

Frauenklinik und Poliklinik der Technischen Universität München Klinikum rechts der Isar  
(Direktorin: Univ.-Prof. Dr. M. Kiechle)

**Modellsystem zur Magnet-aktivierten Einzelzellseparation (MACS) und  
Primärkultivierung von Tumorzellen aus frischem Ovarialkarzinomgewebe und  
Fluoreszenz-aktivierte Tumorzellanalyse (FACS) mittels immunzytochemischer  
Doppelmarkierung**

Claudia Wasmeier

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. N. Harbeck
2. Univ.-Prof. Dr. M. Schmitt

Die Dissertation wurde am 21.10.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 15.01.2003 angenommen.

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Epidemiologie des primären Ovarialkarzinoms	1
1.2 Das Urokinase-Plasminogen-Aktivator-System	2
1.3 Bedeutung und Methoden der Tumorzellisolierung	8
1.3.1 Zellseparationsprinzipien	8
1.3.2 Zellseparationstechniken	10
<b>2. Zielsetzung</b>	<b>13</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>14</b>
3.1 Schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte	14
3.2 Patientengut	14
3.3 Kombiniertes mechanisch-enzymatisches Gewebeaufschluß von frischen Ovarialkarzinomen	15
3.3.1 Prinzip	15
3.3.2 Materialien	15
3.3.3 Methodik	16
3.4 Magnet-aktivierte Tumorzellisolierung (MACS)	17
3.4.1 Prinzip	17
3.4.2 Materialien	19
3.4.3 Methodik	22
3.5 Primärkultur isolierter Tumorzellen	23
3.5.1 Materialien	23
3.5.2 Methodik	24
3.6 Zellfixierung	25
3.6.1 Prinzip	25
3.6.2 Materialien	25

3.6.3	Methodik	26
3.7	Durchflußzytometrischer Tumorzellnachweis mittels immunzytochemischer Doppelfärbung (Zytokeratinmarkierung CK 8/18/19 und tumorassoziierte Proteasenanalyse am Beispiel des Urokinase-Plasminogen-Rezeptors (uPA-R))	27
3.7.1	Prinzip der Durchflußzytofluorometrie	27
3.7.2	Prinzip der Doppelmarkierung	29
3.7.3	Materialien	30
3.7.4	Methodik	32
3.8	Simultane durchflußzytometrische DNA-Analyse und Zytokeratinmarkierung an isolierten Ovarialkarzinomzellen	33
3.8.1	Prinzip	33
3.8.2	Materialien	34
3.8.3	Methodik	35
3.9	Austestung zusätzlicher Antikörper	36
3.9.1	Prinzip	36
3.9.2	Materialien	37
3.9.3	Methodik	40
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
4.1	Methodische Verbesserungen	42
4.1.1	Verbesserter Antikörpercocktail für die MACS-Technik	42
4.1.2	Optimierte Antikörperzusammenstellung für die durchflußzytometrische Doppelmarkierung (CK 8/18/19 und uPA-Rezeptor)	44
4.2	Mechanisch-enzymatischer Gewebeaufschluß	46
4.3	Magnet-aktivierte Zellsortierung	48
4.3.1	Endgültiges Standardprotokoll	48
4.3.2	Durchflußzytometrische Analyse der Zellfraktionen	50
4.4	Kultivierung der isolierten Ovarialkarzinomzellen	53
4.5	Simultane Doppelmarkierung der Ovarialkarzinomzellen am Durchflußzytofluorometer	54

4.5.1	Isolierte Ovarialkarzinomzellen aus frischem Tumorgewebe	55
4.5.2	Primärkultivierte Ovarialkarzinomzellen	57
4.6	Durchflußzytometrische DNA-Analyse an frischem Ovarialkarzinomgewebe	59
4.6.1	Vergleichende DNA-Analyse an den verschiedenen Zellfraktionen mit Hilfe von Propidiumjodid (PI)	59
4.6.2	Verbesserte DNA-Analyse an frischem Ovarialkarzinomgewebe durch simultane Markierung mit CK-Antikörpern und PI	61
4.6.3	DNA-Analyse durch Dreifach-Markierung mit PI, CK-Antikörper und uPA-Rezeptor-Antikörper	63
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>65</b>
5.1	Einzelzellgewinnung über mechanisch-enzymatischen Gewebeaufschluß	65
5.2	Magnet-aktivierte Tumorzellisolierung – Gegenüberstellung verschiedener Zellsortierungssysteme	67
5.3	Tumorzellkultivierung	71
5.4	Immunfluoreszente Tumorzellmarkierung mit Hilfe von Antikörpern gegen CK 8/18/19 und uPA-Rezeptor am Durchflußzytofluorometer	74
5.5	Immunfluoreszente DNA-Analyse an Tumorzellen mit Hilfe von PI, CK 8/18/19 und uPA-Rezeptor am Durchflußzytofluorometer	76
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>78</b>
<b>7.</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>80</b>
<b>8.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>82</b>
<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>103</b>
<b>11.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>105</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Epidemiologie des primären Ovarialkarzinoms

Das Ovarialkarzinom zählt neben dem Mammakarzinom zu der häufigsten Todesursache unter den malignen, gynäkologischen Tumoren der Frau. Seit mehreren Jahrzehnten ist eine stetige Zunahme der Inzidenz und der Mortalität des Ovarialkarzinoms zu verzeichnen (Jänicke et al. 1992, S. 2129). Der initial symptomarme Verlauf der Erkrankung bedingt häufig eine späte Diagnosestellung. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich etwa zwei Drittel der Patientinnen bereits in den fortgeschrittenen Tumorstadien FIGO III und IV. Hieraus resultiert die niedrige Fünf-Jahres-Überlebensrate zwischen 20 und 40 % (Kuhn 1998, S. 3). Die höchste Inzidenz des Ovarialkarzinoms liegt in den westlichen Ländern in der weißen Bevölkerung zwischen dem 5. und 6. Lebensjahrzehnt (Torhorst 1993, S. 850).

Individuelle Ernährungs-, Lebensgewohnheiten und Umwelteinflüsse haben Einfluß auf das Risiko, an Ovarialkarzinom zu erkranken. Infertilität, Nullparität, dauerhafte ovulatorische Zyklen und medikamentös ausgelöste Ovulationen scheinen, ebenso wie fett- und fleischreiche Nahrung, die Inzidenz von Ovarialkarzinomen zu erhöhen (Mutch et al. 1994, S. 407 u. 408). Bei 5 bis 10 % der Ovarialmalignome ist eine genetische Disposition wahrscheinlich. In diesen Fällen findet sich bei 50 % der Betroffenen eine Mutation des BRCA 1-Gens auf dem Chromosom 17, welche auch mit einem erhöhten Risiko für Mammakarzinom verbunden ist (Feunteun et al. 1996, S. 178 u. 179).

Das Ovarialkarzinom zeichnet sich durch ein sehr aggressives regionales Wachstum im intra- und retroperitonealen Raum aus. Ein rasches und vor allem radikales operatives Vorgehen ist deshalb von Nöten, um den Primärtumor und die mitbefallenen Nachbarorgane und –strukturen *in toto* zu entfernen (Jänicke et al. 1992, S. 2131). Eine sich anschließende platinhaltige Chemotherapie soll verstreute Karzinomzellen und Mikrometastasen abtöten.

Bisher wurden vor allem klinische Parameter, wie Histologie und Grading des Tumors, die Größe des Residualtumors, der retroperitoneale Lymphknotenstatus, das Lebensalter der Patientin und die präoperative Aszitesmenge für den weiteren Verlauf der bösartigen Erkrankung herangezogen. In jüngster Zeit finden aber zunehmend tumorbiologische Faktoren Eingang in die klinische Entscheidungsfindung.

So konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, daß die Zunahme der DNA-Synthese-Phase innerhalb des Zellzyklus mit der Teilungsrate der Zellen und mit der Aggressivität des malignen Geschehens korreliert (Kallioniemi et al. 1988, S. 336 u. 338; Park et al. 1988, S. 707; Kimmig et al. 1995, S. 111). In zahlreichen Studien konnte nachgewiesen werden, daß der quantitative Nachweis bestimmter Proteasen in direktem Zusammenhang mit der Invasivität und Metastasierungstendenz von bösartigen Tumoren steht (van der Burg et al. 1996, S. 476 u. 477; Pujade-Lauraine et al. 1995, S. 28 u. 29; Casslén et al. 1994, S. 1305). Barbara Schmalfeldt und Walter Kuhn stellten in ihren Arbeiten am Ovarialkarzinom, eine signifikante Erhöhung verschiedener Proteolysefaktoren in Abhängigkeit von der Tumoraggressivität fest (Schmalfeldt et al. 1995, S. 3959 u. 3960; Kuhn et al. 1994, S. 406).

**Tab. 1:** Übersicht über etablierte und tumorbiologische Prognosefaktoren beim Ovarialkarzinom

<b>Etablierte Prognosefaktoren</b>	<b>Neue, tumorbiologische Prognosefaktoren</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tumorgröße</li> <li>• Grading</li> <li>• Residualtumor</li> <li>• Lymphknotenstatus</li> <li>• Aszites</li> <li>• Lebensalter der Patientin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proliferationsfaktoren: p53, Ki 67, S-Phase</li> <li>• EGF-Onkogene: EGF-R, HER-2</li> <li>• Proteolysefaktoren: Metallo-, Serin-, Cystein-, Aspartylproteasen, und -inhibitoren</li> </ul>

Diese Zusammenschau der einzelnen, etablierten und tumorbiologischen Prognosefaktoren soll genaue Informationen über die Aggressivität des Tumors zum Zeitpunkt der Primärbehandlung, das erhöhte Risiko eines Rezidivs oder einer frühzeitigen Streuung von einzelnen Tumorzellen liefern, um eine risikoadaptierte und individualisierte Therapie einleiten zu können.

## **1.2 Das Urokinase-Plasminogen-Aktivator-System**

Proliferation, Invasion und Metastasierung sind charakteristische Eigenschaften von bösartigen Tumorzellen. Die Fähigkeit, Komponenten der Basalmembran und der extrazellulären Matrix aufzulösen, sind die Voraussetzung für die lokale Ausbreitung und die

systemische Streuung der Krebszellen. An diesen Vorgängen sind, neben Adhäsivrezeptoren, Adhärenzproteine, Steroidhormone, Wachstums- und Angiogenesefaktoren, proteolytische Enzyme maßgeblich beteiligt. Bei den Proteasesystemen unterscheidet man 4 verschiedene Familien, die alle in die proteolytische Kaskade involviert sind:

1. Serinproteasen: z.B. Plasmin, Gewebe-Typ-Plasminogen-Aktivator (tPA) und Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivator (uPA)
2. Matrixmetalloproteasen: z.B. Kollagenasen, Gelatinasen und Stromelysine
3. Cysteinproteasen: z.B. Kathepsine B und L
4. Aspartylprotease: z. B. Kathepsin D

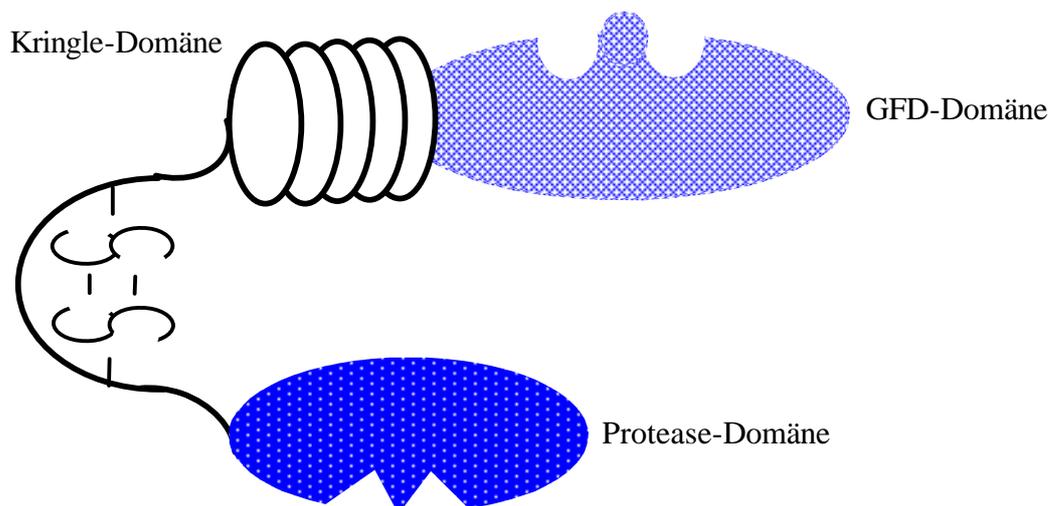
Bei der lokalen Proteolyse spielt das **Urokinase-System** eine zentrale Rolle. Nach Blasi et al. werden hierzu im engeren Sinne die Serinprotease uPA, der uPA-Rezeptor (uPA-R), Plasminogen und sein Rezeptor, und die aus der Gruppe der Serpine stammenden Inhibitoren PAI-1, PAI-2 und Plasminogen-Nexin 1 gerechnet (Blasi 1993,S.109; Blasi 1997, S. 415). Diese Faktoren finden sich nicht nur bei der Tumorzellinvasion und –infiltration, sondern auch physiologischerweise bei der Wundheilung und der Implantation von Trophoblastzellen ins Endometrium bei der Schwangerschaft (Dvorak 1986, S. 1657).

Durch die Wirkung dieser Proteasen können bei Krebserkrankungen maligne Zellen in Lymph- und Blutgefäße einbrechen und einstreuen. Die Höhe der enzymatischen Aktivität von uPA, beziehungsweise die Menge an exprimierten proteolytischen Enzymen korreliert beim Ovarialkarzinom mit der Bösartigkeit der Erkrankung, und ebenso mit der rezidivfreien und Gesamtüberlebenszeit der Patientin (Kuhn et al. 1994,s. 408; Young et al. 1994, S. 1295; Pujade-Lauraine et al. 1993, S. 28; Casslén et al. 1991, S. 1447).

Als wichtigste **Schlüsselproteine der perizellulären Proteolyse** zählen der **uPA**, sein Rezeptor und der Inhibitor PAI-1. Der uPA wurde erstmals 1966 aus Urin isoliert (White 1966, S. 233). Physiologisch kommt das 54 kD-Protein in Fibroblasten, Leukozyten, Trophoblasten, Pneumozyten, Keratinozyten und Zellen des Urogenitaltrakts vor (Schmitt et al. 1995, S. 153; Schmitt et al. 1997, S. 285 u. 286; Plesner et al. 1994, S. 837 u. 838). Die verstärkte Produktion von uPA in aggressiven Tumorzellen konnte Åstedt bei kultivierten Ovarialkarzinomzellen nachweisen (Åstedt 1976, S. 596).

Die Protease uPA wird von den Zellen zunächst als inaktives, einkettiges Enzym (pro-uPA) freigesetzt. Diese Proform besteht aus 411 Aminosäuren, die durch 12 Disulfidbrückenbindungen in ihrer räumlichen Struktur stabilisiert werden. Erst durch die proteolytische Spaltung der Peptidkette an Position 158 und 159 entsteht das aktive, zweikettige Enzym HMW-uPA (Andreasen et al. 1997, S. 3). Die Konversion von pro-uPA in HMW-uPA können neben Plasmin auch andere Proteinasen, wie Plasmakallikrein, Trypsin, Thermolysin, Faktor XIIa, „nerve growth factor- $\gamma$ “, Kathepsin B und L katalysieren (Andreasen 1997, S. 3; M. Conese, 1995, S. 144; Schmitt et al. 1997, S. 286).

Abb. 1: uPA-Molekül



Legende:



GFD-Domäne mit der uPA-Rezeptor-Bindungsregion



Protease-Domäne mit dem aktiven Zentrum



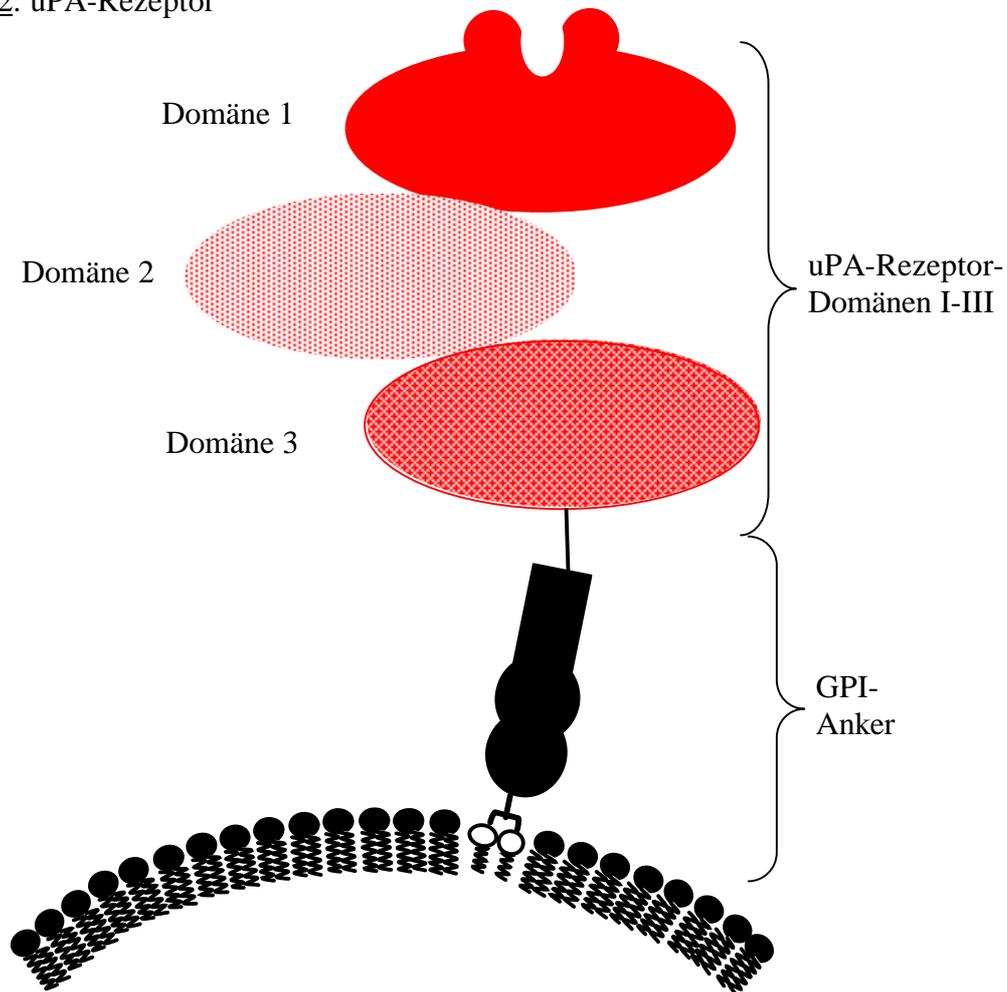
Kringle-Domäne mit Affinität zu heparinverwandten Strukturen der EZM

Der aktive uPA bildet 3 Domänen aus (Conese et al. 1995, S. 144). Der N-terminale Teil (20 kDa), gleichbedeutend mit ATF, umfaßt zwei Domänen: die GFD-Domäne, mit Ähnlichkeit mit dem epidermalen Wachstumsfaktor EGF, die im Bereich ihrer cysteinreichen

Region von Peptid 12-32 an den uPA-Rezeptor binden kann, und die Kringle-Domäne mit starker Affinität zu heparinverwandten Strukturen der Extrazellulärmatrix (Schmitt et al. 1995, S. 155; Ploug et al. 1991, S. 191; Vassalli et al. 1985, S. 89; Appella et al. 1987, S. 4438). Die dritte Domäne, LMW-uPA (**l**ow-**m**olecular-**w**eight) benannt, umfaßt die Protease-Domäne. Mit ihrem aktiven Zentrum, das durch die drei Aminosäuren His<sup>204</sup>, Asp<sup>255</sup>, Ser<sup>356</sup> definiert ist, wandelt sie das enzymatisch inaktive Plasminogen in die aktive Serinprotease Plasmin um (Schmitt et al. 1995, S. 153) (siehe Abb. 1).

