-(ROC-)Kurven	65

1 Einleitung

1.1 Krebs

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Die Bezeichnung Krebs beschreibt eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, denen der gleiche zelluläre Mechanismus zu Grunde liegt. Eine Krebserkrankung kann prinzipiell in fast jedem Gewebe des menschlichen Körpers entstehen. Trotz der gleichen zellulären Grundlage, nämlich der unkontrollierten Teilung von Zellen und der Invasion in benachbartes Gewebe, unterscheiden sich die verschiedenen Krebsarten beachtlich hinsichtlich ihrer Häufigkeit, Symptomatik, Diagnostik, Therapie und Prognose (National Cancer Institute, 2017).

Die Bedeutung der Erkrankung Krebs spiegelt sich im Blick auf die häufigsten Todesursachen in Deutschland wieder. So belegte die Gruppe der bösartigen Neubildungen mit 226.337 Todesfällen im Jahr 2015 in Deutschland (25 % der Todesursachen) hinter den Erkrankungen des Kreislaufsystems (39 % der Todesursachen) den zweiten Platz (Abbildung 1).

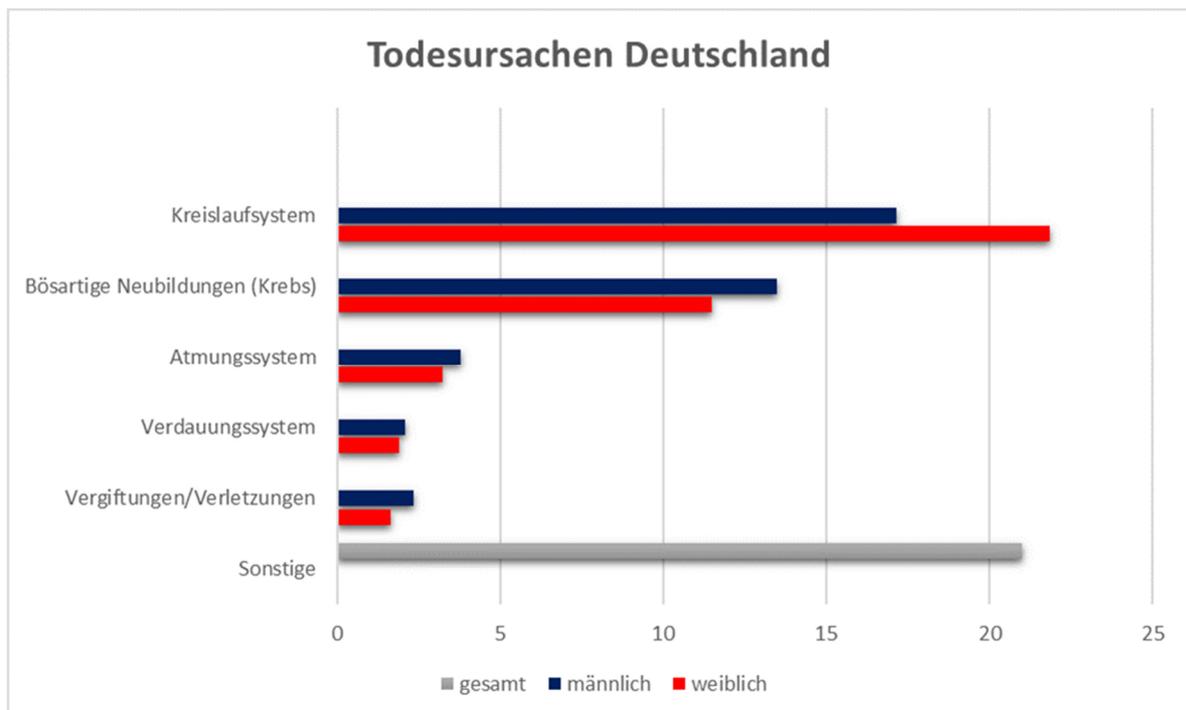


Abbildung 1: Todesursachen in Deutschland im Jahr 2015 (in Prozent) (Statistisches Bundesamt, 2017). Eigene Darstellung.

Bösartige Neubildung	Todesfälle	% der krebsbedingten Todesfälle
Bronchien und Lunge	45.224	20 %
Brustdrüse (Mamma)	18.295	8,1 %
Bauchspeicheldrüse (Pankreas)	17.156	7,6 %
Dickdarm	16.672	7,4 %
Prostata	13.900	6,1 %

Tabelle 1: Top 5 der Todesursachen in der Gruppe der bösartigen Neubildungen in Deutschland 2015.
(Statistisches Bundesamt, 2017).

Betrachtet man die Top 5 der Todesursachen in der Gruppe der bösartigen Neubildungen (Tabelle 1), so wird ersichtlich, dass Krebs nicht nur eine enorme Bedeutung für die betroffene Person hat, sondern auch für die Gesellschaft eine Erkrankung mit hoher Relevanz ist (Statistisches Bundesamt, 2017). Deutlich wird dies beispielsweise, wenn man die Gesamtkosten betrachtet, die Krebserkrankungen verursachen. Diese betragen europaweit im Jahr 2009 126 Milliarden Euro, wobei jeweils etwa 50 Milliarden auf das Gesundheitssystem und auf Produktivitätsausfälle infolge von Krankheit und Tod entfielen. Die restlichen Kosten in Höhe von circa 25 Milliarden Euro entstanden durch sogenannte informale Kosten. Hierunter fallen Kosten, die zum Beispiel durch Besuche oder Pflege der Erkrankten durch Angehörige entstehen (Luengo-Fernandez, Leal, Gray, & Sullivan, 2013).

In Deutschland erkrankten im Jahr 2013 482.470 Menschen an Krebs. Dabei entfielen 252.550 Fälle (52,3 %) auf das männliche Geschlecht und 229.920 (47,7 %) Fälle auf das weibliche Geschlecht. Ein Großteil der Neuerkrankungen fällt bei einem mittleren Erkrankungsalter von 68,3, respektive 67,2 Jahren auf die zweite Lebenshälfte. Insgesamt lebten 2013 1,6 Millionen Menschen in Deutschland, bei denen in den letzten fünf Jahren Krebs diagnostiziert wurde (Barnes, 2016).

Die Entwicklung der Neuerkrankungsraten nahm in den letzten Jahren konstant zu. Erkrankten 1980 noch 124.000 Männer an Krebs, so betrug die Zahl der Neuerkrankungen 2004 schon 230.000, was einen Anstieg um 85 % bedeutet. Bei den Frauen war ein Anstieg von 42 % zu betrachten, nämlich von 145.00 Neuerkrankungen 1980 auf 206.000 im Jahr 2004. Ursächlich hierfür ist unter anderem der demographische Wandel der Bevölkerung. Dies spiegelt sich in der altersstandardisierten Erkrankungsrate wieder, welche im gleichen Zeitraum bei Männern

30 % und bei Frauen 20 % betrug. Genau gegensätzlich verhielt sich die Entwicklung der Mortalität von Krebs. Hier konnte man von 1980 bis 2004 einen Rückgang um 20 % bei beiden Geschlechtern verzeichnen (Abbildung 2) (Bertz, 2010).

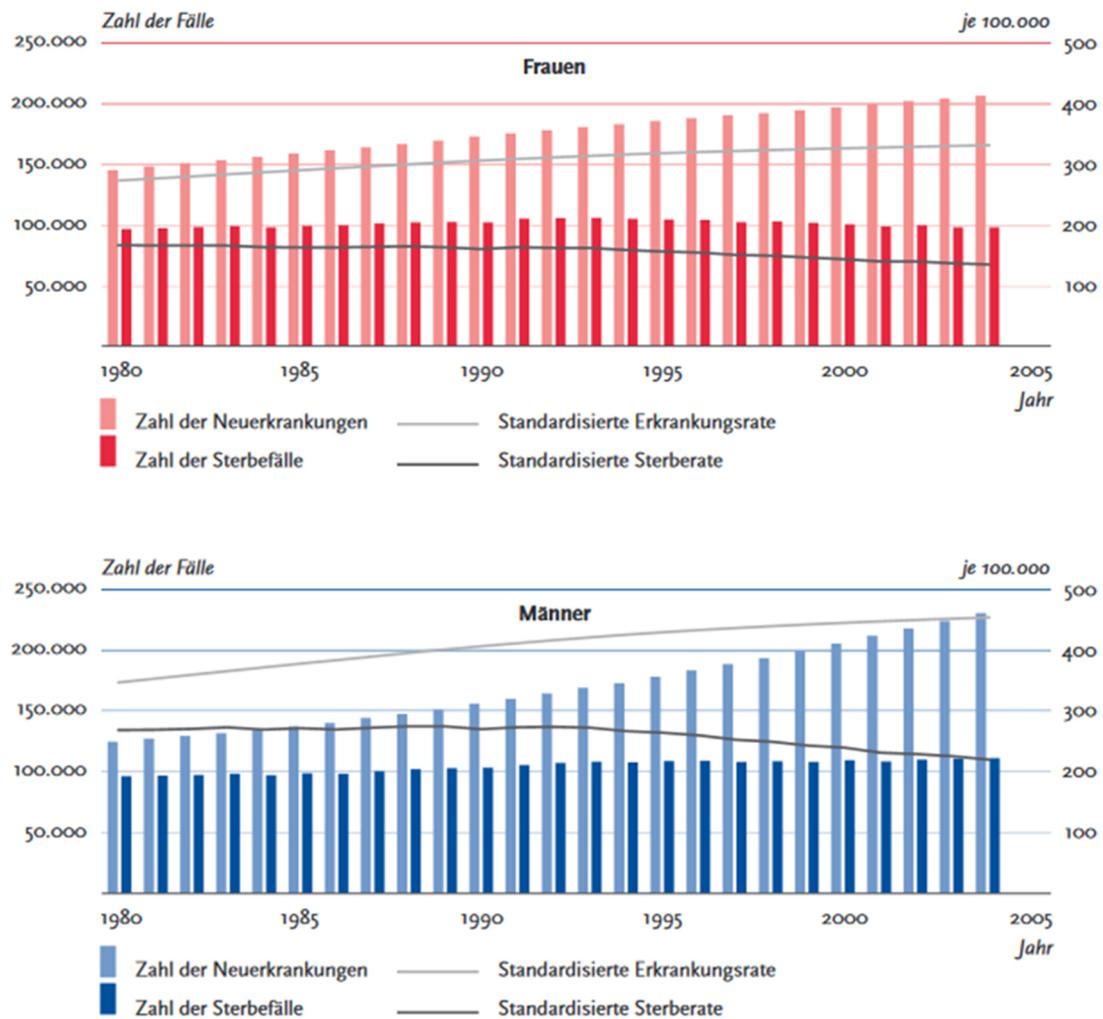


Abbildung 2: Jährliche Neuerkrankungs- und Sterbefälle von 1980 bis 2004 (Krebserkrankungen). Zusätzlich sind die altersstandardisierten Neuerkrankungs- und Sterberaten aufgeführt (Europastandard), übernommen aus: (Bertz, 2010).

1.1.2 Tumorgenese

Betrachtet man die genetischen Ursachen, die der unkontrollierten Teilungskapazität von Tumorzellen zu Grunde liegen, so stößt man auf sogenannte Protoonkogene und Tumorsuppressorgene. Beide Arten von Genen spielen eine bedeutende Rolle im Teilungszyklus der Zelle. Protoonkogene wirken hierbei aktivierend auf die Zellteilung, wohingegen Tumorsuppressorgene einen hemmenden Einfluss ausüben. In gesunden Zellen sind diese beiden Gegenspieler fein aufeinander abgestimmt, um die Homöostase der Zellteilung zu gewährleisten. Durch im Laufe des Lebens entstandene Genmutationen können diese jedoch entweder dauerhaft aktiviert (Protoonkogene) oder inaktiviert (Tumorsuppressorgene) werden, was in beiden Fällen zu einer unkontrollierten Zellteilung führt (Rassow, 2008). Krebszellen besitzen darüber hinaus noch weitere Eigenschaften, die sie schrittweise entwickeln. Diese sogenannten „hallmarks of cancer“ wurden von Hanahan und Weinberg definiert und sind im Folgenden dargestellt:

1. *Autarkie der Wachstumssignale*: Krebszellen erlangen durch Aktivierung von Protoonkogenen die Fähigkeit zur eigenständigen Zellteilung.
2. *Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen*: Krebszellen inaktivieren Tumorsuppressorgene, welche in gesunden Zellen das Wachstum blockieren können.
3. *Widerstandsfähigkeit gegenüber dem programmierten Zelltod (Apoptose)*: Krebszellen modifizieren Gene, um der Apoptose zu entkommen.
4. *Erlangen von Unsterblichkeit*: Krebszellen besitzen die Fähigkeit zur Unsterblichkeit, d.h. zur unbegrenzten Teilung.
5. *Angiogenese*: Krebszellen aktivieren die Bildung von neuen Blutgefäßen zur Versorgung der wachsenden Tumormasse.
6. *Invasives Wachstum und Metastasierung*: Krebszellen wachsen invasiv in andere Gewebe und besitzen die Fähigkeit in andere Organe zu metastasieren (Hanahan & Weinberg, 2000).

Aufgrund neuer Forschungsdaten auf dem Gebiet der Krebsbiologie wurden die sechs „hallmarks of cancer“ 2011 um die folgenden zwei „hallmarks“ erweitert: die Fähigkeit von

Krebszellen den Metabolismus zu ihren Gunsten zu beeinflussen sowie die Vermeidung der Zerstörung durch das menschliche Immunsystem (Hanahan & Weinberg, 2011).

1.1.3 Diagnostik

Wie anfangs bereits erwähnt, handelt es sich bei Krebserkrankungen um eine sehr heterogene Gruppe an Erkrankungen, weshalb sich der Weg zur Diagnose sehr variabel gestaltet und je nach Tumor verschiedene Schwerpunkte in der Diagnostik gesetzt werden. Nichtsdestotrotz kann man fünf Säulen der Diagnostik definieren, mit deren Hilfe eine Krebserkrankung diagnostiziert werden kann (Abbildung 3). In den letzten Jahren rückte die Bedeutung von Tumormarkern zunehmend in den Fokus des Interesses. Die Definition von Tumormarkern ist wie folgt: Tumormarker sind Substanzen, die unter physiologischen Bedingungen gar nicht oder nur in geringem Maße im Körper vorkommen und von Tumoren oder aber als Antwort anderer Zellen auf eine Tumorentstehung vermehrt sezerniert werden. Diese Substanzen (Proteine, Lipide, DNA, Pathogene, molekulare Signaturen, etc.) können im Blut, Urin, Stuhl, Tumorgewebe oder anderen Geweben oder Körperflüssigkeiten vorkommen. Anwendung finden sie vor allem in der Kontrolle von Therapien und in der Erkennung von Rezidiven, in der Risikobewertung, in der Vorhersage von Nebenwirkungen und als Hilfe bei der Therapieadaptation (Braun, 2014).

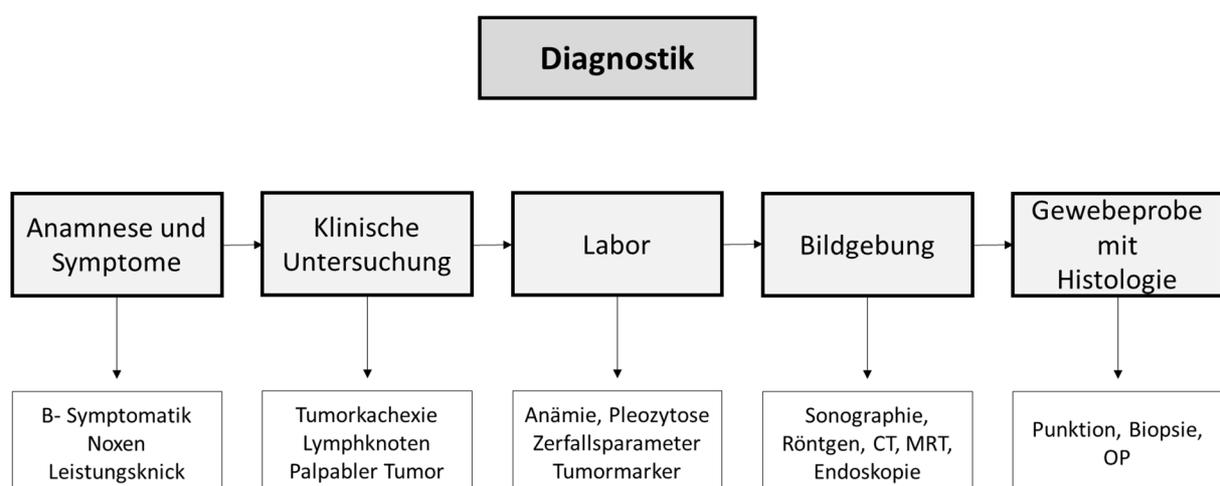


Abbildung 3: Die fünf Säulen zur Diagnose von Krebserkrankungen. Das Vorgehen von links nach rechts ergibt eine klinisch sinnvolle Reihenfolge. Unter jeder Diagnosegruppe finden sich jeweils passende Beispiele. Eigene Darstellung.

Ein neues, weniger invasives und noch nicht weit verbreitetes Werkzeug bei der Diagnostik von Krebserkrankungen stellen die sogenannten „liquid biopsies“ dar. Dabei wird mittels modernster Messverfahren zellfreie Tumor-DNA im Blut und anderen Körperflüssigkeiten detektiert. Die Wertigkeit der Ergebnisse dieses Verfahrens ist derzeit noch nicht komplett geklärt (Dahl et al., 2015).

Um eine Krebserkrankung angemessen behandeln zu können, muss zunächst ihre Ausbreitung exakt beschrieben werden. Dies betrifft die Tumorgroße, die Beschaffenheit der regionären Lymphknoten und gegebenenfalls das Vorkommen von Metastasen. In der TNM-Klassifikation werden diese Informationen zusammengeführt und im Rahmen des Stagings bewertet. Dabei beschreiben die Buchstaben jeweils ein Merkmal des Tumors:

- T: Ausdehnung des Primärtumors
- N: Befall der lokalen Lymphknoten
- M: Metastasen

Des Weiteren kann die Klassifikation beispielsweise Auskunft über Lymphgefäß- oder Veneninfiltration, das pathologische Grading (Grad der Differenzierung der Krebszellen) und die Resektionsart geben. An dieser Klassifikation leitet sich in den meisten Fällen die jeweilige Therapie ab, wodurch sich direkt ihre hohe klinische Relevanz zeigt (Webber et al., 2014).

1.1.4 Therapie

Die onkologische Therapie unterscheidet zwischen zwei grundsätzlich unterschiedlichen Therapiezielen. Der kurative Ansatz wird dann gewählt, wenn durch therapeutische Maßnahmen eine Heilung des Patienten von seinem Tumorleiden angestrebt wird. Ist dagegen aufgrund der Ausdehnung des Tumors oder aus Gründen, die in der Person des Erkrankten liegen - Alter, Begleiterkrankungen, Behandlungswunsch - eine Heilung nicht das primäre Ziel, ist ein palliativer Ansatz mit dem Patienten zu diskutieren. Beim palliativen Ansatz steht die Besserung von Krankheitssymptomen sowie die Verbesserung der allgemeinen Lebensqualität des Patienten im Vordergrund (Braun, 2014).

Wie angedeutet, unterscheiden sich die verschiedenen Krebsentitäten hinsichtlich Wachstum und Tendenz der Ausbreitung stark. Demzufolge muss sich auch die Therapie der einzelnen

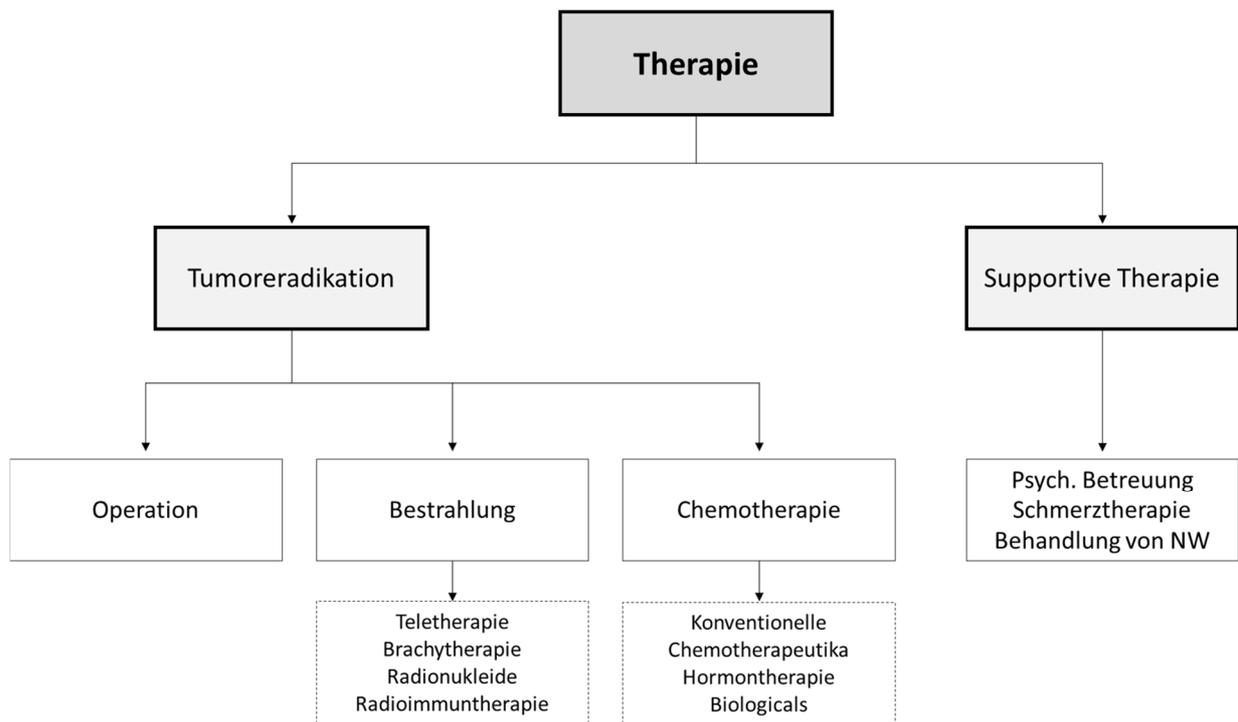


Abbildung 4: Therapieoptionen bei Krebserkrankungen (NW = Nebenwirkungen). Eigene Darstellung.

Krebsarten unterscheiden. Die hierbei eingesetzten Methoden verfolgen das Ziel der vollständigen Tumoreradikation, entweder mittels chirurgischer Operation, dem Einsatz von Chemotherapeutika, mittels Bestrahlung oder einer Kombination aus diesen Optionen (Abbildung 4). Sowohl bei der Bestrahlung als auch bei der Chemotherapie stehen verschiedene Formen beziehungsweise Substanzen zur Verfügung. Die Teletherapie bedient sich einer externen Strahlenquelle, welche den Tumor im Körper mit γ -Strahlung, Röntgenstrahlung oder Teilchenstrahlung angreift. Bei der Brachytherapie werden sogenannte radioaktive Seeds in den Tumor oder in die Nähe des Tumors eingebracht, die dort den Tumor lokal bestrahlen. Radionukleide sind strahlungsaktive Elemente, welche relativ selektiv von bestimmten Geweben aufgenommen werden und dieses zerstören (Bsp.: Radiojodtherapie bei Schilddrüsentumoren). Die Radioimmuntherapie beruht auf der Konjugation einer Trägersubstanz (beispielsweise eines Antikörpers) mit einem radioaktiven Stoff. Diese Kombination wird optimaler Weise nur von Tumorzellen aufgenommen, um dort ihre maximale Wirkung zu entfalten. In der Gruppe der Chemotherapeutika sind die konventionellen Substanzen, die entweder direkt (beispielsweise Alkylanzien) oder indirekt (beispielsweise Antimetabolite) mit der DNA von Zellen interagieren, von den Stoffen zu unterscheiden, welche zielgerichteter wirken. Hier ist zum einem die Hormontherapie zu

nennen, welche beispielsweise in Form der Steroide bei der Therapie von Leukämien und Lymphomen eine Rolle spielt oder in Form der Sexualhormone in der gynäkologischen Onkologie zum Einsatz kommt. Zum anderen gibt es die Gruppe der Biologicals. Diese Stoffe besitzen entweder ein spezielles Zielmolekül (beispielsweise Antikörper gegen krebszelltypische Stoffe) oder besitzen die Fähigkeit das Immunsystem des Körpers so zu modellieren, dass es vermehrt Tumorzellen tötet (Zytokine, Gentherapie) (Fauci, 2008). Hierbei nimmt auch die Bedeutung der Immun-Checkpoint-Inhibitoren in den letzten Jahren zu. Krebszellen verschaffen sich einen Überlebensvorteil, indem sie Moleküle in bestimmten Signalwegen stimulieren, welche eine hemmende Wirkung auf das Immunsystem ausüben. Beispiele hierfür wären das zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Antigen 4 (CTLA-4), was die T-Zellaktivierung negativ beeinflusst oder das programmierte Zelltodprotein 1 (PD-1), was die T-Zellfunktionen unterdrückt. Immun-Checkpoint-Inhibitoren inaktivieren diese Moleküle, wodurch die Immunität gegen Krebszellen gesteigert wird (Pardoll, 2012).

1.2 Kolorektales Karzinom

Bösartige Tumoren des Dick- und Mastdarms (kolorektale Karzinome) stellen sowohl bei Männern als auch bei Frauen in Deutschland die zweithäufigste Tumorerkrankung dar. 2013 wurde in Deutschland bei insgesamt etwa 62.400 Menschen ein kolorektales Karzinom diagnostiziert. Davon entfielen circa 34.050 Fälle auf das männliche und 28.360 Fälle auf das weibliche Geschlecht. Kolorektale Karzinome sind bei beiden Geschlechtern die zweithäufigste Todesursache in der Gruppe der bösartigen Neubildungen. Die relative 5-Jahresüberlebensrate betrug geschlechterunabhängig im Jahr 2013 63 %. Diese ist jedoch stark vom Stadium abhängig, in dem die Tumorerkrankung diagnostiziert wurde (Barnes, 2016).

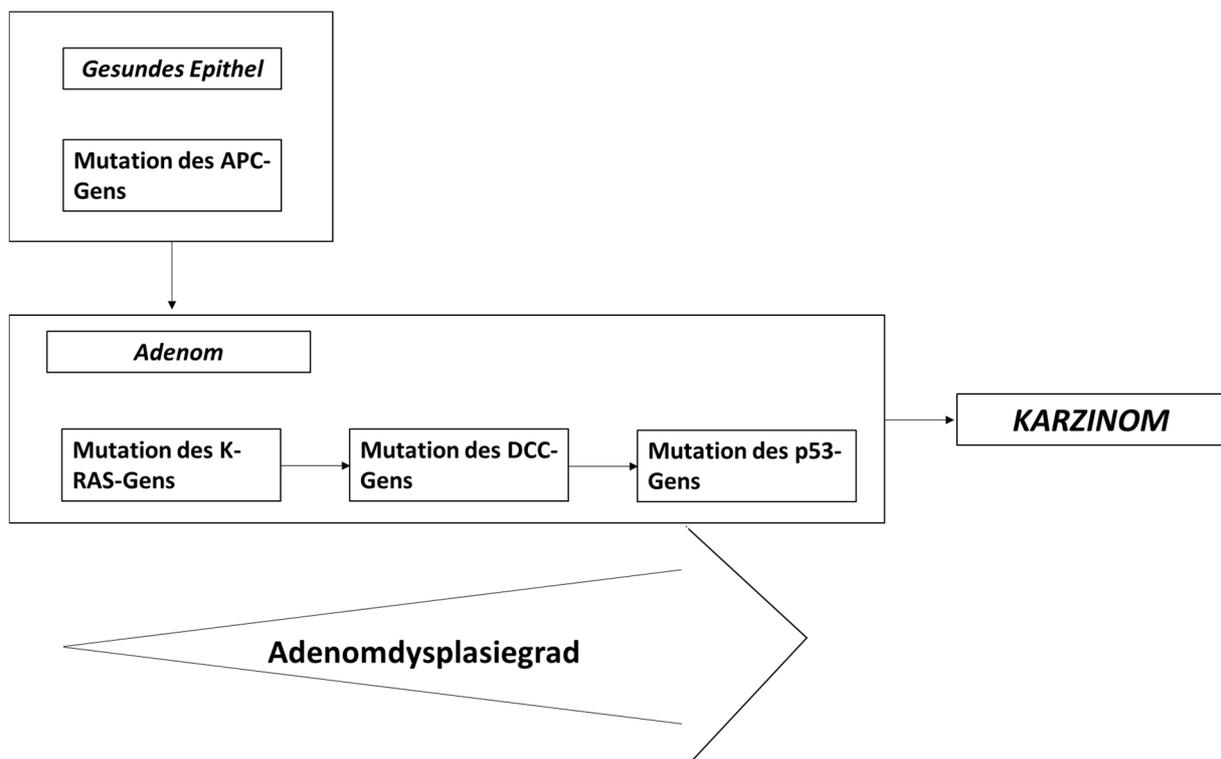


Abbildung 5: Adenom-Karzinom-Sequenz bei kolorektalen Karzinomen. Am Anfang der Sequenz scheint die Mutation des APC-Tumorsuppressor-Gens zu stehen, wodurch aus gesundem Epithel ein Adenom entsteht (Ichii et al., 1992). Eine Reihe weiterer Mutationen führt zur Zunahme der Dysplasie des Adenoms. Hierbei konnten unter anderem Mutationen des K-RAS-Protoonkogens (Takahashi & Wakabayashi, 2004) und des DCC-Tumorsuppressor-Gens (Thiagalingam et al., 1996) nachgewiesen werden. Den entscheidenden Schritt zur malignen Transformation scheint die Mutation des p53-Tumorsuppressor-Gens darzustellen (Tanaka, 2009). Eigene Darstellung.

Pathogenetisch spielt bei kolorektalen Karzinomen die erstmals 1988 beschriebene Adenom-Karzinom-Sequenz eine bedeutende Rolle (Vogelstein et al., 1988). Diese beschreibt die Beobachtung, dass die meisten kolorektalen Karzinome aus Adenomen entstehen. Adenome sind benigne epitheliale Neoplasien, welche in Form sogenannter Polypen im Darmlumen sichtbar werden. Der Entstehung solcher Adenome liegt eine bestimmte Abfolge verschiedener Mutationen von Tumorsuppressorgenen und Protoonkogenen zu Grunde. Hierbei scheint die Mutation des p53-Suppressorgens den entscheidenden Schritt zum Übergang vom Adenom zum Karzinom darzustellen (Abbildung 5) (Tanaka, 2009).

Die Symptome bei kolorektalen Karzinomen treten sehr unspezifisch und spät auf. Vor allem bei Blutbeimengungen im Stuhl oder Änderung der Stuhlgewohnheiten (Obstipation, Diarrhöe) sollte eine Tumorerkrankung differenzialdiagnostisch in Betracht gezogen werden. Weiter Hinweise können ein positiver Hämoccult-Test, abdominelle Resistenzen oder ein palpabler Tumor in der digital-rektalen Untersuchung (kurz: DRU) sein. Den diagnostischen Goldstandard stellt die Koloskopie mit Biopsieentnahme verdächtiger Regionen dar. Bestätigt sich die Verdachtsdiagnose schließen sich verschiedene Arten der Bildgebungen zur Erhebung des Stagings an (Abbildung 6) (Braun, 2014).

Abhängig vom Staging ergibt sich die TNM-Klassifikation:

- Infiltration des Primärtumors von:
 - Epithel oder Lamina propria (TIS)
 - Submukosa (T1)
 - Muscularis propria (T2)
 - Subserosa (T3)
 - Viszerales Peritoneum (T4a) oder Nachbarorgane/-strukturen (T4b)
- Befall lokaler Lymphknoten:
 - Negativ (N0)
 - 1-3 Lymphknotenmetastasen (N1)
 - > als 3 Lymphknotenmetastasen (N2)
- Fernmetastasierung:
 - Negativ (M0)
 - In einem Organ (M1)
 - In mehr als einem Organ oder im Peritoneum (M2) (Herold, 2013)

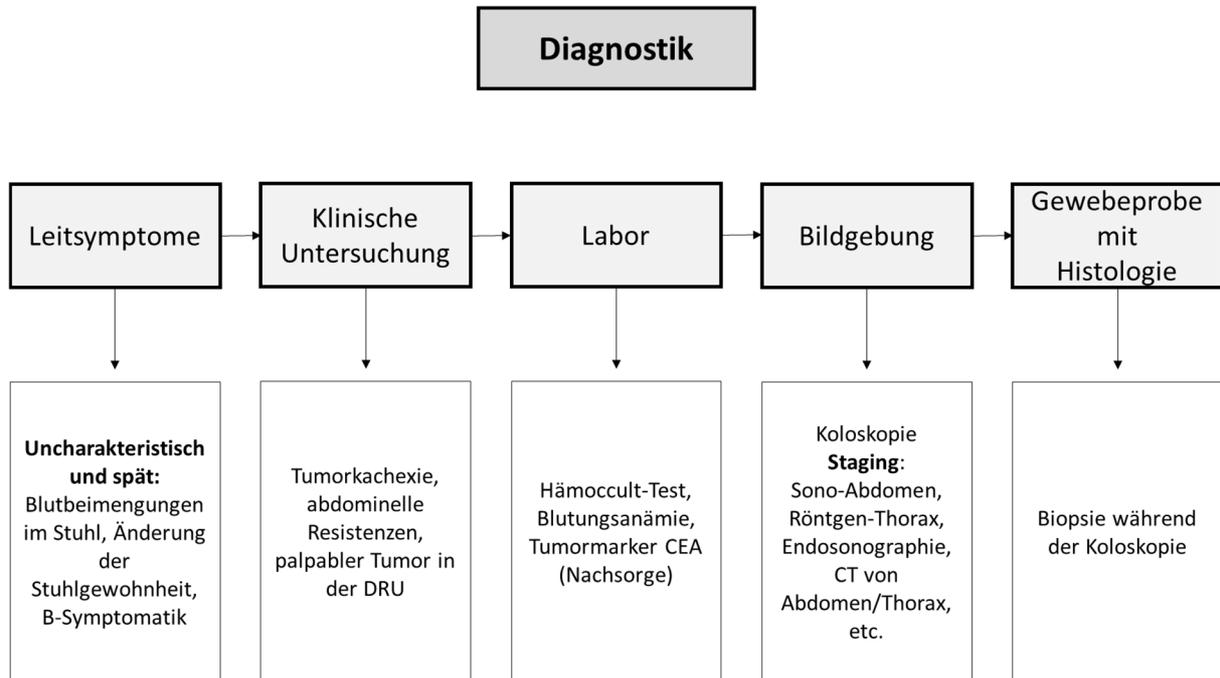


Abbildung 6: Diagnostik beim kolorektalen Karzinom. Das Vorgehen von links nach rechts ergibt eine klinisch sinnvolle Reihenfolge. Unter jeder Diagnosegruppe finden sich jeweils passende Beispiele. Abkürzungen: DRU = digital-rektale Untersuchung. Eigene Darstellung.

Die TNM-Klassifikation bildet die Grundlage für die Stadieneinteilung nach UICC (Union internationale contre le cancer), die unter anderem die Basis der Therapieentscheidung darstellt (Herold, 2013). Den Goldstandard bei der kurativen Behandlung stellt die chirurgische Therapie dar. Hierbei wird die komplette Entfernung des Tumors angestrebt. Postoperativ nimmt die adjuvante Bestrahlung des Operationsgebietes einen großen Stellenwert ein. Die Indikation einer adjuvanten Chemotherapie sollte stadien- und patientenabhängig leitliniengerecht in einem interdisziplinären Tumorboard getroffen werden.

Aufgrund der Tatsache, dass die meisten kolorektalen Karzinome aus Adenomen entstehen, spielt die Krebsfrüherkennung eine bedeutende Rolle. Hierbei sollten bei Personen ab 50 Jahren jährlich ein fäkaler Okkultbluttest sowie die digital-rektale Untersuchung durchgeführt werden. Ab dem 50. Lebensjahr sollte alle zehn Jahre die Durchführung einer Koloskopie angestrebt werden (Braun, 2014).

1.3 Hitzeschockproteine

Bereits 1962 beobachtete der italienische Wissenschaftler F. Ritossa nach Wärmebehandlung über 37°C eine Auflockerung in der Riesenchromosomenstruktur der Speicheldrüsenzellen der Fliegenart *Drosophila melanogaster*, die auf eine verstärkte Transkriptionsaktivität bestimmter Genabschnitte hinweist (Ritossa, 1962). Dieser sogenannten Hitzeschockantwort wurde später die Überexpression von Hitzeschockproteinen (englisch: heat shock proteins, kurz: HSP) zugeordnet (Tissieres, Mitchell, & Tracy, 1974). Aufgrund der erstbeschriebenen Induktion der Proteine durch Hitze wurden die Proteine als Hitzeschockproteine bezeichnet. Später zeigte sich, dass nahezu jede Art von Stress in der Lage ist, die Expression der HSP zu induzieren. Im Laufe der Jahre entdeckte man immer mehr Mitglieder dieser Proteinfamilien und klassifizierte sie mittels ihres Molekulargewichts. Ein Überblick über die wichtigsten Vertreter der HSP ist in Tabelle 2 gezeigt. Jede Familie besitzt eine große Anzahl von Mitgliedern, die innerhalb einer Familie stark konserviert sind (Kampinga et al., 2009).

HSP wurden bislang in allen kernhaltigen Zellen nachgewiesen. Dies trifft sowohl für Pro- als auch für Eukaryoten zu. Generell sind die HSP-Gehalte in Zellen unter normalen physiologischen Bedingungen niedrig. Ist eine Zelle jedoch Stress ausgesetzt, beispielsweise in Form von Temperaturerhöhungen, UV-Strahlung oder Hypoxie, wird die Transkription und somit die Produktion der HSP rasch gesteigert (Horvath, Multhoff, Sonnleitner, & Vigh, 2008). Betrachtet man die Hauptfunktionen der HSP als molekulare Chaperone (deutsch: Anstandsdamen) so ergibt diese Hochregulation durchaus Sinn. Chaperone spielen bei der Faltung neusynthetisierter Aminosäuresequenzen, dem Transport von Proteinen sowie bei der Reparatur und dem Abbau fehlgefalteter Proteine eine bedeutende Rolle (Hartl, 1996). Neben dieser üben HSP noch eine Vielzahl weiterer Funktionen im Bereich der Regulation des Zelltodes, der Antigenpräsentation und Immunstimulation aus. Zudem unterstützen membrangebundene und extrazelluläre (exosomale) HSP die interzelluläre Kommunikation (Horvath et al., 2008).

Aufgrund der Heterogenität der HSP und ihrer weitreichenden Funktionen wird im Folgenden intensiver auf die Funktionen der Hsp70-Familie (Hsp70, HSPA) eingegangen.

Klassifikation nach Kampinga et al.	Klassifikation mittels Molekulargewicht
HSPH	Hsp110
HSPC	Hsp90
HSPA	Hsp70
DNAJ	Hsp40
HSPB	small HSP
HSPD/E	Hsp60/Hsp10
CCT	TRIC

Tabelle 2: Klassifikation der HSP nach Kampinga und mittels Molekulargewicht (Kampinga et al., 2009).

1.3.1 Hitzeschockprotein 70 (Hsp70)

Die Familie der 70 kDa HSP ist, analog zu anderen HSP, eine Gruppe hochkonservierter Proteine, die in allen Zellen, ob Pro- oder Eukaryoten, in nahezu allen Zellkompartimenten vorkommt. Ihre Ubiquität und die enge Verwandtschaft zwischen den HSP verschiedener Spezies zeigt folgendes Beispiel: Die Aminosäuresequenz des menschlichen Hsp70 stimmt mit der Sequenz der Fliegenart *Drosophila* zu 73 % und mit Dank (dem Korrelat zu Hsp70 in *E. coli*) zu 47 % überein (Hunt & Morimoto, 1985).

Insgesamt wurden bis jetzt 13 Proteine beschrieben, die der Hsp70-Familie zugeordnet werden. Diese unterscheiden sich anhand ihrer Aminosäuresequenz, ihrer Art der Regulation, ihres Vorkommens in der Zelle und ihrer Funktion. Spricht man von Hsp70, so bezieht man sich meistens auf die bekanntesten Vertreter der Familie, HSPA 1A und HSPA 1B, die sich nur in zwei Aminosäuren unterscheiden. Es könnte sich bei den beiden Vertretern um „splice“-Varianten handeln. Zusammen mit HSPA 6 bilden sie die Gruppe der Familie, deren Bildung durch Temperaturerhöhung induziert wird. Demgegenüber steht HSPA 8, auch Hsc70 (heat shock cognate protein 70) genannt, welches konstitutiv in Zellen vorkommt und vorwiegend Aufgaben unter physiologischen Bedingungen erfüllt (Kampinga et al., 2009). Diese Funktionen werden ausführlich an anderer Stelle beschrieben.

Alle 70kDa HSP sind strukturell sehr ähnlich aufgebaut, wobei die Länge der Aminosäuresequenz zwischen 639 und 679 Aminosäuren variiert. Die Proteine besitzen eine ATPase-Domäne, welche zur ATP-Bindung erforderlich ist und eine Substratbindedomäne, die durch eine Proteasen-sensible Region getrennt werden. Zudem interagieren eine Reihe

anderer Proteine mit HSP. Die variable Region der Proteine unterscheidet sich von HSP zu HSP. Mit dem sogenannten EEVD-Motiv besitzen sie außerdem eine Region, an die speziell Co-Chaperone und andere HSP binden können. HSP, die in bestimmten Zellorganellen vorkommen sollen, weisen zudem ein Lokalisationssignal am N-terminalen Ende auf (Abbildung 7) (Daugaard, Rohde, & Jaattela, 2007). Vertreter der Hsp70-Familie kommen nämlich nicht nur im Zytosol, sondern auch in verschiedenen Zellkompartimenten vor. Dazu zählen das endoplasmatische Retikulum, die Mitochondrien und der Nukleus (Kampinga et al., 2009). Darüber hinaus konnte Hsp70 auf Zellmembranen (Multhoff et al., 1995) und im extrazellulären Milieu nachgewiesen werden (Feige & Polla, 1994; Pockley & Multhoff, 2008; Vega et al., 2008). Abbildung 8 gibt einen Überblick über die verschiedenen Aufgaben von Hsp70 in der Zelle. Ist die Zelle exogenem Stress, beispielsweise in Form von Temperaturerhöhung ausgesetzt, so wird die Transkription und damit die Synthese der durch Stress induzierbaren Hsp70-Vertreter durch den Transkriptionsfaktor HSF („heat-shock-factor“) gesteigert. Die Aktivierung von HSF geschieht durch die Denaturierung von Proteinen in der Zelle, durch Änderungen des Zustandes der Zellmembran sowie mittels Membranrezeptoren, welche als Messinstrumente für exogene Stressoren fungieren (Horvath et al., 2008; Schaeffer, Bassi, & Gattaz, 2005).

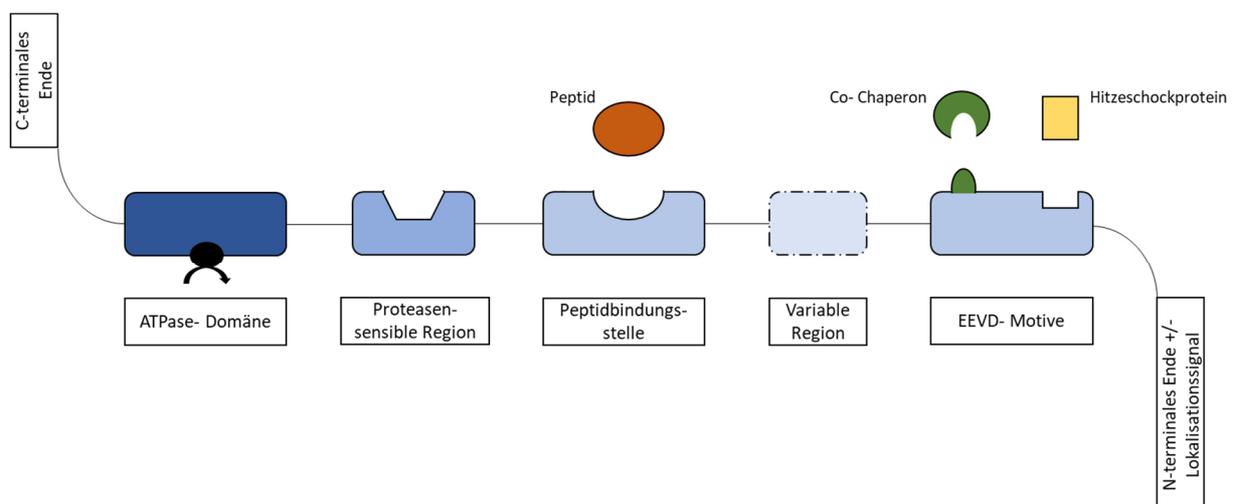


Abbildung 7: Struktur von Hsp70. Dargestellt sind die verschiedenen Regionen mit ihren jeweiligen Bindungsstellen. Eigene Darstellung adaptiert nach (Daugaard et al., 2007).

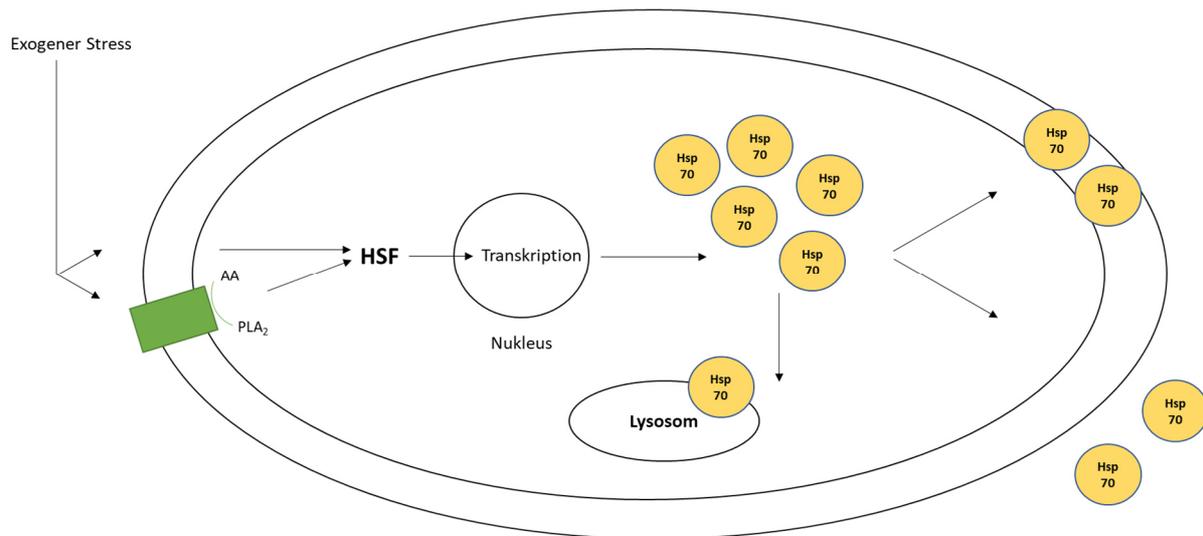


Abbildung 8: Transkription und Funktion von Hsp70 in Zellen. Exogener Stress führt über den Hsp-Rezeptor, über Rezeptoren oder über die Aktivierung von Phospholipase A₂ (PLA₂) zur vermehrten Transkription von Hsp70 mittels des Transkriptionsfaktors HSF („heat shock factor“). Hsp70 übt nun Funktionen im Zytosol, in der Plasmamembran, extrazellulär und im Zusammenspiel mit Lysosomen aus. Eigene Darstellung adaptiert nach (Horvath et al., 2008).

HSP erfüllen diverse Funktionen. Zum einen übernehmen sie verschiedene Aufgaben im Zytosol der Zellen. Hierzu gehören unter physiologischen Bedingungen die Proteinfaltung sowie die Korrektur oder der Abbau von fehlgefalteten und denaturierten Proteinen. Zudem spielen HSP beim Transport von Proteinen sowie bei der Kontrolle von regulatorischen Proteinen eine Rolle (Daugaard et al., 2007; Lindquist & Craig, 1988). Unter Stress schützen die HSP die Zellen zusätzlich vor der Akkumulation denaturierter und fehlgefalteter Proteine und dem damit verbundenen Zelltod. Dies konnte sowohl *in vitro* an Zellkulturen (Bellmann, Jaattela, Wissing, Burkart, & Kolb, 1996; Wissing & Jaattela, 1996) als auch *in vivo* an Mäusemodellen (Marber et al., 1995; Plumier et al., 1995) gezeigt werden. Eine weitere Schutzfunktion übt Hsp70 über die Interaktion mit Lysosomen aus. Hsp70 stabilisiert lysosomale Membranen, verhindert somit die Membranpermeabilisation der Lysosomen, die damit verbundene Ausschüttung von pro-apoptotischen Faktoren und den anschließenden Zelltod (Nylandsted et al., 2004). Zudem schützt Hsp70 mitotische Zellen vor Zentrosomenschäden und Teilungsabnormalitäten (Hut, Kampinga, & Sibon, 2005).

Hsp70 konnte unter physiologischen und pathologischen Bedingungen auf der Oberfläche und im Lumen verschiedener Zellen gefunden werden, beispielsweise auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten (Hirsh, Hashiguchi, Chen, Yip, & Junger, 2006) oder auf und in

Primärzellen verschiedener Tumorentitäten. Hierzu zählen beispielsweise Knochentumoren (Ewing-Sarkom, Osteosarkom) (Multhoff et al., 1995), Tumoren des Colons, des Rektums, des Magen und des Pankreas. Auch auf der Zelloberfläche von Lungentumoren und Tumoren des zentralen Nervensystems sowie des blutbildenden Systems konnte Hsp70 auf der Zellmembran nachgewiesen werden (Hantschel et al., 2000; Pfister et al., 2007). Gleichzeitig exprimieren korrespondierende gesunde Zellen kein beziehungsweise nur sehr geringe Mengen an Hsp70 auf ihrer Membran. Tumorzellen, die hohe Konzentrationen an Hsp70 enthalten, scheinen aufgrund dieser Tatsache, resistenter gegenüber Stress zu sein (z.B. gegenüber durch Bestrahlung ausgelösten zytotoxischen Effekten) (Gehrmann et al., 2005).

Der Einbau des Proteins in die Plasmamembranen von maligne entarteten Zellen und vor allem der zu Grunde liegende Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt und Gegenstand aktueller Forschung. Aufgrund der Tatsache, dass weder Salz, Säure oder Lauge in der Lage ist, Hsp70 aus der Membran von Tumorzellen zu entfernen (Gehrmann et al., 2008; Vega et al., 2008), erscheint eine Bindung an andere Proteine der Plasmamembran unwahrscheinlich (Botzler, Li, Issels, & Multhoff, 1998). Weitere Daten legen nahe, dass die Lokalisation von Hsp70 in Plasmamembranen über sogenannte „detergent-resistant microdomains“, auch „lipid rafts“ genannt, vermittelt ist, da Hsp70 mit Hilfe von nicht-ionischen Detergenzien nicht aus der Zelloberfläche von Hsp70-positiven Zellen gelöst werden konnte (Vega et al., 2008).

„Lipid rafts“ bezeichnen bestimmte Bereiche in der Zellmembran, welche einen hohen Anteil an Sphingolipiden und Cholesterin aufweisen (Brown & London, 2000). Eine andere „lipid raft“-unabhängige Verankerung von Hsp70 in die Zellmembran ist an das Vorkommen von Phosphatidylserin geknüpft. Einen positiven Effekt auf den Einbau von Hsp70 in Plasmamembranen konnte zudem für Globotriaosylceramid (Gehrmann et al., 2008), das anionische Phospholipid Bismonoacylglycerophosphat (Nylandsted et al., 2004) sowie für Monosialotetrahexosylgangliosid und Cholesterin nachgewiesen werden (De Maio, 2011). Phosphatidylcholin oder Phosphatidylethanolamin dagegen scheinen den Einbau von Hsp70 in die Zellmembran nicht zu fördern (Arispe, Doh, Simakova, Kurganov, & De Maio, 2004). Nichtsdestoweniger ist der genaue Mechanismus der Lipidinteraktion nicht vollständig verstanden. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass dieser mit der Membranfluidität verknüpft ist und beispielsweise vom „flip/flop“-Prozess des Phosphatidylserins abhängig sein könnte (De Maio, 2011; Horvath et al., 2008).

Darüber hinaus konnte Hsp70 im extrazellulären Milieu gefunden werden (De Maio, 2011). Hieraus ergibt sich die Frage, auf welche Art und Weise die Proteine den Weg ins extrazelluläre Milieu finden. Hierbei werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert. Eine Sekretion im typischen Sinne über den klassischen Weg via endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat scheint jedoch sehr unwahrscheinlich. Stoffe, die zur Blockierung dieses ER-Golgi-Weges führen (Monensin, Brefeldin A, Tunicamycin und Thapsigargin) führten zu keiner Abnahme der Sekretion von Hsp70 (Bausero, Gastpar, Multhoff, & Asea, 2005). Generell kann man momentan von zwei prinzipiell unterschiedlichen Wegen ausgehen. Einerseits kann Hsp70 passiv durch Zelltod und die damit verbundene Zellyse ins extrazelluläre Milieu gelangen. Andererseits akkumulieren Daten, die zeigen, dass es vor allem bei Tumorzellen zu einer aktiven Freisetzung von Hsp70 aus Lipid-Vesikeln kommt. Hierbei taten sich in den letzten Jahren folgende drei Möglichkeiten hervor, welche die Unabhängigkeit vom endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat teilen (De Maio, 2011):

1. Die Sekretion über den Lysosomen-Endosomen-Weg postuliert die Translokation von Hsp70 in Lysosomen. Dort entziehen sie sich dem Abbau und gelangen anschließend über endozytotische Prozesse ins extrazelluläre Milieu (Mambula & Calderwood, 2006).
2. Weitere experimentelle Daten legen eine Sekretion über sogenannte „secretory-like granules“ nahe (Evdonin et al., 2006).
3. Verschiedene Studien haben zudem gezeigt, dass Hsp70 in membrangebundener Form als Lipidvesikel im extrazellulären Milieu von Tumorzellen vorkommt (Gastpar et al., 2005; Vega et al., 2008). Aufgrund ihres Verhaltens auf einem Zuckergradienten, ihrer geringen Größe und ihrem hohen Anteil an Acetylcholinesterase konnten diese Vesikel als Exosomen charakterisiert werden (Gastpar et al., 2005).

Die Entstehung von Exosomen und ihre Sekretion zeigt Abbildung 9. Exosomen besitzen einen Durchmesser von 40 bis 100 nm (Johnstone, 2006). Experimentelle Untersuchungen zeigen, dass Tumorzellen im Gegensatz zu den jeweiligen gesunden Zellen Membranvesikel sezernieren. Dabei konnte Hsp70 auf der Membran dieser Vesikel und in ihrem Inneren nachgewiesen werden. Neben Tumorzellen sezernieren verschiedene Zellen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen Exosomen.

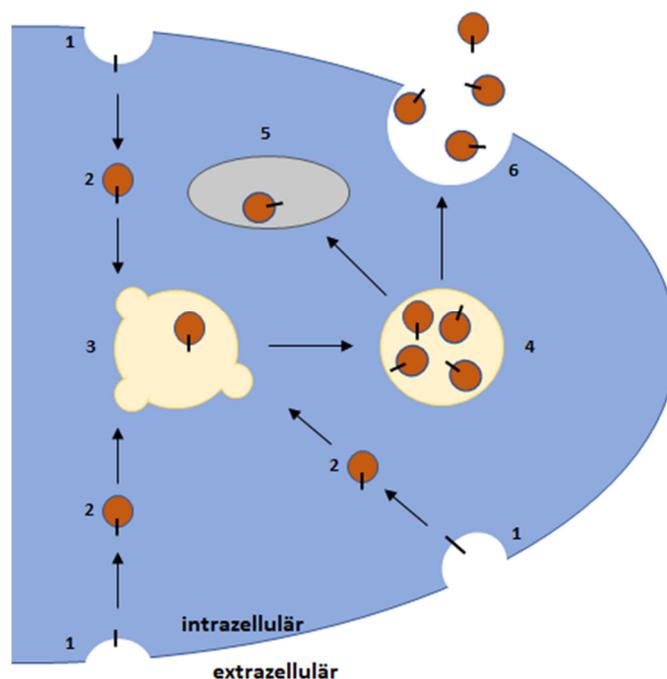


Abbildung 9: Entstehung und Freisetzung von Exosomen. Exosomen entstehen aus einer doppelten Einstülpung der Zellmembran (1). Die durch diesen Vorgang entstandenen Vesikel (2) formen sich zu sogenannten „Early Endosomes“ (3). Durch Verschmelzung formen sich größere Vesikel, welche mehrere kleine enthalten. Diese nennt man „multivesicular bodies“ (4). Sie werden entweder in Lysosomen abgebaut (5) oder fusionieren mit der Zellmembran, wodurch die darin enthaltenen Exosomen in den extrazellulären Raum gelangen (6) (Bobrie, Colombo, Raposo, & Thery, 2011). Dieser Sekretionsvorgang kann durch Stress, beispielsweise durch das Zytokin Interferon- γ , stimuliert werden, was zu einer erhöhten Konzentration an Exosomen im extrazellulären Milieu führt (Bausero et al., 2005). Eigene Darstellung.

Hierzu zählen Zellen der hämatopoetischen und lymphatischen Zellreihe (Retikulozyten (Johnstone, Adam, Hammond, Orr, & Turbide, 1987), B-Zellen (Raposo et al., 1996) und T-Zellen (Peters et al., 1989)), Adipozyten, Fibroblasten, intestinale Epithelzellen, Schwann-Zellen und Alveolarzellen. Exosomen konnten folglich auch in diversen Körperflüssigkeiten, wie im Serum, im Urin oder in der bronchoalveolären Lavage nachgewiesen werden (Record, Subra, Silvente-Poirot, & Poirot, 2011). Exosomen, wie in Abbildung 9 ersichtlich, entstehen durch eine Einstülpung der Plasmamembran. Sie spiegeln folglich die Zusammensetzung der Plasmamembran der Zelle in dem Bereich der Einstülpung wieder. Dies bedeutet, dass Exosomen, die von Zellen mit einer hohen Dichte an membrangebundenem Hsp70

(beispielsweise Tumorzellen) abstammen, eine hohe Dichte an Hsp70 in ihrer Membran aufweisen.

Allerdings können auf Exosomen nicht alle Bestandteile der Plasmamembran gefunden werden. Deshalb wird vermutet, dass die Einstülpungen nicht an willkürlichen Orten entstehen. Aufgrund der Tatsache, dass in der Membran von Exosomen ein hoher Anteil von Cholesterin und Sphingolipiden nachgewiesen werden konnte, wird angenommen, dass die Einstülpungen primär im Bereich von „lipid rafts“ geschehen (de Gassart, Geminard, Fevrier, Raposo, & Vidal, 2003; Simpson, Jensen, & Lim, 2008). Durch den Einstülpungsvorgang werden außerdem Teile des Zytosols, nicht aber des Endoplasmatischen Retikulums oder des Golgi-Apparates, in den Exosomen eingeschlossen. Dementsprechend konnte man in Exosomen, die beispielsweise von B-Zellen (Clayton, Turkes, Navabi, Mason, & Tabi, 2005) oder Kolon- und Pankreastumorzellen (Gastpar et al., 2005) sezerniert wurden, HSP nachweisen. Jedoch wurden, analog zur Plasmamembran, nicht sämtliche Proteine des Zytosols nachgewiesen. Dementsprechend kann auch hier eine hohe Spezifität bei der Beladung von Exosomen angenommen werden (De Maio, 2011).

Unabhängig vom Mechanismus der Sekretion erfüllen extrazelluläre gelöste und membrangebundene HSP wichtige Funktionen im Bereich der interzellulären Kommunikation. Hierbei übermitteln sie beispielsweise Widerstandsfähigkeit gegenüber Stress auf andere Zellen und fungieren als Ziel- und Kommunikationsprotein für das Immunsystem (Calderwood, Mambula, & Gray, 2007).