Der **uPA-Rezeptor**, ein stark glykosyliertes, cysteinbeladenes und damit strukturstabiles 55 - 60 kDa-Protein wurde erstmals 1988 von Vassalli et al. und del Rosso auf peripheren leukozytären Zellen und den histiozytären Lymphomzellen U937 beschrieben (Vassalli et al. 1985, S. 89). Mittlerweile konnte der uPA-R auf vielen anderen Zellen (Monozyten, neutrophilen Leukozyten, T-Lymphozyten, Endothelzellen) und fetalen Trophoblastzellen nachgewiesen werden. B-Lymphozyten hingegen exprimieren den Rezeptor nicht. (Jardi et al. 1996, S. 1012; Xue et al. 1994, S. 4631 u. 4632; Nykjær et al. 1994, S. 507; Kanse et al. 1996, S. 349 u. 350). Die Abkürzung CD 87 ist gleichbedeutend mit dem uPA-Rezeptor (Behrendt et al. 1995, S. 271; Moller 1993, S. 296).

Der uPA-Rezeptor besteht zuerst aus einer Proteinsequenz von 313 Aminosäuren mit zusätzlichen 22 Signalproteinen. Durch Spaltungsprozesse entsteht ein Polypeptid aus drei sich wiederholenden Proteinreihen von jeweils ungefähr 90 Peptiden (Behrendt et al. 1995, S. 271). Jede dieser drei Domänen formiert eine eigene Domäne mit einer komplexen Beta-Struktur (Behrendt et al. 1995, S. 271). Für die spezifische Bindung des Liganden uPA sind die Proteine Position 1 bis 87 der Domäne I von entscheidender Bedeutung. Die Domänen II und III erhöhen die Bindungsaffinität der uPA an Domäne I (Ploug et al. 1994, S. 8994). Der Rezeptor ist über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI) an der Zellmembran gebunden (Ploug et al. 1994, S. 8995; Moller 1993, S. 295).

Abb. 2: uPA-Rezeptor

Neben der Bindung an uPA besitzt der uPA-Rezeptor eine Bindungsfähigkeit zu anderen Liganden wie VN und Integrinen. Die Anbindung dieser Moleküle an den Rezeptor wird durch pro-uPA, uPA, die A Kette von uPA und den uPA/PAI-1-Komplex gefördert, und wird durch die Bindung von PAI-1 an uPA inhibiert. (Wie et al. 1994, S. 32383). Die Ankoppelung des Liganden an den uPA-Rezeptor erzeugt Signale, welche die intrazelluläre Phosphorylierung, die Zellproliferation und andere Veränderungen in der Zelle bewirken und somit eine Signaltransduktionskaskade auslösen (Andreasen et al. 1997, S. 4 u. 7).



### 1.3 Bedeutung und Methoden der Tumorzellisolierung

Zum besseren Verständnis der Pathophysiologie von Tumoren ist es von großer Bedeutung die kleinsten Bausteine der Tumore in ihrer Struktur und Funktion zu kennen. Zu diesem Zweck verwendet man zunächst Tumorzellen aus Zellkulturlinien verschiedenster Entitäten. Die primär anhand von Zellkulturen gewonnenen Ergebnisse über die Zellbiologie und -physiologie von Tumorzellen können jedoch nicht ohne Vorbehalt auf *in vivo* Bedingungen übertragen werden. Aufgrund der fehlenden Zellheterogenität, veränderten Umgebungsfaktoren und Überangebot an Wachstumsfaktoren bestehen in der Zellkultur artifiziell veränderte Wachstumsbedingungen. Unter Normalbedingungen sind die Tumorzellen in einem Gewebeverband, bestehend aus einem Gemisch von u.a. Leukozyten, Fibroblasten und extrazellulärer Matrix, eingebettet. Daher sind durch die Zellkultur nur bedingt Rückschlüsse auf die Verhältnisse und Vorgänge in Malignomen erlaubt.

Durch die schonende Isolierung von Tumorzellen aus frischem Tumorgewebe gelingt es aber, die aus Zellkulturexperimenten erarbeiteten Ergebnisse, z.B. über Rezeptor-, Enzymexpression und Zellinteraktionen, an einem an die *in vivo* Situation angelehnten Modell zu überprüfen.

#### 1.3.1 Zellseparationsprinzipien

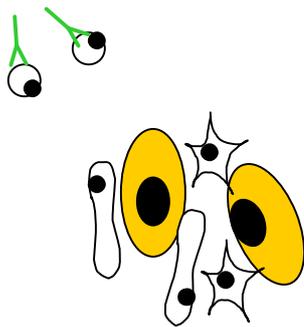
Man unterscheidet zwei verschiedene Arten von Zellseparationsprinzipien: die Positiv- und die Negativseparation. Das Konzept der Positivseparation besteht in der Markierung der gewünschten Zellen. Im Falle der Negativseparation werden alle unerwünschten Zellen markiert und aus der Fraktion eliminiert. Jedes der beiden Verfahren besitzt Vor- und Nachteile. Die Wahl der richtigen Methode sollte vom Ziel der Separation abhängig gemacht werden.

Durch die **Positivseparation** gelingt es, spezifisch an den Antikörper gebundene Zellen anzureichern, wobei der anhaftende Antikörper sich aber störend für nachfolgende Analysen auswirken kann (Voshol et al, 1993, S. 25). Ein entscheidendes Problem dieser Technik, gerade in Hinblick auf Tumorzellen, liegt in der oftmaligen Zellheterogenität dieser Zellen und dem Fehlen von spezifischen Antikörpern aufgrund der variablen Antigenexpression

innerhalb eines Primärtumors (van der Linden et al. 1992, S. 165; Durrant et al., 1989 b, S. 856; Peterson et al., 1983, S. 4292).

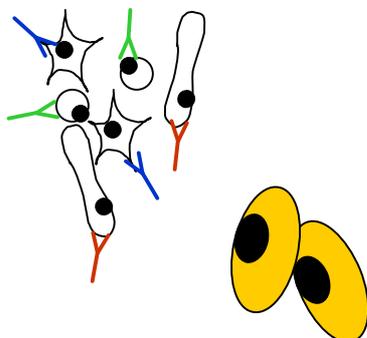
Bei der **Negativseparation** umgeht man die Problematik der Zellheterogenität, beispielsweise von Tumorzellen, und bedient sich einer Vielzahl von spezifischen Antikörpern, die gegen die Nicht-Tumorzellen gerichtet sind. Neben dem mengenmäßig großen Antikörperverbrauch können sich Kreuzreaktionen der Antikörper mit z.B. Tumorzellen störend auf die Separation auswirken. Die klare Strategie dieses Verfahrens ist es, die sehr unterschiedlichen Tumorzellen innerhalb eines Tumorgewebes in "unberührter" Form für die weitere Zellanalyse oder -kultur zu isolieren.

Abb. 4a: Positivseparation



- Vorteile:**
- hohe Spezifität
  - geringer AK-Verbrauch
- Nachteile:**
- eingeschränkte Anzahl spezifischer AK, z.B. gegen Tumorzellen
  - störender AK für nachfolgende Analysen

Abb. 4b: Negativseparation



- Vorteile:**
- Separation heterogener Zellpopulationen, z.B. Tumorzellen
  - hohe Sensitivität
- Nachteile:**
- hoher AK-Verbrauch
  - AK-Kreuzreaktionen

### 1.3.2 Zellseparationstechniken

Die verschiedenen Techniken der Tumorzellisolierung lassen sich in sechs unterschiedliche Verfahren gruppieren: die Dichtezentrifugation, die durchflußzytometrisch gesteuerte Zellsortierung, die dielektrophoretische Zellfraktionierung, die selektive Zellkultivierung, die Zellfiltration nach der ISET-Technik (isolation by size of epithelial tumor cells) und die immunomagnetisch aktivierte Zellseparation.

Die **Dichtezentrifugation** basiert im wesentlichen in der Auftrennung der Zellsuspension nach Größe und Gewicht der einzelnen Zellart. Man unterscheidet dabei grundsätzlich zwei verschiedene Gradienten, nämlich den kontinuierlichen, mit stetig ansteigender Dichte und den diskontinuierlichen (Griwatz et al., 1995, S. 255; Walle et al., 1983, S. 403; Sitar et al., 1999, S. 341). Dieses Verfahren ist besonders geeignet zur Zellgewinnung von homogenen Zellpopulationen, wie Lymphozyten oder Erythrozyten. Im Gegensatz dazu lassen sich die morphologisch sehr unterschiedlichen Tumorzellen nur ungenügend mit dieser Technik in einer Phase anreichern (Durrant, 1992, S. 60).

Bei der **durchflußzytometrischen Zellsortierung** wird jede einzelne Zelle im Durchflußzytometer hinsichtlich Größe, Granularität und gegebenenfalls Fluoreszenzverhalten analysiert und durch ein serielles Zelltrennungsverfahren mit Hilfe einer zusätzlichen Sortiervorrichtung nach den vorgegebenen Parametern sortiert (Oud et al., 1985, S. 161; Abeln et al., 1994, S. 257). Mit dieser Methode gelingt es, gleichzeitig mehrere Eigenschaften einer Zelle zu erfassen und für die Sortierung heranzuziehen. Demgegenüber steht jedoch als limitierender Faktor der apparative Aufwand und die komplexe Handhabung (Radbruch und Recktenwald, 1995, S. 271; Göttlinger et Radbruch, 1993, S. 533)

Bei der **dielektrophoretischen Zelltrennung** nützt man das elektrostatische Phänomen an der Zelloberfläche und die Schwerkraftwirkung einer Zelle aus. Beide Parameter differieren von Zellart zu Zellart. Durch Anlegen der Spannung an den Endelektroden trennen sich die Zellen entsprechend der Stärke ihres elektrostatischen Feldes und der Wirkung der Schwerkraft in bezug auf ihr Eigengewicht auf (Wang et al., 2000, S. 834; Cheng et al., 1998, S. 2322). Limitiert wird das Verfahren durch seine begrenzte Kapazität und die multiplen Störfaktoren auf das Schwerkraftfeld des Systems, wie Luftblasen und mikrobielle Kontamination (Bauer et al., 1999, S. 170).

Der Einsatz von **selektiven Kulturmedien** ermöglicht das gezielte Wachstum einer definierten Zellart. Mit Hilfe von verschiedenen Zusatzreagenzien, wie Proteinen, Wachstumsfaktoren und Toxinen, wird zum einen die Proliferation einer bestimmten Zellpopulation stimuliert und zum anderen die einer anderen unterdrückt (Ethier et al., 1993, S. 629). Bedingt durch die begrenzte Anzahl an wachstumsfördernden und -inhibierenden Substanzen kann dieses Verfahren für bestimmte Zellarten angewandt werden. Allerdings stellt der zeitliche Faktor einen deutlichen Nachteil dar.

Die **ISET-Technik** erreicht durch die Zellfiltration aus einem Zellgemisch die Einzelzellisolierung von epithelialen Tumorzellen aufgrund deren verhältnismäßig großen Volumen. Die Technik läßt sich jedoch nicht auf eine Zellsuspension, bestehend aus Zellen mit annähernd gleicher Zellgröße oder auf eine dysmorphe Tumorzellpopulation epithelialen Ursprungs, übertragen (Vona et al., 2000, S. 59).

Die **immunomagnetisch aktivierte Zellsortierung** stellt ein paralleles Verfahren dar, bei dem eine Vielzahl von Zellen gleichzeitig separiert werden kann. Es basiert im Wesentlichen auf der Separation von Zellen, die mit magnetisierbaren Partikeln markiert sind. Die Partikel können über direkt oder indirekt gekoppelte Antikörper an die Zellen andocken (Owen et Sykes, 1984 S. 43). Anwendung finden dabei zwei, sich in der Größe der Partikel unterscheidende Verfahren: Das Dynal-Verfahren und das MACS-Verfahren (Göttlinger et Radbruch, 1993, S. 531).

Das **Dynal-Verfahren** verwendet eisenhaltige Polystyrolkugeln mit einem Durchmesser von 4,4 µm (Dynabeads M-450), die an monoklonale Antikörper gekoppelt sind. Durch eine, von einem zweiseitigen Dauermagneten umgebene Vorrichtung werden die mit Dynabeads beladenen Zellen von den restlichen im Reagenzglas befindlichen Zellen sehr schnell abgetrennt (Bertoncello et al., 1991, S. 96).

Beim **MACS-Verfahren** (**M**agnetic **A**ctivated **C**ell **S**eparation), welches von der Firma Miltenyi 1990 erstmals eingeführt wurde, werden supramagnetisierbare Partikel in der Größenordnung von zellulären Makromolekülen (Durchmesser ca. 50 nm) benützt, welche direkt oder indirekt an Antikörper gebunden sind. Die Apparatur zur Zellsortierung besteht aus einer Säule gefüllt mit Stahlwolle, umgeben von einem starken Permanentmagneten. Die markierten Zellen bleiben innerhalb des magnetischen Feldes an der Stahlwolle hängen, wohingegen die unmarkierten Zellen diese ungehindert passieren. Nach Entfernung aus dem

Magnetfeld können die markierten Zellen von der entmagnetisierten Stahlwollensäule entfernt werden (Miltenyi et al., 1990, S. 233).

Die Anwendungsmöglichkeiten der immunomagnetisch aktivierten Zellsortierung sind breit gefächert, v.a. findet sie Anwendung in der Isolierung von Zellpopulationen aus dem peripheren Blut oder anderen Körperflüssigkeiten, wie Knochenmark oder Aszites (Griwatz et al., 1995, S. 256; Garau et al., 1997, S. 17; Martin et al., 1998, S. 254; von Schonfledt et al., 1999, S. 584; Boyer et al., 2000, S. 183). In diesen Körperflüssigkeiten liegen die Zellen bereits als Einzelzellen vor. Das Anwendungsfeld erstreckt sich jedoch auch auf die Einzelzellseparation aus solidem Material nach Gewebeaufschluß (Yaremko et al., 1996, S. 98; Harbeck et al., 1995, S. 1951; Carr et al., 1999, S. 163).

**Tab. 2:** Vor- und Nachteile der einzelnen Separationstechniken

<b>Separationstechnik</b>	<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
Dichtezentrifugation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schnelle Auftrennung</li> <li>• Geringer Kostenaufwand</li> <li>• Unbegrenzte Zellkapazität</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nur geeignet für homogene Zellpopulationen</li> </ul>
Durchflußzytometrische Zellsortierung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Multiparameter-Sortierung</li> <li>• Unbegrenzte Zellkapazität</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hoher Kostenaufwand</li> <li>• Hoher Zeitfaktor</li> <li>• Komplexe Handhabung</li> <li>• Hoher technischer Aufwand</li> </ul>
Dielektrophoretische Zellfraktionierung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geringer Kostenaufwand</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hoher Zeitfaktor</li> <li>• Begrenzte Zellkapazität</li> </ul>
Selektive Zellkultivierung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Isolierte Zellkultivierung</li> <li>• Gleichzeitige Zellanreicherung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hoher Zeitfaktor</li> <li>• Zellveränderung in Kultur</li> </ul>
ISET-Technik	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schnelle Auftrennung</li> <li>• Geringer techn. Aufwand</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nur geeignet für homogene Zellpopulationen</li> <li>• Keine Separation von Subzellarten möglich</li> </ul>
Immunomagnetisch aktivierte Zellseparation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schnelle Auftrennung</li> <li>• Spezifische Separation mittels AK</li> <li>• Positiv- und Negativseparation möglich</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Magnetische Interaktionen</li> <li>• Unspezif. AK-Reaktionen</li> <li>• Begrenzte Zellkapazität</li> </ul>

## 2. Zielsetzung

Ziel dieser Doktorarbeit war die Herstellung einer Einzelzellsuspension aus solidem Tumorgewebe (Ovarialkarzinomen). Aus der Zellsuspension sollten die Tumorzellen zur weiteren Primärkultivierung über eine Negativseparation mittels der MACS-Technik isoliert werden. Die Tumorzellen sollten über eine simultane Markierung von Cytokeratin 8/18/19 und dem uPA-Rezeptor am Durchflußzytofluorometer charakterisiert werden. Um das Ziel dieser Arbeit zu erreichen, wurden folgende Anforderungen an dieses Verfahren gestellt:

1. Methodische Verbesserung des kombinierten mechanisch-enzymatischen Gewebeaufschlusses zur Anwendung auf solides Ovarialkarzinomgewebe und dessen Metastasen
2. Optimierung des Antikörpercocktails zur Eliminierung aller Nichttumorzellen über Negativseparation in Anwendung der MACS-Technik
3. Gewinnung von Tumorzellen in ausreichender Anzahl und hoher Reinheit ohne Veränderung von Morphologie und Antigenexpression unter Erhalt der Lebens- und Teilungsfähigkeit der Tumorzellen
4. Tumorzellisolierung durch mechanisch-enzymatischen Aufschluß und immunmagnetisch aktivierte Tumorzellseparation unter dem Gesichtspunkt der Sterilität für die Primärkultivierung
5. Charakterisierung der Ovarialkarzinomzellen mittels simultaner Antikörpermarkierung am Durchflußzytofluorometer am Beispiel von Cytokeratin 8/18/19 und dem uPA-Rezeptor
6. Anwendung dieses Verfahrens mit geringem Zeitaufwand und einfacher technischer Handhabung

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte

- A) Herstellung einer Einzelzellsuspension aus frischem Ovarialkarzinomgewebe mit Hilfe des kombinierten mechanisch-enzymatischen Gewebeaufschlusses
- B) Immunomagnetisch aktivierte Tumorzellisolierung mittels der MACS-Technik über das Prinzip der Negativseparation
- C) Primärkultivierung der separierten Ovarialkarzinomzellen
- D) Phänotypisierung der isolierten Ovarialkarzinomzellen am Durchflußzytofluorometer über die simultane Detektion von Zytokeratin 8/18/19 und des uPA-Rezeptors mit fluoreszierenden Antikörpern

#### 3.2 Patientengut

Es wurden insgesamt 36 Ovarialkarzinome unterschiedlicher Dignität und Malignität aufgeschlossen. Bei allen Patienten erhielten wir nach Befundung durch den Pathologen ein Teilstück des operativ entnommenen Gewebes zum weiteren Aufschluß, wie in dem Schema 3.1 aufgezeigt. Die verwendeten Gewebeproben lassen sich, wie in nach folgender Tabelle dargestellt, einteilen in:

Tab. 3: Verteilungsmuster der Gewebeproben

Histologie		FIGO-Stadium			
Adeno	Muzinös	I	II	III	IV
34	2	0	10	19	7

### **3.3 Kombiniertes mechanisch-enzymatisches Gewebeaufschluß von frischen Ovarialkarzinomen**

#### **3.3.1 Prinzip**

Der erste Schritt des kombinierten **mechanisch-enzymatischen Gewebeaufschlusses** ist die mechanische Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials. Dabei wird das Tumorgewebe soweit wie möglich von umgebendem Fett- und Bindegewebe, sowie von makroskopisch sichtbaren Blutgefäßen befreit. Danach wird das Gewebe mit Skalpell und feinen Scheren zu einem homogenen Gewebebrei zerkleinert. Im zweiten Schritt des Aufschlusses werden bindegewebehaltige Zellverbände und Zellaggregationen durch Einwirkung von Enzymen gelöst. In der sich anschließenden Filtration durch feine Nylonnetze werden größere Bestandteile aus der Zellsuspension entfernt. Durch zusätzliches Waschen und Abzentrifugieren gelingt es, das Zellgemisch von Zelltrümmern zu befreien.

Bei diesem kombinierten Gewebeaufschluß ist die gründliche und feine mechanische Präparation sehr entscheidend für die anschließende enzymatische Disaggregation.

#### **3.3.2 Materialien**

RPMI + Penstrep (Penicillin + Streptomycin) – Lösung

- 495 ml steriles RPMI
- 5 ml steriles Penstrep (100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin; Boehringer-Mannheim, Deutschland)

RPMI + Penstrep + 0,005 % Kollagenase D – Lösung:

- 472,5 ml steriles RPMI
- 5,0 ml steriles Penstrep
- 2,5 ml 1%ige Kollagenase D (Boehringer-Mannheim, Deutschland)

Die gesamte Lösung von 500 ml wird mit einem 1 µm Filter sterilfiltriert.

PBS (Phosphate-buffered-saline) – Lösung:

Herstellung der Stocklösung:

- 40,0 gr NaCl
- 1,0 gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 7,2 gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
- 1,0 gr KCl

Das Salzgemisch wird in einem Volumen von 500 ml Aqua bidest. gelöst.