Es konnte gezeigt werden, dass Komplexe aus HSP und antigenen Peptiden durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen werden und dem MHC-Rezeptor-Weg (MHC = major histocompatibility complex) zugeführt werden. Dieser Vorgang wird „cross-priming“ genannt (Arnold-Schild et al., 1999; Srivastava, Udono, Blachere, & Li, 1994). Eine Beteiligung konnte unter anderem für CD14- (CD = Cluster of differentiation) (Asea et al., 2000), CD91- (Basu, Binder, Ramalingam, & Srivastava, 2001) und CD40-Rezeptoren (Becker, Hartl, & Wieland, 2002) sowie für „scavenger“-Rezeptoren (Berwin et al., 2003; Theriault, Adachi, & Calderwood, 2006) nachgewiesen werden. Der durch Endozytose aufgenommene und anschließend verarbeitete Komplex wird von antigenpräsentierenden Zellen (kurz: APC) auf MHC-Rezeptoren der Klasse I präsentiert (Castellino et al., 2000). Dies führt zu einer antigenspezifischen CD8⁺ T-Zell-Antwort (Blachere et al., 1997; Ciupitu et al., 1998). Weitere experimentelle Daten legen nahe, dass es durch extrazelluläres Hsp70 zu einer vermehrten

Prozessierung von Antigenstrukturen und ihrer Präsentation auf MHC-Rezeptoren der Klasse II kommt. Dies dient als Erkennungsstruktur für CD4⁺ T-Lymphozyten, was zu einer vermehrten Aktivierung und Proliferation dieser führt (R. Wang, Kovalchin, Muhlenkamp, & Chandawarkar, 2006).

Hsp70 scheint des Weiteren mit hoher Affinität an Rezeptoren auf Monozyten zu binden. Vor allem das C-terminale Ende des Proteins zeigt hierbei ein hohes stimulierendes Potential. So steigert Hsp70 in Monozyten die Freisetzung von Chemokinen, Interleukin-12, Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Stickstoffoxid, was zu einer allgemeinen Aktivierung des Immunsystems führt. Außerdem konnte somit die Reifung dendritischer Zellen gefördert werden (Lehner et al., 2004; Y. Wang et al., 2002). Für die Ausschüttung von Zytokinen, wie TNF- α , Interleukin 6 und Interleukin 1- β , wurde ein CD14-abhängiger und ein CD14-unabhängiger Signalübertragungsweg beschrieben (Asea et al., 2000).

Es gibt experimentelle Hinweise auf eine Aktivierung von Makrophagen durch extrazelluläres Hsp70. Dieses bindet an „lipid-raft“-Mikrodomänen der Plasmamembran von Makrophagen und steigert deren Phagozytosekapazität um das bis zu sechsfache (R. Wang et al., 2006). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass mit Hsp70 assoziierte Lipidvesikel Makrophagen 250-mal stärker aktivieren, als gelöstes Hsp70 in gleicher Konzentration (Vega et al., 2008).

Zusätzlich dazu dient auf der Plasmamembran von Tumorzellen gebundenes Hsp70 als Erkennungsstruktur für natürliche Killerzellen. Diese binden Hsp70 und töten die betroffenen Zellen durch ihre lytische Aktivität (Multhoff et al., 1997). Es wurde gezeigt, dass dieser Vorgang Granzym B-abhängig ist und die Apoptose der betroffenen Zellen induziert (Gross, Koelch, DeMaio, Arispe, & Multhoff, 2003). Des Weiteren fördert extrazelluläres Hsp70 die Proliferation von natürlichen Killerzellen und steigert deren zytolytische Aktivität gegenüber Tumorzellen, welche Hsp70 auf ihrer Plasmamembran exprimieren (Multhoff et al., 1999). Die zytolytische Aktivität und Migration natürlicher Killerzellen konnte zudem auch von Hsp70-membran-positiven Exosomen gesteigert werden (Gastpar et al., 2005).

Verschiedene Studien zeigten, dass Hsp70-Werte im Serum von Patienten mit bestimmten Erkrankungen im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden erhöht sind. Dies konnte beispielsweise für Patienten mit ARDS (acute respiratory distress syndrome) (Ganter et al., 2006), mit koronarer Herzkrankheit (Zhang et al., 2010) oder mit Krebserkrankungen (Azuma et al., 2003; Dutta et al., 2012) gezeigt werden. Allerdings besteht das Problem, dass die Messwerte eine hohe Streuung aufweisen. Abhängig vom verwendeten ELISA-Testsystem

(kurz für: enzyme linked immunosorbent assay) konnten sowohl Werte im pg/ml-Bereich (Dutta et al., 2012; Lebherz-Eichinger et al., 2012) als auch Werte von mehreren µg/ml (Pockley, Shepherd, & Corton, 1998) gemessen werden. Zusätzlich muss bei der Nutzung von unverdünnten Serum- oder Plasmaproben der sogenannte Matrixeffekt in Betracht gezogen werden. Dieser ist definiert als der Effekt, den alle Stoffe einer Probe (z.B. Serum), die nicht der zu messende Analyt (hier: Hsp70) sind, auf das Endergebnis haben (Njemini, Demanet, & Mets, 2005). Erschwerend kommt hierbei dazu, dass die meisten der verwendeten ELISA-Systeme nicht für die Nutzung mit Serum- oder Plasmaproben generiert und validiert wurden (Multhoff & Hightower, 2011).

Der Forschungsgruppe von Frau Multhoff ist es gelungen, einen neuen Antikörper gegen Hsp70 (cmHsp70.1) herzustellen. Dabei wurden Mäuse mit einer 14 Aminosäuren langen Sequenz des C-terminalen Endes (TKDNNLLGRFELSG; kurz: TKD) von Hsp70 immunisiert. Die menschliche TKD-Sequenz unterscheidet sich von der Sequenz der Mäuse nur durch die Aminosäure an Position 2. Deshalb besitzt der Antikörper eine Kreuzreaktivität zwischen menschlichem und murinem Hsp70. Die Besonderheit besteht darin, dass der Antikörper, im Gegensatz zu anderen Antikörpern gegen Hsp70, keine Kreuzreaktivität zu Hsc70 besitzt und somit spezifisch die durch Stress induzierbare Form der Hsp70-Familie detektiert. Zusätzlich ist er in der Lage, membrangebundenes Hsp70 auf Tumorzellen zu erkennen. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass nur ein kleiner Teil des C-terminalen Endes auf der Membran zugänglich ist (Abbildung 10) (Multhoff & Hightower, 2011; Stangl, Gehrman, Dressel, et al., 2011). Aufgrund dieser Tatsachen bietet sich der Antikörper für die Verwendung in einem ELISA für Serum- und Plasmaproben an, da er neben freiem auch exosomales Hsp70 erkennen und somit messen kann.

Diese Arbeit hat das Ziel einen neuen lipHsp70-ELISAs zu validieren, welcher sich die Eigenschaften des cmHsp70.1-Antikörpers zu Nutze macht. Dabei wurden Puffer, Detergenzien und Antikörper verwendet, welche optimal auf die Erkennung von freiem und membrangebundenem Hsp70 abgestimmt sind. Zur internen Kontrolle wurden die Proben zusätzlich mit einem kommerziell erhältlichen Hsp70-ELISA von R&D-Systems gemessen und mit diesen Ergebnissen verglichen. Ziel der Arbeit ist es, ein optimiertes ELISA-System zur Messung von Hsp70 zu etablieren und einen Normbereich für den Hsp70-Serumwert bei gesunden Spendern zu definieren. Um einen möglichen pathologischen Cut-off-Wert zu

bestimmen, wurden die Hsp70-Serumwerte der gesunden Probanden mit denen von Patienten mit kolorektalen Karzinomen verglichen.

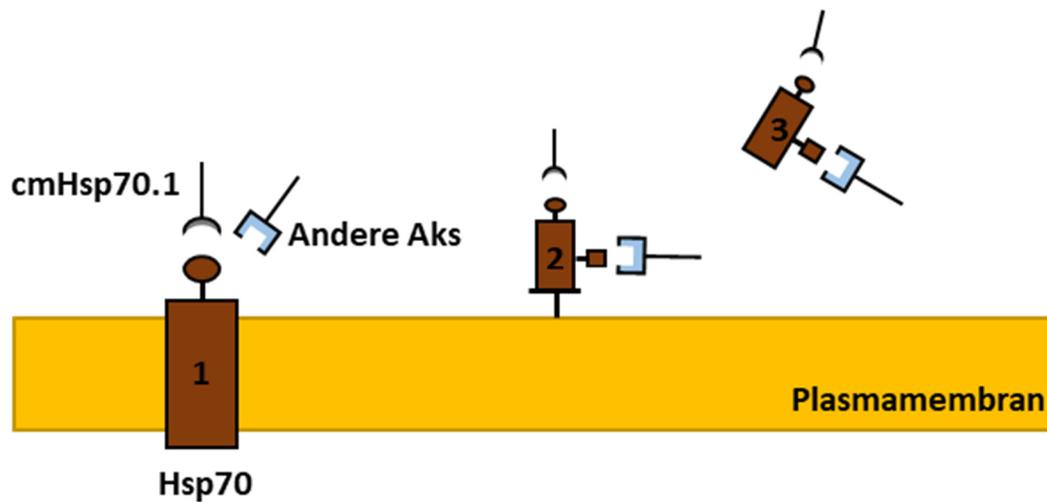


Abbildung 10: Eigenschaften des Antikörpers cmHsp70.1. Er kann sowohl membrangebundenes (1), rezeptorgebundenes (2) und freies Hsp70 (3) erkennen und binden. Andere Antikörper dagegen können membrangebundenes Hsp70 (1) nicht erkennen. Sie binden lediglich rezeptorgebundenes (2) und freies Hsp70 (3) (Multhoff & Hightower, 2011). Eigene Darstellung.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Alle Materialien, Reagenzien und Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, gemäß den Herstellerangaben gelagert.

2.1.1 Materialien zur venösen Blutentnahme

Produkt	Hersteller
Octeniderm® farblos	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Safety-Multifly®-butterfly Nadel 21G	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette® 7,5 ml Z	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette® 9ml K3E	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 3: Materialien zur venösen Blutentnahme.

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller
Aqua ad iniectabilia	B. Braun, Melsungen, Deutschland
BCA Protein-Kit	Pierce, Thermo, Rockford, IL, USA
2,2-Bis(hydroxymethyl)-2,2',2''-nitrilotriethanol (BIS-TRIS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Chemiluminescence Developing-Kit	Pierce, Thermo, Rockford, IL, USA
CrossDown-Puffer	Applichem, Chicago, IL, USA
EDTA	Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Horseradish peroxidase-conjugated Streptavidin	Pierce, Thermo, Rockford, IL, USA
LSM1077	PAA, Cölbe, Germany

Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phosphate buffered saline (PBS)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Rekombinantes Hsp70 (ADI-NSP-555)	Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA
Salzsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Schwefelsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Sf9 insect cell system	Orbigen, San Diego, CA, USA
Substrate reagent pack	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween 20	Calbiochem, Merck, Darmstadt, Deutschland
1-palmitoyl-2-oleoyl-snglycero-3-phosphocholine (POPC)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA
1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (POPS)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA

Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien.

2.1.3 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Biotinylierter muriner monoklonaler Antikörper cmHsp70.1 (cmHsp70.1-Antikörper)	multimmune GmbH, München, Deutschland
Horseradish peroxidase-konjugierter sekundärer Antikörper	Dako, Glostrup, Dänemark
Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen	Dauids Biotechnologie, Regensburg, Deutschland
Total HSP70 Capture Antibody (mouse anti-human Hsp70)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Total HSP70 Detection Antibody (biotinylated rabbit anti-human Hsp70)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

Tabelle 5: Antikörper.

2.1.4 Kit: Human/Mouse/Rat Total HSP70/HSPA1A DuoSet IC ELISA

In den Versuchen wurde das Human/Mouse/Rat Total HSP70/HSPA1A DuoSet IC ELISA Kit von R&D Systems, Minneapolis, MN, USA benutzt. Es beinhaltet die beiden letzten Antikörper aus Tabelle 5, Streptavidin-HRP (mit „horseradish-peroxidase“ konjugiertes Streptavidin) und Total HSP70 Standard (rekombinantes humanes Hsp70). Das Kit wurde bei 4° Celsius gelagert.

2.1.5 Weitere Materialien

Material	Hersteller
Costar 3590 ELISA-Platte	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
D10-Diamond Tips (0,1-10 µl)	Gilson Inc., Middleton, WI, USA
D200-Diamond Tips (2-200 µl)	Gilson Inc., Middleton, WI, USA
D1000-Diamond Tips (200-1000 µl)	Gilson Inc., Middleton, WI, USA
epT.I.P.S 20-300 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcontubes 15ml	TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Deutschland
Falcontubes 50ml	TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Deutschland
Flüssigkeitsreservoir	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Mehrkanalpipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetman; Pipette bis 1000 µl	Gilson Inc., Middleton, WI, USA
Pipetman; Pipette bis 200 µl	Gilson Inc., Middleton, WI, USA
Pipetman; Pipette bis 100 µl	Gilson Inc., Middleton, WI, USA
Pipetman; Pipette bis 10 µl	Gilson Inc., Middleton, WI, USA
SafeLock Tubes 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
96-well MaxiSorp Nunc-Immuno Platte	Thermo, Rochester, NY

Tabelle 6: Weitere Hilfsmaterialien.

2.1.6 Technische Geräte

Gerät	Hersteller
Inkubator	Heraeus, Hanau, Deutschland
Kryozentrifuge Mikro 22r	Hettich Lab, Tuttlingen, Deutschland
Microplate Reader	BioTek, Winooski, VT, USA
Mini Extruder	Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA
Ultrazentrifuge Sorvall Discovery	Hitachi, Tokio, Japan
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau, Deutschland

Tabelle 7: Technische Geräte.

2.1.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Microsoft Excel 2016 und Graphpad Prism, Version 5. Die verwendeten statistischen Tests können dem Ergebnisteil entnommen werden.

2.2 Methoden

2.2.1 Venöse Blutentnahme und Weiterverarbeitung

Es wurde bei 124 nach eigenen Angaben gesunden Probanden sowie bei 44 Patienten mit gesichertem kolorektalem Karzinom eine venöse Blutabnahme vorgenommen. Jeder Proband/Patient erteilte nach Aufklärung über Sinn und Zweck der Studie sein schriftliches Einverständnis. Die Genehmigung der Studie erfolgte durch das Reviewboard des Ethikkomitees der Technischen Universität München. Alle Verfahren hielten sich an die Vorgaben der Erklärung von Helsinki von 1975 (bearbeitet 2008).

Die Haut im Bereich der Einstichstelle für die venöse Blutentnahme wurde gemäß Herstellerangaben desinfiziert. Unter venöser Stauung wurde mit Hilfe einer Safety-Multifly-butterfly-Nadel (21G) jeweils eine S-Monovette 9ml K3E und eine S-Monovette 7,5 ml Z aus einer oberflächlichen Vene in der Ellenbeuge entnommen. Die Röhrchen wurden daraufhin mehrmals vorsichtig gewendet, um das Blut mit dem jeweiligen Inhalt der Röhrchen zu durchmengen. Die Serumproben wurden nach abgelaufener Gerinnung (15 Minuten Ruhezeit bei Raumtemperatur) mit der 750-fachen Erdbeschleunigung (750 g) zehn Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, um das Serum von den restlichen Blutbestandteilen zu trennen. Die Gewinnung von Blutplasma erfolgte durch 15-minütige Zentrifugation mit der 1500-fachen Erdbeschleunigung (1500g) bei 4° Celsius. Die Serum- und Plasmaüberstände wurden abpipettiert, in 150 µl-Aliquots portioniert und bei -80° Celsius gelagert.

Die Proben der Patienten mit kolorektalem Karzinom wurden auf die gleiche Weise von Rödel, F. am Universitätsklinikum in Frankfurt am Main abgenommen und weiterverarbeitet.

Der Einfluss der Nahrungskarenz wurde getestet, indem eine venöse Blutentnahme vor und zwei Stunden nach Einnahme einer fett- und kohlenhydratreichen Mahlzeit erfolgte. Die Entnahme und Verarbeitung der Blutproben wurden wie oben beschrieben vorgenommen.

Zudem wurde der Effekt von wiederholtem Auftauen und Einfrieren überprüft, indem einzelne Proben mehrmals aufgetaut und wieder eingefroren wurden.

Um den Einfluss der Hämolyse zu untersuchen, wurden Erythrozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation und LSM1077 isoliert. Diese Erythrozyten wurden daraufhin mittels Scherkräften lysiert, um bestimmte Serumproben mit steigenden Mengen der

lysierten Erythrozyten zu versetzen. Die Serumproben wurden photometrisch bei 562 nm, 578 nm und 598 nm gemessen, um deren Hämoglobinmenge zu bestimmen. Anschließend wurde die Hämoglobinkonzentration in Anlehnung an (Kahn, Watkins, & Bermes, 1981) berechnet. Die Verarbeitung, um den Einfluss der Hämolyse zu untersuchen sowie die Berechnung der Hämoglobinkonzentration wurden von Breuninger, S. und Schwarzer, J. durchgeführt (Breuninger, 2014).

2.2.2 Herstellung von rekombinantem Hsp70

Die Herstellung von rekombinanten Hsp70 mittels einem Sf9 insect cell system und die Quantifizierung mittels BCA Protein-Kit wurde von Breuninger, S. und Schwarzer, J. durchgeführt (Breuninger, 2014).

2.2.3 Herstellung von Lipidvesikeln

Zur Herstellung von Lipidvesikeln, welche mit Hsp70 beimpft werden können, wurde der Mini Extruder von Avanti Polar Lipids verwendet (Abbildung 11). Dieser Extruder formt aus einer Lipidlösung mittels Scherstress und einer Polycarbonatmembran, die in der Mitte des Gerätes eingelegt wird, Lipidvesikel. Diese Vesikel besitzen einen Durchmesser, der von der verwendeten Lösung und der eingesetzten Membran abhängig ist.



Abbildung 11: Mini Extruder von Avanti Polar Lipids; copyright: Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA.

Die in diesem Versuch verwendete Lösung beinhaltete insgesamt 10 mg an Lipiden. Die Lipide wurden im molaren Verhältnis von 4:1 aus in Chloroform gelöstem 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (POPC) und 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serin (POPS) anhand folgender Berechnung gemischt:

10 mg (Lipide)

$$= 2,05 \text{ mg (POPS)} \left(\text{aus: } n = \frac{0,00205 \text{ g}}{784 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 2,6147 * 10^{-6} \right)$$

$$+ 7,95 \text{ mg (POPC)} \left(\text{aus: } n = \frac{0,00795 \text{ g}}{760,1 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 10,4591 * 10^{-6} \right)$$

Dabei entspricht: $10,4591 * 10^{-6} = 4 * (2,6147 * 10^{-6})$

Da die Konzentrationen der beiden Lipidlösungen mit jeweils $c = 25 \text{ mg/ml}$ bekannt sind, konnte die Lösung folgendermaßen hergestellt werden:

aus $c = \frac{m}{v}$ folgt $V = \frac{m}{c}$ und damit:

$$\frac{2,05 \text{ mg}}{25 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}} = 82 \text{ } \mu\text{l POPS} \text{ und } \frac{7,95 \text{ mg}}{25 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}} = 318 \text{ } \mu\text{l POPC}$$

Das daraus resultierende Gemisch wurde mit Hilfe von Stickstoffgas getrocknet. Anschließend wurde das Gemisch mit einem Milliliter Extrusionpuffer (25mM Tris/HCL, pH = 7,4) rehydriert. Daraufhin wurde es eine Stunde und 30 Minuten bei Raumtemperatur und eine halbe Stunde bei 37° Celsius inkubiert. Währenddessen wurde der Mini Extruder laut Herstellerangaben zusammengesetzt. Die Lipidlösung wurde insgesamt 13 Mal durch eine 100 nm dicke Polycarbonatmembran im Mini Extruder gedrückt, wodurch Lipidvesikel mit einem Durchmesser von ungefähr 200 nm entstehen. Die angestrebte Konzentration der nun entstandenen Lösung betrug 1 mg/ml, weshalb 900 μl 1 mM Bis/Tris-Puffer (pH-Wert = 7.4) mit 100 μl der Lipidlösung versetzt wurde. 100 μl dieser Lösung wurden dann mit 1 μg rekombinantem Hsp70 vermischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Lösung mit 100 μl Aqua ad iniectabilia gemischt und anschließend mit 200.000 g zwei Stunden lang in einer Ultrazentrifuge bei 4° Celsius zentrifugiert. Nach

erfolgreicher Zentrifugation wurde sowohl der Überstand als auch die Pellets mit den darin enthaltenen Lipidvesikeln abpipettiert. Die Pellets wurden daraufhin in PBS gelöst und bei 4° Celsius gelagert. Zur Quantifizierung des Hsp70-Wertes der Hsp70-beimpften Lipidvesikel, der leeren Kontrollvesikel und des Überstands wurden der ELISA von R&D-Systems und der lipHsp70-ELISA verwendet.

Die Menge des in den Lipidvesikeln enthaltenem Hsp70 wurde zudem mittels Western-Blot bestimmt. Hierzu wurde der cmHsp70.1-Antikörper, ein mit „horseradish peroxidase“ konjugierter sekundärer Antikörper und das „Chemiluminescence developing kit“ verwendet. Die Hsp70-Konzentration der Lipidvesikel wurde mittels Dichtemessung bestimmt. Die Bestimmung des Hsp70-Gehalts der Lipidvesikel mittels Western-Blots wurde von Breuninger, S. und Schwarzer, J. durchgeführt.

2.2.4 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

ELISA steht als Abkürzung für „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ und dient dazu, Proteine, Peptide oder Hormone zu detektieren und ihre Mengen zu bestimmen. Dabei folgt der ELISA folgendem Prinzip:

Das zu messende Protein, Peptid, Hormon, im Folgenden kurz Antigen genannt, bindet direkt an den Boden einer ELISA-Platte. Im Folgenden wird ein Antikörper (primärer Detektionsantikörper), der möglichst spezifisch für das entsprechende Antigen ist, zupipettiert, was zur Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes führt. Je nach Ausrichtung des ELISAs, sprich, ob ein direkter oder ein indirekter ELISA durchgeführt wird, bestehen nun zwei verschiedene Möglichkeiten (Abbildung 12):

1. Der primäre Detektionsantikörper ist im Falle eines direkten ELISAs mit einer Enzymgruppe konjugiert, welche eine messbare chemische Reaktion katalysieren kann.
2. Im Falle des indirekten ELISAs wird ein weiterer, gegen den primären Detektionsantikörper gerichteter, sogenannter sekundärer Enzym-konjugierter Antikörper verwendet. Diese Enzymgruppe kann wiederum eine messbare chemische Reaktion katalysieren.

Ungeachtet der verwendeten Methode erhält man ähnliche Ergebnisse. Die Beigabe des enzymespezifischen Substrats führt zu einer messbaren chemischen Reaktion, meist in Form

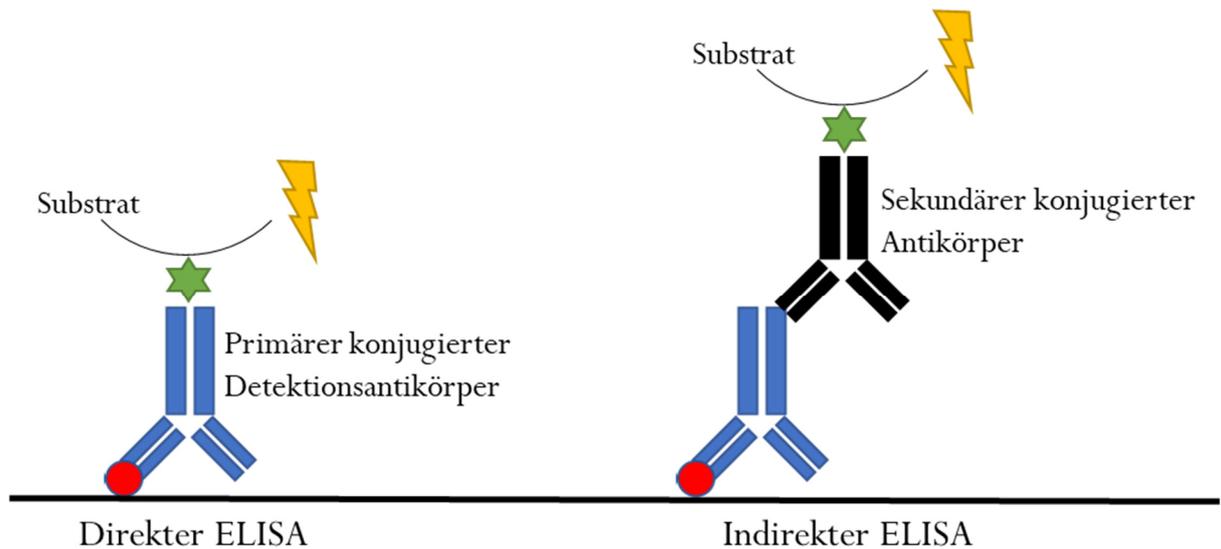


Abbildung 12: Schematische Darstellung eines direkten und indirekten ELISAs. Das Antigen (roter Punkt) bindet auf den Boden einer ELISA-Platte (schwarzer Strich), an das wiederum ein Detektionsantikörper bindet. Dieser ist entweder mit einer Enzymgruppe konjugiert (grüner Stern) (direkter ELISA) oder dient als Erkennungsstruktur für einen sekundären konjugierten Antikörper (indirekter ELISA). Eigene Darstellung.

einer Farbänderung, welche beispielsweise mit einem ELISA-Reader (Photometer) quantitativ gemessen werden kann. Hierzu erstellt man eine Standardkurve mit Hilfe einer Verdünnungsreihe mit bekannten Antigenkonzentrationen, wodurch den bei verschiedenen Wellenlängen gemessenen optischen Dichten Konzentrationen zugeordnet werden können. Die Vorteile des direkten ELISAs liegen vor allem in seiner durch seine Spezifität gegen das Antigen begründeten Vermeidung von Kreuzreaktionen des Antikörpers.

Allerdings bietet der indirekte ELISA im Vergleich zum direkten ELISA eine größere Flexibilität sowie Zeitersparnis, da nicht jeder primäre Antikörper konjugiert werden muss, sondern eine kleine Menge an sekundärem konjugiertem Antikörper ausreicht. Des Weiteren ist die Signalstärke beim indirekten ELISA im Vergleich zum direkten ELISA meist besser.

Eine weitere Art des ELISAs ist der Sandwich-ELISA (Abbildung 13). Sein Name beruht auf der Tatsache, dass das zu messende Antigen zwischen einem „Capture-Antikörper“, welcher auf einer Platte gebunden wird, und dem primären Detektionsantikörper gebunden ist, was theoretisch das Bild eines Sandwiches ergibt. Bei dieser Art des ELISAs werden normalerweise wie beim indirekten ELISA sekundäre Antikörper verwendet, welche mit einem Enzym gekoppelt sind. Die Detektion und Messung des Antigens erfolgt wie bei den zuvor beschriebenen Methoden. Der große Vorteil des Sandwich-ELISAs ist die Tatsache, dass

aufgrund der hohen Spezifität des „Capture-Antikörpers“ keine Aufreinigung des Antigens von Nöten ist. Allerdings eignen sich nicht alle Antikörper zur Verwendung für einen Sandwich-ELISA, weshalb er trotz seiner Spezifität nicht immer angewendet werden kann. Bei den in dieser Studie verwendeten ELISAs zur Bestimmung von Hsp70 handelt es sich jeweils um einen Sandwich-ELISA.

Die vierte Möglichkeit einen ELISA durchzuführen, besteht in der Anwendung des Wettbewerbsprinzips, daher auch der Name der letzten Methode: der kompetitive ELISA (Abbildung 13). Bei dieser Methode konkurriert das Antigen mit einem strukturell ähnlichen, konjugierten Antigen um die Bindung am Antikörper. Dabei wird zuerst der Antikörper an den Boden einer Platte gebunden und mit der das Antigen enthaltenen Probe versetzt. Danach wird das konjugierte Antigen zugegeben, welches nun an sämtliche noch freie, nicht mit dem zu messenden Antigen besetzte Antikörper bindet. Folglich verhält sich das Signal hier umgekehrt proportional, da wenig Antigen in der Probe ein starkes Signal und viel Antigen ein schwaches Signal verursacht.

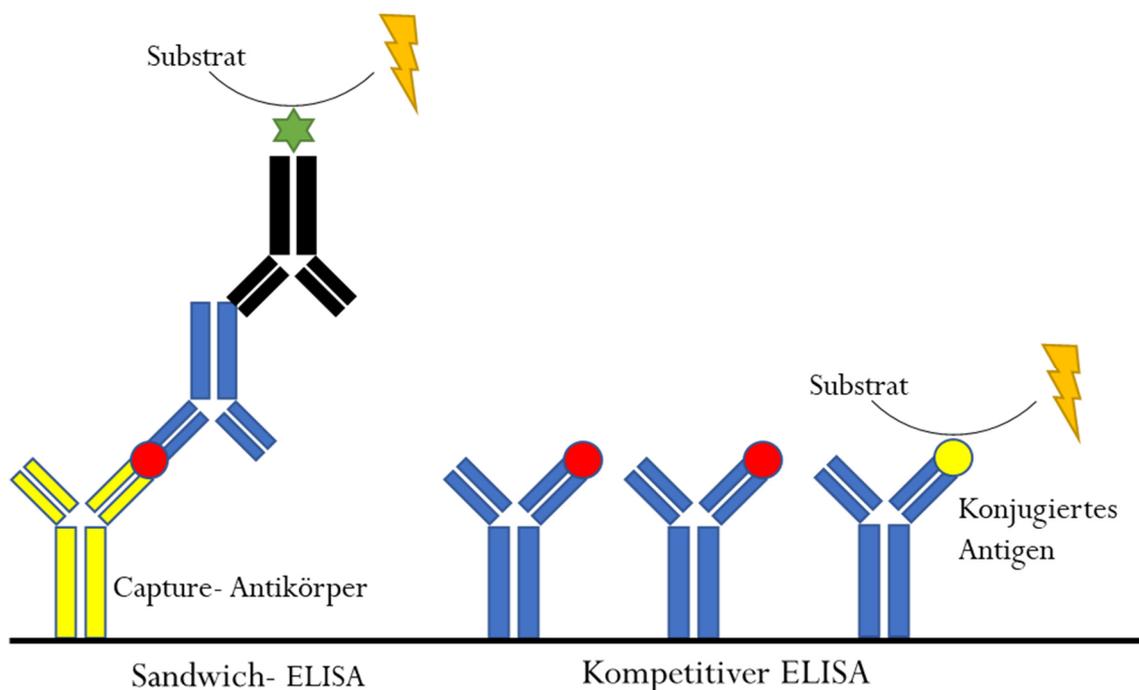


Abbildung 13: Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISAs und eines kompetitiven ELISAs. Ein Capture-Antikörper auf dem Boden einer ELISA-Platte (schwarzer Strich) bindet das Antigen (roter Punkt). Der Detektionsantikörper bindet wiederum das Antigen. Ein weiterer konjugierter Antikörper bindet den Detektionsantikörper (Sandwich-ELISA). Beim kompetitiven ELISA steht das Antigen (roter Punkt) mit einem strukturell ähnlichen, konjugierten Antigen um die Bindung am Capture-Antikörper in Konkurrenz. Eigene Darstellung.

2.2.4.1 Human/Mouse/Rat Total HSP70/HSPA1A DuoSet IC ELISA

Der Human/Mouse/Rat Total HSP70/HSPA1A DuoSet IC ELISA von R&D-Systems folgt den Prinzipien eines Sandwich-ELISAs, welcher im vorherigen Kapitel beschrieben wurde. In Tabelle 8 sind die Reagenzien aufgelistet, welche für die Durchführung des ELISAs benötigt werden. Abbildung 14 zeigt einen Überblick der einzelnen Arbeitsschritte, welche im Folgenden genauer beschrieben werden.

1. Der Capture-Antikörper wurde, wie in Tabelle 8 ersichtlich, gelöst und anschließend mit PBS auf die gewünschte Konzentration von 2 µg/ml verdünnt. Daraufhin wurde eine Costar 3590 ELISA-Platte mit jeweils 100 µl des verdünnten Antikörpers pro Vertiefung beimpft. Die Platte wurde daraufhin luftdicht verschlossen und in einem Plastikbehälter bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert.

Reagenz	Zusammensetzung
IC Diluent #1	1 % BSA in PBS
IC Diluent #4	1 mM EDTA, 0.5 % Triton X-100 in PBS
Streptavidin-HRP	Gebrauchsfertig
Stop-Lösung	2 M H ₂ SO ₄ : 5,6 ml 100 % H ₂ SO ₄ in 100ml aqua ad iniectabilia
Substrat-Lösung	1:1 Mix aus Color Reagent A (H ₂ O ₂) und Color Reagent B (Tetramethylbenzidine) aus dem „substrate reagent pack“
Total HSP70 Capture-Antikörper	Verdünnt mit 200 µl PBS; $c = 360 \mu\text{g/ml}$
Total HSP70 Detection-Antikörper	Verdünnt mit 1 ml IC Diluent #1; $c = 3,6 \mu\text{g/ml}$
Total HSP70 Standard	Verdünnt mit 500 µl IC Diluent #4; $c = 150 \text{ ng/ml}$
Wasch-Puffer	0.05 % Tween 20 in PBS

Tabelle 8: Reagenzien für den ELISA von R&D-Systems.

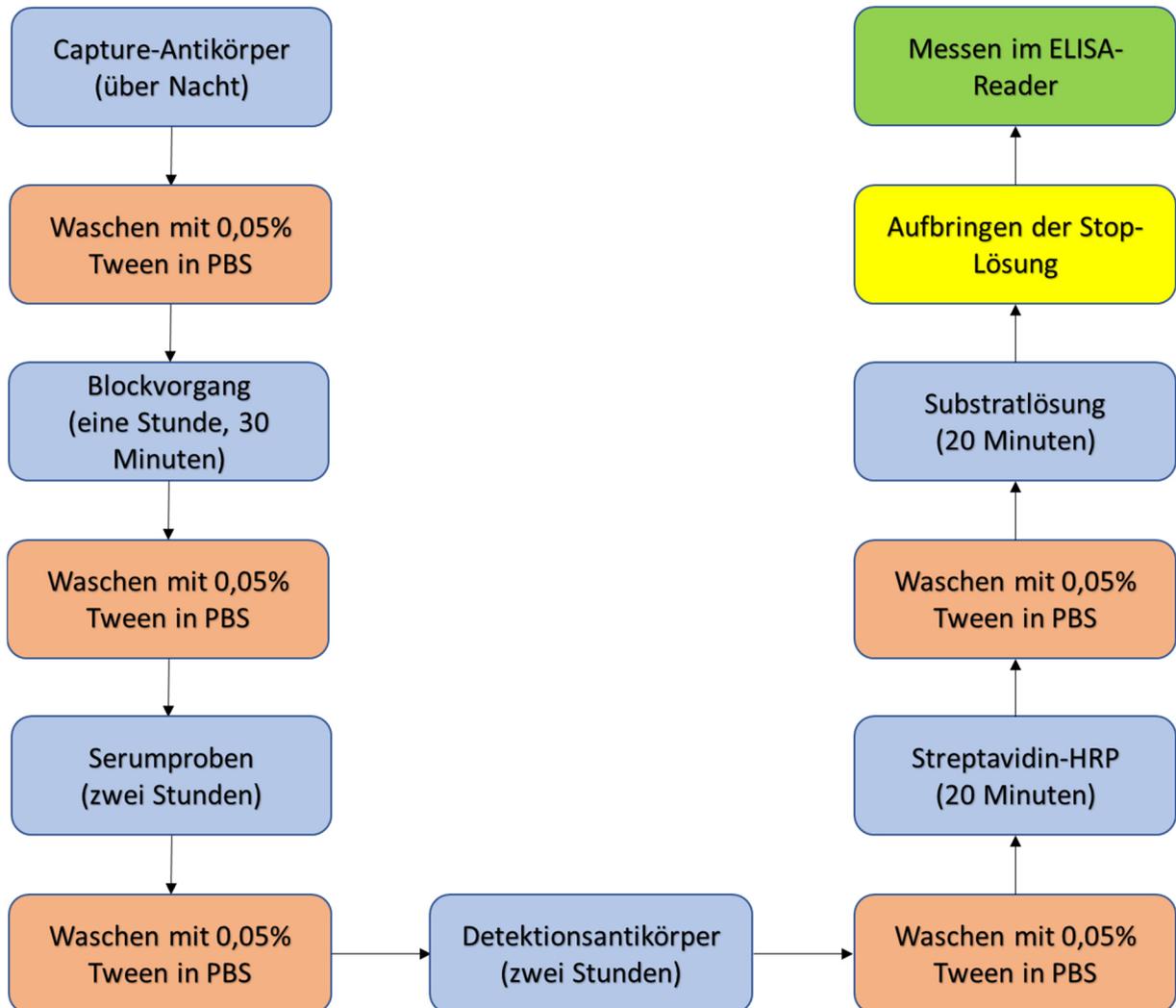


Abbildung 14: Graphische Darstellung der Arbeitsschritte bei der Durchführung des Hsp70-ELISAs von R&D-Systems. Eigene Darstellung.

2. Nach der Inkubation wurde die Antikörperlösung aus den einzelnen Vertiefungen entfernt, indem die Platten kopfüber kräftig auf saubere Papiertücher geschlagen wurden. Zudem wurde jede Vertiefung drei Mal mit 250 µl Wasch-Puffer gereinigt, wobei die Vertiefungen nach jedem Waschzyklus, wie oben beschrieben, auf Papiertüchern gesäubert wurden.
3. Nun erfolgte das Blocken mittels jeweils 250 µl IC-Diluent #1 pro Vertiefung. Die ELISA-Platte wurde wiederum luftdicht verschlossen und in einem Plastikbehälter bei 27° Celsius eine Stunde und 30 Minuten im Inkubator inkubiert.
4. Nach der Inkubation wurde Schritt 2 wiederholt.
5. Die Serum-/Plasmaproben wurden auf Eis schonend aufgetaut. Jeweils 50 µl der verschiedenen Proben wurden mit 200 µl IC Diluent #4 verdünnt, woraus eine 1:5-

fache Verdünnung resultierte. Diese wurde durch behutsames Wenden der Röhrchen gemischt. Zusätzlich wurden acht Proben mit bekannten Konzentrationen von Hsp70 hergestellt, um mit deren Hilfe eine Standardkurve berechnen zu können (10 ng/ml; 5 ng/ml; 2,5 ng/ml; 1,25 ng/ml; 0,625 ng/ml; 0,3125 ng/ml; 0,15625 ng/ml; 0 ng/ml). Im Folgenden ist die Verdünnungsreihe aufgelistet:

10 ng/ml=	60 µl Total Hsp70 Standard + 900 µl IC Diluent #4
5 ng/ml=	450 µl der Lösung mit $c = 10 \text{ ng/ml}$ + 450 µl IC Diluent #4
2,5 ng/ml=	450 µl der Lösung mit $c = 5 \text{ ng/ml}$ + 450 µl IC Diluent #4
1,25 ng/ml=	450 µl der Lösung mit $c = 2,5 \text{ ng/ml}$ + 450 µl IC Diluent #4
0,625 ng/ml=	450 µl der Lösung mit $c = 1,25 \text{ ng/ml}$ + 450 µl IC Diluent #4
0,3125 ng/ml=	450 µl der Lösung mit $c = 0,625 \text{ ng/ml}$ + 450 µl IC Diluent #4
0,15625 ng/ml=	450 µl der Lösung mit $c = 0,3125 \text{ ng/ml}$ + 450 µl IC Diluent #4
0 ng/ml=	450 µl IC Diluent #4

Als Kontrollprobe wurde eine Probe mit einer Konzentration von 2 ng/ml von rekombinantem Hsp70 genutzt. Zwei Vertiefungen pro Probe wurden jeweils mit 100 µl der Proben beimpft, die Platte anschließend luftdicht verschlossen und in einem Plastikbehälter zwei Stunden bei 27° Celsius im Inkubator inkubiert.

6. Nach der Inkubation wurde Schritt 2 wiederholt.
7. Der Detektionsantikörper wurde, wie in Tabelle 8 ersichtlich, gelöst und anschließend mit IC Diluent #1 auf die gewünschte Konzentration von 100 ng/ml verdünnt. Daraufhin wurde die ELISA-Platte mit jeweils 100 µl des verdünnten Antikörpers pro Vertiefung beimpft. Die Platte wurde daraufhin luftdicht verschlossen und in einem Plastikbehälter bei 27° Celsius zwei Stunden im Inkubator inkubiert.
8. Nach der Inkubation wurde Schritt 2 wiederholt.
9. Unmittelbar vor Gebrauch wurde 60 µl Streptavidin-HRP mit 12 ml IC Diluent #1 verdünnt. Jeweils 100 µl dieser Lösung wurde in die einzelnen Vertiefungen der ELISA-Platte pipettiert. Die Platte wurde daraufhin luftdicht verschlossen und in einem Plastikbehälter bei 27° Celsius 20 Minuten im Inkubator inkubiert. Die ELISA-Platte

wurde während der Durchführung des neunten Schrittes keiner direkten Lichteinstrahlung ausgesetzt.

10. Nach der Inkubation wurde Schritt 2 wiederholt.

11. Jeweils 100 µl der Substrat-Lösung wurde in die einzelnen Vertiefungen der ELISA-Platte pipettiert. Die Platte wurde daraufhin luftdicht verschlossen und in einem Plastikbehälter bei 27° Celsius 20 Minuten im Inkubator inkubiert. Die ELISA-Platte wurde während der Durchführung des elften Schrittes keiner direkten Lichteinstrahlung ausgesetzt.

12. Nach der Inkubation wurde 50 µl der Stop-Lösung in jede Vertiefung pipettiert.

13. Zum Schluss wurde mit Hilfe eines Microplate-Readers bei 450 nm die optische Dichte jeder Vertiefung bestimmt. Die Wellenlängenkorrektur betrug 570 nm.

Jede in dieser Arbeit mit dem ELISA von R&D-Systems gemessene Probe wurde, soweit im Ergebnisteil nicht anders vermerkt, insgesamt dreimal (n=3) gemessen.

2.2.4.2 LipHsp70-ELISA

Der selbstentwickelte lipHsp70-ELISA folgt ebenso wie der Human/Mouse/Rat Total HSP70/HSPA1A DuoSet IC ELISA dem Prinzip eines Sandwich-ELISAs. In Tabelle 9 sind die für den ELISA benötigten Reagenzien ersichtlich. Abbildung 15 gibt einen Überblick, über die Arbeitsschritte des ELISAs, welche im Anschluss genauer beschrieben werden.

1. Der polyklonale Hasen-Antikörper wurde mit Natriumcarbonatpuffer auf die gewünschte Konzentration von 2 µg/ml verdünnt. In die Vertiefungen einer 96-well MaxiSorp Nunc-Immuno Platte wurde anschließend jeweils 100 µl des verdünnten Antikörpers pipettiert. Die Platte wurde daraufhin luftdicht verschlossen und in einem Plastikbehälter bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert.

Reagenz	Zusammensetzung
cmHsp70.1-Antikörper	$c = 2,4 \text{ mg/ml}$ in PBS
CrossDown-Puffer	Gebrauchsfertig
Diluent #1	1 % BSA in PBS
Diluent #2	2 % Milchpulver in PBS
Natriumcarbonatpuffer	0,1 M Natriumcarbonat (pH 11,4), 0,1 M Natriumhydrogencarbonat (pH 8,5), pH des Puffers 9,6
Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen	$c = 1,32 \text{ mg/ml}$
Streptavidin-HRP	Gebrauchsfertig
Stop-Lösung	2 M H ₂ SO ₄ : 5,6 ml 100 % H ₂ SO ₄ in 100ml aqua ad iniectabilia
Substrat-Lösung	1:1 Mix aus Color Reagent A (H ₂ O ₂) und Color Reagent B (Tetramethylbenzidine) aus dem „substrate reagent pack“
Wasch-Puffer	0.05 % Tween 20 in PBS

Tabelle 9: Reagenzien für den lipHsp70-ELISA.

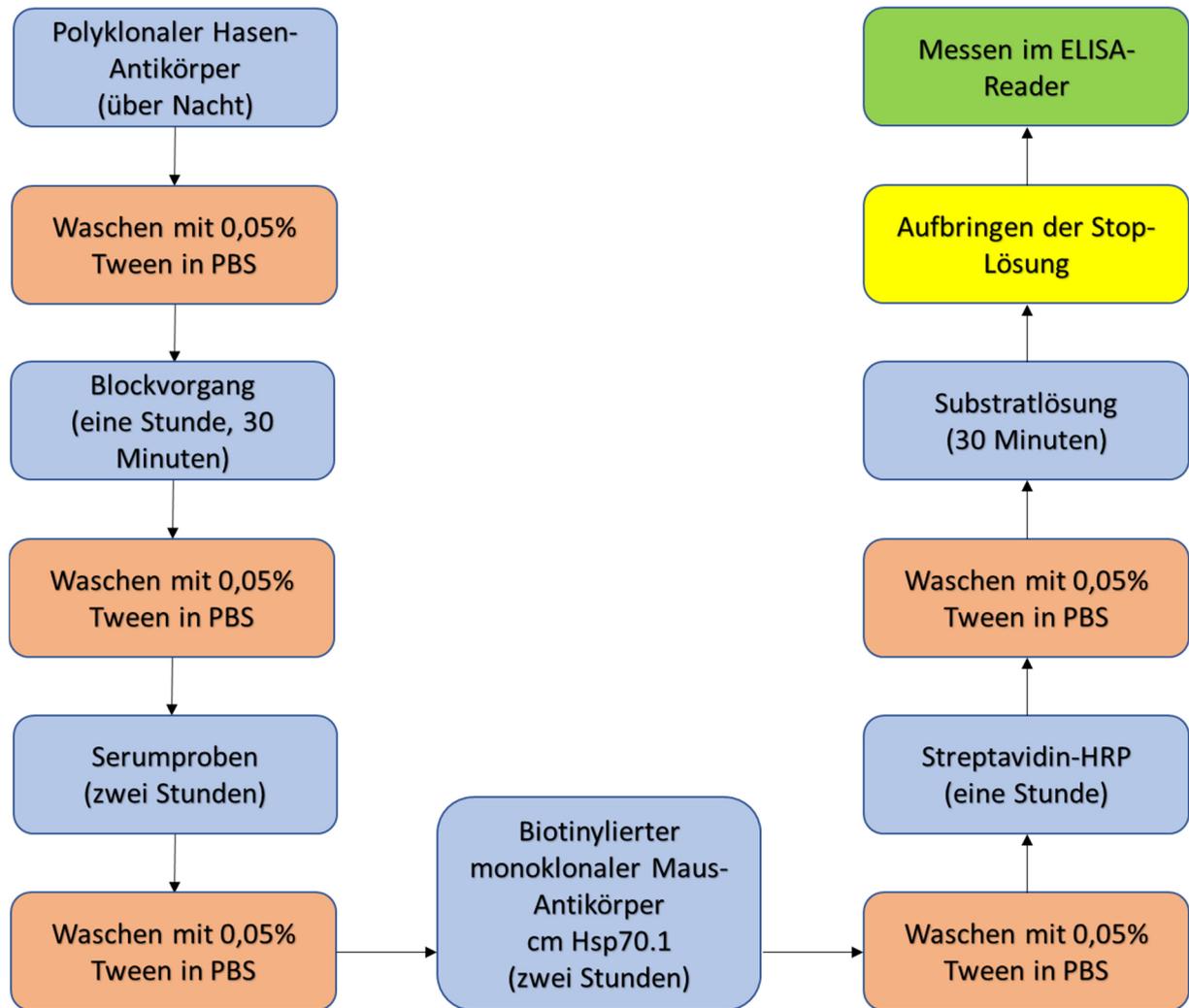


Abbildung 15: Graphische Darstellung der Arbeitsschritte bei der Durchführung des lipHsp70- ELISAs. Eigene Darstellung.

2. Nach der Inkubation wurde die Antikörperlösung aus den einzelnen Vertiefungen entfernt, indem die Platten kopfüber kräftig auf saubere Papiertücher geschlagen wurden. Zudem wurde jede Vertiefung drei Mal mit 250 µl Wasch-Puffer gereinigt, wobei die Vertiefungen nach jedem Waschzyklus, wie oben beschrieben, auf Papiertüchern gesäubert wurden.
3. Jede Vertiefung wurde nun mit 300 µl Diluent #2 geblockt, die Platte anschließend luftdicht verschlossen und eine Stunde und 30 Minuten bei 27° Celsius in einem Plastikbehälter im Inkubator inkubiert.
4. Nach der Inkubation wurde Schritt 2 wiederholt.

5. Die Serum-/Plasmaproben wurden auf Eis schonend aufgetaut. Jeweils 50 µl der verschiedenen Proben wurde mit 200 µl CrossDown-Puffer verdünnt, woraus eine 1:5-fache Verdünnung resultierte. Diese Lösung wurde durch behutsames Wenden der Röhren gemischt. Zusätzlich wurden acht Proben mit bekannten Konzentrationen von rekombinantem Hsp70 hergestellt, um mit deren Hilfe eine Standardkurve berechnen zu können (50 ng/ml; 25 ng/ml; 10 ng/ml; 5 ng/ml; 2,5 ng/ml; 1,25 ng/ml; 0,625 ng/ml; 0 ng/ml). Im Folgenden ist die Verdünnungsreihe aufgelistet:

50 ng/ml= Abhängig von der Ausgangskonzentration des rekombinanten Hsp70 wurde es mit CrossDown- Puffer auf die gewünschte Konzentration von 50 ng/ml verdünnt.

25 ng/ml= 150 µl der Lösung mit $c = 50 \text{ ng/ml}$ + 150 µl CrossDown- Puffer

10 ng/ml= 120 µl der Lösung mit $c = 25 \text{ ng/ml}$ + 480 µl CrossDown- Puffer

5 ng/ml= 300 µl der Lösung mit $c = 10 \text{ ng/ml}$ + 300 µl CrossDown- Puffer

2,5 ng/ml= 300 µl der Lösung mit $c = 5,0 \text{ ng/ml}$ + 300 µl CrossDown- Puffer

1,25 ng/ml= 300 µl der Lösung mit $c = 2,5 \text{ ng/ml}$ + 300 µl CrossDown- Puffer

0,625 ng/ml= 300 µl der Lösung mit $c = 1,25 \text{ ng/ml}$ + 300 µl CrossDown- Puffer

0 ng/ml= 300 µl CrossDown- Puffer

Als Kontrollprobe wurde eine Probe mit einer Konzentration von 2 ng/ml von rekombinantem Hsp70 genutzt. Zwei Vertiefungen pro Probe wurden jeweils mit 100 µl der Proben beimpft, die Platte anschließend luftdicht verschlossen und in einem Plastikbehälter zwei Stunden bei 27° Celsius im Inkubator inkubiert.

6. Nach der Inkubation wurde Schritt 2 wiederholt.
7. Der biotinylierte monoklonale Maus-Antikörper cmHsp70.1 wurde mit Diluent #2 auf die gewünschte Konzentration von 4 µg/ml verdünnt. Daraufhin wurde die Platte mit jeweils 100 µl des verdünnten Antikörpers pro Vertiefung beimpft. Die Platte wurde luftdicht verschlossen und in einem Plastikbehälter bei 27° Celsius zwei Stunden im Inkubator inkubiert.
8. Nach der Inkubation wurde Schritt 2 wiederholt.

9. Die Streptavidin-HRP wurde mit Diluent #1 auf die gewünschte Konzentration von 200 ng/ml verdünnt. Jeder Vertiefung wurden jeweils 100 µl der verdünnten Streptavidin-HRP hinzugefügt. Die Platte wurde daraufhin luftdicht verschlossen und in einem Plastikbehälter bei 27° Celsius eine Stunde im Inkubator inkubiert. Die ELISA-Platte wurde während der Durchführung des neunten Schrittes keiner direkten Lichteinstrahlung ausgesetzt.
10. Nach der Inkubation wurde Schritt 2 wiederholt.
11. Jeweils 100 µl der Substrat-Lösung wurde in die einzelnen Vertiefungen der ELISA-Platte pipettiert. Die Platte wurde daraufhin luftdicht verschlossen und in einem Plastikbehälter bei 27° Celsius 30 Minuten im Inkubator inkubiert. Die ELISA-Platte wurde während der Durchführung des elften Schrittes keiner direkten Lichteinstrahlung ausgesetzt.
12. Nach der Inkubation wurde 50 µl der Stop-Lösung in jede Vertiefung pipettiert.
13. Zum Schluss wurde mit Hilfe eines Microplate-Readers bei 450 nm die optische Dichte jeder Vertiefung bestimmt. Die Wellenlängenkorrektur betrug 570 nm.

Jede in dieser Arbeit mit dem lipHsp70-ELISA gemessene Probe wurde, soweit im Ergebnisteil nicht anders vermerkt, insgesamt dreimal (n=3) gemessen.

2.2.5 Erstellen der Kalibrierungskurve und Bestimmung der Intra- und Interassay-Präzision, der Linearität sowie des Detektionslimits

Das Vorgehen beim Erstellen der Kalibrierungskurve, bei der Bestimmung der Intra- und Interassay-Präzision sowie der Linearität kann aus dem Methodenteil von (Breuninger, 2014) entnommen werden. Zur Bestimmung des Detektionslimits nach (Armbruster & Pry, 2008) wurden jeweils 36 Proben ohne Hsp70 und mit einer Hsp70-Konzentration von 0,63 ng/ml gemessen. Das Limit der Proben ohne Hsp70 beträgt $\mu_B + 1,645\sigma_B$. Hierbei entspricht μ_B der mittleren Abweichung und σ_B der Standardabweichung. Das Detektionslimit kann danach durch folgende Formel bestimmt werden: $\text{Detektionslimit} = (\mu_B + 1,645\sigma_B) + 1,645\sigma_S$. σ_S entspricht der Standardabweichung der Proben mit der definierten Hsp70-Konzentration. Die Versuche und die nötigen Auswertungen zum Erstellen der Kalibrationskurve, zur

Bestimmung der Intra- und Interassay-Präzision, zur Bestimmung des Detektionslimits und der Linearität wurden bereits im Vorfeld dieser Arbeit von Breuninger, S. und Schwarzer, J. durchgeführt.

2.2.6 Bestimmung der „Recovery“

Um die „Recovery“ des lipHsp70-ELISAs und des ELISAs von R&D-Systems zu testen, wurden vier Serumproben, die im Verhältnis 1:5 verdünnt wurden, mit Hsp70 in einer Konzentration von 2,5 ng/ml und 5 ng/ml versetzt. Die gleichen Serumproben wurden zudem ohne die Zugabe von zusätzlichem Hsp70 gemessen. Die Konzentration der Serumproben wurde schließlich von der gemessenen Konzentration der mit Hsp70 versetzten Proben abgezogen. Dieses Ergebnis wurde mit dem zu erwartenden Wert in Verhältnis gesetzt, um somit die „Recovery“ des jeweiligen ELISA-Systems zu beurteilen.

2.2.7 Methode zur Bestimmung des Normbereichs für Hsp70-Serumwerte eines gesunden Kontrollkollektivs

Zur Bestimmung eines Normbereiches können generell verschiedene Methoden angewandt werden. Da Methoden, die eine Gauß-Normalverteilung annehmen, sehr fehleranfällig sind, wenn diese Annahme nicht zutrifft, werden zur Bestimmung des Normbereichs in der Literatur nicht-parametrische Verfahren empfohlen. Zwei Hauptvertreter dieser Gruppe sind die Perzentilenschätzung und die nicht-parametrischen Toleranzintervalle, wobei ersteres bevorzugt werden sollte und in dieser Arbeit verwendet wird. Nicht-parametrische Verfahren bestimmen den Normbereich selbst bei der Tatsache, dass eine Gauß-Normalverteilung vorliegt, genauer (Reed, Henry, & Mason, 1971).

Bei der Bestimmung mittels Perzentilenschätzung werden die Werte der gesunden Probanden zunächst in eine aufsteigende Reihenfolge gebracht. Nun werden die 2,5 %-Perzentile und die 97,5 %-Perzentile abgeschätzt, indem angenommen wird, dass sich diese auf dem Rang l befinden.

Dieser Rang l definiert sich folgendermaßen:

$$l = 0,025 * (n + 1), \text{ wobei } n = \text{Anzahl der Werte}$$

Daraus lässt sich schließen, dass die 2,5 %-Perzentile auf dem l -ten Platz von unten liegt und die 97,5 %-Perzentile auf dem l -ten Platz von oben. Da diesen Werten meist keine ganzen Zahlen entsprechen, bedient man sich zu deren Bestimmung der linearen Interpolation:

$$Y_n = Y_1 + \frac{(Y_2 - Y_1)}{(X_2 - X_1)} * (X_n - X_1)$$

Auf diese Weise erhält man zwei Werte, die die untere und obere Grenze des Normbereichs definieren.

Zusätzlich können für die obere und untere Grenze jeweils Konfidenzintervalle bestimmt werden, welche den wahren Wert mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit enthalten. Diese Wahrscheinlichkeit kann 70 % oder 90 % betragen. Aus Tabelle 3 aus (Reed et al., 1971) können für die Zahl n die Variablen a und b abgelesen werden, welche die x -Werte bezeichnen, die den unteren und oberen Wert des Konfidenzintervalls definieren.

Die Grenzen des Konfidenzintervalls für die 2,5 %-Perzentile wird demzufolge von $x_{(a)}$ und $x_{(b)}$ definiert. Analog hierzu werden die Grenzen der 97,5 %-Perzentile durch $x_{((n+1)-a)}$ und $x_{((n+1)-b)}$ beschrieben.

Das Problem bei dieser Methode besteht darin, dass sie abhängig von den niedrigen und hohen Werten ist. Deshalb muss man überprüfen, ob es sich bei diesen Werten um Ausreißer handelt. Der höchste Werte sollte nach (Reed et al., 1971) verworfen werden, wenn der Abstand des höchsten vom zweit höchsten Wertes größer ist, als ein Drittel der Spannweite aller Werte.

Der höchste Wert sollte als Ausreißer bewertet werden, wenn gilt:

$$r = \frac{x_{(n)} - x_{(n-1)}}{x_{(n)} - x_{(1)}} > \frac{1}{3}$$

Gleichermaßen sollte der kleinste Wert als Ausreißer betrachtet werden, wenn gilt:

$$r = \frac{x_{(2)} - x_{(1)}}{x_{(n)} - x_{(1)}} > \frac{1}{3}$$

2.2.8 Receiver-Operating-Characteristic-Kurve

Um festzustellen, ob hohe Serumwerte eines bestimmten Stoffes durch ein pathologisches Ereignis statistisch zu erklären sind, können sogenannte „Receiver Operating Characteristic“-Kurven (ROC-Kurven) erstellt werden (Abbildung 16). Diese Kurve stellen für bestimmte cut-off-Werte die Rate der Falsch-Positiven (= 1 - Spezifität) auf der x-Achse, die Rate der Richtig-Positiven (= Sensitivität) auf der y-Achse gegenüber. Die Winkelhalbierende entspricht dabei dem Ergebnis eines Testes, der dem Zufallsprinzip folgt. Hierbei entsprechen sich die Falsch-Positiven-Quote und die Richtig-Positiven-Quote; der Test hat somit die Aussagekraft eines Münzwurfes. Je mehr sich die Kurve dagegen von der Winkelhalbierenden entfernt, umso genauer wird der Test. Ein perfekter Test würde bis zu einer Sensitivität von 1,0 der y-Achse folgen, um dann parallel zur x-Achse zu verlaufen. Ein generelles Maß für die Genauigkeit des Tests spiegelt die sogenannte „Area under the curve“ (AUC) wieder. Je näher dieser Wert an 1 liegt, umso genauer ist der Test (Akobeng, 2007).