Herstellung der Gebrauchslösung:

- 1:10 Verdünnung der Stocklösung mit Aqua bidest.
- Einstellung mit 2 N NaOH auf pH 7,3

Die Sterilfiltration der Pufferlösung erfolgt mit Hilfe eines 1  $\mu\text{m}$  Filters.

(Reagenzien von Merck, Darmstadt, Deutschland)

Erythrozyten – Lysis – Puffer :

- 8,29 gr  $\text{NH}_4\text{Cl}$
- 1,00 gr  $\text{NaHCO}_3$
- 0,038 gr NaEDTA (Titrplex III)

Das Salzgemisch wird in einem Volumen von 1000 ml Aqua bidest. gelöst.

Der pH-Wert wird mit 2 N NaOH auf 7,2 eingestellt.

Sterilisierte Scheren, Skalpelle, Rasierklingen, chirurgische Pinzetten, Bechergläser, Glasplatten, gassterilisierte 50 ml Röhren und gassterilisierte 50 ml Röhren umspannt mit 75  $\mu\text{m}$  bzw. 40  $\mu\text{m}$  Nylonnetzen (Reichert, Chemietechnik, Heidelberg, Deutschland)

### 3.3.3 Methodik

Das operativ entnommene Tumorgewebe wird primär in einem mit steriler RPMI-Penstrep-Lösung gefüllten Becherglas auf Eis aufbewahrt. Unter Verwendung von feinen Skalpellen, Scheren, Rasierklingen und Pinzetten, werden das umgebende Fett- und Bindegewebe, sowie die makroskopisch sichtbaren Gefäßstrukturen abpräpariert. Daraufhin wird das Material in 0,2 – 0,3  $\text{cm}^3$  große Stücke zerkleinert und zu einer homogenen Suspension verarbeitet. Im

Pellet vorhandene Erythrozyten werden zuvor durch 20 ml Erythrozyten-Lysis-Puffer pro Röhrchen im 37 °C warmen Schüttelbad über 10 min lysiert. Anschließend wird die Suspension auf mehrere 50 ml Röhrchen, gefüllt mit 20 ml RPMI-Penstrep-0,005 % Kollagenase D-Lösung, verteilt und für 30 min im 37 °C warmen Schüttelbad inkubiert. Nach Abschluß der enzymatischen Desintegration wird das Zellgemisch durch ein 75 µm und im zweiten Schritt durch ein 40 µm Nylonnetz, verbunden mit einer Vakuum-Wasserpumpe, filtriert. Zwischen jedem dieser Versuchsschritte wird die Zellsuspension jeweils zweimal mit RPMI-Penstrep-Lösung gewaschen und bei 300 x g, 10 min, 4 °C, abzentrifugiert. Der Zellüberstand wird verworfen, und die Einzelzellsuspension in PBS-Lösung resuspendiert.

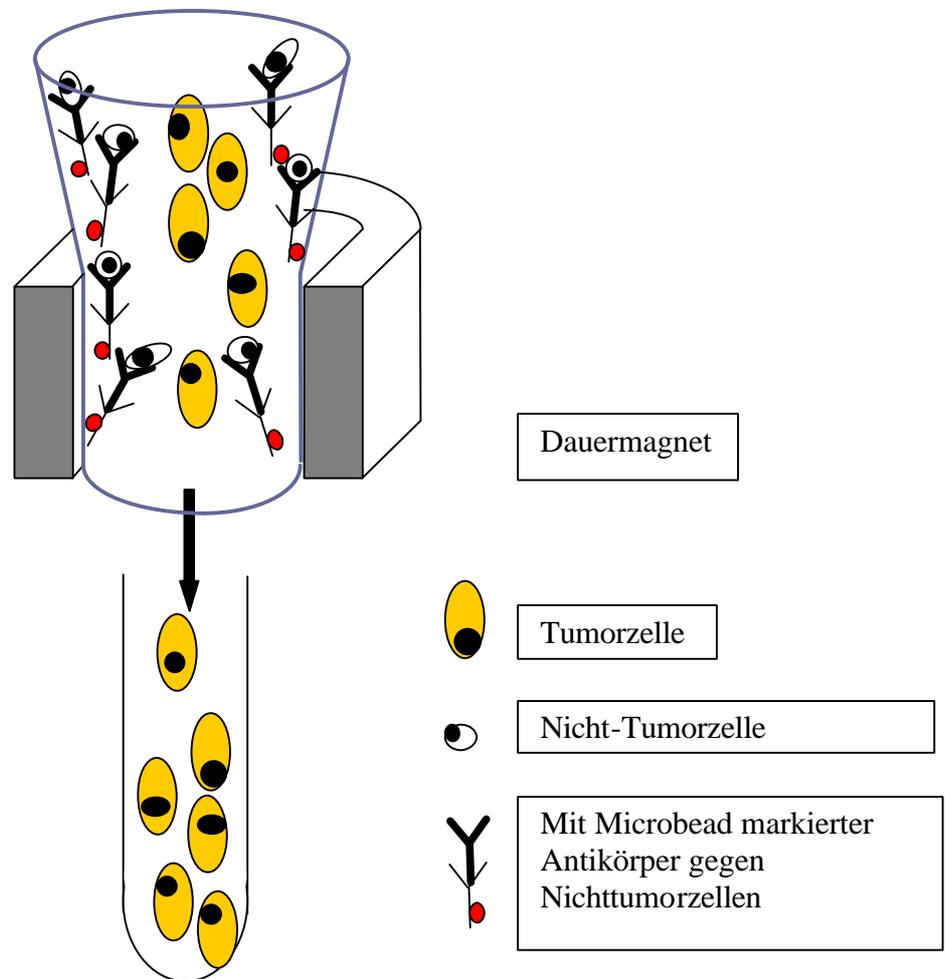
### 3.4 Magnet-aktivierte Tumorzellisolierung (MACS)

#### 3.4.1 Prinzip

Bei der **immunomagnetischen Zellsortierung mittels MACS-Technik** werden bestimmte Zellen aus heterogenen Zellgemischen mit Hilfe von Magnetpartikeln, die mit spezifischen Antikörpern behaftet sind, separiert (Fillola et al. 1996, S. 129).

Prinzipiell unterscheidet man zwei Arten von Separationsprinzipien: **die Positiv- und die Negativseparation**. In beiden Fällen werden Antikörper, die gegen zellspezifische Oberflächenantigene oder andere intrazelluläre Strukturen gerichtet sind, verwendet. Die Antikörper ihrerseits sind direkt oder indirekt an magnetische Kleinstpartikel, auch als Microbeads bezeichnet, gekoppelt (Miltenyi et al. 1990, S. 235). Im Falle der Positivseparation richten sich die verwendeten Antikörper gegen die zu isolierende Zellart. Bei der Negativseparation hingegen werden alle störenden Zellen durch den Einsatz verschiedener Antikörper aus der Zellsuspension entfernt, um eine Zellart zu isolieren (siehe Abb. 5).

Abb. 5: Immunomagnetische Zellsortierung nach dem **Prinzip der Negativseparation**



Nach Inkubation der Antikörper trägt man die Zellsuspension auf eine mit Stahlwolle gefüllte Säule auf. Die gefüllte Säule wird durch einen sie umgebenden Dauermagneten magnetisiert. Die mit Microbeads beladenen Zellen bleiben an der Magnetsäule haften. Die nicht markierten Zellen passieren die Säule ungehindert und werden am Ende aufgefangen. Die gebundenen Zellen können nach Entfernung aus der Dauermagnetvorrichtung problemlos wieder von der Säule abgelöst werden. Am Ende resultieren insgesamt drei Fraktionen: die **Kontrollfraktion** mit der Ausgangszellsuspension, die **Positivfraktion** mit den Antikörper markierten Zellen und die **Negativfraktion** mit den nicht markierten Zellen. Der

Reinheitsgrad der jeweiligen Fraktion kann durch die Wiederholung des Separationsvorganges erhöht werden. Durch die gezielte Wahl der Säulengröße und Nadelstärke gelingt es, die Kapazität und die Durchflußgeschwindigkeit des Systems für die entsprechenden Zwecke zu ändern.

### 3.4.2 Materialien

70 % Ethanol – Lösung:

- 350 ml Ethanol absolut (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 150 ml sterilfiltriertes PBS (siehe unter 3.1.2)

PBS – Lösung:

(siehe unter 3.1.2)

Aqua bidest.

PBS – Penstrep – Lösung:

- 495 ml sterilfiltriertes PBS (siehe unter 3.1.2)
- 5 ml steriles Penstrep

PBS – Penstrep – 1 % BSA (Bovines Serum Albumin) – Lösung:

- 495 ml sterilfiltriertes PBS (siehe unter 3.1.2)
- 5 ml steriles Penstrep
- 5 mg BSA (Sigma, Chemical Co., St. Louis, USA)

Das bovine Serumalbumin wird langsam aufgelöst und durch einen 1 µm Sterilfilter filtriert.

Magnetischer Zellsortierer (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland):

- Dauermagnethalterung
- 2 gassterilisierte Type C Säulen (Kapazität für  $1 \times 10^8$  Zellen)

- Sterile Depletionsnadel (Nadel Nr. 12, 22 G 1 ¼ mit durchschnittlicher Flußgeschwindigkeit von 1,5 ml/min)
- Sterile Waschnadel (Nadel Nr.1, 20 G 1 ½ mit durchschnittlicher Flußgeschwindigkeit von 6,0 ml/min)
- Steriler Dreiwegehahn
- sterile 10 ml Spritzen

Verwendete Antikörper:

(siehe Tab. 4 unter Punkt 3.4.2)

Autoklavierte Pasteurpipetten, Gummihütchen, gassterilisierte 50 ml Röhren, autoklavierte 100 ml Bechergläser und gassterilisierte 15 ml Röhren;

Für den Versuchsansatz wird jeweils PBS-Penstrep-1 % BSA-Lösung verwendet.

**Tab. 4: Verwendete Antikörper für die Magnetseparation**

**Unkonjugierte Primärantikörper**

MAb Fibroblasten Surface Protein F 4771	Monoklonale IgM	Maus Mensch	gegen	0,2 µg/µl	Sigma Immuno Chemicals, St. Louis, USA
Leucocyte CD 45	Monoklonale IgG1	Maus Mensch	gegen	0,2 µg/µl	Caltag Laboratories, San Francisco, USA
AK gegen von-Willebrand-Faktor	Monoklonale IgG1 kappa	Maus Mensch	gegen	0,2 µg/µl	DAKO, Hamburg, Germany

**Mit Magneteilchen beladene Sekundärantikörper**

Microbeads IgG	Monoklonale IgG	Ratte gegen Maus		Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Germany
Microbeads IgM	Monoklonale IgM	Ratte gegen Maus		Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Germany

### 3.4.3 Methodik

#### A) Vorbereitung der Magnetsäule

Bevor man mit der Magnetseparation beginnt, müssen die zwei mit Stahlwolle gefüllten Säulen vorbereitet werden. Dazu wird am unteren Ablauf der Säule ein Dreiwegehahn befestigt. An diesem befindet sich senkrecht nach unten eine sterile Waschnadel und am seitlichen Ausgang eine 10 ml Spritze. Mit dieser Konstruktion ist es möglich, die Säule durch den seitlichen Spritzenaufsatz in aufeinanderfolgenden Schritten vorsichtig ohne Bildung von Luftbläschen mit 70%igem Ethanol, Aqua dest., steriler PBS-Lösung, steriler PBS-Penstrep-Lösung und sterilfiltrierter PBS-Penstrep-BSA-Lösung zu waschen. Die am Ende mit PBS-Penstrep-BSA-Lösung gefüllte Säule wird nun zusammen mit dem Dreiwegehahn in die Dauermagnethalterung eingespannt. Die Waschnadel und die 10 ml Spritze verbleiben am Dreiwegehahn.

#### B) Versuchsprotokoll für die Antikörpermarkierung

Das nach zweimaligem Waschen mit sterilfiltrierter PBS-Penstrep-BSA-Lösung und anschließender Zentrifugation (300 x g, 4 °C, 10 min) verbleibende Zellpellet wird in einem Volumen von 500 µl sterilfiltrierter PBS-Penstrep-BSA-Lösung resuspendiert und nochmals in der Zählkammer gezählt. Als weiteres wird zur Zellsuspension ein Cocktail aus den Primärantikörpern gegen von-Willebrand-Faktor, MAb F4771 und CD 45 zugegeben. Dabei werden pro 10 Mio. Zellen jeweils 50 µl MAb F4771, 6 µl CD45 und 48 µl von-Willebrand-Faktor-AK benötigt. Bei einem Versuchsansatz von 20 Mio. Zellen wird die Suspension schließlich mit sterilfiltrierter PBS-Penstrep-BSA-Lösung auf ein Gesamtvolumen von 1 ml aufgefüllt. Für die Dauer der Antikörperinkubation (30 min) wird der eisgekühlte Behälter auf eine Schüttelplatte (Stufe 1) gestellt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Suspension zweimal in PBS-Penstrep-BSA-Lösung gewaschen und nachfolgend bei 300 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Im Anschluß erfolgt die Inkubation mit den mit Magnetpartikeln beladenen Zweitantikörpern. Hierzu wird das Zellpellet zunächst in 100 µl PBS-Penstrep-BSA-Lösung resuspendiert. Anschließend werden pro 10 Mio. Zellen je 120 µl Microbeads der Klasse IgG und IgM hinzugefügt. In der Endkonzentration sollen wiederum 20 Mio. Zellen in 1ml Lösung vorliegen. Nach 30 min Inkubation auf der Schüttelplatte werden die

Zellen wie zuvor zweimalig gewaschen und abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in einem Gesamtvolumen von 1 ml PBS-Penstrep-BSA-Lösung pro 20 Mio. Zellen resuspendiert. Von dieser Suspension wird eine Menge von 5 Mio. Zellen unter der Bezeichnung „Allesfraktion“ abgenommen, und jeweils zur Hälfte in 1%iger Paraformaldehydlösung (PFA) und 70%iger Ethanollösung fixiert (siehe 3.6.2).

### **C) Vorgang der immunomagnetischen Zellseparation**

Bevor mit der Zellsortierung begonnen werden kann, wird die Waschnadel gegen die feinere Depletionsnadel mit geringerer Durchflußgeschwindigkeit ausgewechselt. Die Nadelspitze mündet dabei in ein 15 ml Röhrchen. Mit Beginn des Auftragens der Zellsuspension auf die Magnetsäule wird der Dreiwegehahn längs gestellt. Die Zellen passieren nun im Flüssigkeitsstrom die Säule. Währenddessen muß stetig darauf geachtet werden, daß der Flüssigkeitspegel nicht unterhalb des Säulenniveaus absinkt. Wenn die gesamte Zellsuspension die Säule durchflossen hat, unterbricht man den Flüssigkeitsstrom durch Querstellen des Dreiwegehahns. Das Säulensystem wird anschließend gegen eine zweite vorbereitete Säule ausgetauscht. Der Sortiervorgang wird mit der Negativfraktion an einer neuen Säule wiederholt, um noch verbliebene mit Magnetbeads beladene Zellen abzufangen. Die negativseparierten Zellen werden als nächstes, zum einen für die durchflußzytometerische Analyse in Paraformaldehyd und Ethanol fixiert, und zum anderen primär-kultiviert. Die zwei aus der Magnethalterung entnommenen Säulen werden mit PBS-Penstrep-BSA-Lösung gründlich gespült, um alle anhaftenden Zellen abzulösen und als Positivfraktion für die weitere Analyse am Durchflußzytofluorometer weiter zu verarbeiten.

## **3.5 Primärkultur isolierter Tumorzellen**

### **3.5.1 Materialien**

Kulturmedium:

- 500 ml D-DMEM ( GIBCO, Karlsruhe, Deutschland)
- 125 ml 20%iges dialysiertes FKS (GIBCO, Karlsruhe, Deutschland)
- 6,2 ml 1%iges L – Glutamin

- 3,1 ml Gentamycin (50 µg/ml)

PBS – 0,05 % EDTA ( = Titriplex III ) – Lösung :

- 1,8612 gr EDTA (Merck, Deutschland)
- 100 ml PBS (siehe unter 3.1.2)

Die Lösung wird bei 4 °C gelagert.

Kulturplatten:

- 25 ml Kulturflasche
- 6 – Well – Kulturplatte

### 3.5.2 Methodik

Von der gewonnenen Negativfraktion werden 10 Mio. Zellen abpipettiert und zur Vorbereitung für die **Zellkultur** zweimal mit dem angesetzten Kulturmedium bei 37 °C gewaschen. Nach der Zentrifugation werden die Tumorzellen in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Im Anschluß entnimmt man je 100 µl (= 1 Mio. Zellen) und befüllt einzeln die sechs Vertiefungen der 6-Well-Kulturplatte. Die verbleibenden 4 Mio. Zellen werden zu gleichen Teilen in zwei 25 ml Kulturflaschen ausgesät. Danach fügt man je nach Kulturbehälter zwischen 2 bis 10 ml Nährmedium hinzu und läßt die Zellen bei 37 °C in einer 5%igen Kohlendioxid- und 95%igen Luft-Atmosphäre kultivieren (Möbus et al. 1994, S. 426). In der Anfangsphase wird das Zellwachstum lediglich beobachtet, und bei Bedarf frisches Kulturmedium zugegeben. Erst wenn die Zellen sich durch sichtbare Adhärenz an die Kulturbedingungen gewöhnt haben, kann man sie das erste Mal passagieren (Lynn et al. 1996, S. 369). Dazu werden die Zellen mit PBS-0,05 % EDTA-Lösung von dem Kulturbehälter abgelöst und mit frischem Kulturmedium bei 37 °C gewaschen und abzentrifugiert (Harbeck et al. 1993, S. 278). Anschließend werden die Zellen nach erfolgter Zellzahlbestimmung erneut in Kultur genommen. Bei jeder dieser Zellpassagen kann eine gewisse Zellmenge für spätere Kultivierungszwecke abgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren werden. Nach zirka einem Monat werden die Zellen endlich aus der Primärkultur genommen und für die weitere durchflußzytometrische Diagnostik in 70%igem Ethanol und 1%igem PFA fixiert (siehe 3.6.2).

## 3.6 Zellfixierung

### 3.6.1 Prinzip

Die Fixierung der Zellen in den unterschiedlichen Fixierungsreagenzien richtet sich nach der jeweiligen Versuchsmethode und nach den zu untersuchenden Antigenen (Clevenger et.al. 1993, S. 158). Speziell für die **Bestimmung von DNA** und der **Synthese-Phase** (S-Phase) des Zellzyklus ist es wichtig die Zellmembran für fluoreszierende Stoffe permeabel zu machen. Durch die Einwirkung von 70%igem Ethanol können die Bindungen zwischen den Phospholipidmolekülen der Doppelmembran teilweise aufgebrochen werden. Nur so gelingt es den relativ großen Fluorochromteilchen die semimembranöse Zellwand zu passieren, um sich an den Nukleus anlagern zu können (Herbert et al. 1989, S. 538).

Zum **Nachweis der Oberflächenrezeptoren** von Zellen ist es von entscheidender Bedeutung, die Zelle so wenig wie möglich zu schädigen. Die Substanz Paraformaldehyd ist zum Beispiel ein Fixierungsmittel, welches durch die Stabilisierung der intrazellulären Bindungen die Zelle in ihrer ursprünglichen Form weitgehend erhält. Durch die Ausbildung von reversiblen Methylenbrückenbindungen zwischen Amino-, Imino-, Sulfhydryl-, Hydroxylgruppen und Proteinen und durch die Reaktion der Aminogruppen mit Nucleinsäuren, sowie durch die Katalysation der Verknüpfung von DNA mit Nucleoproteinen, entstehen sogenannte „Quervernetzungen“, die das Zellgerüst konservieren (Fox et.al. 1985, S. 849). Die Reversibilität der kovalenten Bindungen verringert in der späteren Versuchsmessung am Durchflußzytofluorometer die Hintergrundfluoreszenz.

### 3.6.2 Materialien

PBS – 0,33 % BSA – 70 % Ethanol – Lösung:

- 30 ml PBS-0,33 % BSA-Lösung
- 70 ml Ethanol absolut.