Zwei Methoden werden üblicherweise verwendet, um einen optimalen cut-off-Wert zu bestimmen. Der Youden-Index spiegelt den Punkt auf der ROC-Kurve wieder, der am weitesten auf einer orthogonalen Linie von der Winkelhalbierenden entfernt ist. Mathematisch gesehen sucht man den größten Wert aus der Summe von Sensitivität und Spezifität. Für einen bestimmten Cut-off- Wert lässt sich der Youden-Index folgendermaßen berechnen:

$$\text{Youden – Index} = \text{Sensitivität} + \text{Spezifität} - 1$$

Die (0,1)-Methode sucht den Punkt auf der ROC-Kurve, der am nächsten zum Punkt P(0/1) liegt und somit am nächsten zum perfekten diagnostischen Test. Diesen Punkt definiert der kleinste Wert aus:

$$(1 - \text{Sensitivität})^2 + (1 - \text{Spezifität})^2 \text{ (Akobeng, 2007).}$$

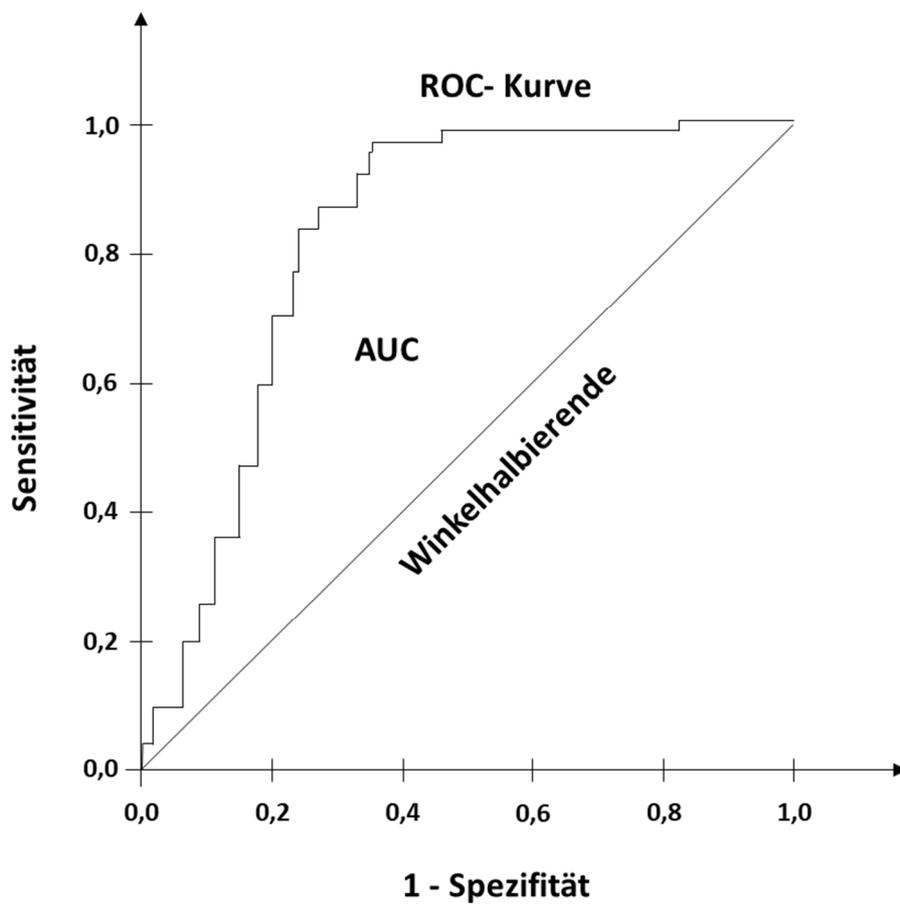


Abbildung 16: Schematische Darstellung einer ROC-Kurve. Die y-Achse spiegelt die Sensitivität wieder; die x-Achse die Rate der Falsch-Positiven (1-Spezifität) wieder. Die ROC-Kurve zeigt für verschiedene Cut-off-Werte diese beiden Parameter an. AUC steht für „Area under the curve“. Je mehr sich dieser Wert an 1 annähert, umso genauer ist der Test. Eigene Darstellung.

3 Ergebnisse

3.1 Beschreibung des gesunden Kontrollkollektivs

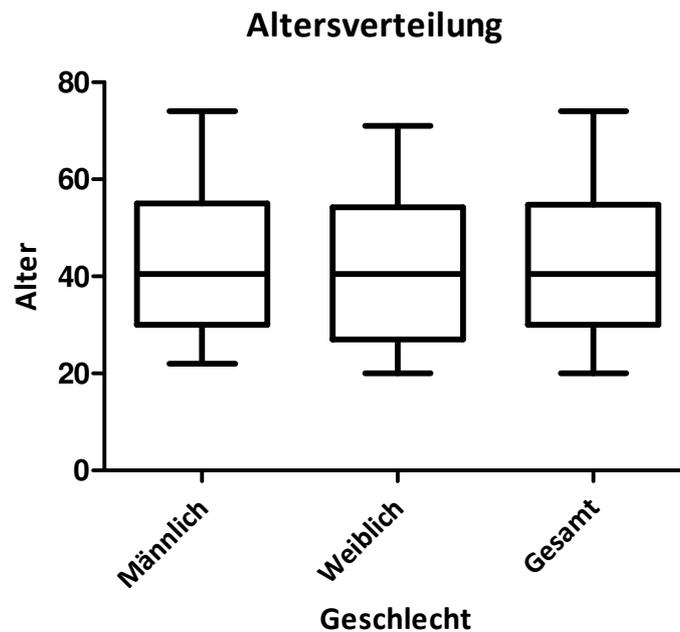


Abbildung 17: Altersverteilung des gesunden Kontrollkollektivs. Das obere/untere Ende der Antennen stellt das maximale/das minimale Alter des Kollektivs dar. Das untere/obere Ende der Box spiegelt die 25 %-Perzentile/die 75 %-Perzentile wieder. Die Linie in der Box gibt den Median wieder.

Abbildung 17 beschreibt die Altersverteilung der gesunden Probanden. Insgesamt nahmen 124 Probanden an der Studie teil. Davon waren 70 (56,5 %) männlich und 54 (43,5 %) weiblich. Der Median des Alters beträgt 40,5 Jahre und das Durchschnittsalter 42,2 Jahre. Das Alter der Patienten zeigt eine Spannweite zwischen 20 und 74 Jahren mit einer 25 %-Perzentile von 30 Jahren und einer 75 %-Perzentile von 54,8 Jahren.

In der männlichen Gruppe (n= 70) beträgt der Median 40,5 Jahre und der Mittelwert 42,7 Jahre. Die 25 %-Perzentile beläuft sich auf 30 Jahre und die 75 %-Perzentile auf 54 Jahre. Die Spannweite liegt zwischen 22 und 74 Jahren.

In der weiblichen Gruppe (n= 54) beträgt der Median 40,5 Jahre und der Mittelwert 41,5 Jahre. Die 25 %-Perzentile beläuft sich auf 27 Jahre und die 75 %-Perzentile auf 54,3 Jahre. Die Spannweite liegt zwischen 20 und 71 Jahren.

3.2 Beschreibung des Patientenkollektivs mit kolorektalem Karzinom

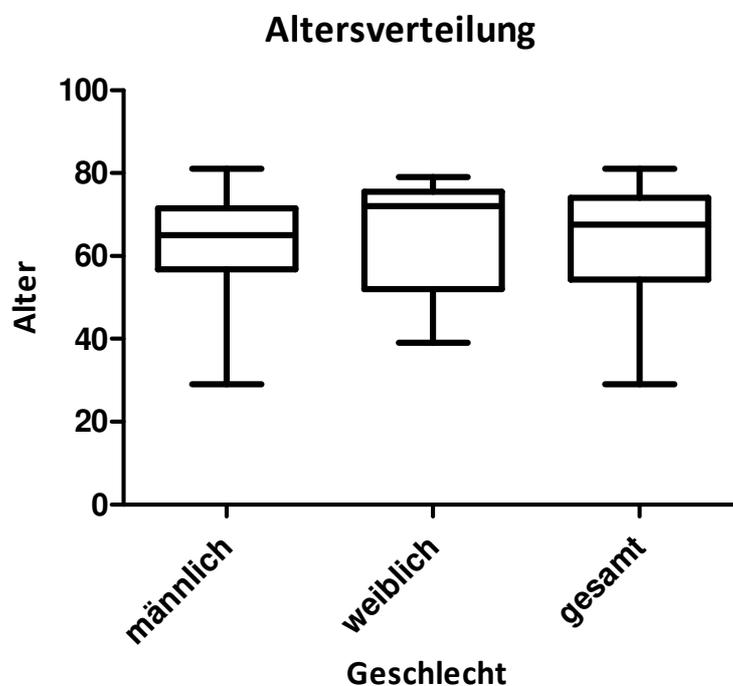


Abbildung 18: Altersverteilung der Patienten mit kolorektalem Karzinom. Das obere/untere Ende der Antennen stellt das maximale/das minimale Alter des Kollektivs dar. Das untere/obere Ende der Box spiegelt die 25 %-Perzentile/die 75 %-Perzentile wieder. Die Linie in der Box gibt den Median wieder.

Insgesamt wurden 44 Patienten in der Studie erfasst, wovon 26 (59 %) männlich und 18 (41 %) weiblich waren. Der Median des Alters beträgt 67,5 Jahre und das Durchschnittsalter 64,2 Jahre. Das Alter der Patienten zeigte eine Spannweite zwischen 29 und 81 Jahren mit einer 25 %-Perzentile von 54,3 Jahren und einer 75 %-Perzentile von 74 Jahren (Abbildung 18).

In der männlichen Gruppe (n= 26) beträgt der Median 65 Jahre und der Mittelwert 62,7 Jahre. Die 25 %-Perzentile beläuft sich auf 56,8 Jahre und die 75 %-Perzentile auf 71,5 Jahre. Die Spannweite liegt zwischen 29 und 81 Jahren.

In der weiblichen Gruppe (n= 18) beträgt der Median 72 Jahre und der Mittelwert 66,4 Jahre. Die 25 %-Perzentile beläuft sich auf 52 Jahre und die 75 %-Perzentile auf 75,5 Jahre. Die Spannweite liegt zwischen 39 und 79 Jahren.

Das Staging und Grading der Patienten mit kolorektalem Karzinom kann Tabelle 10 entnommen werden. Es flossen T-Stadien von T3 bis T4 in die Studie ein. Dies entspricht einer

Infiltration des Tumors bis in die Subserosa (T3), bis in das viszerale Peritoneum (T4a) beziehungsweise in angrenzende Organe oder Nachbarstrukturen (T4b). Der Lymphknotenbefall reichte von N0 bis N2 (N0: keine regionären Lymphknotenmetastasen; N1: bis zu 3 Lymphknotenmetastasen; N2: mehr als 3 Lymphknotenmetastasen). Insgesamt wiesen zwei der 44 Patienten Fernmetastasen (=M1) auf. Das Grading ergab, wenn es erhoben wurde, bis auf eine Ausnahme (G3 (=schlechte Differenzierung)) das Stadium G2 (=mittlere Differenzierung) (Braun, 2014).

Patient	T	N	M- Klassifikation	Grading
1	uT3	uN+	MX	G2
2	uT3	uN0	cM0	G2
3	cT3	cN+	cM0	G2
4	cT3	cN1	cM0	G2
5	cT3	cN1	cM1	G2
6	cT3	cN0	cM0	G2
7	cT3	cN0	cM0	G2
8	uT3	uN0	cM0	G2
9	cT3	cN2	cM0	G2
10	cT3	uN0/cN+	M0	-
11	cT3	cN+	cM0	G2
12	uT3	cNX	cM0	G2
13	cT3	cN1	cM0	G2
14	uT3	uN1	cM0	G2
15	uT3	cN0	cM0	G2
16	cT2	cN1	cM0	G2
17	cT3	cN2	MX	G2
18	cT3	cN2	cM0	G2
19	cT3a	cN2	cM0	-
20	cT3-4	cN+	cM0	G2
21	cT3	cN0	cM0	G2

22	cT3	cN1	cM0	G3
23	uT3	cN0	cM0	G2
24	uT3	uN0	cM0	G2
25	cT4	cN1	cM0	G2
26	uT3	uN2	cM0	G2
27	uT3	uN1	cM0	G2
28	uT3	uN1	cM0	G2
29	uT3	N+	cM0	G2
30	cT3	cN0	cM0	-
31	cT3	cN1	cM0	G2
32	cT3	cN2	cM1	G2
33	T3	N2	M0	G2
34	cT3	cN0	M0	G2
35	uT3	uN0	cM0	-
36	cT3	cN+	cM0	-
37	cT3	cN0	cM0	-
38	cT2	uN0	M0	G2
39	cT3	cN+	cM0	G2
40	uT3	uN1	cM0	G2
41	uT3b-4	cN+	cM0	-
42	uT3	uN1	cM0	G2
43	cT3	cN+	cM0	G2
44	cT3	uN1	cM0	G2

Tabelle 10: TNM-Klassifikation und Grading der Patienten mit kolorektalem Karzinom. Abkürzungen: c: Staging mittels klinischer Untersuchung; u: Staging mittels Ultraschalluntersuchung.

3.3 Validierung des ELISAs

Um ein neues ELISA-System zu validieren, müssen die verschiedenen Substanzen, wie beispielsweise Block-Puffer und Antikörper sowie der Grad der Verdünnung der Proben möglichst gut aufeinander abgestimmt werden. Im Falle des neuen ELISA-Systems stellte sich eine 1:5-fache Verdünnung der Proben als geeignetste Option heraus, um Matrixeffekte, welche bei unverdünnten Proben zu beobachten sind, zu reduzieren.

Abbildung 19 zeigt eine Kalibrierungskurve, die in den Experimenten verwendet wurde. Die Abbildung zeigt zudem die passende Funktion, um die Kurve zu beschreiben. Die Funktion wurde mit Hilfe eines „four-parameter fit“-Modells bestimmt.

Sechs Hsp70-Proben wurden verwendet, um die Linearität des ELISAs zu bewerten. Hierbei bediente man sich des Vergleiches der linearen und nichtlinearen Polinomanpassung des Verhältnisses der wirklichen und der gemessenen Konzentrationen der Proben. Dabei zeigte sich, dass der neue Hsp70-ELISA in einem Bereich von 0,36 - 17,41 ng/ml Linearität aufweist (Abbildung 20).

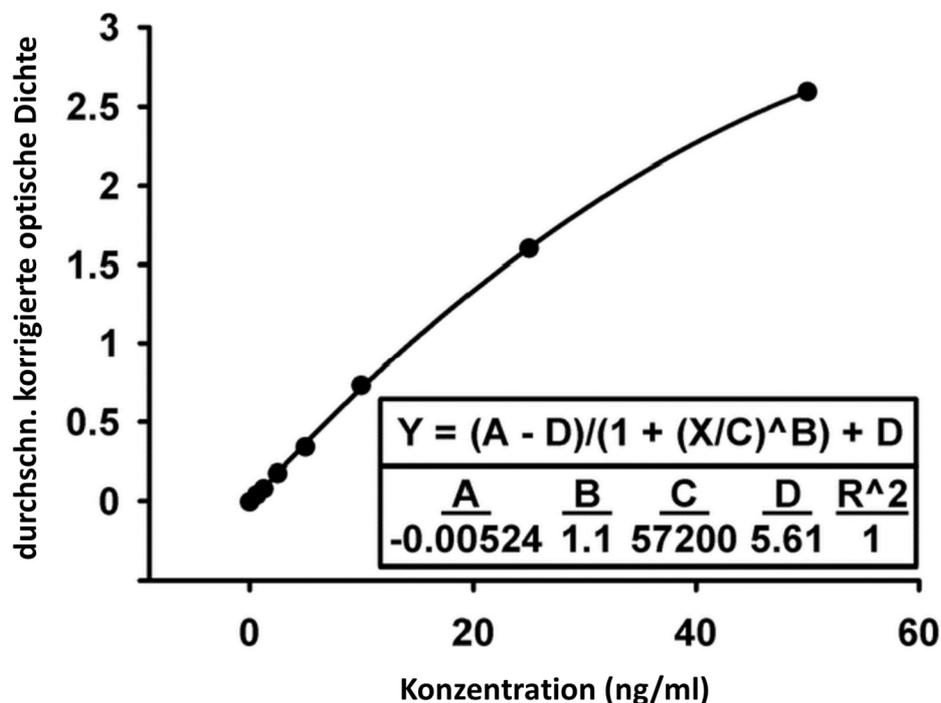


Abbildung 19: Eine Kalibrierungskurve, wie sie in den Versuchen verwendet wurde. Die Gleichung wurde mittels eines "four-parameter fit"-Modells bestimmt. Die y-Achse gibt die durchschnittliche korrigierte optische Dichte an. Auf der x-Achse findet sich die Hsp70-Konzentration in ng/ml. Bearbeitet aus: (Breuninger, 2014).

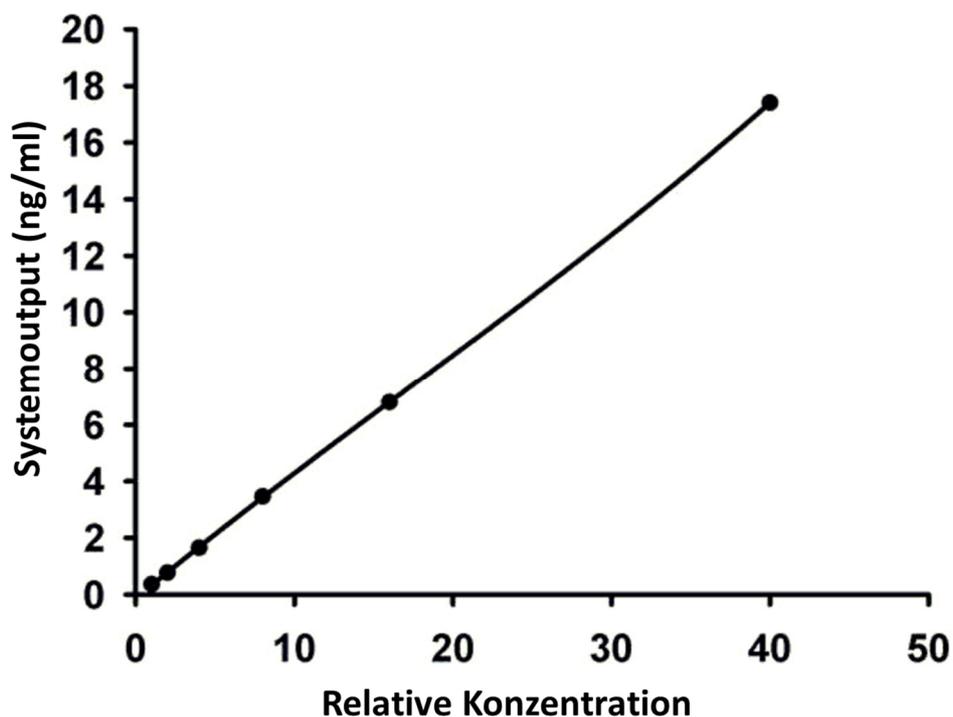


Abbildung 20: Linearität des lipHsp70-ELISAs. Diese ist im Bereich von 0,36 - 17,4 ng/ml gegeben. Die y-Achse gibt den Systemoutput in ng/ml wieder. Auf der x-Achse findet sich die relative Konzentration. Bearbeitet aus: (Breuninger, 2014).

Im Zuge der Validierung des ELISA-Systems wurden außerdem die Intra- und Interassay-Präzision bestimmt. Die Intraassay-Präzision beschreibt die Schwankungen, die bei wiederholten Bestimmungen von gleichen Proben auf derselben ELISA-Platte entstehen. Um die Intraassay-Präzision zu bestimmen, wurden Proben von zwei Probanden insgesamt zwanzig Mal gemessen. Anschließend wurden die Variationskoeffizienten berechnet, welche man durch Division der Standardabweichung durch den Mittelwert erhält. Der Variationskoeffizient bewegte sich hierbei im Bereich zwischen 5,2 % und 8,1 %. Die Interassay-Präzision schätzt den Einfluss von verschiedenen Zeitpunkten, an denen die Messungen durchgeführt wurden, ab. Die Interassay-Präzision wurde bestimmt, indem Proben an drei verschiedenen Tagen gemessen wurden und die Variationskoeffizienten berechnet wurden. Diese lagen zwischen 1,0 % und 18 % und besaßen einen Durchschnittswert von 10,9 %.

Das Detektionslimit nach (Armbruster & Pry, 2008) für das neue ELISA-System beträgt 0,3 ng/ml. Die Berechnungen der Kalibrationskurve, der Linearität, der Intra- und Interassay-

Präzision und des Detektionslimits wurden im Voraus dieser Arbeit von Breuninger, S. und Schwarzer, J. durchgeführt (Breuninger, 2014).

3.4 Bestimmung der „Recovery“

Ein Weg, um herauszufinden, ob ein ELISA die wahre Konzentration eines Stoffes misst, sind sogenannte „spike-and-Recovery“-Versuche und die Bestimmung der „Recovery“. Diese gibt in Prozent an, wie viel einer definierten Menge des zu messenden Analyts der ELISA detektiert, wenn die definierte Menge einer zu analysierenden Probe (in diesem Fall: Serum) beigegeben wird.

Serumproben von vier Probanden wurden je dreimal gemessen; ohne zusätzliches Hsp70, versetzt mit Hsp70 in einer Konzentration von 2,5 ng/ml und in einer Konzentration von 5 ng/ml.

Insgesamt wurde dieser Versuch dreimal wiederholt (n=3). Als Kontrolle wurde der Versuch gleichermaßen viermal (n=4) mit dem Hsp70- ELISA von R&D-Systems durchgeführt.

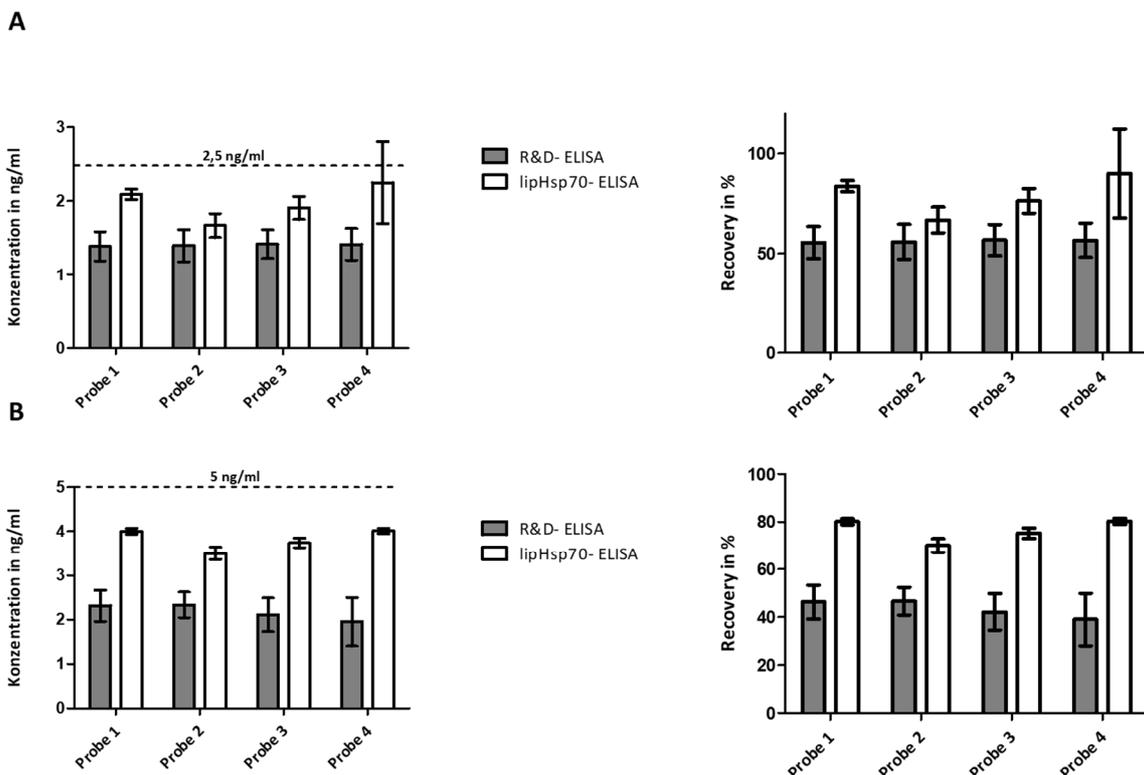


Abbildung 21: Recovery des lipHsp70-ELISAs und des R&D-ELISAs. Links jeweils in absoluten Werten (Konzentration in ng/ml) und rechts in Prozent des zu erwartenden Wertes. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder. Abbildungen A zeigen die Ergebnisse der Spikingversuche mit Hsp70 in der Konzentration 2,5 ng/ml. Abbildungen B zeigen die Ergebnisse der Versuche mit Hsp70 in der Konzentration 5 ng/ml.

Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse der Versuche. Wurden die Serumproben mit Hsp70 in der Konzentration 2,5 ng/ml versetzt, so detektierte der lipHsp70-ELISA durchschnittlich 79 % des zugegebenen Hsp70 (Minimum: 67 % (1,671 ng); Maximum: 90 % (2,25 ng)). Im Gegensatz hierzu zeigte der ELISA von R&D-Systems lediglich eine „Recovery“ von durchschnittlich 56 % (Minimum: 55 % (1,387 ng); Maximum: 57 % (1,419 ng)).

In den „spiking“-Versuchen mit der Konzentration 5 ng/ml, detektierte der lipHsp70 durchschnittlich 76 % des zugegebenen Hsp70 (Minimum: 70 % (3,502 ng); Maximum: 80 % (4,013 ng)). Auch hier zeigte der ELISA von R&D-Systems mit durchschnittlich 44 % (Minimum: 39 % (1,951 ng); Maximum: 47 % (2,332 ng)) eine geringere „Recovery“.

Der lipHsp70-ELISA zeigt zusammenfassend mit $1,981 \pm 0,125$ ng/ml ($79 \pm 5,0$ % des zu erwartenden Wertes) bei den 2,5 ng/ml-Versuchen und mit $3,816 \pm 0,122$ ng/ml ($76 \pm 2,4$ % des zu erwartenden Wertes) bei den 5 ng/ml-Versuchen eine signifikant bessere „Recovery“, als der Hsp70-ELISA von R&D-Systems. Dieser detektierte lediglich $1,405 \pm 0,007$ ng/ml ($56 \pm 0,3$ % des zu erwartenden Wertes) bei den 2,5 ng/ml-Versuchen, beziehungsweise $2,176 \pm 0,091$ ng/ml ($44 \pm 1,8$ % des zu erwartenden Wertes) bei den 5 ng/ml-Versuchen (Abbildung 22).

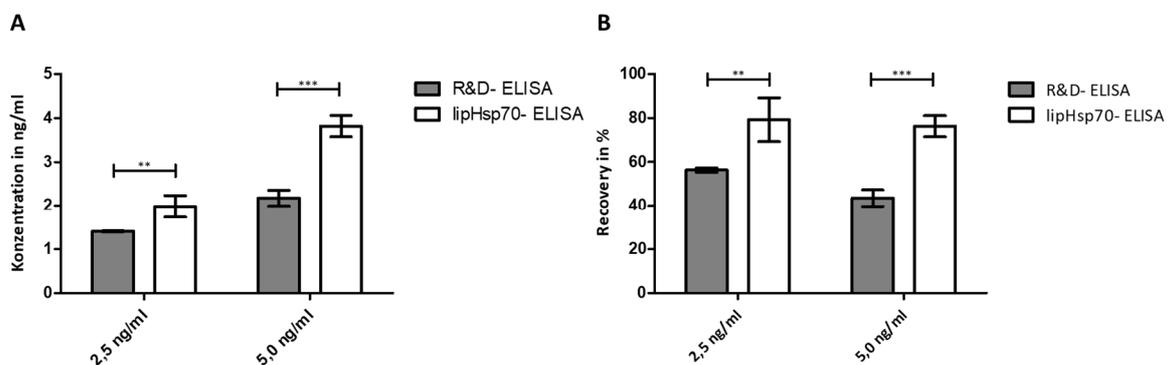


Abbildung 22: Durchschnittliche "Recovery" des lipHsp70-ELISAs und des ELISAs von R&D-Systems. Die Spikingversuche wurden mit Hsp70 in der Konzentration von 2,5 ng/ml und 5,0 ng/ml durchgeführt. Die Abbildungen zeigen die "Recovery" in absoluten Zahlen (Konzentration in ng/ml) (A) sowie in Prozentzahlen (Prozent des zu erwartenden Wertes) (B). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die Menge des gemessenen Hsp70 der beiden Assays unterscheidet sich im ungepaartem t-Test signifikant (** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$).

3.5 Einfluss von Störfaktoren auf den lipHsp70-ELISA

Um auszuschließen, dass Begebenheiten, welche im klinischen Alltag vorkommen können, den ELISA negativ beeinflussen, wurden die Auswirkungen von verschiedenen Störfaktoren untersucht.

Die Hämolyse einer Blutprobe wird durch verschiedene Faktoren begünstigt. Hierzu zählen beispielsweise eine zu lange Stauzeit, zu schnelles Abnehmen der Blutprobe sowie eine lange Zeitspanne zwischen Abnahme und Weiterverarbeitung der Proben. Drei verschiedene Serumproben gesunder Probanden wurden mit steigenden Mengen an lysierten Erythrozyten versetzt. Die Menge der Erythrozyten wurde mittels Hämoglobinbestimmung quantifiziert. Hierbei zeigte sich, dass der Hsp70-Wert bis zu einer Hämoglobinkonzentration von 9,6 mg/dl relativ stabil bleibt. Bei höheren Hämoglobinkonzentrationen wurde der Hsp70-Wert der Proben signifikant beeinflusst (Abbildung 23). Die Bearbeitung der Proben und die Auswertung der Daten wurden von Breuninger, S. und Schwarzer, J. durchgeführt (Breuninger, 2014).

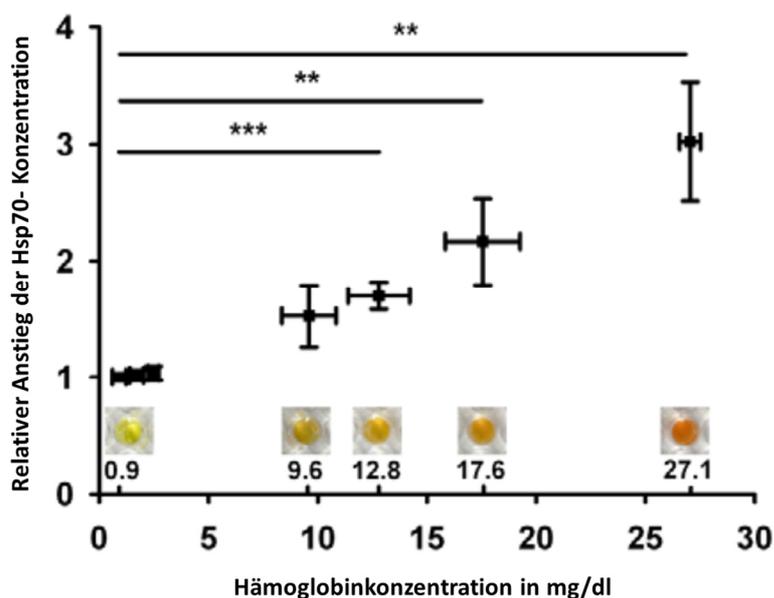


Abbildung 23: Relativer Anstieg des Hsp70-Serumwerts nach Zugabe von lysierten Erythrozyten. Die Menge wurde durch deren Hämoglobin-Konzentrationen (in mg/dl) definiert. Die Bilder zeigen die Serumproben nach Zugabe der lysierten Erythrozyten. Die Werte bleiben bis zu einer Hämoglobinkonzentration von 9,6 mg/dl relativ stabil. Höhere Werte beeinflussen den Wert signifikant (t-Test; *** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$), übernommen aus: (Breuninger, 2014).