Zunächst wird in einem Voransatz eine Menge von 0,33 mg BSA in 100 ml PBS (siehe 3.1.2) gelöst. Von dieser 0,33%igen BSA-PBS-Lösung werden 30 ml zu 70 ml Ethanol absolut hinzugefügt. Diese Fixierungslösung wird bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Kühlschrank gelagert.

PBS – 1% PFA– Lösung:

- 1 gr PFA
- 8 ml PBS (siehe unter 3.1.2)

Das Paraformaldehyd wird unter Zugabe von 8 ml PBS in ein 100 ml Becherglas gefüllt. Unter ständigem Rühren mit Hilfe des Magnetfisches wird das Gemisch unter dem Abzug auf 60 °C erhitzt. Zur vollständigen Auflösung des Paraformaldehyds wird tropfenweise 2 N NaOH hinzugegeben, bis sich die Trübung auflöst. Anschließend wird die Lösung zum Abkühlen von der Herdplatte genommen. Danach wird unter permanenter Kontrolle mit pH-Papier der pH-Wert der Lösung mit 1 N HCL vorsichtig auf pH 7 eingestellt. Diese PFA-Stammlösung wird schließlich mit PBS auf 100 ml aufgefüllt und bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

### 3.6.3 Methodik

#### A) Ethanolfixierung:

Die Hälfte des Zellpellets (= 10 Mio. Zellen) aus der Negativ- als auch der Positivfraktion wird jeweils unter kräftigem Resuspendieren mit Hilfe einer Pasteurpipette in 1 ml 70%igen Ethanol fixiert. Die 15 ml Röhren werden anschließend mit 70%igem Ethanol bis zu einer Verdünnung von 3 Mio. Zellen pro 1 ml aufgefüllt.

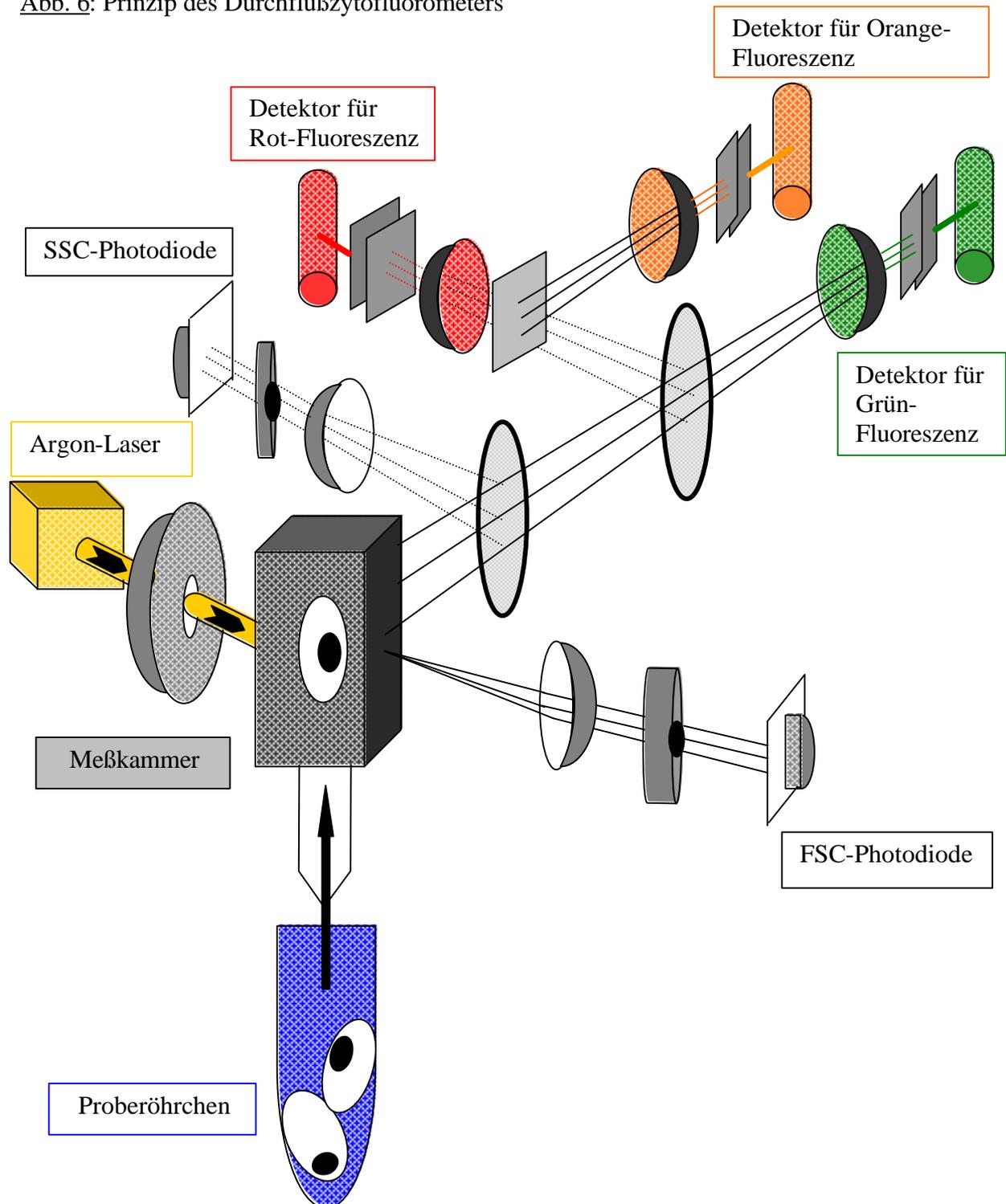
#### B) Paraformaldehydfixierung:

Die beiden anderen Hälften der zwei Zellfraktionen werden jeweils in 1%iger PFA-Lösung fixiert. Am Ende sollen in den 15 ml Röhren 3 Mio. Tumorzellen pro 1 ml PFA-Lösung vorliegen. In dieser Form lassen sich die Zellen für maximal 3 Wochen stabil bei 4 °C aufbewahren.

### 3.7 Durchflußzytometrischer Tumorzellnachweis mittels immunzytochemischer Doppelfärbung (CK und uPA-R)

#### 3.7.1 Prinzip der Durchflußzytofluormetrie

Abb. 6: Prinzip des Durchflußzytofluorometers



Das **Durchflußzytofluorometer (=FACS-Gerät)** ermöglicht die Analyse einzelner Zellen in heterogenen Zellproben unter standardisierten Bedingungen. Die Durchflußzytofluorometrie gestattet die gleichzeitige Messung von mehreren Zellparametern. Durch die Kombination von Laser (=Lichtquelle) und Photodetektoren für Streulicht und Fluoreszenz gelingt es, Aussagen über morphologische und immunologische Eigenschaften von Zellen zu erhalten (Wood 1993, S. 71). Über die Vernetzung mit einem Computer können die Daten in Form von Zahlendiagrammen, Histogrammen oder in einem Koordinatensystem als sogenannte „dot plots“ gegeneinander aufgetragen werden (Wood 1993, S. 87 u. 88). Die Voraussetzung für die Verwertbarkeit der Messung ist eine Probe aus Einzelzellen in einer Konzentration von 0,5 bis 20 Mio. Zellen/ml (Becton Dickinson, 1992, S. 4).

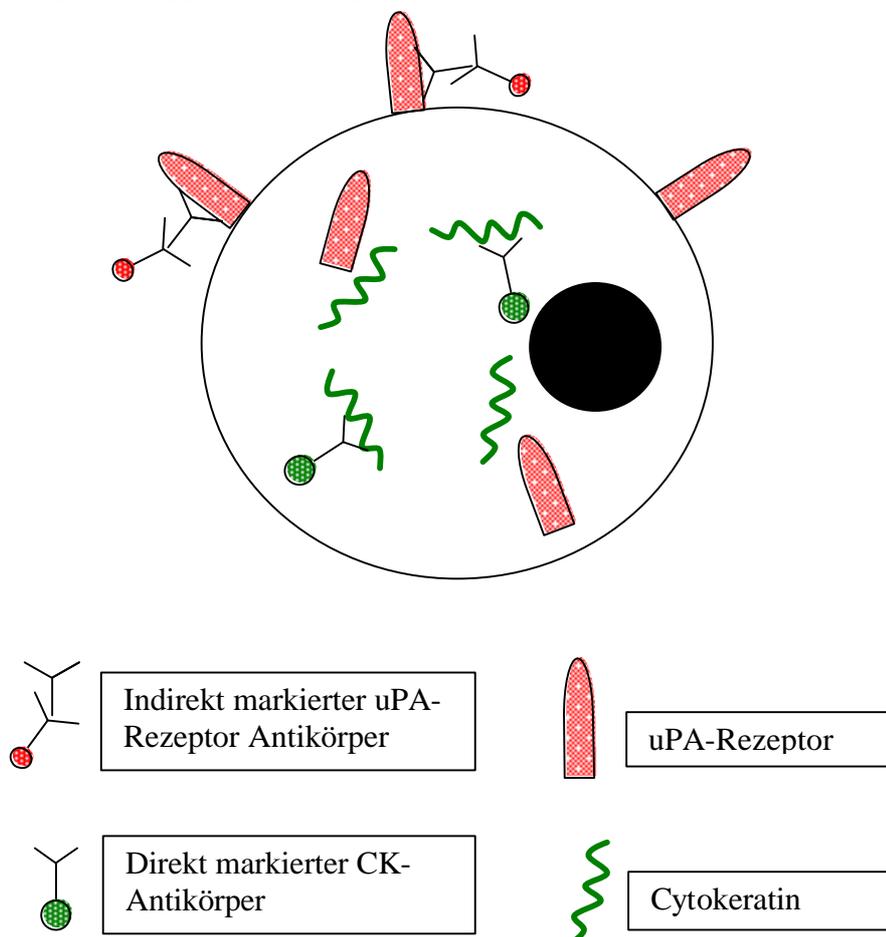
Die Zellen werden nach dem Einbringen des Proberöhrchens über eine Stahlkapillare in die Meßküvette gesogen. Durch den Flüssigkeitsstrom der Trägerlösung passieren sie nacheinander den Analysepunkt (Wood 1993, S. 71). Am Analysepunkt kreuzt der Lichtstrahl des Lasers den Flüssigkeitsstrahl in einem Winkel von 90°. Die hydrodynamische Fokussierung erlaubt nur dann eine korrekte Erfassung, Analyse und Klassifizierung der Zelle, wenn sie tatsächlich vom Lichtstrahl getroffen wird (Wood 1993, S. 72 u. 73). Das vorwärts („**forward light scatter**“ = **FSC**) und seitwärts („**side light scatter**“ = **SSC**) gestreute Licht wird von Photodetektoren gemessen. Der FSC-Detektor steht in gerader Linie zum Lichtstrahl, während der SSC-Detektor im rechten Winkel zum Laser angebracht ist. Die Signale des Vorwärtsstreulichtes geben Informationen über die Zellgröße und Zellaggregation. Durch das im rechten Winkel abgestreute Licht hingegen kann die Zelle bezüglich ihrer Granularität, Dichte und Oberflächenbeschaffenheit beurteilt werden (Wood 1993, S. 77 u. 78). Das optische Signal der Fluoreszenz, angeregt mit Hilfe eines 488 nm Argon-Lasers, wird von Photodetektoren, die ebenfalls rechtwinklig zum Laserstrahl angeordnet sind, verarbeitet (Waggoner 1993, S. 113). Drei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe haben in dem Anregungsbereich des Argon-Lasers ihr Absorptionsmaximum. Es können somit gleichzeitig die Fluoreszenzintensitäten von drei verschiedenen Fluoreszenzspektren ermittelt werden (Becton Dickinson, 1992, S. 6 u. 7). Die Intensität der Fluoreszenz ist ein Maß für die Menge an gebundenen fluoreszenzmarkierten Antikörpern (siehe Abb. 6).

Die von den Photodektoren aufgenommenen optischen Signale werden, nachdem sie um einen linearen oder logarithmischen Faktor prozessiert worden sind, über einen Analog-Digital-Wandler in digitale und computer-gerechte Signale umgewandelt (Wood 1993, S. 86). Die Pulshöhe ist analog zur Signalstärke. Von einem spezifischen Signal, vor allem in Bezug auf fluoreszenzmarkierte Antikörper, kann jedoch erst ausgegangen werden, wenn die Ergebnisse in Relation zur Hintergrundstrahlung und zur Autofluoreszenz betrachtet werden. Die Hintergrundstrahlung wird durch fluoreszierende Lösungsmittel verursacht, wohingegen die Autofluoreszenz durch natürlich fluoreszierende Zellbestandteile entsteht. Man benötigt somit stets verschiedene Kontrollproben zur Ermittlung der einzelnen Störstrahlungen.

Die Zelle kann durch diese ausführliche Beschreibung nicht nur in Hinblick auf ihre Morphologie, sondern auch bezüglich ihrer Antigenität und anderer immunologischer Charakteristika klassifiziert werden (Wood 1993, S. 87).

### 3.7.2 Prinzip der Doppelmarkierung

Abb. 7: Prinzip der Doppelmarkierung



Der simultane Einsatz von zwei fluoreszenzmarkierten Antikörpern aus verschiedenen Fluoreszenzbereichen ermöglicht die gleichzeitige Darstellung von Zelloberflächen-Antigenen und intrazellulären Strukturen bei einer Zelle. Durch diese Methode der weitergehenden Charakterisierung gelingt es, die Zelle noch genauer in ihrer Beschaffenheit und ihren Eigenschaften zu beschreiben (Wood 1993, S. 87). Die Zuordnung zu einer bestimmten Zellart oder Subpopulation wird hiermit erleichtert. Mit Hilfe von Antikörpern gegen Cytokeratin werden zytokeratinhaltige epitheliale Zellen identifiziert (Feitz 1985, S. 114). Epitheliale Ovarialkarzinomzellen reagieren mit Antikörpern gegen die intermediären Filamente Zytokeratin (CK) 8/18/19 (Moll et al. 1982, S. 14 u. 15). Die Ovarialkarzinomzellen besitzen je nach Tumorstadium den Urokinase-Rezeptor in unterschiedlicher Quantität an ihrer Zelloberfläche und im Zytoplasma (Luther et al. 1997, S. 1238). Durch die **Doppelmarkierung der Tumorzellen mit CK- und uPA-Rezeptor-Antikörper** verfügt man über die Möglichkeit, die Rezeptor-Expression bei Ovarialkarzinomzellen zu untersuchen.

### 3.7.3 Materialien

PBS – 1 % BSA – Lösung:

- 500 ml PBS (siehe unter 3.1.2)
- 5 mg BSA (Sigma, Chemical Co., St. Louis, USA)

Das bovine Serumalbumin wird langsam in PBS gelöst.

Verwendete Antikörper:

(siehe Tab. 5 unter Punkt 3.7.2)

Meßgeräte und Software:

Zur Messung wird das Durchflußzytofluorometer „FACS Calibur“ von Becton Dickenson (BD) verwendet, für die Datenanalyse das Programm „Cellquest“ von BD benutzt.

Tab 5: Verwendete Antikörper für die **Doppelmarkierung**

**Direktkonjugierte Cytokeratin-Antikörper**

CAM 5.2-FITC	Monoklonale IgG <sub>2a</sub> (H+L) -> CK 8/18/19	Maus gegen Mensch	FITC 488/520 nm	25 µg/ml	Becton Dickinson, San Jose, USA
--------------	--	-------------------	--------------------	----------	---------------------------------

**Unkonjugierte uPA-Rezeptor Antikörper**

#399 R	Polyklonale IgG -> Domäne I/II/III	Kaninchen gegen Mensch		1 µg/µl	American diagnostica, USA
--------	---------------------------------------	---------------------------	--	---------	---------------------------

**Fluorochromkonjugierte Sekundärantikörper**

IgG-PE R	IgG (H+L) F(ab') <sub>2</sub> Fragment	Esel gegen Kaninchen	R-PE 490/580 nm	0,5 mg/ml	Jackson Immuno Research Lab., West Baltimore Pike, USA
IgG-FITC	IgG (H+L) F(ab') <sub>2</sub> Fragment	Kaninchen gegen Maus	FITC 488/520 nm	1,2 mg/ml	Jackson Immuno Research Lab., West Baltimore Pike, USA

**Negativkontrollen**

IgG <sub>2a</sub>	IgG <sub>2a</sub> kappa	Maus-gegen- Glukoseoxidase (Aspergillus niger)	FITC 488/520 nm	0,2 mg/ml	DAKO, Hamburg, Germany
IgG R	IgG	Nichtimmunisiertes Kaninchen		15 mg/ml	DAKO, Hamburg, Germany

### 3.7.4 Methodik

Bevor mit dem Versuch überhaupt begonnen wird, müssen die verwendeten Zellen nach Entfernen aus dem Fixierungsreagenz zweimal in PBS-1 % BSA-Lösung gewaschen und nachträglich bei 300 x g abzentrifugiert werden. Erst jetzt kann mit der Versuchsreihe gestartet werden. Hierfür werden neun Röhrchen benötigt. Die Röhrchen werden zunächst in unterschiedlicher Weise mit PBS-1 % BSA-Pufferlösung (PL) und dem jeweiligen Antikörper gefüllt (siehe Tab. 6). Erst danach werden zu jedem Röhrchen  $2,5 \times 10^5$  der vorbereiteten Zellen hinzupipettiert. Die Proben werden anschließend für 30 min bei RT aufbewahrt. Nach Ablauf der ersten Inkubationsphase schließt sich ein zweimaliger Waschschrift in PBS-1 % BSA-Lösung mit jeweiligem Abzentrifugieren (300 x g und 4 °C für 10 min) und Abpipettieren des Überstandes an.

In der zweiten und dritten Inkubationsphase wird mit Fluorochromteilchen beladenen Antikörpern gearbeitet. Hierzu muß der Versuchsraum abgedunkelt werden. Das abzentrifugierte Zellpellet wird jeweils wieder resuspendiert. In die einzelnen Röhrchen werden erneut nacheinander Pufferlösung und Antikörper in entsprechender Menge zugegeben (siehe Tab. 6). Nach 30 min wird die Inkubation durch zweimaliges Waschen, Abzentrifugieren und Abpipettieren des Zellüberstandes beendet. Die dritte Inkubation verläuft in dem gleichen Schema.

Am Ende wird jedes einzelne Zellpellet in den verschiedenen Röhrchen in 250 µl PBS-1 % BSA-Lösung resuspendiert und bis zur Messung am Durchflußzytofluorometer in abgedunkelter Umgebung gelagert.

**Tab. 6:** Versuchsprotokoll der **simultanen Antikörperdetektion CK / uPA-Rezeptor**

Probe	1. Inkubation	2. Inkubation	3. Inkubation
1	250 µl PL	250 µl PL	250 µl PL
2	250 µl PL	6 µl IgG-PE R + 244 µl PL	250 µl PL
3	16 µl (1:30) IgG R + 234 µl PL	6 µl IgG-PE R + 244 µl PL	250 µl PL
4	80 µl (1:10) #399 R + 170 µl PL	6 µl IgG-PE R + 244 µl PL	250 µl PL
5	250 µl PL	250 µl PL	65 µl (1:20) IgG <sub>2a</sub> -FITC + 185 µl PL
6	250 µl PL	250 µl PL	25 µl CAM 5.2-FITC + 225 µl PL
7	250 µl PL	250 µl PL	50 µl (1:20) IgG-FITC R + 200 µl PL
8	80 µl (1:10) #399 R + 170 µl PL	6 µl IgG-PE R + 244 µl PL	25 µl CAM 5.2-FITC + 225 µl PL
9	80 µl (1:10) #399 R + 170 µl PL	6 µl IgG-PE R + 244 µl PL	50 µl (1:20) IgG-FITC R + 200 µl PL

### 3.8 Simultane durchflußzytometrische DNA-Analyse und Zytokeratindetektion an isolierten Ovarialkarzinomzellen

#### 3.8.1 Prinzip

Durch die **DNA-Markierung** der Einzelzellen ergibt sich in der Summe im Histogramm das Verteilungsmuster über die Zellzyklusstadien, in denen sich die einzelnen Zellen momentan befinden. Mit Hilfe der gleichzeitigen spezifischen Antikörper-Detektion einer bestimmten Zellpopulation, besteht die Möglichkeit, gezielt das Verteilungsmuster dieser Zellart darzustellen. Damit die Fluorochromteilchen für die DNA-Markierung in den Intrazellulärraum gelangen können, muß jedoch zuvor die Zellmembran durch einwirkende Reagenzien, zum Beispiel mit 70%igem Ethanol, entsprechend permeabel gemacht werden.

Um unspezifische Reaktionen mit intrazellulärer RNA zu vermeiden, wird dieses Protein vor der Anfärbung der DNA mit Hilfe eines spezifischen Enzyms (RNase) abgebaut.

Das Ziel der Messung ist es, von der Tumorzellpopulation ein möglichst präzises Histogrammbild über das Verteilungsmuster der Zellzyklusphasen herauszuarbeiten. Für die genaue Beurteilung des DNA-Histogramms bedarf es jedoch einer Vergleichszellpopulation an gesunden diploiden Zellen. Hierzu können beispielsweise humane **p**eriphere **B**lutlymphozyten (PBL) dienen. Mit Hilfe des Auswertungsprogramms ModFit LT (Verity Software House, Inc.) wird das DNA-Histogramm der Tumorzellpopulation in Relation zu jenem der PBL bewertet. Besondere Gewichtung finden dabei die Ploidie und die Verteilung der **G0/G1-, G2/M- und S-Phasefraktionen**.

### 3.8.2 Materialien

PBS – 1 % BSA – Lösung:

(siehe 3.5.2)

PBS – 5 M EDTA – Lösung:

(siehe 3.3.1)

Ficoll – Paque (Biochrom KG, Berlin, Deutschland)

Heparin–Natrium: Thrombophob–2500 (Nordmark Arzneimittel GmbH, Hamburg, Deutschland)

0,25 m RNase (58 kUnits/mg Protein)

Propidiumjodid (PI 30 mg/l in PBS bei pH 7,4)

Verwendete Antikörper:

(siehe Tab. 2 unter Punkt 3.5.2)

Humane periphere Blutlymphozyten (PBL)

(siehe Punkt 3.8.3)

15 ml Röhrchen, 45 ml Röhrchen, 15 ml FACS – Röhrchen;

### 3.8.3 Methodik

#### A) PBL-Präparation

Nachdem man das entnommene Vollblut von einem gesunden Probanden im Verhältnis 1 zu 15 heparinisiert hat, wird das Volumen mit PBS-1 % BSA-Lösung verdoppelt. Anschließend verteilt man das Blut vorsichtig auf 15 ml Röhrchen, welche zuvor mit 6 ml Ficoll-Paque gef llt wurden. Das Blut wird daraufhin bei 1200 x g und 10  C abzentrifugiert und nach 20 min langsam abgebremst. Während dieses Vorganges trennen sich die einzelnen Blutbestandteile je nach ihrem Dichtegradienten in verschiedene Schichten auf. Die PBL befinden sich am Ende in der Interphase zwischen lipo- und hydrophiler Schicht. Die milchige Interphase wird vorsichtig abpipettiert, mit PBS-1 % BSA-Lösung gewaschen, abzentrifugiert und für mindestens 24 Stunden in 70%igem Ethanol fixiert.

#### B) DNA-Messung an zytokeratinmarkierten Ovarialkarzinomzellen

Für die DNA-Messung werden die in 70%igem Ethanol fixierten Ovarialkarzinomzellen (=Negativfraktion) verwendet. Die Zellen werden zunächst wie unter Punkt 3.7.3 gewaschen und abzentrifugiert, wobei man als Pufferlösung PBS-EDTA-Lösung nimmt. Für den Versuchsansatz benötigt man dabei insgesamt zirka 1,5 Mio. Zellen. Separat davon verf hrt man in gleicher Weise mit den fixierten PBL, die als Vergleichskollektiv dienen. Die sieben Proberöhrchen werden für den ersten Inkubationsschritt, wie im Versuchsprotokoll Tab. 4 aufgezeigt, mit Pufferlösung und Antikörper gef llt. Im Anschluß gibt man pro Röhrchen je  $2,5 \times 10^5$  Zellen hinzu. Nach 30 Minuten wird die Inkubation, wie zuvor unter Punkt 3.7.3 beschrieben, durch zwei Wasch- und Zentrifugationsschritte beendet. Für die zweite Inkubation werden den Röhrchen, entsprechend dem Versuchsprotokoll Tab. 4, wiederum Pufferlösung und das Enzym RNase hinzugefügt. Der enzymatische Aufschluß wird nach 15 Minuten durch Abschrecken der Röhrchen in Eiswasser abgestoppt. Wie im

Versuchsprotokoll beschrieben, wird den einzelnen Proberöhrchen das Fluorochrom **Propidiumjodid** (PI) zugegeben. Nach 10-minütiger Einwirkzeit kann mit der Messung am Durchflußzytofluorometer begonnen werden. Der gesamte Versuch läuft dabei ab dem Zeitpunkt der PI-Zugabe im abgedunkelten Raum bei Raumtemperatur ab.

**Tab. 7: Versuchsprotokoll für Doppelmarkierung von DNA und CK**

Probe	1. Inkubation	2. Inkubation	3. Inkubation
1	250 µl PL + OVCA-Zellen	250 µl PL	250 µl PL
2	250 µl PL + OVCA-Zellen	250 µl PL	20 µl PI + 230 µl PL
3	250 µl PL + OVCA-Zellen	40 µl RNase + 210 µl PL	250 µl PL
4	250 µl PL + OVCA-Zellen	40 µl RNase + 210 µl PL	20 µl PI + 230 µl PL
5	65 µl (1:20) IgG <sub>2a</sub> -FITC + 185 µl PL + OVCA-Zellen	250 µl PL	250 µl PL
6	25 µl CAM 5.2-FITC + 225 µl PL + OVCA-Zellen	40 µl RNase + 210 µl PL	20 µl PI + 230 µl PL
7	250 µl PL + PBL-Zellen	40 µl RNase + 210 µl PL	20 µl PI + 230 µl PL

### 3.9 Austestung zusätzlicher Antikörper

#### 3.9.1 Prinzip

Zur Ausarbeitung eines geeigneten Versuchsprotokolls für die immunomagnetische Einzelzellseparation, als auch für die simultane Doppelmarkierung, bedarf es des Einsatzes von idealen „Erst- und Zweit-Antikörpern“. Die Antikörper müssen hierbei nach zweierlei Kriterien ausgewählt werden: der Spezifität und der Sensitivität. Die Wahl des richtigen Tiersystems und der richtigen Zellfixierung ist dabei mitentscheidend.

Für die MACS-Methode ist es wichtig, einen **Antikörper-Cocktail** zusammenzustellen, der möglichst das gesamte Spektrum an Nicht-Tumorzellen in der Zellsuspension abdeckt.

Im Falle der Doppelmarkierung von Tumorzellen mit Antikörpern gegen CK und uPA-Rezeptor, bzw. DNA ist es am Durchflußzytofluorometer von entscheidender Bedeutung, daß keine zusätzlichen Störfaktoren durch unspezifische Bindungen oder überlappende Fluoreszenzspektren auftreten.

Erst die Verwendung von passenden Antikörpern garantiert optimale Versuchsbedingungen und ebenso zuverlässige Meßergebnisse.

### **3.9.2 Material**

PBS – 1 % BSA – Lösung:

- 500 ml PBS (siehe unter 3.1.2)
- 5 mg BSA (Sigma, Chemical Co., St. Louis, USA)

Das bovine Serumalbumin wird langsam in PBS gelöst.

Verwendete Antikörper:

siehe Tabelle 4 (unter 3.4.2), 5 (unter 3.7.2) und 8 (unter 3.9.2)

Tab. 8: Liste der weiteren **ausgetesteten Antikörper**

**Unkonjugierte Primärantikörper gegen Nicht-Tumorzellen**

T-Cell CD 3	Monoklonale IgG1 kappa	Maus gegen Mensch	-	DAKO, Hamburg, Germany
Monocyte CD 14	Monoklonale IgG <sub>2a</sub> kappa	Maus gegen Mensch	-	DAKO, Hamburg, Germany
Granulocyte DC 15	Monoklonale IgM kappa	Maus gegen Mensch	-	DAKO, Hamburg, Germany
B-Cell CD 45 RA	Monoklonale IgG1 kappa	Maus gegen Mensch	-	DKAO, Hamburg, Germany

**Fluorochromkonjugierte Primärantikörper gegen Nicht-Tumorzellen**

Leucocyte CD 45 R-PE	Monoklonale IgG1	Maus gegen Mensch	R-PE	Caltag Laboratories, San Francisco, USA
----------------------	------------------	-------------------	------	---

**Unkonjugierte uPA-Rezeptor Antikörper**

uPAR IgG #399 R	Polyklonale IgG	Kaninchen gegen Mensch	-	American Diagnostica, USA
HU 277	Polyklonale IgG -> Domäne I/II/III	Huhn gegen Mensch	-	Klin. Forschergruppe Frauenklinik, TU München, Germany
II D 7	Monoklonale IgG -> Domäne II	Maus gegen Mensch	-	Klin. Forschergruppe Frauenklinik, TU München, Germany
III B 11	Monoklonale IgG -> Domäne II	Maus gegen Mensch	-	Klin. Forschergruppe Frauenklinik, TU München, Germany
HD 13.1	Monoklonale IgG -> Domäne II/III	Maus gegen Mensch	-	Klin. Forschergruppe Frauenklinik, TU München, Germany

**Fluorochromkonjugierte uPA-Rezeptor Antikörper**

6D7 / 3F3 FITC	Monoklonale IgG -> Domäne III	Maus gegen Mensch	FITC	Klin. Forschergruppe Frauenklinik, TU München, Germany
----------------	----------------------------------	-------------------	------	--

**Unkonjugierte Zytokeratin Antikörper**

Anti-Cytokeratin 8/18	Monoklonale IgG <sub>2a</sub>	Maus gegen Mensch	-	Medac Diagnostica, Hamburg, Germany
CAM 5.2	Monoklonale IgG <sub>2a</sub> (H+L) -> CK 8/18/19	Maus gegen Mensch	-	Becton Dickinson, San Jose, USA

### Fluorochromkonjugierte Zytokeratin Antikörper

CAM 5.2-FITC	Monoklonale IgG <sub>2a</sub> (H+L) -> CK 8/18/19	Maus gegen Mensch	-	Becton Dickinson, San Jose, USA
--------------	--	-------------------	---	---------------------------------

### Unkonjugierte EMA Antikörper

EMA	Monoklonale IgG -> EMA	Maus gegen Mensch	-	DAKO, Hamburg, Germany
-----	---------------------------	-------------------	---	------------------------

### Fluorochromkonjugierte Sekundärantikörper

IgG FITC	IgG (H+L)	Maus gegen Kaninchen	DTAF	Jackson Immuno Research Lab., West Baltimore Pike, USA
IgG FITC	Polyklonale IgG	Schwein gegen Kaninchen	FITC	DAKO, Hamburg, Germany
IgG R-PE	IgG (H+L) F(ab') <sub>2</sub> Fragment	Ziege gegen Maus	R-PE	Jackson Immuno Research Lab., West Baltimore Pike, USA
IgG R-PE	IgG (H+L) F(ab') <sub>2</sub> Fragment	Esel gegen Kaninchen	R-PE	Jackson Immuno Research Lab., West Baltimore Pike, USA

### Unkonjugierte Negativkontrollen

Chrom Pure Mouse IgG	IgG	Maus	-	Jackson Immuno Research Lab., West Baltimore Pike, USA
Chrom Pure Chicken IgG	IgG	Huhn	-	Jackson Immuno Research Lab., West Baltimore Pike, USA
Mouse IgM	IgM	Maus gegen Glukoseoxidase (Aspergillus niger)	-	DAKO, Hamburg, Germany

### Fluorochromkonjugierte Negativkontrollen

IgG1 FITC	IgG1 kappa	Maus gegen Glukoseoxidase (Aspergillus niger)	FITC	DAKO, Hamburg Germany
IgG1 R-PE	IgG1 kappa	Maus gegen Glukoseoxidase (Aspergillus niger)	R-PE	DAKO, Hamburg Germany

### 3.9.3 Methodik

Zunächst werden die in Frage kommenden **spezifischen Primärantikörper** gegen die verschiedenen Antigene, z.B. CD 3, uPA-Rezeptor usw., ausgewählt. Anschließend werden die zumeist in pulverisierter Form vorliegenden Antikörper, wie vom Hersteller vorgeschrieben, gelöst. Ausgehend von dieser Grundkonzentration des Antikörpers wird in aufsteigender Verdünnungsreihe eine Folge von zirka 8 Proben mit unterschiedlicher Antikörperkonzentration hergestellt. Wenn der Primärantikörper nicht bereits direkt fluoreszenzmarkiert ist, wird ein bereits bekannter **fluoreszierender Sekundärantikörper** eingesetzt. In jeder Versuchsreihe werden die Antikörper beladenen Proben mit dem Leerwert, den verschiedenen Negativkontrollen und Positivkontrollen verglichen, so daß ein Versuch aus mindestens 11 Proben besteht. In den vorbereiteten Versuchsröhrchen befinden sich  $2,5 \times 10^5$  Zellen, die während des gesamten Versuchsablaufes in einem Gesamtvolumen von 250  $\mu\text{l}$  PBS-1 % BSA-Lösung vorliegen. Das allgemeine Versuchsprotokoll für unmarkierte Antikörper sieht wie folgt aus:

**Tab. 9:** Versuchsprotokoll zur **Austestung von unmarkierten Antikörpern**  
am Beispiel von II D 7

Probennummer	( $2,5 \times 10^5$ Zellen pro 250 $\mu\text{l}$ Gesamtvolumen)	
1 (Leerwert)	-	-
2	-	IgG FITC
3 (Negativkontrolle)	Chrom Pure Mouse IgG	IgG FITC
4 (Positivkontrolle)	HD 13.1	IgG FITC
5	x ml von 1:1 II D 7	IgG FITC
6	x ml von 1:2 II D 7	IgG FITC
7	x ml von 1:4 II D 7	IgG FITC
8	usw.	usw.

Bei direkt fluoreszenzmarkierten Primärantikörpern erübrigt sich die zweite Inkubation mit dem fluoreszierenden Sekundärantikörper.

Die einzelnen Antikörper werden an Zelllinien, die das jeweilig zu untersuchende Antigen besitzen, ausgetestet. Zusätzlich werden die Färbereigenschaften aller Antikörper an den beiden gebräuchlichen Zellfixierungen, 70%igen Ethanol und 1%igen PFA, und an Nativzellen erprobt. Nach Ermittlung der idealen Konzentrationen, werden am Ende die Versuchsbedingungen und erneut die Spezifität der verschiedenen Antikörper anhand von Mischexperimenten mit OVMZ-6-Zellen, PBL, Fibroblasten und HUVEC-Zellen untersucht.

## **4. Ergebnisse**

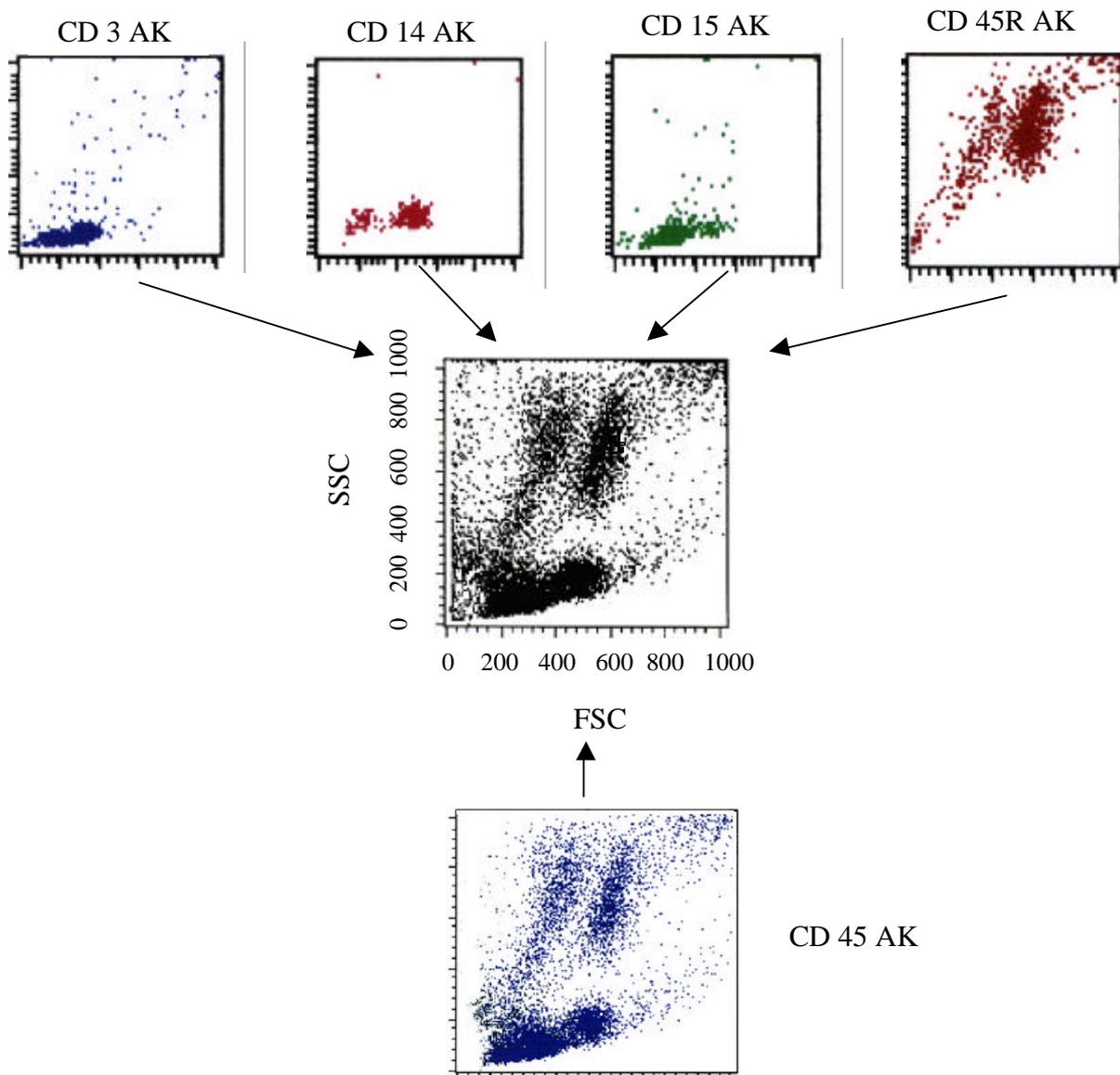
### **4.1 Methodische Verbesserungen**

#### **4.1.1 Verbesserter Antikörpercocktail für die MACS-Technik**

In den Tabellen 1 und 5 findet sich eine Übersicht über die getesteten Antikörper. Das Ziel der Untersuchung war die Antikörper hinsichtlich ihrer Anzahl und ihrer Spezifität zu optimieren.

Zur Markierung der einzelnen Leukozytenarten kristallisierte sich der PAN-Leukozyten-Antikörper CD 45 als besonders wertvoll heraus, so daß dieser die ursprünglich vier verschiedenen Antikörper CD 3, CD 14, CD 15 und CD 45R, wie in Abb. 8 ersichtlich, ersetzen konnte. Um die Antikörperpalette gegen die noch weiteren Nicht-Tumorzellen in der Zellsuspension zu vervollständigen, wurde das Spektrum um zwei Antikörper erweitert. Gegen die zahlreich sich in der Suspension befindlichen Fibroblasten wurde der Antikörper F4771 gefunden. Die noch verbliebenen einzelnen Endothelzellen ließen sich durch den Antikörper gegen Von-Willebrand-Faktor ideal abfangen.

**Abb. 8:** Vergleich der verschiedenen Leukozytenantikörper an PBL aus humanem Vollblut



Durch den Einsatz des Antikörpers CD 45 lassen sich die vier, spezifisch gegen die einzelnen Leukozytenarten gerichteten Antikörper CD 3, CD 14, CD 15 und CD 45R auf einen reduzieren. Die Scatter-Bilder zeigen die mit CD 3 AK spezifisch markierten T-Lymphozyten, die an CD 14 AK gebundenen Monozyten, die mit CD 15 AK beladenen Granulozyten und die mit CD 45R markierten B-Lymphozyten. In Summation ergibt sich die gesamte Palette der Leukozyten wieder, ausgetestet an Leukozyten aus humanem Vollblut. Im Vergleich dazu ermöglicht der CD 45 AK die gleichzeitige Markierung der einzelnen Subklassen an Leukozyten.