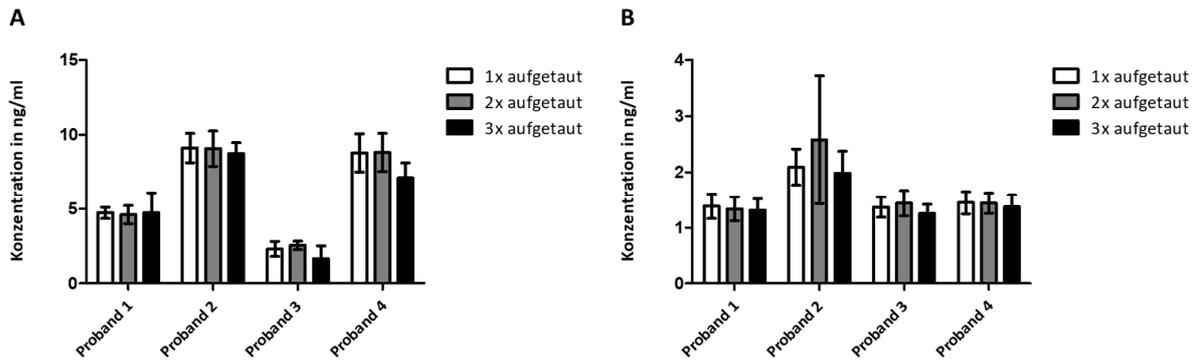


Abbildung 24: Auswirkung von wiederholtem Auftauen und Einfrieren der Proben auf den Hsp70-Serumwert.

Die Abbildungen zeigen die Hsp70-Serumwerte in ng/ml von vier verschiedenen Probanden nach einmaligem, zweimaligem und dreimaligem Einfrieren und Auftauen. Die Messungen wurden mit dem lipHsp70-ELISA (A) und dem ELISA von R&D-Systems (B) durchgeführt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder.

Auch wiederholtes Auftauen und Einfrieren kann Serumwerte beeinflussen. Um dies zu untersuchen, wurden Serumproben von vier gesunden Probanden je einmal, zweimal und dreimal eingefroren und aufgetaut. Nach jedem Auftauprozess wurden der lipHsp70-ELISA und der ELISA von R&D-Systems zur Bestimmung des Hsp70-Serumwertes durchgeführt. Im gepaarten t-Test zeigten sich bei Messung mit dem lipHsp70-ELISA keine signifikanten Unterschiede (p -Wert $>0,05$). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Messung mit dem ELISA von R&D-Systems im gepaarten t-Test ein signifikanter Unterschied ($**p < 0,01$) zwischen den einmalig aufgetauten Proben und denen, die dreimal aufgetaut wurden (Abbildung 24).

Ebenso kann die Nahrungsaufnahme verschiedene Serumwerte beeinflussen. Zur Untersuchung dieses Störfaktors erfolgte bei neun gesunden Probanden eine Blutabnahme bei Nüchternheit und eine zwei Stunden nach einer fett- und kohlenhydratreichen Mahlzeit. Anschließend erfolgte die Messung der Hsp70-Serumwerte mit dem lipHsp70-ELISA und dem ELISA von R&D-Systems. Hierbei zeigt sich bei Verwendung des lipHsp70-ELISAs kein signifikanter Unterschied der Werte vor und nach der Nahrungsaufnahme (gepaarter t-Test; $p > 0,05$). Bei Verwendung des ELISAs von R&D-Systems dagegen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Werten (gepaarter t-Test; $p < 0,05$) (Abbildung 25).

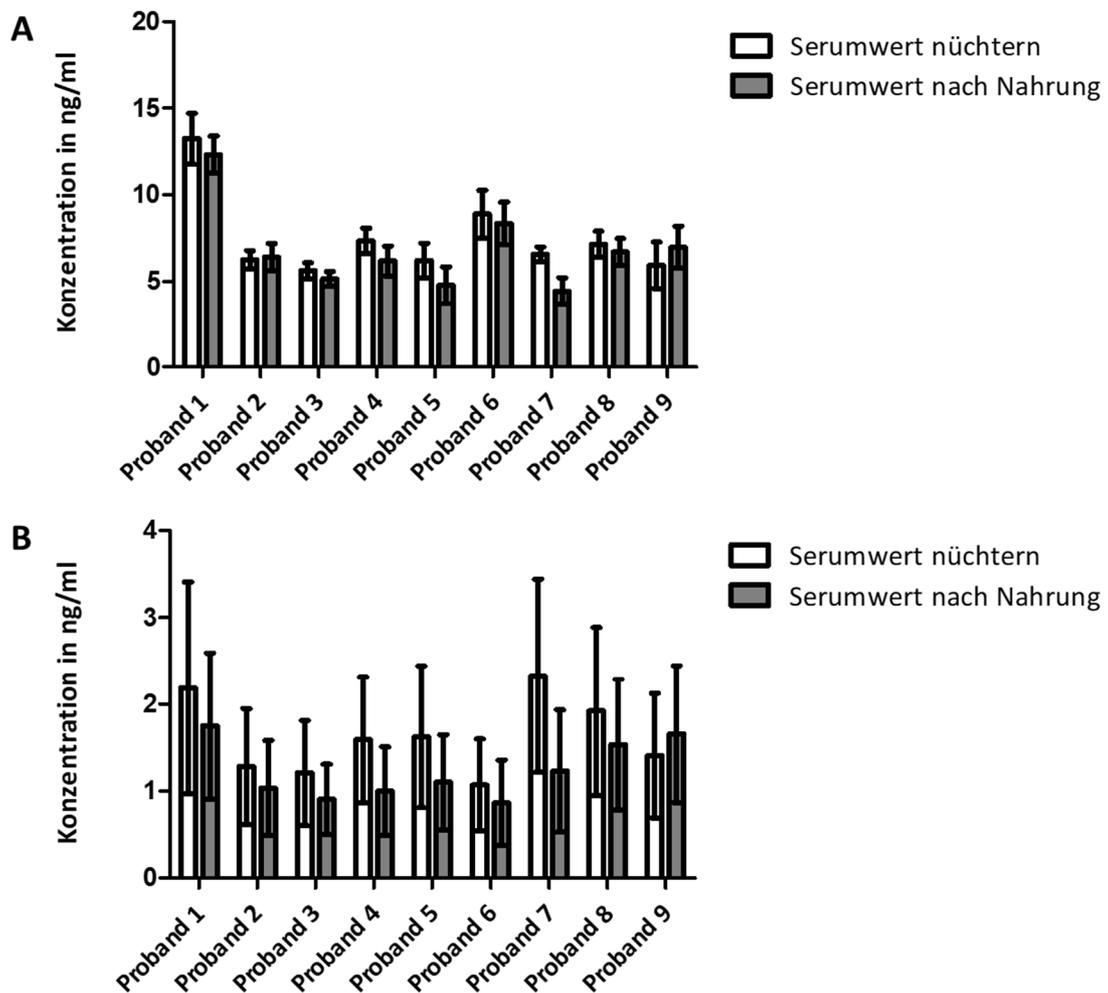


Abbildung 25: Auswirkung von Nahrungsaufnahme auf den Hsp70-Serumwert. Die Abbildungen zeigen die Hsp70-Serumwerte in ng/ml vor (weißer Balken) und nach (grauer Balken) Aufnahme einer fett- und kohlenhydratreichen Nahrungsaufnahme. Die Werte wurden mit dem lipHsp70-ELISA (A) und dem ELISA von R&D-Systems (B) bestimmt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder.

3.6 Vergleich der Messung von Plasma- und Serumproben

Es wurden von vier gesunden Probanden mit unterschiedlichen Hsp70-Werten jeweils Serum- und Plasmaproben, welche bei derselben Entnahme gewonnen wurden, mit dem lipHsp70-ELISA und dem ELISA von R&D-Systems gemessen (Abbildung 26). Bei der Messung mit dem lipHsp70-ELISA zeigten sich im ungepaarten t-Test zwischen den Serum- und Plasmaproben der Probanden keine signifikanten Unterschiede (p -Werte jeweils $> 0,05$). Bei der Messung mit dem ELISA von R&D-Systems zeigte sich bei Proband 4 ein signifikanter Unterschied ($*p < 0,05$ (Proband 4)).

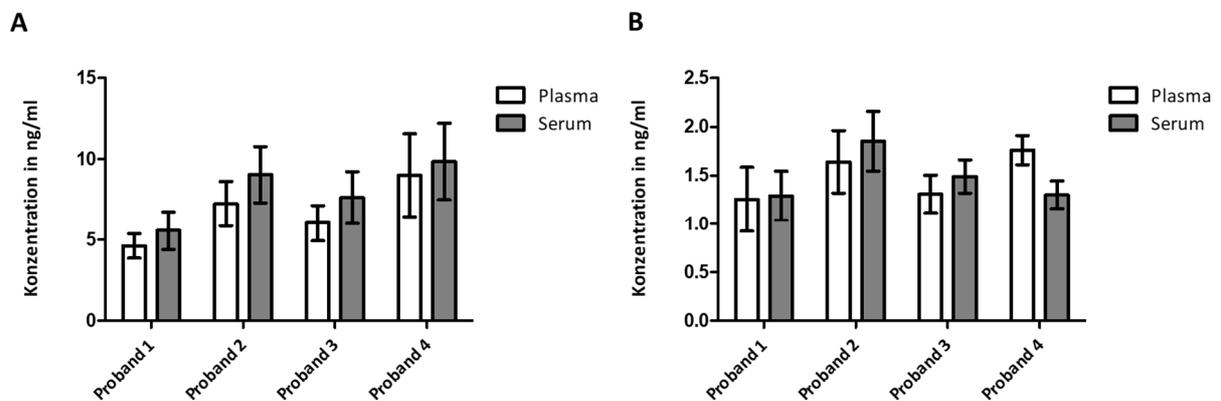


Abbildung 26: Hsp70-Serumwerte in Serum und Plasma. Die Abbildungen zeigen die Hsp70-Serumwerte in ng/ml von vier verschiedenen gesunden Probanden in Plasma (weißer Balken) und Serum (grauer Balken). Die Werte in Plasma und Serum wurden jeweils mit dem lipHsp70-ELISA (A) und dem ELISA von R&D-Systems (B) bestimmt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder.

3.7 Messung von an Lipidvesikel gebundenem Hsp70

Die mit rekombinantem Hsp70 beimpften POPC/POPS-Lipidvesikel wurden jeweils dreimal mit dem lipHsp70-ELISA und dem ELISA von R&D-Systems gemessen. Die Messung mittels Western-Blot ergab eine Hsp70-Konzentration von 2100 ng/ml.

Der lipHsp70-ELISA zeigte mit $1,610 \pm 292$ ng/ml (76 ± 5 % des Wertes im Western Blot) im Vergleich zum ELISA von R&D-Systems mit 155 ± 36 ng/ml (7 ± 1 % des Wertes im Western Blot) einen signifikant höheren Wert ($***p < 0,001$) (Abbildung 27).

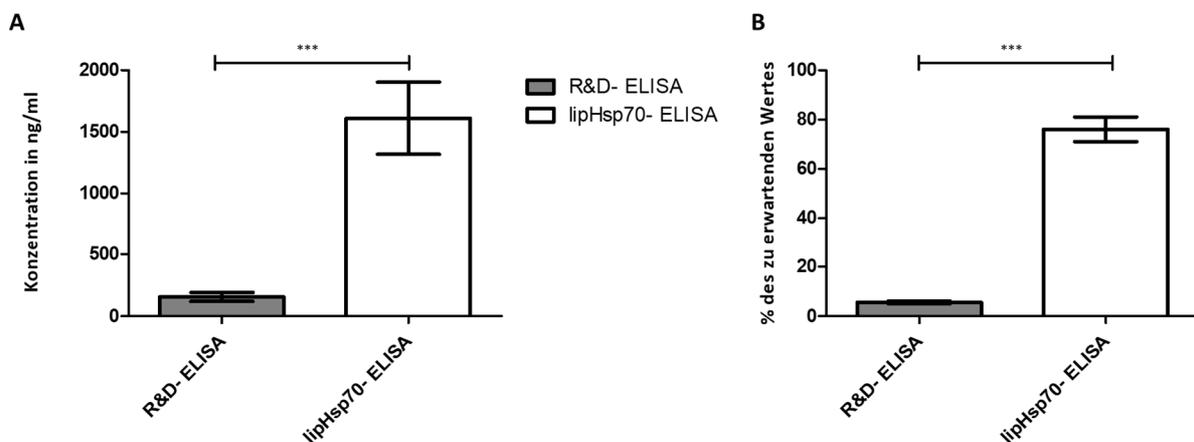


Abbildung 27: Hsp70-Konzentration der mit rekombinantem Hsp70 beimpften POPC/POPS-Lipidvesikel. Die Abbildungen zeigen die Hsp70-Konzentrationen in ng/ml (A) bei Messung mit dem lipHsp70-ELISA (weiße Balken) und dem ELISA von R&D-Systems (grauer Balken). Abbildung B zeigt an, wie viel des zu erwartenden Wertes an Hsp70 in Prozent vom lipHsp70-ELISA und dem ELISA von R&D-Systems detektiert wurde. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Es zeigten sich im t-Test signifikante Unterschiede ($***p < 0,001$).

3.8 Hsp70-Serumwerte im gesunden Kontrollkollektiv und Bestimmung des Schwellenwertes für Hsp70

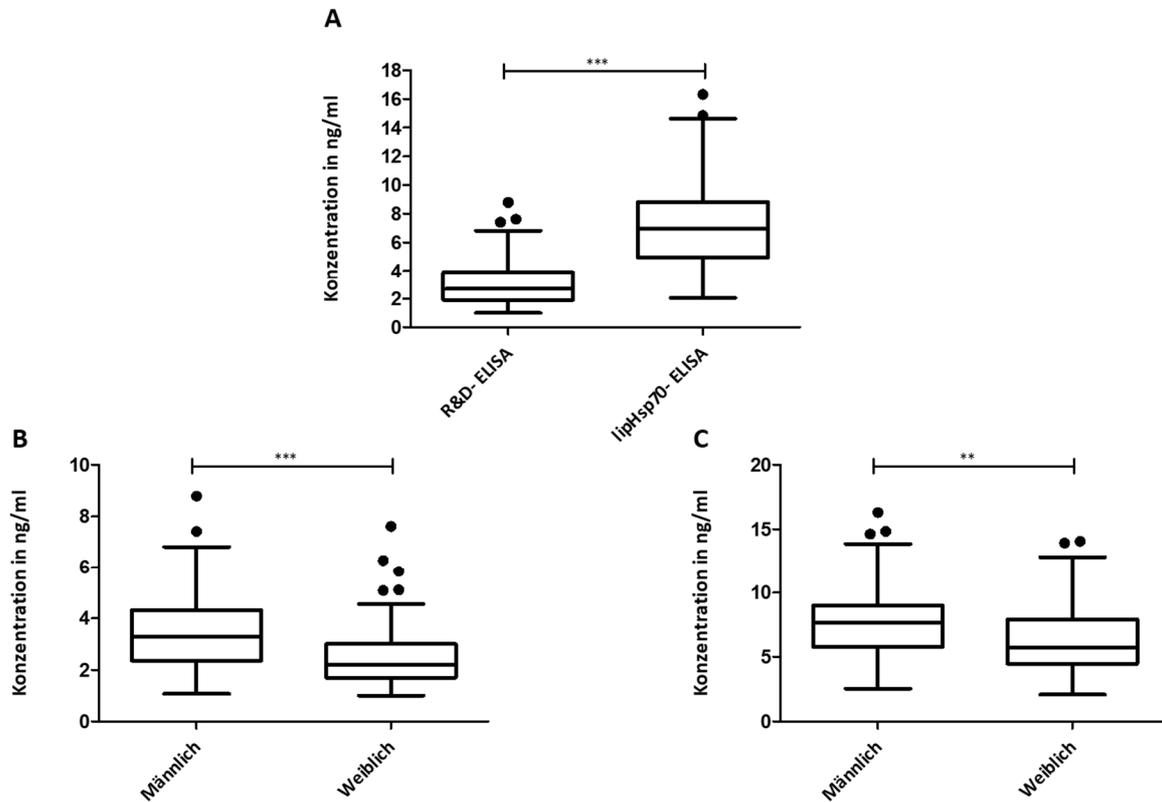


Abbildung 28: Hsp70-Serumwerte des gesunden Kontrollkollektivs. Diese wurden mit dem lipHsp70-ELISA und dem ELISA von R&D-Systems bestimmt (A). Abbildung B zeigt die nach Geschlecht getrennten Werte in ng/ml bei der Messung mit dem ELISA von R&D-Systems, Abbildung C zeigt sie bei der Messung mit dem lipHsp70-ELISA. Die oberen und unteren Grenzen des Boxplots geben die 75 %- und die 25 %-Perzentile an. Die Linie in der Box beschreibt den Median. Die Antennen entsprechen der Art nach Tukey, d.h. die Antenne repräsentiert den letzten Wert, der innerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstandes von den Boxgrenzen liegt. Ein signifikanter Unterschied liegt bei allen Abbildungen vor (Mann-Whitney-U-Test; **p<0,01; ***p<0,001).

Insgesamt wurde bei 124 gesunden Probanden der Hsp70-Serumwert jeweils mit dem lipHsp70-ELISA und dem ELISA von R&D-Systems bestimmt.

Die Messungen mit dem lipHsp70-ELISA ergaben hierbei signifikant höhere Werte, als die Messungen mit dem ELISA von R&D-Systems. Der lipHsp70-ELISA detektierte $7,233 \pm 0,261$ ng/ml. Im Gegensatz dazu betrug der Wert bei Messungen mit dem ELISA von R&D-Systems lediglich $3,071 \pm 0,134$ ng/ml. Dies ergibt mittels Mann-Whitney-U-Test einen p-Wert < 0,001 und somit einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Assays (Abbildung 28).

Männliche Probanden wiesen hierbei im Vergleich zu weiblichen Probanden signifikant höhere Werte auf. Beim Gebrauch des ELISAs von R&D-Systems zeigten Männer Werte von durchschnittlich $3,409 \pm 0,181$ ng/ml, während Frauen Werte von durchschnittlich $2,633 \pm 0,183$ aufwiesen (Mann-Whitney-U-Test; p-Wert < 0,001). Analog zeigte sich das Ergebnis beim lipHsp70-ELISA mit Werten von durchschnittlich $7,814 \pm 0,339$ ng/ml bei männlichen Probanden und von durchschnittlich $6,479 \pm 0,389$ ng/ml bei weiblichen Probanden (Mann-Whitney-U-Test; p-Wert < 0,01) (Abbildung 28).

Sowohl für den lipHsp70-ELISA als auch für den ELISA von R&D-Systems konnte keine Korrelation zwischen Alter und der Höhe des Hsp70-Serumwerts nachgewiesen werden. Es zeigten sich r-Werte nach Pearson von 0,03463 (R&D-ELISA) und -0,1443 (lipHsp70-ELISA), womit eine Korrelation der beiden Variablen unwahrscheinlich ist (Abbildung 29).

Die Bestimmung des Normbereichs erfolgte gemäß des im Methodenteil beschriebenen Verfahrens:

$$l = 0,025 * (n + 1), \text{ wobei } n = \text{Anzahl der Werte (hier } n = 124)$$

$$l = 0,025 * (124 + 1) = 3,125$$

Daraus lässt sich schließen, dass die 2,5 %-Perzentile auf dem 3,125ten Platz von unten liegt und die 97,5 %-Perzentile auf dem 3,125ten Platz von oben.

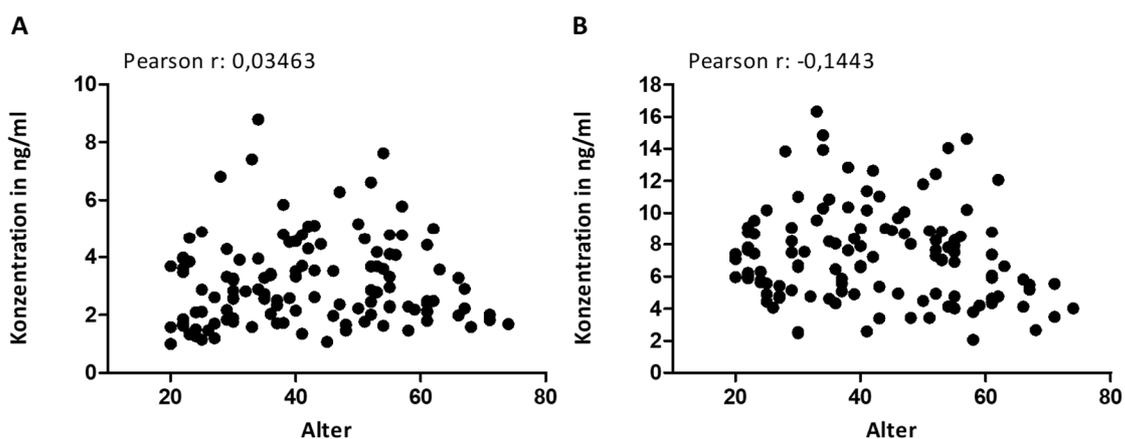


Abbildung 29: Korrelation von Alter und Hsp70-Serumwert. Gegenüberstellung von Alter in Jahren (x-Achse) und Hsp70-Serumwert in ng/ml (y-Achse) bei Messung mit dem ELISA von R&D-Systems (A) und dem lipHsp70-ELISA (B). Jeder Punkt kennzeichnet einen Messwert. Die Werte für das Pearson r zeigen jeweils keine Korrelation an.

Da diese Werte keinen ganzen Zahlen entsprechen, bedient man sich der linearen Interpolation:

$$Y_n = Y_1 + \frac{(Y_2 - Y_1)}{(X_2 - X_1)} * (X_n - X_1)$$

Für die 2,5 %-Perzentile gilt:

$$Y_{3,125} = 2,55 + \frac{(2,59 - 2,55)}{(4 - 3)} * (3,125 - 1)$$

$$Y_{3,125} = 2,555$$

Für die 97,5 %-Perzentile gilt:

$$Y_{3,125} = 14,62 + \frac{(14,05 - 14,62)}{(4 - 3)} * (3,125 - 1)$$

$$Y_{3,125} = 14,54875$$

Hieraus ergibt sich ein unterer Normwert von 2,56 ng/ml und ein oberer Normwert von 14,55 ng/ml.

Nach Tabelle 3 aus (Reed et al., 1971) beträgt $a = 1$ und $b = 7$ für $n = 124$. Daraus ergibt sich für die 2,5 %-Perzentile ein 90 %-Konfidenzintervall zwischen $x_{(1)} = 2,07$ ng/ml und $x_{(7)} = 3,42$ ng/ml und für die 97,5 %-Perzentile ein 90 %-Konfidenzintervall von $x_{(118)} = 12,83$ ng/ml und $x_{(124)} = 16,31$ ng/ml.

Folgende Werte definieren somit den Normbereich für Hsp70-Serumwerte:

Normbereich: 2,56 ng/ml - 14,55 ng/ml

90 %-Konfidenzintervall des unteren Grenzwerts: 2,07 ng/ml - 3,42 ng/ml

90 %-Konfidenzintervall des oberen Grenzwerts: 12,83 ng/ml - 16,31 ng/ml.

Um sogenannte Ausreißer zu identifizieren, wird folgende Bedingung überprüft:

$$r = \frac{x_{(124)} - x_{(123)}}{x_{(124)} - x_{(1)}} > \frac{1}{3}$$

$$r = \frac{x_{(124)} - x_{(123)}}{x_{(124)} - x_{(1)}} = \frac{16,31 - 14,84}{16,31 - 2,07} = \frac{147}{1424} < \frac{1}{3}$$

Da die Voraussetzung für r nicht erfüllt ist, ist der höchste Wert nicht als Ausreißer anzusehen und muss nicht verworfen werden.

$$r = \frac{x_{(2)} - x_{(11)}}{x_{(124)} - x_{(1)}} > \frac{1}{3}$$

$$r = \frac{x_{(2)} - x_{(1)}}{x_{(124)} - x_{(1)}} = \frac{2,46 - 2,07}{16,31 - 2,07} = \frac{39}{1424} < \frac{1}{3}$$

Hier ist die Voraussetzungen für r ebenso nicht erfüllt, womit auch der kleinste Wert nicht als Ausreißer anzusehen ist und nicht verworfen werden muss.

3.9 Hsp-70-Serumwerte bei Patienten mit kolorektalem Karzinom

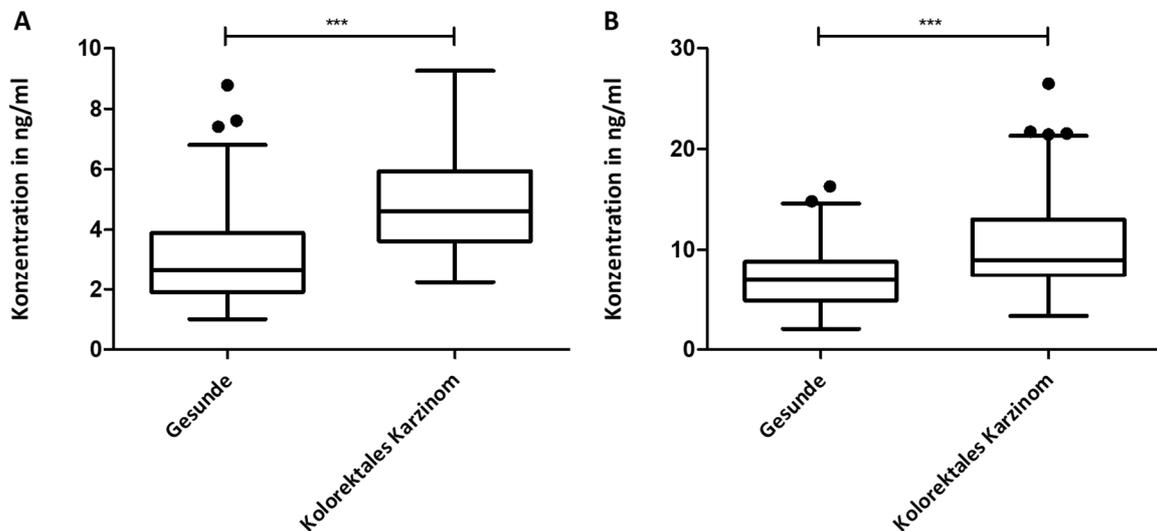


Abbildung 30: Vergleich der Hsp70-Serumwerte des gesunden Kontrollkollektivs mit den Hsp70-Serumwerten von Patienten mit kolorektalem Karzinom. Abbildung A zeigt die Werte bei Messung mit dem ELISA von R&D-Systems und Abbildung B zeigt die Werte bei Messung mit dem lipHsp70-ELISA (Konzentration in ng/ml). Die oberen und unteren Grenzen des Boxplots geben die 75 %- und die 25 %-Perzentile an. Die Linie in der Box beschreibt den Median. Die Antennen entsprechen der Art nach Tukey, d.h. die Antenne repräsentiert den letzten Wert, der innerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstandes von den Boxgrenzen liegt. Ein signifikanter Unterschied liegt bei beiden Abbildungen vor (Mann-Whitney-U-Test; ***p<0,001).

Insgesamt wurden Serumproben von 44 Patienten, bei denen ein kolorektales Karzinom diagnostiziert wurde, mit dem ELISA von R&D-Systems und dem lipHsp70-ELISA gemessen. Der Durchschnittswert bei Messung mit dem R&D-ELISA betrug hierbei $5,095 \pm 0,2767$ ng/ml. Damit weisen Werte von Karzinompatienten einen signifikant höheren Hsp70-Wert auf als gesunde Probanden (Mann-Whitney-U-Test; $p < 0,001$). Auch bei der Messung mit dem lipHsp70-ELISA zeigten die Serumproben von Karzinompatienten mit durchschnittlich $10,98 \pm 0,7851$ ng/ml einen signifikant höheren Wert auf als das gesunde Kontrollkollektiv (Mann-Whitney-U-Test; $p < 0,001$) (Abbildung 30).

Bei der Gegenüberstellung der beiden ELISAs (Abbildung 31) fällt auf, dass der lipHsp70-ELISA mit durchschnittlich $10,98 \pm 0,7851$ ng/ml signifikant mehr Hsp70 im Serum von Patienten mit kolorektalem Karzinomen detektiert, als der ELISA von R&D-Systems mit $5,095 \pm 0,2767$ ng/ml (Mann-Whitney-U-Test; $p < 0,001$).

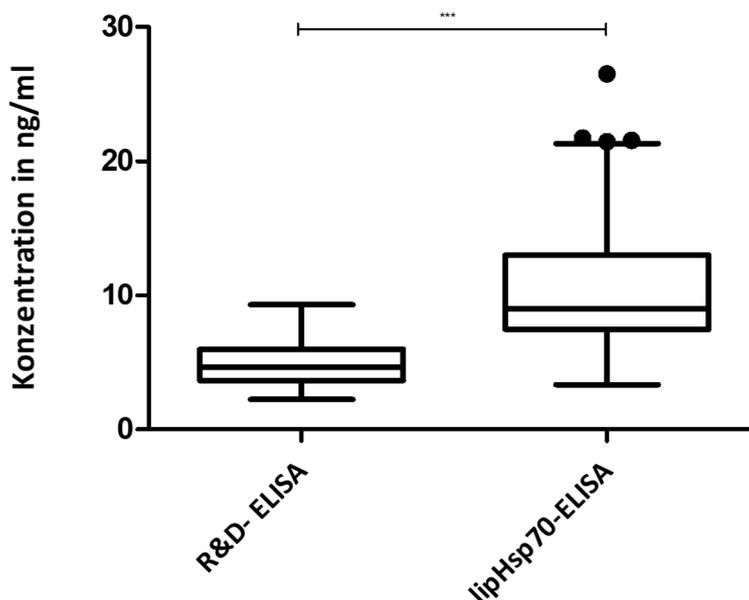


Abbildung 31: Gegenüberstellung von Hsp70-Serumwerten von Patienten mit kolorektalem Karzinom bei Messung mit dem ELISA von R&D-Systems und mit dem lipHsp70-ELISA. Die oberen und unteren Grenzen des Boxplots geben die 75 %- und die 25 %-Perzentile an. Die Linie in der Box beschreibt den Median. Die Antennen entsprechen der Art nach Tukey, d.h. die Antenne repräsentiert den letzten Wert, der innerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstandes von den Boxgrenzen liegt. Zwischen den Hsp70-Serumwerten der beiden Assays besteht ein signifikanter Unterschied (Mann-Whitney-U-Test; *** $p < 0,001$).

Abbildung 32 zeigt die ROC-Kurven für die Werte des lipHsp70-ELISAs und des ELISAs von R&D-Systems. Die „Area under the curve“ beträgt im Falle des R&D-ELISAs 0,82 und 0,74 im Falle des lipHsp70-ELISAs.

Den optimalen Cut-off-Wert für den lipHsp70-ELISA errechnet der Youden-Index bei einem Hsp70- Serumwert von 6,307 ng/ml. Die Spezifität beträgt 42,74 % und die Sensitivität 95,45 %.

Für den ELISA von R&D-Systems liegt laut Youden-Index der optimale Cut-off-Wert bei einem Hsp70-Serumwert von 2,993 ng/ml. Die Spezifität beträgt 58,06 % und die Sensitivität 95,45 %.

Laut (0,1)-Methode beträgt der optimale Cut-off-Wert für den lipHsp70-ELISA 7,692 ng/ml. Dies ergibt eine Sensitivität von 70,45 % und eine Spezifität von 62,1 %. Für den ELISA von

R&D-Systems ergibt sich ein optimaler Cut-off-Wert von 3,624 ng/ml. Hierbei beträgt die Sensitivität 77,27 % und die Spezifität 70,97 %.

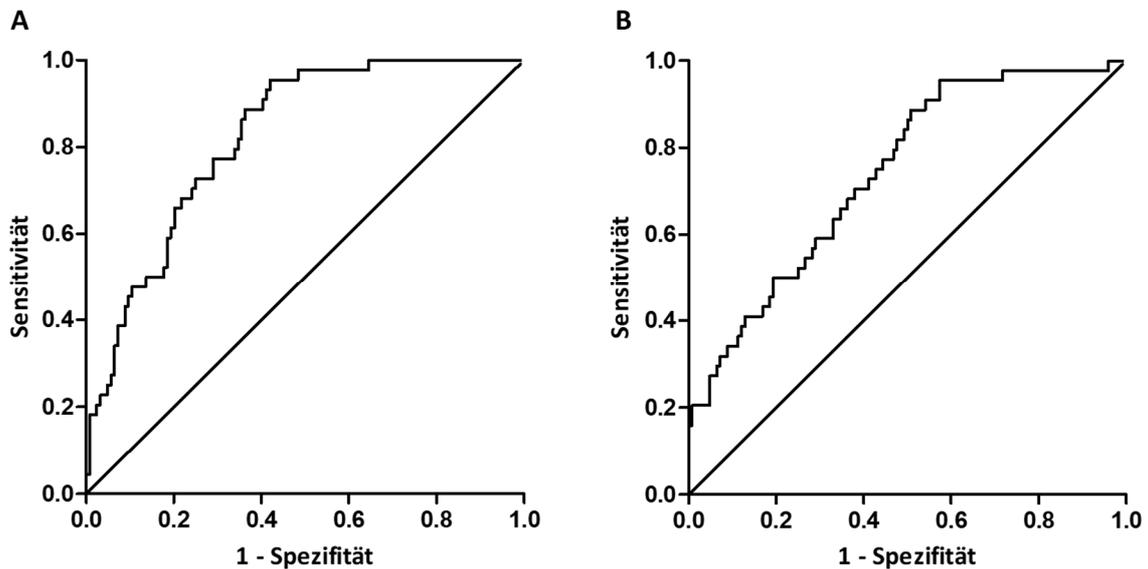


Abbildung 32: Receiver Operating Characteristic-(ROC-)Kurven. Die Abbildungen zeigen die ROC-Kurven des ELISAs von R&D-Systems (A) und des lipHsp70-ELISAs (B) für die Hsp70-Serumwerte von gesunden Probanden gegenüber den Serumwerten von Patienten mit kolorektalem Karzinom. Der Rate der Richtig-Positiven (Sensitivität) auf der y-Achse wird hierbei die Rate der Falsch-Positiven (1 - Spezifität) auf der x-Achse gegenübergestellt.

4 Diskussion

4.1 Vorteile der Verwendung des cmHsp70.1-Antikörpers im lipHsp70-ELISA

Die Verwendung des cmHsp70.1-Antikörpers im lipHsp70-ELISA bietet diverse Vorteile gegenüber den Antikörpern, die in den verschiedenen kommerziell erhältlichen ELISA-Kits, inklusive dem vom R&D-Systems, verwendet werden. Für den cmHsp70.1-Antikörper konnte gezeigt werden, dass er eine hohe Spezifität für Hsp70 aufweist und das strukturell sehr ähnliche Hsc70 nicht bindet (Multhoff & Hightower, 2011). Des Weiteren zeichnet er sich im Gegensatz zu anderen Hsp70-Antikörpern durch eine weitaus geringere Kreuzreaktivität aus, was die Qualität des ELISAs verbessert (Multhoff & Hightower, 2011).

Der größte Vorteil der Verwendung des cmHsp70.1-Antikörpers in einem ELISA besteht in einer Eigenschaft, die ihn deutlich von anderen Hsp70-Antikörpern absetzt. Es konnte gezeigt werden, dass er neben freiem Hsp70 auch membrangebundenes Hsp70 auf Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* bei tumor erkrankten Mäusen binden kann (Stangl, Gehrman, Dressel, et al., 2011). Diese Tatsache, verbunden mit der Erkenntnis, dass extrazelluläres Hsp70 in verschiedenen lipid-assoziierten Formen, wie beispielsweise in der Membran von Exosomen (Gastpar et al., 2005) vorkommen kann, macht den cmHsp70.1-Antikörper zu einem guten ELISA-Werkzeug. Den Serumproben werden Detergenzien zugesetzt, um den Analyt aus Lipidbindungen zu lösen. Allerdings detektiert der lipHsp70-ELISA signifikant höhere Hsp70-Serumwerte von Patienten mit kolorektalem Karzinom, als der von R&D-Systems. Dies lässt die Vermutung zu, dass dieser Lösungsvorgang nur unzureichend stattfindet. Diese Beobachtung konnte bei weiteren Tumorentitäten (Kopf-Hals-Karzinom, Lungenkarzinom, Pankreaskarzinom, Glioblastom, hämatologische Tumorerkrankungen) festgestellt werden (Breuninger, 2014). Zudem zeigen die Messungen der mit Hsp70 beimpften Lipidvesikel, dass der lipHsp70-ELISA und somit der cmHsp70.1-Antikörper membrangebundenes Hsp70 signifikant besser detektiert, als der ELISA von R&D-Systems. Bei weiterer Überlegung kommt allerdings die Frage auf, warum auch die Hsp70-Serumwerte des gesunden Kollektivs bei der Messung mit dem lipHsp70-ELISA signifikant höher sind, als bei der Messung mit dem ELISA

von R&D-Systems. Es konnte gezeigt werden, dass lediglich entartete Zellen und nicht die jeweiligen korrespondierenden gesunden Zellen Hsp70 auf ihrer Membran exprimieren (Multhoff et al., 1995). Einen möglichen Erklärungsansatz hierfür liefern die Beobachtungen, dass auch verschiedene gesunde Zelltypen Exosomen sezernieren, wobei diese Hsp70 in geringem Maße entweder auf ihrer Membran oder im Lumen enthalten können. Zu diesen Zelltypen zählen, wie in der Einleitung genannt, Zellen der hämatopoetischen und lymphatischen Zellreihe (Retikulozyten (Johnstone et al., 1987), B-Zellen (Raposo et al., 1996) und T-Zellen (Peters et al., 1989)), Adipozyten, Fibroblasten, intestinale Epithelzellen, Schwann-Zellen und Alveolarzellen (Record et al., 2011).

Des Weiteren wäre ein Vergleich von zwei verschiedenen Methoden mit dem gleichen Antikörper interessant gewesen. So hätte der ELISA beispielsweise mit einem Western Blot, der sich des cmHsp70.1-Antikörpers bedient, verglichen werden können. Eine mögliche Fragestellung hierbei wäre, ob sich die Serumwerte, die die jeweiligen Assays ermitteln, vergleichbar sind oder sich signifikant unterscheiden. Allerdings ist die Durchführung eines Western Blots sehr aufwendig. Die Qualität eines Western Blots hängt zudem stark von verschiedenen Variablen, wie den verwendeten Puffersystemen, den Gel- Konzentrationen und der Expertise der durchführenden Person, ab. Hierbei ist eine Optimierung dieser Variablen von Nöten.

4.2 Beurteilung des Validierungsprozesses

Laut (Andreasson et al., 2015) sollten die in Tabelle 11 ersichtlichen Parameter im Rahmen einer vollständigen Validierung einer neuen Immunoassay-Methode überprüft werden. Das genaue Vorgehen zur Überprüfung der Parameter kann dieser Arbeit entnommen werden. Vergleicht man den Validierungsprozess des lipHsp70-ELISAs mit den dort aufgeführten Parametern, so fällt auf, dass dieser, gemessen an den vorgegebenen Parametern, nicht vollständig ist. Die Robustheit wurde im Vorfeld der Arbeit im Labor von Prof. Multhoff bestimmt. Ebenso wurden die Inkubationszeiten und -temperaturen sowie die Verwendung der geeigneten Puffersysteme zur Verringerung von Matrixeffekten optimiert. Die Präzision wurde mittels der Bestimmung von Intra- und Interassay-Präzision bestimmt, indem der Variationskoeffizient betrachtet wurde. Dieser betrug für die Intraassay-Präzision zwischen

5,2 % und 8,1 % und für die Interassay-Präzision zwischen 1,0 % und 18 %, was jeweils solide Werte widerspiegelt. Allerdings wurde eine andere Methode, als bei Andreasson verwendet.

Parameter	Bedeutung
Robustheit	Eigenschaft eines Verfahrens gegenüber kleinen Änderungen (bspw. Länge der Inkubationsdauer) unbeeinflussbar zu sein.
Präzision	Übereinstimmung von verschiedenen Messergebnissen unter bestimmten Umständen (bspw. an verschiedenen Tagen)
Richtigkeit	Übereinstimmung eines Durchschnittswertes aus vielen Messungen mit einem definierten Richtwert
Messunsicherheit	Eingrenzung eines Wertebereiches, in dem der wahre Wert mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit liegt
Detektionsminimum und -maximum	Die niedrigste und höchste Konzentration des Analyts, die vom Verfahren noch verlässlich gemessen wird
Linearität	Eigenschaft eines Verfahrens, dass Proben mit Werten oberhalb des Detektionslimits verdünnt werden können und somit verlässliche Ergebnisse liefern
Parallelität	Eigenschaft des im Immunoassay verwendeten Antikörpers endogenes Analyt in der natürlichen Matrix (bspw. Serum) und exogenes Analyt (Kalibrator) in alternativer Matrix gleichermaßen binden zu können
„Recovery“	Prozentualer Anteil einer definierten, einer Probe zugegebenen Menge des Analyts, den ein Verfahren messen kann; auch „spike-and-Recovery“-Versuche genannt
Selektivität	Fähigkeit des Verfahrens den Analyten in Anwesenheit potentiell interferierender Stoffe (bspw. strukturverwandte Verbindungen) verlässlich zu messen
Stabilität der Proben	Stabilität des Analyts in der Probe unter bestimmten Bedingungen/Handlungen (bspw. wiederholtes Einfrieren und Auftauen)

Tabelle 11: Validierungsparameter eines Immunoassays. Parameter und ihre Bedeutung, die im Rahmen einer vollständigen Validierung eines Immunoassays untersucht werden sollten (Andreasson et al., 2015).

Zur Bestimmung des Detektionslimits wurde das Verfahren nach (Armbruster & Pry, 2008) verwendet, welches ein Detektionsminimum von 0,31 ng/ml ergab. Die Überprüfung der Linearität ergab beim lipHsp70 einen Bereich 0,36 ng/ml und 17,41 ng/ml. Die Bestimmung des Detektionsminimums und der Linearität erfolgte nicht nach den Methoden nach Andreasson, sondern gemäß den Standards des Clinical Laboratory Standards Institutes (CLSI). Im Bereich der Recovery zeigte der lipHsp70-ELISA eine signifikant bessere Recovery, als der zur Kontrolle verwendete ELISA von R&D-Systems. Für die Selektivität wurde bereits im Voraus gezeigt, dass der verwendete cmHsp70.1-Antikörper eine hohe Selektivität für Hsp70 zeigt und beispielsweise das stark strukturverwandte Hsc70 nicht bindet (Multhoff & Hightower, 2011). Die Stabilität des Analyts in der Probe wurde mittels Auftau- und Einfrierversuchen untersucht. Es wurden maximal drei solcher Auftau- und Einfrierzyklen durchgeführt. Hierbei zeigte sich beim lipHsp70 keine Beeinträchtigung, allerdings empfiehlt Andreasson Proben bis zu acht Zyklen zu unterziehen. Die Methode in der Arbeit von Andreasson untersucht des Weiteren auch die Lagerung bei verschiedenen Temperaturen und unterschiedliche Lagerungszeiten.

Die Richtigkeit, die Messunsicherheit und die Parallelität der Methode wurden im Zuge der Validierung des lipHsp70-ELISAs nicht beurteilt und sollten in Zukunft noch bewertet werden. Alles in allem kann man trotz der nicht untersuchten Parameter von einer solide validierten neuen Immunoassay-Methode ausgehen.

4.3 Praktikabilität des lipHsp70-ELISAs als diagnostisches Werkzeug

Mit der Entwicklung des lipHsp70-ELISAs ist es gelungen, ein relativ unanfälliges Testsystem zu entwickeln, welches für den Einsatz im klinischen Alltag prinzipiell in Frage kommt. Hierbei fällt vor allem die Unabhängigkeit gegenüber der Nüchternheit des Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme und die Unabhängigkeit gegenüber wiederholten Einfrier- und Auftauzyklen positiv ins Gewicht. Zudem scheint eine moderate Hämolyse den Assay nicht zu beeinflussen.

Die Frage, ob die Verwendung von Plasma oder Serum als gleichwertig anzusehen ist, kann nicht endgültig beantwortet werden. In den untersuchten Proben zeigte sich zwar kein signifikanter Unterschied zwischen den Hsp70- Werten in Serum oder in Plasma, allerdings ist

die Zahl der Proben, die verglichen wurden mit vier zu gering, um eine verlässliche Aussage zu dieser Fragestellung geben zu können.

Generell lässt sich sagen, dass Normbereiche mittels Perzentilenschätzung umso genauer abgeschätzt werden können, umso höher die Anzahl der Werte ist, die in die Bestimmung einfließen. In der Studie wurden Hsp70-Serumwerte von 124 gesunden Probanden bestimmt. Da die Zahl größer als 120 ist, lässt sich ein 90%iges Konfidenzintervall für die unteren und oberen Werte des Normbereichs wählen. Wäre diese Zahl kleiner, so könnte man lediglich 70%ige Konfidenzintervalle verwenden. Auch hier lassen sich die Konfidenzintervalle umso genauer abschätzen, je größer die Zahl der betrachteter Werte ist (Reed et al., 1971).

Bei der Betrachtung der Hsp70-Serumwerte des gesunden Probandenkollektivs fällt auf, dass sich die Werte von Frauen und Männern signifikant unterscheiden. Streng genommen bedeutet dies, dass für Männer und Frauen unterschiedliche Normbereiche zu berechnen sind. Allerdings ist dies bei einer Anzahl von 124 Probanden nicht möglich. Weder die Anzahl der Männer noch die der Frauen beträgt 75 Probanden. Dies ist jedoch nach Tabelle 3 aus (Reed et al., 1971) die Mindestzahl, um 70%ige Konfidenzintervalle für die unteren und oberen Grenzen des Normbereichs verwenden zu können.

Als positiver Effekt kann dagegen die Tatsache gewertet werden, dass zwischen Alter und Hsp70-Serumwert vermutlich keine Korrelation besteht. Mit dem Alter signifikant steigende oder fallende Hsp70-Serumwerte würden die Bestimmung eines Normbereiches und eines Cut-off-Wertes deutlich erschweren. Die Altersstruktur der gesunden Probanden liegt mit durchschnittlich 42,7 Jahren bei männlichen Probanden und 41,5 Jahren bei weiblichen Probanden nahe am Durchschnittsalter der deutschen Bevölkerung im Jahr 2015. Dieses lag bei Männern bei 42,5 Jahren und bei Frauen bei 45,6 Jahren (Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung, 2017).

Die statistische Bewertung des lipHsp70-ELISAs als diagnostisches Werkzeug zeigt mit einem AUC-Wert von 0,74 einen soliden Wert an, der allerdings niedriger ausfällt, als der AUC-Wert des ELISAs von R&D-Systems mit 0,82. Mit dem Youden-Index und der (0,1)-Methode zur Bestimmung optimaler Cut-off-Werte wurden zwei in der medizinischen Statistik gängige Verfahren gewählt. Vorteile dieser Verfahren sind, dass sie relativ leicht zu berechnen sind und dass sie unabhängig von der Prävalenz einer Erkrankung sind (Kelly, Dunstan, Lloyd, & Fone, 2008). Ein Nachteil dieser Verfahren besteht in der Tatsache, dass sie die Intention des Testes vernachlässigen. Der Youden-Index berechnet lediglich die größte Summe aus

Sensitivität und Spezifität. Die (0,1)-Methode definiert den Punkt, der dem perfekten Test am nächsten liegt. Es sollte allerdings immer die Intention des Testes beachtet werden. Ein laborchemischer Suchtest beispielsweise bedarf einer hohen Sensitivität, d.h. dass primär alle möglicherweise Erkrankten vom Test erkannt werden. Dabei wird eine relativ hohe Rate an Falsch-Positiven in Kauf genommen. Bei einem laborchemischen Bestätigungstest dagegen sollte eine möglichst hohe Spezifität angestrebt werden, so dass die Rate der Falsch-Negativen niedrig ist. Dies verhindert, dass Erkrankte vom Test als gesund eingestuft werden und somit eine falsche Diagnose gestellt wird. Ein guter Screening-Test sollte eine hohe Spezifität und Sensitivität haben, um verlässlich mittels eines Testes zwischen gesund und krank unterscheiden zu können.

Die in dieser Arbeit erstellten ROC-Kurven beziehen sich lediglich auf Patienten mit kolorektalem Karzinom. Andere Krebserkrankungen wurden im Zuge dieser Arbeit nicht untersucht, können jedoch aus der Arbeit von (Breuninger, 2014) entnommen werden. Betrachtet man die Cut-off-Werte, die berechnet wurden und vergleicht sie mit dem Normbereich des gesunden Probandenkollektivs, so fällt auf, dass der Cut-off-Wert deutlich unterhalb des Grenzwertes für den oberen Normwert fällt. Ein Erklärungsansatz hierfür könnte sein, dass die Probanden-/Patientenzahl beider Versuchsreihen erhöht werden muss, um statistisch verlässlichere Werte zu erhalten. Zudem wurden erhöhte Hsp70-Serumwerte nicht nur für Krebserkrankungen beschrieben (Ciocca & Calderwood, 2005), sondern auch für verschiedene andere physiologische und pathologische Zustände, welche auch in einem Kollektiv aus gesunden Probanden vorkommen können. So konnten gezeigt werden, dass das Maß arterieller Kalzifikation mit erhöhten Hsp70-Serumwerten einhergeht (Krepuska et al., 2011) oder dass die Schwere einer Asthmaerkrankung mit der Höhe des Hsp70 im Serum vergesellschaftet ist (Hou et al., 2011). Zudem bestehen Hinweise, dass Menschen, die häufig Handys benutzen, höhere Hsp70-Serumwerte aufweisen, als Menschen, die dieses selten nutzen (Balakrishnan et al., 2014). Dies zeigt, dass der lipHsp70-ELISA ein geringes Potential besitzt, als alleiniger Screeningwert in der Onkologie genutzt zu werden, da Hsp70-Serumerhöhungen nicht spezifisch für Tumorerkrankungen sind. Allerdings bietet der Hsp70-Serumwert ein großes diagnostisches Potential, welches im nächsten Kapitel ersichtlich wird.

4.4 Ausblick und Einordnung der Arbeit

Der Bereich der „liquid“-Tumorbiomarker ist ein Forschungsgebiet, das sich in den letzten Jahren schnell entwickelt hat. Die Vorteile eines Biomarkers z.B. aus dem Blut sind offensichtlich. Im Gegensatz zu einer Tumorbiopsie, die zwar bei der Diagnosefindung einer Tumorerkrankung fast immer den Goldstandard darstellt, handelt es sich bei der Bestimmung von Biomarkern aus dem Blut um ein minimal-invasives Verfahren. Hierfür wird lediglich eine Blutprobe oder eine Probe anderer Körperflüssigkeiten, wie beispielsweise Urin, benötigt. Wie das Beispiel des Prostata-spezifischen-Antigens (PSA) zeigt, werden Tumorbiomarker schon seit längerer Zeit in der Praxis eingesetzt (Schroder et al., 2014).

Viele Forschungsergebnisse legen nahe, dass der Hsp70-Serumwert als Tumorbiomarker verwendet werden könnte. Das zeigen beispielsweise Ergebnisse von Patienten mit Pankreaskarzinomen (Dutta et al., 2012), mit Brustkrebs (Gunaldi, Afsar, et al., 2015) oder mit kolorektalem Karzinom (Gunaldi, Kocoglu, et al., 2015). Bestimmung von Hsp70 im Serum ergibt deshalb Sinn, da Zusammenhänge zwischen der Höhe des Hsp70-Serumwertes und der Aggressivität des Tumors bestehen.

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass bei Plattenepithelkarzinomen das Maß der Expression von Hsp70 auf der Zellmembran mit der Höhe des Hsp70-Serumwertes korreliert (Gehrmann et al., 2014). Dies ist von Bedeutung, da Patienten mit Hsp70-membranpositiven Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region eine geringere Überlebensrate aufweisen, als Patienten mit der Hsp70-membrannegativen Art des gleichen Tumors (Pfister et al., 2007). Darüber hinaus zeigen aktuelle Daten, dass beispielsweise bei Patienten, die an kolorektalen Karzinomen erkrankt sind, hohe Hsp70-Serumwerte mit einer höheren Mortalität einhergehen (Jubran et al., 2017). Dies wirft die Frage auf, ob der Hsp70-Serumwert bei bestimmten Tumorentitäten als prognostischer Marker dienen kann.

Bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region (Gehrmann et al., 2014) und mit „Non-small cell lung-cancer“ (NSCLC) (Gunther et al., 2015) sowie bei Mäusen mit dem Hsp70-membranpositiven FaDu-Plattenepithelkarzinom (Bayer et al., 2014) konnte eine Korrelation zwischen Tumorumfang und Hsp70-Serumwert festgestellt werden. Auch die daraus entstehende Frage, ob die Therapie und die damit verbundene Reduktion des Tumorumfanges zu einer Abnahme des Hsp70-Serumwertes führen, konnte positiv beantwortet werden. So nahmen die Hsp70-Serumwerte von Patienten mit

Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region nach Operation und adjuvanter Strahlentherapie ab und näherten sich den Werten des gesunden Kontrollkollektivs an (Gehrmann et al., 2014). Identische Ergebnisse zeigten sich auch nach Bestrahlung tumor erkrankter Mäuse (Bayer et al., 2014). Damit könnte der Hsp70-Serumwert auch als prädiktiver Marker für den Erfolg einer onkologischen Therapie fungieren.

Um Hsp70 als validen Tumorbiomarker etablieren zu können, müssen jedoch bei den verschiedenen Tumorentitäten weitere Studien mit größeren Fallzahlen vorgenommen werden.

Neben diagnostischen Möglichkeiten scheint Hsp70 auch in der Therapie von Tumorerkrankungen ein großes Potential zu bieten. Aktuell versucht man durch drei verschiedenen Wirkstoffgruppen mit Hsp70 zu interagieren – den Hsp70-Inhibitoren, den Protein-Aptameren (einsträngige RNA-/DNA-Oligonukleotide, die durch ihre dreidimensionale Struktur bestimmte Proteine binden können) und Antikörpern. Hierbei scheint die Therapie mittels Antikörper die potenteste und vielversprechendste Möglichkeit darzustellen (Chatterjee & Burns, 2017). Der in dem lipHsp70-ELISA verwendete cmHsp70.1-Antikörper konnte bei Mäusen mit kolorektalen Karzinomen das Tumolvolumen signifikant reduzieren. Diese Reduktion verbesserte zudem die Überlebensrate der behandelten Mäuse um 20 % (Stangl, Gehrmann, Riegger, et al., 2011). Ein weiterer Therapieansatz verfolgt das Ziel, membrangebundenes Hsp70 auf Tumorzellen in Patienten mit metastasierten kolorektalen und nicht-kleinzelligen Lungen-Karzinomen (NSCLC) im Rahmen einer Phase-I-Studie mit autologen NK-Zellen zu behandeln. Diese wurden außerhalb des Körpers (ex vivo) gegen Membran-Hsp70 stimuliert. Die ex vivo-Stimulation der Patientenlymphozyten erfolgte mit dem Hsp70-Peptid TKD und dem pro-inflammatorischen Zytokin Interleukin-2. Nach Stimulation erhöht sich die zytotoxische und migratorische Aktivität von NK-Zellen gegenüber Hsp70-membranpositiven Tumoren (Krause et al., 2004). Momentan wird diese Behandlungsmöglichkeit in einer randomisierten klinischen Phase-II-Studie hinsichtlich ihrer Wirksamkeit bei Patienten mit NSCLC nach Radiochemotherapie bewertet (Specht et al., 2015).

5 Zusammenfassung

Krebserkrankungen stellen eine enorme Herausforderung für Erkrankte und für die Gesellschaft dar. Tumorerkrankungen stellten im Jahr 2015 nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache (Statistisches Bundesamt, 2017). Als ideale Tumorbiomarker eignen sich von Krebszellen vermehrt produzierte Stoffe, die in Körperflüssigkeiten gemessen werden können. Sie werden in der Medizin schon seit geraumer Zeit für Diagnostik, Monitoring von Therapien und Verlaufskontrollen benutzt und nehmen mehr und mehr an Bedeutung zu.

Die erstmal 1962 beschriebenen Hitzeschockproteine sind eine heterogene Gruppe an hochkonservierten Proteinen, welche nach Stress vermehrt exprimiert werden. Sie erfüllen eine hohe Anzahl an wichtigen Funktionen in der Proteinhomöostase (Lindquist & Craig, 1988). Die nach ihrem Molekulargewicht bezeichnete Hsp70-Familie besteht insgesamt aus mindestens 13 Vertretern, wobei die durch Stress induzierbaren Formen HSPA 1A und HSPA 1B bislang am besten charakterisiert sind (Kampinga et al., 2009). Es konnte gezeigt werden, dass Hsp70 nicht nur in Zellen vorkommt, sondern auch extrazellulär (De Maio, 2011). Besonders interessant ist hierbei die Tatsache, dass Hsp70 auf der Zellmembran von Krebszellen nachgewiesen werden konnte (Multhoff et al., 1995). Experimentelle Daten legen nahe, dass Krebszellen aktiv Mikrolipidvesikel (z.B. Esosomen), welche Hsp70 auf ihrer Membran tragen, ins extrazelluläre Milieu sezernieren (Gastpar et al., 2005; Vega et al., 2008). Deshalb könnte der Hsp70-Serumwert Auskunft über die vitale Tumormasse geben.

Erhöhte Hsp70-Serumwerte konnten bei verschiedenen Krankheiten festgestellt werden (Ganter et al., 2006; Zhang et al., 2010), unter anderem auch bei verschiedenen Krebsentitäten (Azuma et al., 2003; Dutta et al., 2012). Allerdings variierten die Messergebnisse sehr stark. Ein Grund dafür könnte sein, dass die meisten ELISA-Testsysteme nicht für die Verwendung von Serum- oder Plasmaproben validiert sind (Multhoff & Hightower, 2011).

In unserer Arbeitsgruppe ist es gelungen, einen Antikörper gegen Hsp70 (cmHsp70.1) herzustellen, der sowohl freies als auch an Lipidmembranen gebundenes Hsp70 erkennen kann. Dieser Antikörper besitzt zudem eine geringe Kreuzreaktivität und ist deshalb hochspezifisch für das stressinduzierbare Hsp70 (Multhoff & Hightower, 2011). In dieser

Arbeit wurde ein ELISA zur Messung von Hsp70 in Serumproben von gesunden Probanden und Patienten mit kolorektalen Karzinomen validiert, der den cmHsp70.1-Antikörper als Detektionsantikörper nutzt.

Die Validierung zeigte, dass der lipHsp70-ELISA ein verlässliches System darstellt, welches beispielsweise in „Spike-and-Recovery“-Versuchen signifikant bessere Ergebnisse lieferte, als der zur Kontrolle verwendete kommerzielle ELISA von R&D-Systems. Ebenso detektiert der lipHsp70-ELISA signifikant besser liposomal gebundenes Hsp70, als der ELISA von R&D-Systems. Es zeigte sich zudem, dass der lipHsp70-ELISA gegenüber potentiellen Störfaktoren (Hämolyse, Lagerung der Proben, Nüchternheit des Patienten) robuster ist.

Bei 124 untersuchten Proben von gesunden Probanden zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Hsp70-Serumwerte in Probanden in unterschiedlichen Altersgruppen. Der lipHsp70 detektierte zudem signifikant mehr Hsp70 im Serum, als der ELISA von R&D-Systems. Die statistische Bestimmung des Hsp70-Serumwertes bei Messung mit dem lipHsp70-ELISA ergab einen Normbereich von 2,56 ng/ml - 14,55 ng/ml (90 %-Konfidenzintervall der Grenzwerte: 2,07 ng/ml - 3,42 ng/ml und 12,83 ng/ml - 16,31 ng/ml).