#### **4.1.2 Optimierte Antikörperzusammenstellung für die durchflußzytometrische Doppelfärbung (CK / uPA-Rezeptor)**

Das Grundprinzip der simultanen Antikörpermarkierung ist die Zusammenstellung von zwei Antikörpern, die aus unterschiedlichen Tiergruppen stammen und mit jeweils verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Nur so kann ein spezifisches Fluoreszenzsignal gewährleistet werden. Die Tabellen 2 und 5 veranschaulichen die Vielzahl an hierfür ausgetesteten Antikörpern.

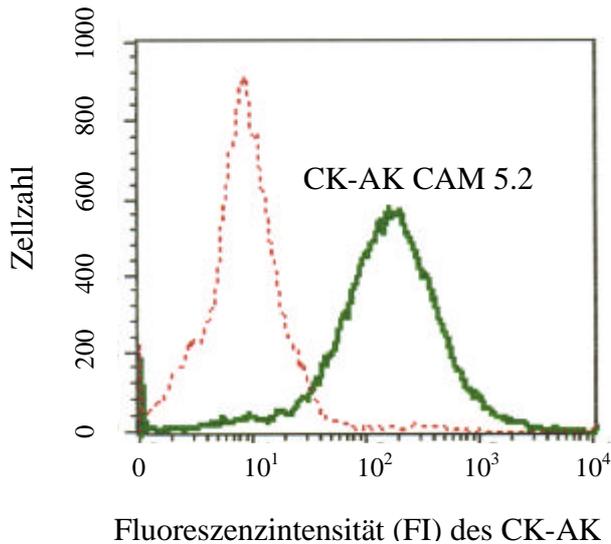
Für die „Idealanforderungen“ zeigten sich der direkt an FITC gebundene CK Antikörper CAM 5.2 aus dem Tiersystem Maus und der indirekt mit PE markierte, polyklonale uPA-Rezeptor Antikörper #399R aus dem Tiersystem Kaninchen als besonders geeignet.

Der CK-Antikörper CAM 5.2 richtet sich dabei vor allem selektiv gegen Zytokeratine 8,18 und 19. Damit deckt er sich genau mit der Zytokeratinzusammensetzung in Ovarialkarzinomzellen. In Abb. 9 spiegelt sich das spezifische Bindungsverhalten an den Ovarialkarzinomzellen OVMZ 6 im Vergleich zu Leukozyten wieder. Durch den bereits direkt angehenden Fluoreszenzfarbstoff konnte auf einen fluoreszierenden Sekundärantikörper verzichtet werden. Hierdurch verringerte sich das zusätzliche Risiko an weiteren unspezifischen Bindungen. Der uPA-R-Antikörper #399R zeichnet sich trotz seiner Polyklonalität durch seine spezifische Bindung an den drei Domänen des uPA-Rezeptors aus (siehe Abb. 10). Obwohl dieser Antikörper durch einen Zweitantikörper Fluoreszenz markiert werden mußte, wurde durch die bewußte Wahl der Erstantikörper aus unterschiedlichen Tiersystemen die Gefahr von unspezifischen Antikörperreaktionen stark reduziert.

Die restlichen CK- und uPA-R-Antikörper fanden in Kombination miteinander keine Verwendung aufgrund gleicher Tiersysteme, identischer Fluoreszenzfarbstoffe oder unzureichend spezifischen Bindungsverhaltens.

Abb. 9:

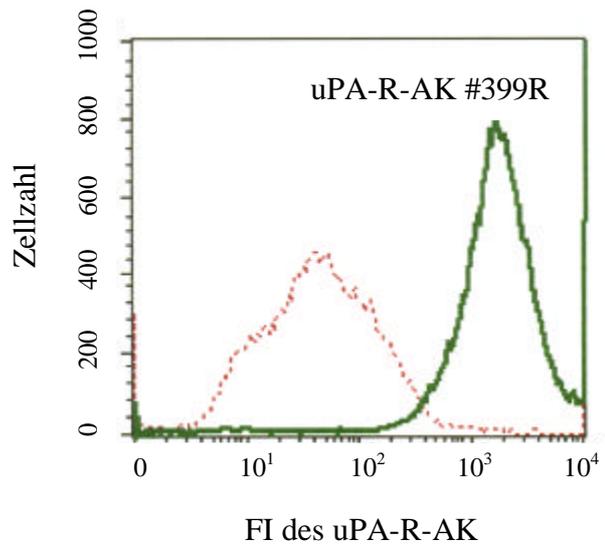
Spezifische Bindung des CK-AK  
CAM 5.2-FITC



Die übereinanderliegenden Histogramme der Leukozyten und OVMZ-6-Zellpopulation zeigen die spezifische Bindung des CK-AK CAM 5.2-FITC an zytokeratinhaltige OVMZ-6-Zellen (dickgrün; mean 270). Im Vergleich dazu bindet der CK-AK an den Leukozyten, die kein Zytokeratingerüst besitzen, schlecht. Hierdurch ergibt sich der niedrige Meanwert der Fluoreszenzintensität (gepunktet-rot; mean 52).

Abb. 10:

Spezifische Bindung des uPA-R-AK  
#399R



Durch vorangehende Blockierung des uPA-R-AK mit CHO-uPA-R<sub>1-277</sub> gelingt es dem uPA-R-AK #399R nicht mehr, gleichzeitig an den uPA-R der OVMZ-6-Zellen anzubinden (gepunktet-rot; mean 238). Im unblockierten Zustand kann der uPA-R-AK #399R spezifisch an den uPA-R der OVMZ-6-Zellen binden. Dadurch ergibt sich im logarithmisch gemessenen Histogramm eine hohe mittlere Fluoreszenzintensität (dickgrün; mean 2168).

## 4.2 Mechanisch-enzymatischer Gewebeaufschluß

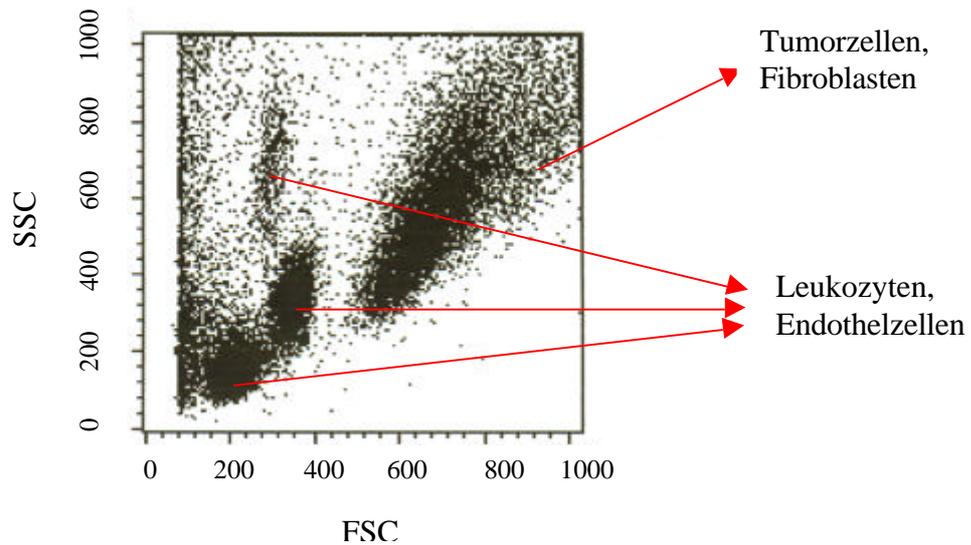
Bei den verwendeten Ovarialkarzinomen handelte es sich, wie in der Übersicht unter 3.2 ersichtlich ist, in der Mehrzahl der Fälle um Tumore fortgeschritteneren Stadiums (FIGO III und IV), wobei neben Primärtumorgewebe, auch Lymphknoten und Bauchnetzmetastasen verarbeitet wurden.

In Anlehnung an das Versuchsprotokoll von Dr. Sabine Schwarze gelang es, die Gewebeprobe nach mechanischer Zerkleinerung mittels Skalpell und Schere in Kombination mit der milden enzymatischen Disaggregation durch 0,005%ige Kollagenase D- Lösung zu einer homogenen Einzelzellsuspension aufzuschließen (Schwarze 1997, S. 11 u. 35). Zur Verbesserung der Zellhomogenität wurden die Zellen im Anschluß durch feine Nylonnetze unterschiedlicher Feinheit filtriert. Insgesamt dauerte der mechanisch-enzymatische Aufschluß zirka 1 Stunde.

Wie bereits Dr. Sabine Schwarze in Ihrer Doktorarbeit zur Auswirkung der Kollagenase D- Behandlung auf Oberflächenantigene zeigen konnte, und sich in den nachfolgenden Versuchen bei der Doppelmarkierung der aufgeschlossenen Ovarialkarzinomzellen praktisch beweisen ließ, bleibt der uPA-Rezeptor nach der kombinierten mechanisch-enzymatischen Behandlung weitgehend funktionell reaktiv (siehe dazu Abb. 17) (Schwarze 1997, S. 35; Harbeck et al. 1995, S. 1251)

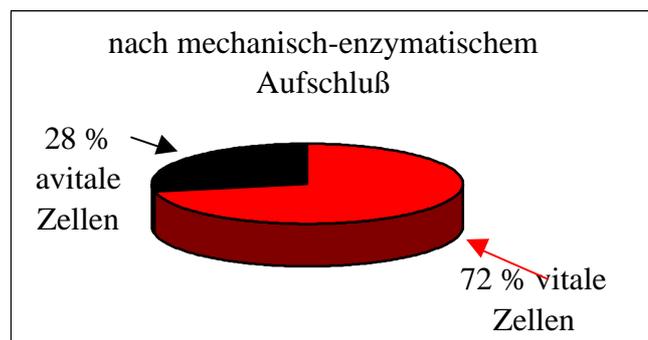
Zusätzlich gelang es durch den milden mechanisch-enzymatischen und gleichzeitig sterilen Gewebeaufschluß, die Zellen mit einer Prozentzahl von durchschnittlich 72 % lebender Zellen in Primärkultur zu nehmen. Dazu wurde nach dem Einzelzellaufschluß der 36 Ovarialkarzinome je eine Zellprobe entnommen und mit 1%iger Trypanblaulösung angefärbt. Unter dem Lichtmikroskop werden die vitalen, membranintakten Zellen nicht angefärbt, wohingegen die geschädigten Zellen blau sind. In den 36 aufgeschlossenen Gewebeprobe fanden sich im Mittel 72 % lebende Zellen, wobei im schlechtesten Falle nur 56 % und im günstigsten Falle 87 % der Zellen vital waren.

Abb. 11: Durchflußzytometrisches Scatterbild eines mechanisch-enzymatisch aufgeschlossenen Ovarialkarzinoms



Das linear gemessene, durchflußzytometrische Scatterbild zeigt eine Zellsuspension bestehend aus Einzelzellen, welche sich in verschiedene Zellpopulationen von unterschiedlicher Größe (FSC) und Granularität (SSC) abgrenzen lassen.

Abb. 12: Kreisdiagramm über die Vitalität der Einzelzellen nach dem kombiniert mechanisch-enzymatischen Aufschluß



Nach Aufschluß von 36 Ovarialkarzinomen ergibt sich nach Anfärben der Einzelzellsuspensionen mit 1%iger Trypanblaulösung im Mittel eine Rate von 72 %  $\pm$  6 % vitalen Zellen.

## **4.3 Magnet-aktivierte Zellsortierung**

### **4.3.1 Endgültiges Standardprotokoll**

Wie im vorangegangenen Kapitel 4.1.1 bereits vorgestellt, kristallisierten sich für die Positivselektion der Nichttumorzellen nur insgesamt drei geeignete Antikörper heraus. In Kombination stellten die drei Antikörper den idealen Antikörpercocktail dar, um die in der frischen Zellsuspension befindlichen Leukozyten, Fibroblasten und Endothelzellen von den Ovarialkarzinomzellen abzutrennen. Der Primärantikörper CD 45 wurde zur Markierung der Leukozyten eingesetzt. Der AK MAb F4771 richtete sich gegen Fibroblasten, und der AK gegen von-Willebrand-Faktor diente zur Eliminierung der Endothelzellen. Nachdem die Primärantikörper aus unterschiedlichen Immunglobulinklassen stammen, wurden mit Microbeads beladene Sekundärantikörper der Immunglobulinklassen IgM und IgG verwendet. Am Ende ergab sich für die zirka 90minütige Magnet-aktivierte Zellsortierung aus frischem Ovarialkarzinomgewebe das unter Tabelle 10 schematisch zusammengestellte Versuchsprotokoll.

Tab.10: Endgültiges Versuchsprotokoll zur Magnet-aktivierten Zellseparation von vitalen Tumorzellen aus frischem Ovarialkarzinomgewebe mittels Negativseparation.

1. Voraussetzungen:

Herstellung einer homogenen Zellsuspension aus frischem Ovarialkarzinomgewebe in einer sterilen PBS-Penstrep-BSA-Lösung durch kombinierten mechanisch-enzymatischen Gewebeaufschluß

2. Versuchsablauf:

⇒ **1. Inkubation** (bei RT für 30 min) mit:

- CD 45 AK: 6  $\mu\text{l}/10^7$  Zellen
- MAb F4771: 50  $\mu\text{l}/10^7$  Zellen
- von-Willebrand-Faktor AK: 48  $\mu\text{l}/10^7$  Zellen

⇒ 2 x Waschen in steriler PBS-Penstrep-BSA- Lösung mit jeweils anschließender Zentrifugation bei 300 x g und 4 °C für 10 min

⇒ **2. Inkubation** (bei RT für 30 min) mit:

- Anti-IgM-Microbeads: 120  $\mu\text{l}/10^7$  Zellen
- Anti-IgG-Microbeads: 120  $\mu\text{l}/10^7$  Zellen

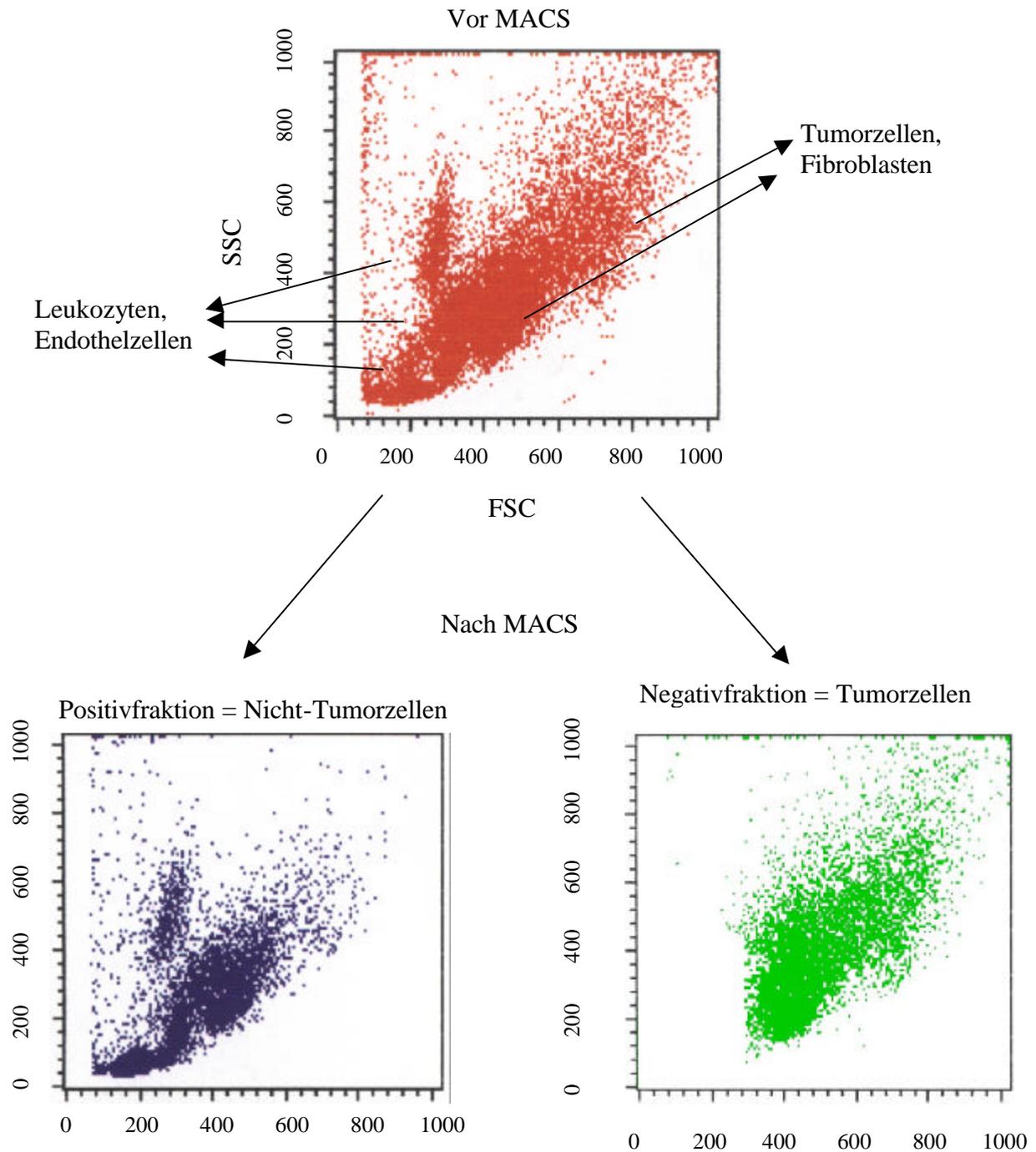
⇒ 2 x Waschen in steriler PBS-Penstrep-BSA –Lösung mit jeweils anschließender Zentrifugation bei 300 x g und 4 °C für 10 min

⇒ Beginn der Magnetseparation nach Resuspension der Zellen in zirka 5 ml PSA-Penstrep-BSA –Lösung (siehe Kapitel 3.4.3 Absatz 3)

### **4.3.2 Durchflußzytometrische Analyse der Zellfraktionen**

Lichtmikroskopisch ließen sich die verschiedenen Zellfraktionen nach der Magnetseparation nur schwerlich unterscheiden. Erst anhand des durchflußzytometrischen Scatterbildes erkannte man deutliche Unterschiede bei den beiden Zellsuspensionen der Negativ- und Positivfraktion hinsichtlich ihres Verteilungsmusters der einzelnen Zellpopulationen. In Zusammenschau mit dem Scatterbild der Ausgangszellsuspension vor der MACS-Separation wurde die Zellpopulation der Ovarialkarzinomzellen (Negativfraktion) nahezu vollständig von den Nicht-Tumorzellen (Positivfraktion) getrennt. In Abbildung 13 werden die drei verschiedenen Scatterbilder der Ausgangszellsuspension, der Negativ- und der Positivzellfraktion in sehr anschaulicher Weise gegenübergestellt.

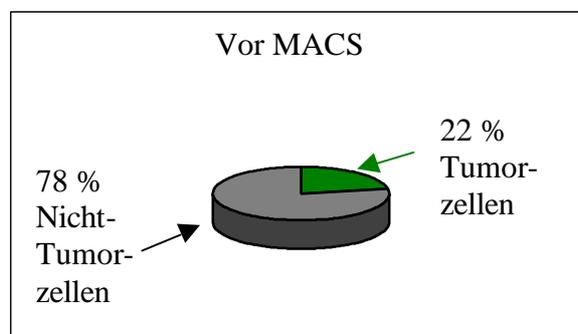
**Abb. 13** Durchflußzytometrische Scatterbilder der Ausgangszellsuspension, Negativ- und Positivzellfraktion aus frischem Ovarialkarzinomgewebe (lineare Messung)



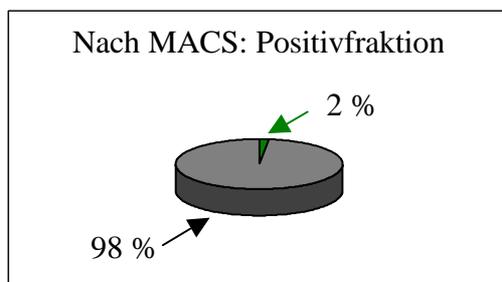
Nach zwei MACS-Durchläufen zeigt sich eine deutliche Anreicherung der Ovarialkarzinomzellen in der Negativzellfraktion, wohingegen sich die Positivzellfraktion hauptsächlich aus den restlichen Zellpopulationen an Nicht-Tumorzellen zusammensetzt.

Die Magnet-aktivierte Zellseparation konnte an 17 frisch aufgeschlossenen Ovarialkarzinomgeweben durchgeführt werden, wobei der Reinheitsgrad an angereicherten Ovarialkarzinomzellen in der Negativfraktion zum Teil sehr erheblich variierte. So konnte im ungünstigsten Falle nur eine Reinheit von 57 % und im idealsten Falle eine Reinheit von 91 % erzielt werden. Im Mittel konnte bei 17 mechanisch-enzymatisch aufgeschlossenen und einzellzell-separierten Ovarialkarzinomen eine Anreicherung der Ovarialkarzinomzellen in der Negativzellfraktion von 83 % erreicht werden. Durchschnittlich lag der Anteil an Ovarialkarzinomzellen in der ursprünglichen Zellsuspension vor der Zellseparation bei  $22 \pm 5 \%$ . Damit ergibt sich eine Anreicherung der Ovarialkarzinomzellen um etwa das vierfache.

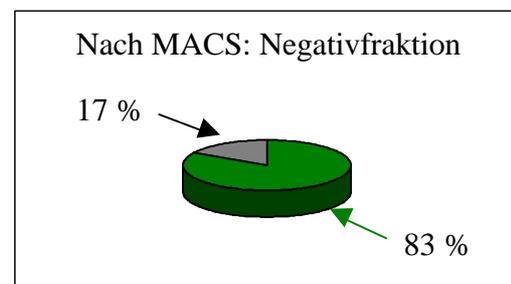
**Abb. 14** Vergleich von Originalsuspension, Positiv- und Negativfraktion in Hinblick auf die prozentuelle Zellzusammensetzung



Vor der Zellsortierung befinden sich in der Ausgangszellsuspension (grün) durchschnittlich 22% an Ovarialkarzinomzellen bei 17 untersuchten Ovarialkarzinomen.



Nach der Sortierung beträgt der Tumorzellanteil (grün) in der Positivfraktion ca. 2 %



Der Tumorzellanteil (grün) in der Negativfraktion lässt sich durch die Magnetseparation auf 83 % im Mittel erhöhen.

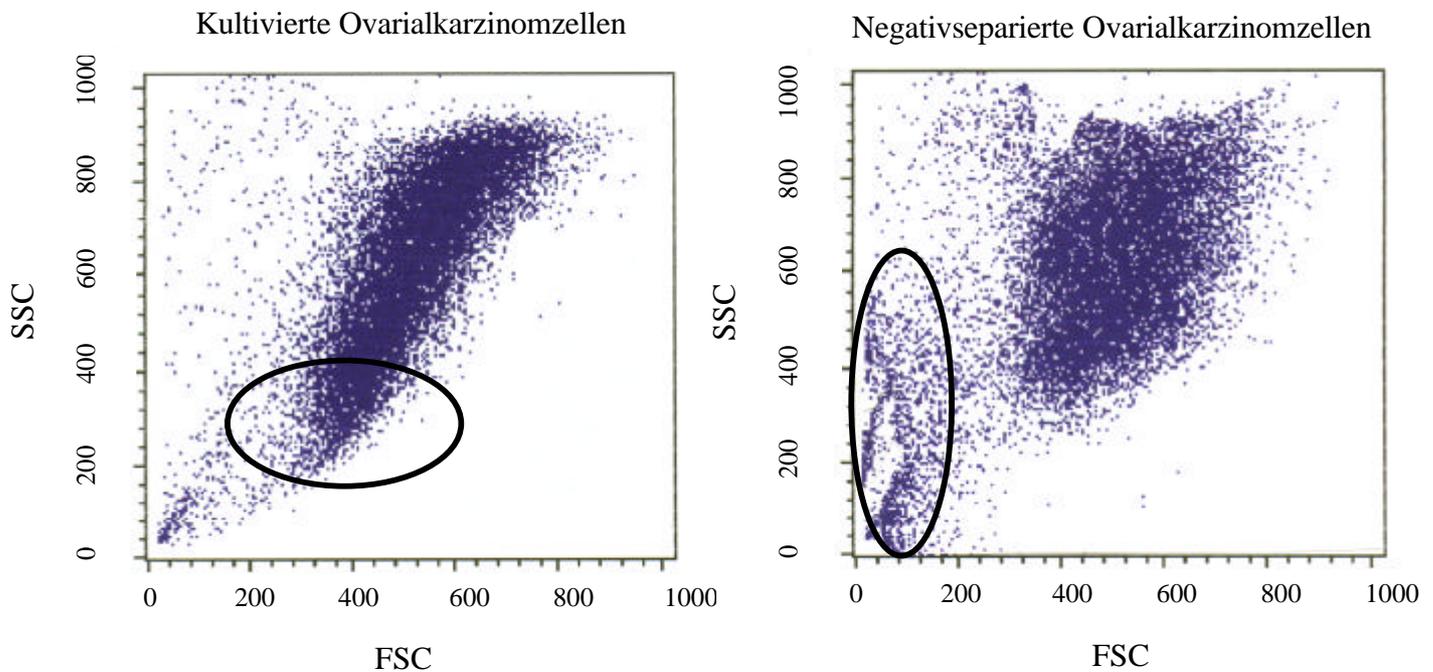
#### 4.4 Kultivierung der isolierten Ovarialkarzinomzellen

Voraussetzungen für eine erfolgreiche Kultivierung sind sterile Arbeitsbedingungen, incl. sterile Arbeitsmaterialien. Bei insgesamt 17 aufgeschlossenen und einzellseparierten Ovarialkarzinomen ist es exemplarisch bei fünf von sieben Negativfraktionen gelungen, eine Tumorzellkultur anzuzüchten. Dabei konnte man erst von einem Erfolg der Kultivierung sprechen, wenn sich die Zellen in Kultur tatsächlich vermehrten. Zwei aufgeschlossene Negativfraktionen konnten wegen ausbleibender Adhärenz der Zellen oder fehlender Wachstumstendenz nicht in Kultur dauerhaft in Kultur gebracht werden.

Die restlichen fünf Proben an negativfraktionierten Ovarialkarzinomzellen haben begonnen sich nach zirka fünf Tagen zu teilen. Bis zu diesem Zeitpunkt mußte lediglich das verbrauchte Nährmedium nachgefüllt werden. Die in der Zellfraktion restlichen, störenden Fibroblasten wurden durch Zugabe von wachstumshemmenden Substanzen, z.B. FKS, eliminiert. Nach Ablauf einer Woche konnten die Zellen schließlich erstmals aus der Kultur genommen. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit PBS-EDTA-Lösung abgelöst und abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen wieder mit frischem Nährmedium erneut in Kultur gebracht. Danach verdoppelte sich die Zahl der Zellen innerhalb von fünf bis sechs Tagen. Je nach Dichte des Zellrasen mußten die Zellen vom Kulturgefäß abgelöst, abzentrifugiert und auf zwei neue Kulturgefäß aufgeteilt werden. Dies geschieht, um das Zellwachstum nicht durch eine zu hohe Zelldichte zu behindern. Nach 30 Tagen wurden die Ovarialkarzinomzellen endgültig aus der Kultur genommen und für die durchflußzytometrische Charakterisierung vorbereitet (siehe Abb. 15).

In der durchflußzytometrischen Darstellung der negativseparierten Zellen und der kultivierten Zellen aus der Negativfraktion zeigte sich jeweils eine homogene Zellpopulation ähnlicher Streubreite im FSC und SSC. Durch die idealen Wachstumsbedingungen in Kultur gelang es die Zellpopulation der isolierten Zellen zu verdichten. Um weitere Informationen über die isolierten und kultivierten Tumorzellen zu erhalten müssen die Zellen hinsichtlich ihres DNA-Gehaltes, ihres Antigenmusters und ihrer Vitalität untersucht werden. Hierdurch gelingt erst die Charakterisierung der Ovarialkarzinomzellen.

**Abb. 15:** Durchflußzytometrische Darstellung der kultivierten Ovarialkarzinomzellen in Gegenüberstellung zur Negativzellfraktion



Das Scatterbild stellt die Zellpopulation der angezüchteten, negativseparierten Zellen aus frischem Tumorgewebe dar. Die hohe Streubreite des Sideward-Scatters entsteht durch den Anteil an aggregierten und toten Zellen (siehe Kreis). Dies ließe sich anhand des DNA-Gehaltes und der Vitalität der Zellen mittels PI nachweisen.

Das Streulichtbild der Negativzellfraktion zeigt ebenfalls eine nahezu homogene Zellpopulation mit vergleichsweise etwas größerer Streubreite der Tumorzellgröße (FSC). Im linken unteren Bildrand finden sich zusätzlich Zellfragmente zerstörter oder toter Zellen (siehe Kreiszeichnung).

#### **4.5 Simultane Doppelmarkierung der Ovarialkarzinomzellen am Durchflußzytometer**

Wie bereits unter Abschnitt 3.7.2 beschrieben, zeichnen sich die Ovarialkarzinomzellen durch ihr Zellgerüst bestehend aus den Zytokeratinfilamenten 8/18/19 aus. Zusätzlich findet sich auf der Oberfläche der Ovarialkarzinomzellen der Rezeptor für die Protease uPA. Es ist jedoch anzumerken, daß dieser Rezeptor ebenso von benignen Zellen, wie Fibroblasten und

Granulozyten, synthetisiert wird (Vassalli et al. 1985, S. 89; Jardi et al. 1996, S. 1012). Erst durch den kombinierten Nachweis beider Antigene gelingt die eindeutige Identifizierung der Ovarialkarzinomzellen innerhalb des Zellgemisches. Die gleichzeitige Markierung der Zytokeratine 8/18/19 und des uPA-Rezeptors mittels spezifischer Antikörper ermöglicht den quantitativen Nachweis der Ovarialkarzinomzellen in den verschiedenen Zellfraktionen. Am besten gelingt die Darstellung der Doppelmarkierung über dot-plot-Bilder. Hierbei werden die beiden fluoreszierenden Antikörper gegeneinander in der Vertikal- und Horizontalachse aufgetragen. In Abhängigkeit von der Stärke des Fluoreszenzsignals befindet sich der „dot“ weiter oder näher vom Nullpunkt entfernt. Zellen, wie die Ovarialkarzinomzellen mit positivem CK-AK- und uPA-R-AK-Signal befinden sich somit im rechten oberen Bildbereich des dot-plot-Bildes.

Die Ergebnisse von Dr. Sabine Schwarze hinsichtlich der „erhaltenen funktionellen Reaktivität des uPA-R“, konnten nach dem kombinierten mechanisch-enzymatischen Gewebeaufschluß und der Magnet-aktivierten Tumorzellanreicherung, sowie nach der Kultivierung anhand der durchflußzytometrischen Ergebnisse bestätigt werden (Schwarze S. 1997, S. 36 u. 37).

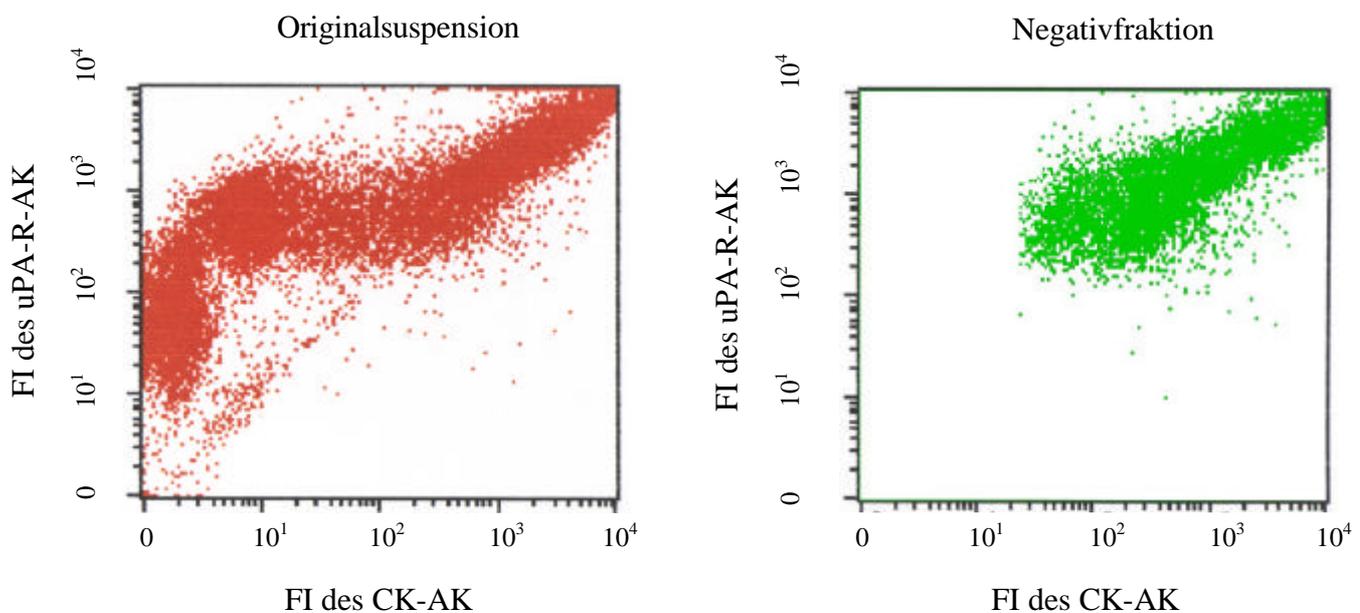
#### **4.5.1 Isolierte Ovarialkarzinomzellen aus frischem Tumorgewebe**

Über die simultane Doppelmarkierung wird in Gegenüberstellung von Ausgangszellsuspension und Negativzellfraktion, die fast vollständige Entfernung der Nichttumorzellen aus der Negativzellfraktion deutlich. Während in der Ausgangszellsuspension nur wenige Zellen mit kombiniertem Fluoreszenzsignal zu finden sind, zeigt sich in der Negativzellfraktion eine deutliche Anreicherung an doppelmarkierten Zellen, gleichbedeutend mit den isolierten Ovarialkarzinomzellen. Bei den zahlreichen uPA-R positiven Zellen in der Ausgangszellsuspension handelt es sich in der Vielzahl um Fibroblasten und Granulozyten, welche den Rezeptor ebenfalls tragen. Die restlichen Zellen zeigen keine spezifische Bindung des uPA-R-AK #399R und des CK-AK CAM 5.2 (siehe Abb. 16).

Durch die Doppelmarkierung der Zellpopulation ließ sich, anhand der registrierten Fluoreszenzsignale im Bezug auf insgesamt  $2 \times 10^4$  gemessene Zellen pro durchflußzytometrischer Meßprobe, das Verhältnis von Ovarialkarzinomzellen und Nicht-

Tumorzellen ermitteln. In Summation aller 17 mechanisch-enzymatisch aufgeschlossener und magnet-aktiviert separierter Ovarialkarzinome hat sich ein Mittelwert (mean) von  $22 \% \pm 5 \%$  Ovarialkarzinomzellen vor und von  $83 \% \pm 4 \%$  nach Separation ergeben (siehe Abb. 14 unter Punkt 4.3.2).

**Abb. 16:** Doppelmarkierung der Ovarialkarzinomzellen mittels CAM 5.2 gegen CK 8/18/19 und uPA-R-AK #399R: Spezifischer Nachweis der angereicherten Ovarialkarzinomzellen in der Negativfraktion im Vergleich zur Ausgangszellsuspension (logarithmische Messung)



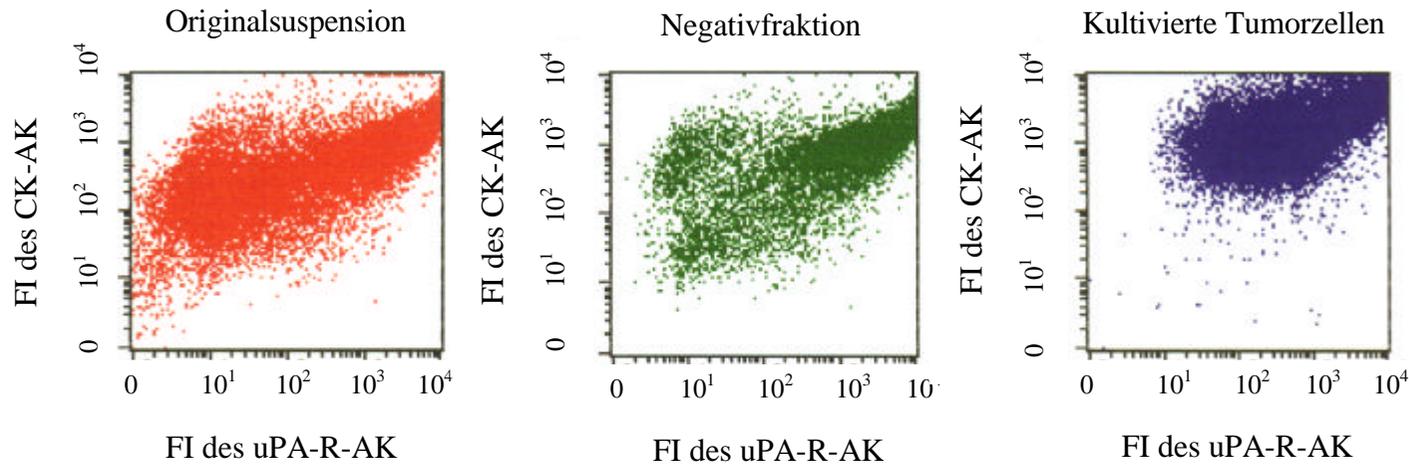
Deutlich erkennbare heterogene Zellpopulationen mit unterschiedlichem Bindungsverhalten in Bezug auf CK- und uPA-R-Antikörper; im Mittelwert nur  $22 \% \pm 5 \%$  an doppelmarkierten Ovarialkarzinomzellen (siehe oberer rechter Bildabschnitt);

Homogene doppelmarkierte Zellpopulation, welche gleichbedeutend mit den CK- und uPA-R-positiven Ovarialkarzinomzellen ist; der Anteil an Ovarialkarzinomzellen in der Suspension liegt bei einem Mittelwert von  $83 \% \pm 4 \%$  bei insgesamt 17 gemessenen Ovarialkarzinomproben;

#### 4.5.2 Kultivierte Ovarialkarzinomzellen

Die Vermutung, daß es sich bei den angezüchteten Zellen, um die negativ-separierten Ovarialkarzinomzellen aus dem frisch aufgeschlossenen Tumorgewebe handelt, konnte durch die weiteren Antikörper-Doppelmarkierungen bestätigt werden. Durch die nachfolgende simultane Markierung der angezüchteten Ovarialkarzinomzellen mit Antikörpern gegen uPA-Rezeptor und Zytokeratinfilamente 8/18/19 erfolgte der endgültige Nachweis über die richtige Zuordnung der Zellen. Am besten läßt sich dies wiederum anhand von dot-plot-Bildern veranschaulichen. In Zusammenschau mit den Fluoreszenzbildern der Originalsuspension und Negativzellfraktion konnte die angezüchtete Zellpopulation aufgrund des identischen Reaktionsverhaltens gegenüber den verwendeten Antikörpern als Fraktion der isolierten Ovarialkarzinomzellen nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Fluoreszenzbild der Negativzellfraktion ergibt sich eine deutliche Zunahme der Homogenität der Zellpopulation bei gleichzeitiger Abnahme der restlichen Nicht-Tumorzellen. Darüber hinaus ist eine verstärkte Antikörperbindung des uPA-Rezeptor-AK erkennbar. Die Vermutung liegt nahe, daß aufgrund der einheitlichen Wachstumsbedingungen in Kultur eine vermehrte uPA-Rezeptor-Produktion unter gleichzeitig zunehmender Homogenität der Ovarialkarzinomzellen ausgelöst wurde (siehe Abb. 17).