Bei 44 Patienten mit kolorektalem Karzinom zeigten sich signifikant höhere Hsp70-Serumwerte bei Verwendung des lipHsp70-ELISAs. Erklärbar ist dies wiederum durch die Tatsache, dass der cmHsp70.1-Antikörper in der Lage ist, membrangebundenes Hsp70 auf Exosomen, die sich im Blut befinden, zu detektieren. Die Werte des gesunden Kontrollkollektivs unterschieden sich zudem signifikant von denen der an Krebs erkrankten Patienten. Bei den angefertigten ROC-Kurven zeigten sich solide AUC-Werte. Die Bestimmung des Cut-off-Wertes erfolgte mittels Youden-Index (6,307 ng/ml; Spezifität: 42,74 %; Sensitivität: 95,45 %) und 0,1-Methode (7,692 ng/ml; Spezifität: 62,1 %; Sensitivität: 70,45 %). Die Verwendung von Hsp70 als Tumormarker erscheint sinnvoll, da verschiedene Eigenschaften eines Tumors mit der Höhe des Hsp70-Serumwertes oder der Hsp70-Membranpositivität verknüpft sind. So weisen experimentelle Daten daraufhin, dass die Expressionsstärke von Hsp70 auf der Zellmembran von Tumorzellen mit der Höhe des Hsp70-Serumwertes korreliert (Gehrmann et al., 2014). Hohe Hsp70-Serumwerte scheinen zudem mit einer erhöhten Mortalität verbunden zu sein (Jubran et al., 2017). Gegenstand aktueller Forschung ist außerdem das therapeutische Potential von Hsp70. Hsp70-Inhibitoren, Protein-Aptamere und Hsp70-Antikörper werden derzeit diskutiert, um Tumorzellen sensitiver gegenüber Therapien zu machen (Chatterjee & Burns, 2017).

6 Literaturverzeichnis

- Akobeng, A. K. (2007). Understanding diagnostic tests 3: Receiver operating characteristic curves. *Acta Paediatr*, 96(5), 644-647. doi:10.1111/j.1651-2227.2006.00178.x
- Andreasson, U., Perret-Liaudet, A., van Waalwijk van Doorn, L. J., Blennow, K., Chiasserini, D., Engelborghs, S., Fladby, T., Genc, S., Kruse, N., Kuiperij, H. B., Kulic, L., Lewczuk, P., Mollenhauer, B., Mroczko, B., Parnetti, L., Vanmechelen, E., Verbeek, M. M., Winblad, B., Zetterberg, H., Koel-Simmelink, M., & Teunissen, C. E. (2015). A Practical Guide to Immunoassay Method Validation. *Front Neurol*, 6, 179. doi:10.3389/fneur.2015.00179
- Arispe, N., Doh, M., Simakova, O., Kurganov, B., & De Maio, A. (2004). Hsc70 and Hsp70 interact with phosphatidylserine on the surface of PC12 cells resulting in a decrease of viability. *FASEB J*, 18(14), 1636-1645. doi:10.1096/fj.04-2088com
- Armbruster, D. A., & Pry, T. (2008). Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev*, 29 Suppl 1, S49-52.
- Arnold-Schild, D., Hanau, D., Spehner, D., Schmid, C., Rammensee, H. G., de la Salle, H., & Schild, H. (1999). Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *J Immunol*, 162(7), 3757-3760.
- Asea, A., Kraeft, S. K., Kurt-Jones, E. A., Stevenson, M. A., Chen, L. B., Finberg, R. W., Koo, G. C., & Calderwood, S. K. (2000). HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med*, 6(4), 435-442. doi:10.1038/74697
- Azuma, K., Shichijo, S., Takedatsu, H., Komatsu, N., Sawamizu, H., & Itoh, K. (2003). Heat shock cognate protein 70 encodes antigenic epitopes recognised by HLA-B4601-restricted cytotoxic T lymphocytes from cancer patients. *Br J Cancer*, 89(6), 1079-1085. doi:10.1038/sj.bjc.6601203
- Balakrishnan, K., Murali, V., Rathika, C., Manikandan, T., Malini, R. P., Kumar, R. A., & Krishnan, M. (2014). Hsp70 is an independent stress marker among frequent users of mobile phones. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 33(4), 339-347.
- Barnes, B. B., J.; Buttman-Schweiger, N.; Fiebig, J.; Jordan, S.; Kraywinkel, K.; Niemann, H.; Nowossadeck, E.; Poethko-Müller, C.; Prütz, F.; Rattay, P.; Schönfeld, I.; Starker, A.; Wienecke, A.; Wolf, U.; Castell, S.; Deleré, Y.; Grabow, D.; Katsch, P.; Multmeier, J.; Spix, C.; Tenckhoff, B. (2016). *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*.
- Basu, S., Binder, R. J., Ramalingam, T., & Srivastava, P. K. (2001). CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity*, 14(3), 303-313.
- Bausero, M. A., Gastpar, R., Multhoff, G., & Asea, A. (2005). Alternative mechanism by which IFN-gamma enhances tumor recognition: active release of heat shock protein 72. *J Immunol*, 175(5), 2900-2912.
- Bayer, C., Liebhardt, M. E., Schmid, T. E., Trajkovic-Arsic, M., Hube, K., Specht, H. M., Schilling, D., Gehrman, M., Stangl, S., Siveke, J. T., Wilkens, J. J., & Multhoff, G. (2014). Validation of heat shock protein 70 as a tumor-specific biomarker for monitoring the outcome of radiation therapy in tumor mouse models. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 88(3), 694-700. doi:10.1016/j.ijrobp.2013.11.008
- Becker, T., Hartl, F. U., & Wieland, F. (2002). CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *J Cell Biol*, 158(7), 1277-1285.

- Bellmann, K., Jaattela, M., Wissing, D., Burkart, V., & Kolb, H. (1996). Heat shock protein hsp70 overexpression confers resistance against nitric oxide. *FEBS Lett*, *391*(1-2), 185-188.
- Bertz, J. D., S.; Haberland, J.; Kraywinkel, K.; Kurt, B.; Wolf, U. (2010). *Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland - Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010*.
- Berwin, B., Hart, J. P., Rice, S., Gass, C., Pizzo, S. V., Post, S. R., & Nicchitta, C. V. (2003). Scavenger receptor-A mediates gp96/GRP94 and calreticulin internalization by antigen-presenting cells. *EMBO J*, *22*(22), 6127-6136. doi:10.1093/emboj/cdg572
- Blachere, N. E., Li, Z., Chandawarkar, R. Y., Suto, R., Jaikaria, N. S., Basu, S., Udono, H., & Srivastava, P. K. (1997). Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *J Exp Med*, *186*(8), 1315-1322.
- Bobrie, A., Colombo, M., Raposo, G., & Thery, C. (2011). Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic*, *12*(12), 1659-1668. doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01225.x
- Botzler, C., Li, G., Issels, R. D., & Multhoff, G. (1998). Definition of extracellular localized epitopes of Hsp70 involved in an NK immune response. *Cell Stress Chaperones*, *3*(1), 6-11.
- Braun, J.; Dormann, A. (2014). *Klinikleitfaden Innere Medizin* (Vol. 12). München: Elsevier. p. 536-553
- Breuninger, S. E., J.; Knape, C.; Gunther, S.; Regel, I.; Rödel, F.; Gaipf, U.; Thorsteinsdottir, J.; Giannitrapani, L.; Dickinson, A.; Multhoff, G. (2014). Quantitative Analysis of Liposomal Heat Shock Protein 70 (Hsp70) in the Blood of Tumor Patients Using a Novel Liphsp70 ELISA. *J Clin Cell Immunol*, *5*, 264.
- Brown, D. A., & London, E. (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem*, *275*(23), 17221-17224. doi:10.1074/jbc.R000005200
- Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung. (2017). http://www.bib-demografie.de/SharedDocs/Glossareintraege/DE/D/durchschnittsalter_bevoelkerung.html. (aufgerufen am 20.10.2017).
- Calderwood, S. K., Mambula, S. S., & Gray, P. J., Jr. (2007). Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity. *Ann N Y Acad Sci*, *1113*, 28-39. doi:10.1196/annals.1391.019
- Castellino, F., Boucher, P. E., Eichelberg, K., Mayhew, M., Rothman, J. E., Houghton, A. N., & Germain, R. N. (2000). Receptor-mediated uptake of antigen/heat shock protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways. *J Exp Med*, *191*(11), 1957-1964.
- Chatterjee, S., & Burns, T. F. (2017). Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach. *Int J Mol Sci*, *18*(9). doi:10.3390/ijms18091978
- Ciocca, D. R., & Calderwood, S. K. (2005). Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones*, *10*(2), 86-103.
- Ciupitu, A. M., Petersson, M., O'Donnell, C. L., Williams, K., Jindal, S., Kiessling, R., & Welsh, R. M. (1998). Immunization with a lymphocytic choriomeningitis virus peptide mixed with heat shock protein 70 results in protective antiviral immunity and specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*, *187*(5), 685-691.
- Clayton, A., Turkes, A., Navabi, H., Mason, M. D., & Tabi, Z. (2005). Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. *J Cell Sci*, *118*(Pt 16), 3631-3638. doi:10.1242/jcs.02494
- Dahl, E., Jung, A., Fassunke, J., Hummel, M., Penzel, R., Dietmaier, W., & Lassmann, S. (2015). [Chances and risks of blood-based molecular pathological analysis of circulating tumor

- cells (CTC) and cell-free DNA (cfDNA) in personalized cancer therapy: positional paper from the study group on liquid biopsy of the working group for molecular pathology in the German Society of Pathology (DGP)]. *Pathologe*, 36(1), 92-97. doi:10.1007/s00292-014-2069-x
- Daugaard, M., Rohde, M., & Jaattela, M. (2007). The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett*, 581(19), 3702-3710. doi:10.1016/j.febslet.2007.05.039
- de Gassart, A., Geminard, C., Fevrier, B., Raposo, G., & Vidal, M. (2003). Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood*, 102(13), 4336-4344. doi:10.1182/blood-2003-03-0871
- De Maio, A. (2011). Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa. *Cell Stress Chaperones*, 16(3), 235-249. doi:10.1007/s12192-010-0236-4
- Dutta, S. K., Girotra, M., Singla, M., Dutta, A., Otis Stephen, F., Nair, P. P., & Merchant, N. B. (2012). Serum HSP70: a novel biomarker for early detection of pancreatic cancer. *Pancreas*, 41(4), 530-534. doi:10.1097/MPA.0b013e3182374ace
- Evdonin, A. L., Martynova, M. G., Bystrova, O. A., Guzhova, I. V., Margulis, B. A., & Medvedeva, N. D. (2006). The release of Hsp70 from A431 carcinoma cells is mediated by secretory-like granules. *Eur J Cell Biol*, 85(6), 443-455. doi:10.1016/j.ejcb.2006.02.008
- Fauci, A. S. B., Eugene;Kasper, Dennis L. (2008). *Harrison's Principles of Internal Medicine* (Vol. 17): McGraw-Hill Publishing. p. 514-533
- Feige, U., & Polla, B. S. (1994). Hsp70--a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications. *Experientia*, 50(11-12), 979-986.
- Ganter, M. T., Ware, L. B., Howard, M., Roux, J., Gartland, B., Matthay, M. A., Fleshner, M., & Pittet, J. F. (2006). Extracellular heat shock protein 72 is a marker of the stress protein response in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 291(3), L354-361. doi:10.1152/ajplung.00405.2005
- Gastpar, R., Gehrman, M., Bausero, M. A., Asea, A., Gross, C., Schroeder, J. A., & Multhoff, G. (2005). Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res*, 65(12), 5238-5247. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3804
- Gehrman, M., Liebisch, G., Schmitz, G., Anderson, R., Steinem, C., De Maio, A., Pockley, G., & Multhoff, G. (2008). Tumor-specific Hsp70 plasma membrane localization is enabled by the glycosphingolipid Gb3. *PLoS One*, 3(4), e1925. doi:10.1371/journal.pone.0001925
- Gehrman, M., Marienhagen, J., Eichholtz-Wirth, H., Fritz, E., Ellwart, J., Jaattela, M., Zilch, T., & Multhoff, G. (2005). Dual function of membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70), Bag-4, and Hsp40: protection against radiation-induced effects and target structure for natural killer cells. *Cell Death Differ*, 12(1), 38-51. doi:10.1038/sj.cdd.4401510
- Gehrman, M., Specht, H. M., Bayer, C., Brandstetter, M., Chizzali, B., Duma, M., Breuninger, S., Hube, K., Lehnerer, S., van Phi, V., Sage, E., Schmid, T. E., Sedelmayr, M., Schilling, D., Sievert, W., Stangl, S., & Multhoff, G. (2014). Hsp70--a biomarker for tumor detection and monitoring of outcome of radiation therapy in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiat Oncol*, 9, 131. doi:10.1186/1748-717X-9-131

- Gross, C., Koelch, W., DeMaio, A., Arispe, N., & Multhoff, G. (2003). Cell surface-bound heat shock protein 70 (Hsp70) mediates perforin-independent apoptosis by specific binding and uptake of granzyme B. *J Biol Chem*, *278*(42), 41173-41181. doi:10.1074/jbc.M302644200
- Gunaldi, M., Afsar, C. U., Okuturlar, Y., Gedikbasi, A., Kocoglu, H., Kural, A., Akarsu, C., Gunduz, U., & Tiken, E. E. (2015). Elevated serum levels of heat shock protein 70 are associated with breast cancer. *Tohoku J Exp Med*, *236*(2), 97-102. doi:10.1620/tjem.236.97
- Gunaldi, M., Kocoglu, H., Okuturlar, Y., Gedikbasi, A., Karabulut, M., Alis, H., & Hursitoglu, M. (2015). Heat shock protein 70 is a useful marker for predicting colorectal cancer. *J BUON*, *20*(6), 1464-1470.
- Gunther, S., Ostheimer, C., Stangl, S., Specht, H. M., Mozes, P., Jesinghaus, M., Vordermark, D., Combs, S. E., Peltz, F., Jung, M. P., & Multhoff, G. (2015). Correlation of Hsp70 Serum Levels with Gross Tumor Volume and Composition of Lymphocyte Subpopulations in Patients with Squamous Cell and Adeno Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Immunol*, *6*, 556. doi:10.3389/fimmu.2015.00556
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57-70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hantschel, M., Pfister, K., Jordan, A., Scholz, R., Andreesen, R., Schmitz, G., Schmetzer, H., Hiddemann, W., & Multhoff, G. (2000). Hsp70 plasma membrane expression on primary tumor biopsy material and bone marrow of leukemic patients. *Cell Stress Chaperones*, *5*(5), 438-442.
- Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, *381*(6583), 571-579. doi:10.1038/381571a0
- Herold, G. (2013). *Innere Medizin*. Köln: Dr. med. Gerd Herold. p. 490-496
- Hirsh, M. I., Hashiguchi, N., Chen, Y., Yip, L., & Junger, W. G. (2006). Surface expression of HSP72 by LPS-stimulated neutrophils facilitates gammadeltaT cell-mediated killing. *Eur J Immunol*, *36*(3), 712-721. doi:10.1002/eji.200535422
- Horvath, I., Multhoff, G., Sonnleitner, A., & Vigh, L. (2008). Membrane-associated stress proteins: more than simply chaperones. *Biochim Biophys Acta*, *1778*(7-8), 1653-1664. doi:10.1016/j.bbamem.2008.02.012
- Hou, C., Zhao, H., Li, W., Liang, Z., Zhang, D., Liu, L., Tong, W., Cai, S. X., & Zou, F. (2011). Increased heat shock protein 70 levels in induced sputum and plasma correlate with severity of asthma patients. *Cell Stress Chaperones*, *16*(6), 663-671. doi:10.1007/s12192-011-0271-9
- Hunt, C., & Morimoto, R. I. (1985). Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *82*(19), 6455-6459.
- Hut, H. M., Kampinga, H. H., & Sibon, O. C. (2005). Hsp70 protects mitotic cells against heat-induced centrosome damage and division abnormalities. *Mol Biol Cell*, *16*(8), 3776-3785. doi:10.1091/mbc.E05-01-0038
- Ichii, S., Horii, A., Nakatsuru, S., Furuyama, J., Utsunomiya, J., & Nakamura, Y. (1992). Inactivation of both APC alleles in an early stage of colon adenomas in a patient with familial adenomatous polyposis (FAP). *Hum Mol Genet*, *1*(6), 387-390.
- Johnstone, R. M. (2006). Exosomes biological significance: A concise review. *Blood Cells Mol Dis*, *36*(2), 315-321. doi:10.1016/j.bcmd.2005.12.001

- Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L., & Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*, *262*(19), 9412-9420.
- Jubran, R., Kocsis, J., Garam, N., Malati, E., Gombos, T., Barabas, L., Graf, L., Prohaszka, Z., & Fishelson, Z. (2017). Circulating mitochondrial stress 70 protein/mortalin and cytosolic Hsp70 in blood: Risk indicators in colorectal cancer. *Int J Cancer*, *141*(11), 2329-2335. doi:10.1002/ijc.30918
- Kahn, S. E., Watkins, B. F., & Bermes, E. W., Jr. (1981). An evaluation of a spectrophotometric scanning technique for measurement of plasma hemoglobin. *Ann Clin Lab Sci*, *11*(2), 126-131.
- Kampinga, H. H., Hageman, J., Vos, M. J., Kubota, H., Tanguay, R. M., Bruford, E. A., Cheetham, M. E., Chen, B., & Hightower, L. E. (2009). Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones*, *14*(1), 105-111. doi:10.1007/s12192-008-0068-7
- Kelly, M. J., Dunstan, F. D., Lloyd, K., & Fone, D. L. (2008). Evaluating cutpoints for the MHI-5 and MCS using the GHQ-12: a comparison of five different methods. *BMC Psychiatry*, *8*, 10. doi:10.1186/1471-244X-8-10
- Krause, S. W., Gastpar, R., Andreesen, R., Gross, C., Ullrich, H., Thonigs, G., Pfister, K., & Multhoff, G. (2004). Treatment of colon and lung cancer patients with ex vivo heat shock protein 70-peptide-activated, autologous natural killer cells: a clinical phase I trial. *Clin Cancer Res*, *10*(11), 3699-3707. doi:10.1158/1078-0432.CCR-03-0683
- Krepuska, M., Szeberin, Z., Sotonyi, P., Sarkadi, H., Fehervari, M., Apor, A., Rimely, E., Prohaszka, Z., & Acsady, G. (2011). Serum level of soluble Hsp70 is associated with vascular calcification. *Cell Stress Chaperones*, *16*(3), 257-265. doi:10.1007/s12192-010-0237-3
- Leberherz-Eichinger, D., Ankersmit, H. J., Hacker, S., Hetz, H., Kimberger, O., Schmidt, E. M., Reiter, T., Horl, W. H., Haas, M., Krenn, C. G., & Roth, G. A. (2012). HSP27 and HSP70 serum and urine levels in patients suffering from chronic kidney disease. *Clin Chim Acta*, *413*(1-2), 282-286. doi:10.1016/j.cca.2011.10.010
- Lehner, T., Wang, Y., Whittall, T., McGowan, E., Kelly, C. G., & Singh, M. (2004). Functional domains of HSP70 stimulate generation of cytokines and chemokines, maturation of dendritic cells and adjuvanticity. *Biochem Soc Trans*, *32*(Pt 4), 629-632. doi:10.1042/BST0320629
- Lindquist, S., & Craig, E. A. (1988). The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet*, *22*, 631-677. doi:10.1146/annurev.ge.22.120188.003215
- Luengo-Fernandez, R., Leal, J., Gray, A., & Sullivan, R. (2013). Economic burden of cancer across the European Union: a population-based cost analysis. *Lancet Oncol*, *14*(12), 1165-1174. doi:10.1016/S1470-2045(13)70442-X
- Mambula, S. S., & Calderwood, S. K. (2006). Heat shock protein 70 is secreted from tumor cells by a nonclassical pathway involving lysosomal endosomes. *J Immunol*, *177*(11), 7849-7857.
- Marber, M. S., Mestril, R., Chi, S. H., Sayen, M. R., Yellon, D. M., & Dillmann, W. H. (1995). Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J Clin Invest*, *95*(4), 1446-1456. doi:10.1172/JCI117815
- Multhoff, G., Botzler, C., Jennen, L., Schmidt, J., Ellwart, J., & Issels, R. (1997). Heat shock protein 72 on tumor cells: a recognition structure for natural killer cells. *J Immunol*, *158*(9), 4341-4350.

- Multhoff, G., Botzler, C., Wiesnet, M., Muller, E., Meier, T., Wilmanns, W., & Issels, R. D. (1995). A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *Int J Cancer*, *61*(2), 272-279.
- Multhoff, G., & Hightower, L. E. (2011). Distinguishing integral and receptor-bound heat shock protein 70 (Hsp70) on the cell surface by Hsp70-specific antibodies. *Cell Stress Chaperones*, *16*(3), 251-255. doi:10.1007/s12192-010-0247-1
- Multhoff, G., Mizzen, L., Winchester, C. C., Milner, C. M., Wenk, S., Eissner, G., Kampinga, H. H., Laumbacher, B., & Johnson, J. (1999). Heat shock protein 70 (Hsp70) stimulates proliferation and cytolytic activity of natural killer cells. *Exp Hematol*, *27*(11), 1627-1636.
- National Cancer Institute. (2017). What is cancer? Retrieved from <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer#drivers-of-cancer> (aufgerufen am 17.10.2017).
- Njemini, R., Demanet, C., & Mets, T. (2005). Comparison of two ELISAs for the determination of Hsp70 in serum. *J Immunol Methods*, *306*(1-2), 176-182. doi:10.1016/j.jim.2005.08.012
- Nylandsted, J., Gyrd-Hansen, M., Danielewicz, A., Fehrenbacher, N., Lademann, U., Hoyer-Hansen, M., Weber, E., Multhoff, G., Rohde, M., & Jaattela, M. (2004). Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *J Exp Med*, *200*(4), 425-435. doi:10.1084/jem.20040531
- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, *12*(4), 252-264. doi:10.1038/nrc3239
- Peters, P. J., Geuze, H. J., Van der Donk, H. A., Slot, J. W., Griffith, J. M., Stam, N. J., Clevers, H. C., & Borst, J. (1989). Molecules relevant for T cell-target cell interaction are present in cytolytic granules of human T lymphocytes. *Eur J Immunol*, *19*(8), 1469-1475. doi:10.1002/eji.1830190819
- Pfister, K., Radons, J., Busch, R., Tidball, J. G., Pfeifer, M., Freitag, L., Feldmann, H. J., Milani, V., Issels, R., & Multhoff, G. (2007). Patient survival by Hsp70 membrane phenotype: association with different routes of metastasis. *Cancer*, *110*(4), 926-935. doi:10.1002/cncr.22864
- Plumier, J. C., Ross, B. M., Currie, R. W., Angelidis, C. E., Kazlaris, H., Kollias, G., & Pagoulatos, G. N. (1995). Transgenic mice expressing the human heat shock protein 70 have improved post-ischemic myocardial recovery. *J Clin Invest*, *95*(4), 1854-1860. doi:10.1172/JCI117865
- Pockley, A. G., & Multhoff, G. (2008). Cell stress proteins in extracellular fluids: friend or foe? *Novartis Found Symp*, *291*, 86-95; discussion 96-100, 137-140.
- Pockley, A. G., Shepherd, J., & Corton, J. M. (1998). Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals. *Immunol Invest*, *27*(6), 367-377.
- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., & Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*, *183*(3), 1161-1172.
- Rassow, J. H., K.; Netzker, R.; Deutzmann, R. (2008). *Biochemie* (Vol. 2). Stuttgart: Thieme. p. 523 - 528
- Record, M., Subra, C., Silvente-Poirot, S., & Poirot, M. (2011). Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors. *Biochem Pharmacol*, *81*(10), 1171-1182. doi:10.1016/j.bcp.2011.02.011

- Reed, A. H., Henry, R. J., & Mason, W. B. (1971). Influence of statistical method used on the resulting estimate of normal range. *Clin Chem*, 17(4), 275-284.
- Ritossa, F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia*, 18(12), 571-573. doi:10.1007/BF02172188
- Schaeffer, E. L., Bassi, F., Jr., & Gattaz, W. F. (2005). Inhibition of phospholipase A2 activity reduces membrane fluidity in rat hippocampus. *J Neural Transm (Vienna)*, 112(5), 641-647. doi:10.1007/s00702-005-0301-9
- Schroder, F. H., Hugosson, J., Roobol, M. J., Tammela, T. L., Zappa, M., Nelen, V., Kwiatkowski, M., Lujan, M., Maattanen, L., Lilja, H., Denis, L. J., Recker, F., Paez, A., Bangma, C. H., Carlsson, S., Puliti, D., Villers, A., Rebillard, X., Hakama, M., Stenman, U. H., Kujala, P., Taari, K., Aus, G., Huber, A., van der Kwast, T. H., van Schaik, R. H., de Koning, H. J., Moss, S. M., Auvinen, A., & Investigators, E. (2014). Screening and prostate cancer mortality: results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up. *Lancet*, 384(9959), 2027-2035. doi:10.1016/S0140-6736(14)60525-0
- Simpson, R. J., Jensen, S. S., & Lim, J. W. (2008). Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics*, 8(19), 4083-4099. doi:10.1002/pmic.200800109
- Specht, H. M., Ahrens, N., Blankenstein, C., Duell, T., Fietkau, R., Gaigl, U. S., Gunther, C., Gunther, S., Habl, G., Hautmann, H., Hautmann, M., Huber, R. M., Molls, M., Offner, R., Rodel, C., Rodel, F., Schutz, M., Combs, S. E., & Multhoff, G. (2015). Heat Shock Protein 70 (Hsp70) Peptide Activated Natural Killer (NK) Cells for the Treatment of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) after Radiochemotherapy (RCTx) - From Preclinical Studies to a Clinical Phase II Trial. *Front Immunol*, 6, 162. doi:10.3389/fimmu.2015.00162
- Srivastava, P. K., Udono, H., Blachere, N. E., & Li, Z. (1994). Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming. *Immunogenetics*, 39(2), 93-98.
- Stangl, S., Gehrman, M., Dressel, R., Alves, F., Dullin, C., Themelis, G., Ntziachristos, V., Staeblein, E., Walch, A., Winkelmann, I., & Multhoff, G. (2011). In vivo imaging of CT26 mouse tumours by using cmHsp70.1 monoclonal antibody. *J Cell Mol Med*, 15(4), 874-887. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01067.x
- Stangl, S., Gehrman, M., Riegger, J., Kuhs, K., Riederer, I., Sievert, W., Hube, K., Mocikat, R., Dressel, R., Kremmer, E., Pockley, A. G., Friedrich, L., Vigh, L., Skerra, A., & Multhoff, G. (2011). Targeting membrane heat-shock protein 70 (Hsp70) on tumors by cmHsp70.1 antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(2), 733-738. doi:10.1073/pnas.1016065108
- Statistisches Bundesamt. (2017). *Gesundheit - Todesursachen in Deutschland*. [https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400157004.pdf? blob=publicationFile](https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400157004.pdf?blob=publicationFile) (aufgerufen am 22.10.2017).
- Takahashi, M., & Wakabayashi, K. (2004). Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. *Cancer Sci*, 95(6), 475-480.
- Tanaka, T. (2009). Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *J Carcinog*, 8, 5.
- Theriault, J. R., Adachi, H., & Calderwood, S. K. (2006). Role of scavenger receptors in the binding and internalization of heat shock protein 70. *J Immunol*, 177(12), 8604-8611.
- Thiagalingam, S., Lengauer, C., Leach, F. S., Schutte, M., Hahn, S. A., Overhauser, J., Willson, J. K., Markowitz, S., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1996). Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nat Genet*, 13(3), 343-346. doi:10.1038/ng0796-343

- Tissieres, A., Mitchell, H. K., & Tracy, U. M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol*, *84*(3), 389-398.
- Vega, V. L., Rodriguez-Silva, M., Frey, T., Gehrmann, M., Diaz, J. C., Steinem, C., Multhoff, G., Arispe, N., & De Maio, A. (2008). Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages. *J Immunol*, *180*(6), 4299-4307.
- 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. doi:10.1056/NEJM198809013190901
- Wang, R., Kovalchin, J. T., Muhlenkamp, P., & Chandawarkar, R. Y. (2006). Exogenous heat shock protein 70 binds macrophage lipid raft microdomain and stimulates phagocytosis, processing, and MHC-II presentation of antigens. *Blood*, *107*(4), 1636-1642. doi:10.1182/blood-2005-06-2559
- Wang, Y., Kelly, C. G., Singh, M., McGowan, E. G., Carrara, A. S., Bergmeier, L. A., & Lehner, T. (2002). Stimulation of Th1-polarizing cytokines, C-C chemokines, maturation of dendritic cells, and adjuvant function by the peptide binding fragment of heat shock protein 70. *J Immunol*, *169*(5), 2422-2429.
- Webber, C., Gospodarowicz, M., Sobin, L. H., Wittekind, C., Greene, F. L., Mason, M. D., Compton, C., Brierley, J., & Groome, P. A. (2014). Improving the TNM classification: findings from a 10-year continuous literature review. *Int J Cancer*, *135*(2), 371-378.
- Wissing, D., & Jaattela, M. (1996). HSP27 and HSP70 increase the survival of WEHI-S cells exposed to hyperthermia. *Int J Hyperthermia*, *12*(1), 125-138.
- Zhang, X., Xu, Z., Zhou, L., Chen, Y., He, M., Cheng, L., Hu, F. B., Tanguay, R. M., & Wu, T. (2010). Plasma levels of Hsp70 and anti-Hsp70 antibody predict risk of acute coronary syndrome. *Cell Stress Chaperones*, *15*(5), 675-686. doi:10.1007/s12192-010-0180-3

7 Danksagung

Zuerst möchte ich Frau Prof. Multhoff für ihre Geduld, ihre Expertise, ihre Ratschläge und ihre ständige Erreichbarkeit danken. Frau Prof. Multhoff ist sich nie für eine schnelle Antwort und ein offenes Ohr zu schade. Ein großes Dankeschön geht an Janina Schwarzer und Stephanie Breuninger, die mir sämtliche praktischen Fähigkeiten im Labor mit großer Geduld beigebracht haben und mich bei allen Versuchen unterstützt haben. Hierbei möchte ich zudem allen Mitarbeitern der Abteilung für Experimentelle Radioonkologie danken, die immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Zu großem Dank bin ich all denen verpflichtet, die für meine Doktorarbeit ihr Blut zur Verfügung gestellt haben. Ohne deren Bereitschaft hätte diese Arbeit nicht verwirklicht werden können.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei den wichtigsten Menschen in meinem Leben bedanken. Ohne meine Eltern, meine Brüder und vor allem ohne meine Freundin wäre dies alles nicht möglich gewesen. Ob moralischer Beistand oder Korrekturlesen, auf euch war immer Verlass.