Abb. 17: Vergleichende dot-plot-Bilder von Ausgangszellsuspension, Negativzellfraktion und kultivierten Zellen anhand immunzytochemischer Doppelmarkierung mit CK-AK CAM 5.2 (FITC) und uPA-R-AK #399R (PE)



Im Fluoreszenzbild der Originalsuspension zeigt sich ein bunt gemischtes Bild von verschiedenen Zellpopulationen mit unterschiedlichem Reaktionsverhalten gegenüber den beiden verwendeten Antikörpern. Davon sind  $22\% \pm 5\%$  anteilig Ovarialkarzinomzellen, bei 17 aufgeschlossenen Karzinomen (mean-wert);

Das Fluoreszenzbild der Negativzellfraktion wird durch das Doppelbindungsvermögen von uPA- und CK-Antikörper an die Ovarialkarzinomzellen dominiert; im Mittelwert befinden sich  $83\% \pm 4\%$  Ovarialkarzinomzellen in der Fraktion bei insgesamt 17 untersuchten Ovarialkarzinomgeweben.

Im Doppelmarkierungsversuch an 5 primärkultivierten Ovarialkarzinomen kristallisiert sich eine homogene Population von Ovarialkarzinomzellen mit einheitlichem Doppelbindungsverhalten heraus. Dabei zeigt sich ein deutlich verstärktes uPA-R und CK-Antikörper-Signal. Nach Markierung beträgt der Prozentanteil an Ovarialkarzinomzellen 98%.

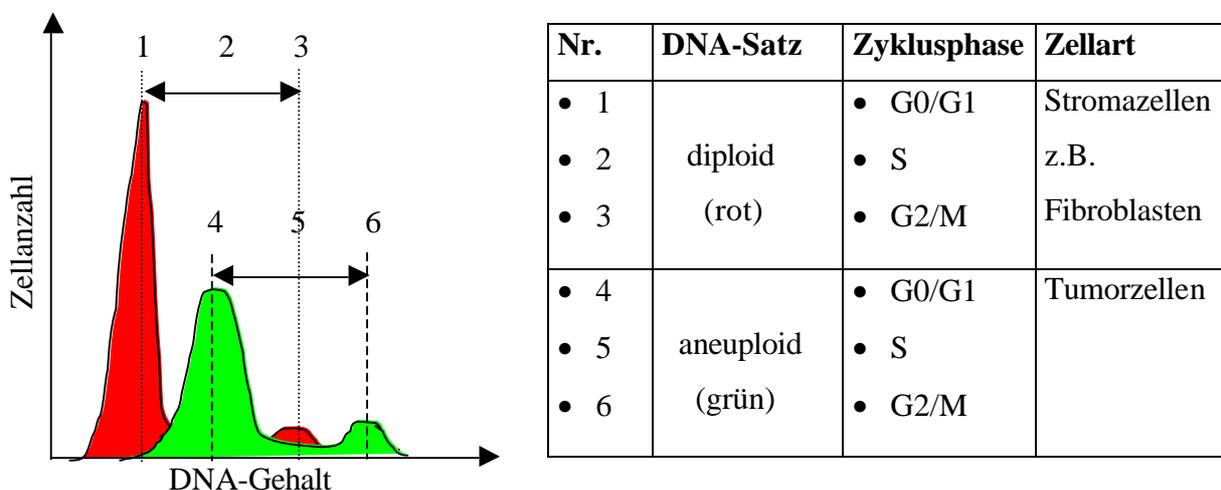
## 4.6 Durchflußzytometrische DNA-Analyse an frischem Ovarialkarzinomgewebe

### 4.6.1 Vergleichende DNA-Analyse an den verschiedenen Zellfraktionen mit Hilfe von Propidiumjodid

Nach dem mechanisch-enzymatischen Aufschluß und der immunomagnetischen Separation (MACS) wurde die gewonnene Negativzellfraktion, als auch die Ausgangszellsuspension in 70%iger Ethanollösung für mindestens 24 Stunden fixiert. Das Fixierungsmittel ermöglicht die Permeabilisierung der Zellmembran. Durch diesen Schritt gelingt es später dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid (PI), wie unter Punkt 3.6.3 beschrieben, in die Zellen einzudringen und die DNA anzufärben.

In der Auswertung kommt die DNA-Analyse am besten im Histogrammbild zur Darstellung. Um die einzelnen peaks des Histogrammbildes besser entsprechenden DNA-Phasen zuordnen zu können, wurde eine homogene, sich nicht teilende Kontrollzellpopulation mit diploidem DNA-Satz verwendet. Hierfür dienten humane periphere Blutlymphozyten (PBL). Der isolierte Gipfelanstieg im Histogrammbild der PBL markierte somit die Position der G0/G1-Phase eines diploiden DNA-Satzes (siehe Tab. 11). In Zusammenschau mit den nachfolgenden Histogrammbildern von Originalsuspension und Negativfraktion ließen sich die Positionen der einzelnen DNA-Phasen genauer bestimmen.

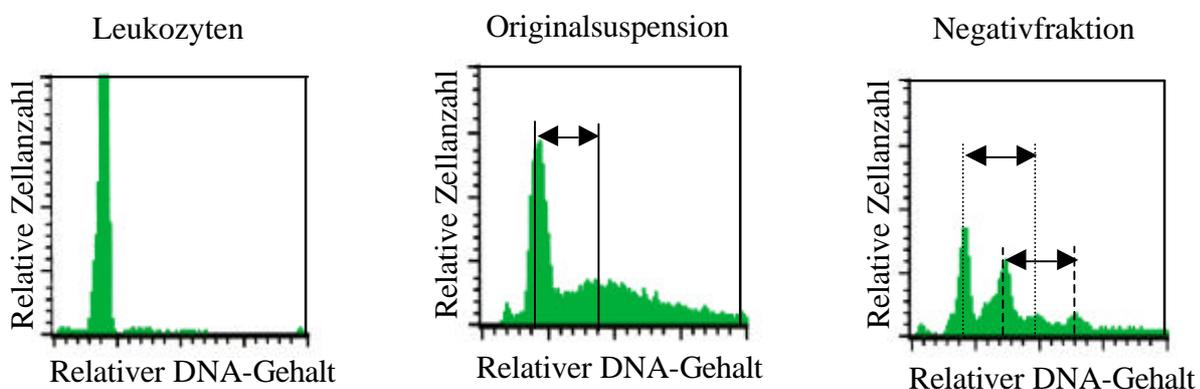
**Tab. 11:** Schematisches DNA-Histogramm einer diploiden und aneuploiden Zellpopulation



Es konnten insgesamt zehn in 70%igem Ethanol fixierte und einzelsortierte Ovarialkarzinome bezüglich ihres DNA-Gehaltes analysiert werden. Bei den restlichen sieben von 17 aufgeschlossenen Ovarialkarzinomen reichte die Zellzahl der sortierten Negativfraktion nicht für einen weiteren, in Ethanol fixierten DNA-Meßansatz aus.

Mit Hilfe der PBL als Kontrollpopulation ließ sich bei jeder Messung der diploide G0/G1-peak ermitteln. Anhand dessen konnten die verschiedenen Peaks im Histogrammbild der Originalsuspension und Negativfraktion definiert werden. Während in der Originalsuspension der peak mit diploiden Zellen deutlich dominierte, zeigte sich in der Negativfraktion eine Verschiebung in Richtung der aneuploiden Zellen. Gleichzeitig nahm der diploide DNA-Satz ab, und es kristallisierten sich die einzelnen Positionen der G0/G1- und G2/M-Phase von aneuploiden und restlichen diploiden Zellpopulationen besser heraus. Zudem ließ sich die S-Phase genauer bestimmen.

**Abb. 18:** histographische DNA-Analyse mit PI an Originalsuspension und Negativfraktion in Zusammenschau mit der PBL-Kontrollpopulation



Der einzelne Gipfelanstieg der PBL-Kontrollpopulation markiert die diploide G0/G1-Phase.

Unter Orientierung an dem Gipfel der diploiden G0/G1-Phase der PBL zeigt sich hier ein zweigipfeliges DNA-Histogramm ohne erkennbaren aneuploiden DNA-Satz.

Im Vergleich zur Originalsuspension kristallisiert sich eine eindeutige aneuploide Zellpopulation von Tumorzellen heraus, bei gleichzeitiger Reduktion der diploiden Zellen.

#### 4.6.2 Verbesserte DNA-Analyse an frischem Ovarialkarzinomgewebe durch simultane Markierung mit CK-Antikörper und Propidiumjodid

In der histogrammischen DNA-Darstellung vor und nach der MACS-Separation wurde deutlich, wie sehr die Nicht-Tumorzellen in der Ausgangszellsuspension das DNA-Histogramm beeinflussen. Das DNA-Verteilungsmuster der Tumorzellen wurde dabei zum Teil vollständig von dem der Nicht-Tumorzellen überlagert. Dadurch wurde die DNA-Analyse der Tumorzellen verfälscht. Eine genauere Beurteilung der Ploidie und der DNA-Phasen der Tumorzellen ist dementsprechend erst nach Isolierung der Tumorzellen möglich. Eine weitere Verbesserung der DNA-Analyse wurde durch den Einsatz von Zytokeratin-Antikörpern gegen Zytokeratin-Filamente der epithelialen Ovarialkarzinomzellen erzielt. Hierdurch präziserte sich die Histogrammdarstellung des DNA-Gehaltes der Ovarialkarzinomzellen noch zusätzlich.

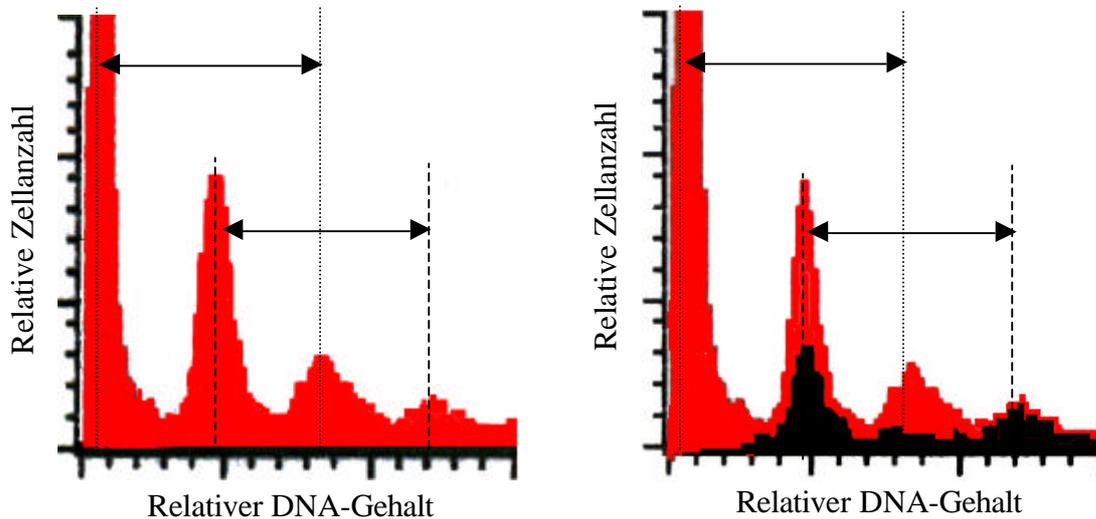
In Gegenüberstellung der beiden Histogrammbilder mit und ohne CK-Markierung der separierten Ovarialkarzinomzellen zeigte sich eine weitere, wenn auch nur geringe Abnahme des aneuploiden G0/G1-peaks bei nahezu gleichbleibendem G2/M-peak.

Bei diesem Versuch mit negativseparierten Ovarialkarzinomzellen mit und ohne CK-Markierung läßt sich die Verteilung der Zellzyklusphasen wie folgt in Prozentzahlen ausdrücken:

Tab. 12: Prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen bei negativseparierten Ovarialkarzinomzellen mit und ohne CK-Markierung (siehe Versuch Abb. 19)

<b>Zellfraktion</b>	<b>G0/G1-Phase</b>	<b>S-Phase</b>	<b>G2/M-Phase</b>
Negativfraktion ohne CK-Markierung	50	16	34
Negativfraktion mit CK-Markierung	50	25	25

**Abb. 19:** Vergleich von DNA-Analyse an separierten Ovarialkarzinomzellen mit und ohne Zytokeratin-Markierung (Ausschnitt aus Histogrammbildern)



Der Ausschnitt des Histogrammbildes von negativseparierten Ovarialkarzinomzellen zeigt die einzelnen Zellzyklusphasen der aneuploiden Tumorzellen und der restlichen diploiden Zellpopulationen in der Negativfraktion

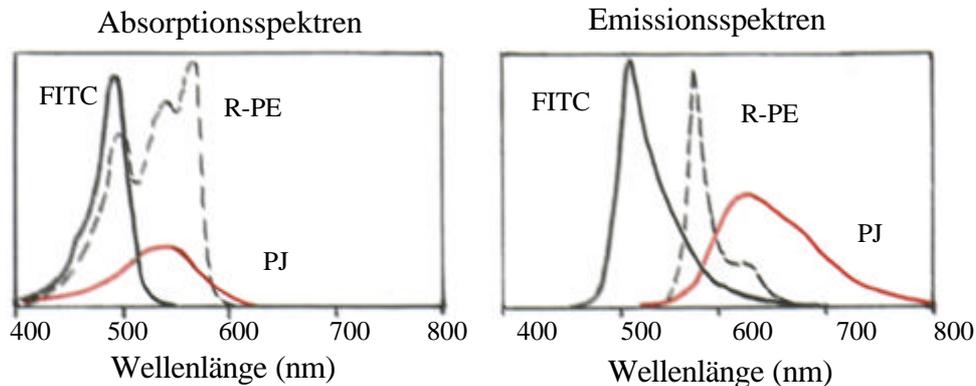
Durch die CK-Markierung der negativseparierten Ovarialkarzinomzellen in der Negativfraktion erreicht man eine noch genauere histographische Darstellung des aneuploiden Zellzyklus der Tumorzellen. Der Zellzyklus der diploiden Zellpopulationen lässt sich hierdurch fast vollständig ausblenden.

Durch die Kombination der magnet-aktivierten Ovarialkarzinomzellisolierung und der simultanen Fluoreszenzmarkierung der Ovarialkarzinomzellen mit CK-Antikörper und PI ist es gelungen, das DNA-Muster der Tumorzellen noch besser herauszuarbeiten. Durch die Negativseparation der Tumorzellen konnten die Tumorzellen in der Zellsuspension angereichert werden. Mit Hilfe der simultanen Markierung der epithelialen Tumorzellen mit einem CK-Antikörper konnte man zusätzlich die Fluoreszenzsignale der restlichen, noch verbliebenen Nicht-Tumorzellen im Histogrammbild eliminieren.

#### **4.6.3 DNA-Analyse durch Dreifach-Markierung mit Propidiumjodid, CK-Antikörper und uPA-Rezeptor-Antikörper**

Nach üblicher Fixierung der verschiedenen Zellfraktionen in 70%iger Ethanollösung, wurden die Zellen simultan mit CK-Antikörper CAM 5.1 und uPA-R- Antikörper #399R laut Protokoll 3.7.4 markiert. Diese Doppelmarkierung diente wiederum zur genaueren Definition der Tumorzellen als Zytokeratin-positive und gleichzeitig uPA-Rezeptor-tragende Zellen. Die anschließende DNA-Anfärbung erfolgte erneut mit Propidiumjodid. Am Ende des Versuchsablaufes wurde die DNA-Analyse durch Dreifach-Markierung der Tumorzellen am Durchflußzytofluorometer durchgeführt. Trotz der Auswahl von drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen mit unterschiedlichen Emissionsmaxima zeigte sich eine deutliche Überschneidung der Farbspektrenbereiche bedingt durch die Streubreite jedes einzelnen Fluoreszenzfarbstoffes. Der Versuch mit Hilfe von vorgeschalteten Filtern und Blenden das Farbspektrum jedes Fluoreszenzfarbstoffes optimal auf sein spezifisches Strahlungsmaximum zu fokussieren, scheiterte an den zu dicht aneinander gelegenen Emissionsmaxima. Vor allem die beiden Fluoreszenzfarbstoffe PE und PI liegen mit ihrem spezifischen Strahlungsmaximum sehr dicht nebeneinander, so daß sie sich nach Gaußschem Verteilungsprinzip ihrer Farbspektren in einem nicht unerheblichen Teil sogar überlagern (siehe Abb. 20). Eine verwertbare und aussagekräftige Auswertung konnte damit nicht durchgeführt werden, ohne die einzelnen Farbspektren der drei Fluoreszenzfarbstoffe maßgeblich in ihrer spezifischen Emissionsstrahlung zu beschneiden. Die Folge war überdies ein hoher Verlust an wichtigem Datenmaterial. Die Möglichkeit eine andere Auswahl an Fluoreszenzfarbstoffen zu treffen, war aufgrund des definierten Anregungsspektrums des Argonlasers bei dem vorhandenen Durchflußzytofluorometer nicht gegeben. So überschritten der zeitliche Aufwand und die technischen Möglichkeiten, den Gewinn einer solchen Dreifach-Markierung.

Abb. 20: Schematische Darstellung der Absorptions- und Emissionsspektren der drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe FITC, R-PE und PI



Wie im Kurvendiagramm und in der nachfolgenden Tabelle ersichtlich ist, liegen die Absorptionsmaxima aller drei Fluoreszenzfarbstoffe im unmittelbaren Anregungsbereich des Argonlasers von 488 nm Wellenlänge. Hierdurch gelingt eine gleichzeitige und optimale Anregung aller drei Fluoreszenzfarbstoffe.

Die gezeigten Emissionskurven und die Tabellendaten der drei Fluoreszenzfarbstoffe veranschaulicht die Problematik bei der Messung des emittierten Lichtes. Aufgrund der ausgeprägten Überschneidung der Emissionskurven, vor allem im Rotlichtbereich von R-PE und PI, geht die Vorfilterung und Einblendung des spezifischen Emissionslichtes sehr zu Lasten der Sensitivität und ermöglicht damit nur mehr eine bedingt spezifische Analyse

Tab. 13: Wellenlängendaten über die Absorptions- und Emissionsmaxima der Fluoreszenzfarbstoffe FITC, R-PE und PI im nm Angaben

Fluoreszenzfarbstoff	Absorption	Emission
Fluorisoithiocyanin	488	525
R-Phycoerythrin R-PE	490, 565	575
Propidiumjodid PI	480 – 575	613

## 5. Diskussion

Weigel und Durrant konnten nachweisen, daß sich die Antigenmodulation, die Expression von verschiedenen Antigenen und die Bindungsfähigkeit in Bezug auf Antikörper bei länger kultivierten Zellen verändert (Weigel et al. 1983, S. 5091; Durrant et al. 1986 b, S. 42). Native Tumorzellen aus Karzinomgewebe kommen den *in vivo* Bedingungen eines Tumors näher als Zellen aus der Zellkultur. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war damit der schonende Aufschluß von Ovarialkarzinomgewebe und die zügige Tumorzellseparation, um anschließend die vitalen Ovarialkarzinomzellen in ihren Antigeneigenschaften zu charakterisieren und in Kultur zu bringen.

### 5.1 Einzelzellgewinnung über mechanisch-enzymatischen Gewebeaufschluß

In Anlehnung an die Doktorarbeit von Dr. Sabine Schwarze, die sich mit dem Aufschluß von soliden Tumoren im Modellversuch beschäftigte, wurde die kombinierte Technik des mechanisch-enzymatischen Gewebeaufschlusses verwendet (Harbeck et al. 1995, S. 1251; Schwarze 1997, S. 12 u. 13). Die von Dr. Sabine Schwarze gebrauchte automatische Zerkleinerungsvorrichtung (Bachofer, Reutlingen) für den Tumorgewebeaufschluß fand wegen ihrer unzureichenden Zerkleinerung des soliden Ovarialkarzinomgewebes keine Verwendung. Statt dessen wurde das solide Ovarialkarzinomgewebe manuell mit feinem Präparationsbesteck zerkleinert. Die MEDI Maschine (DAKO, Hamburg) wurde wegen der erhöhten Gefahr von Zellmembranschäden aufgrund der hohen Scherkräfte und der hohen Materialkosten nicht verwendet. Die enzymatische Desintegration der Zellverbände erfolgte mittels 0,005%iger Kollagenase D-Lösung. Nachfolgend wurde die Zellsuspension durch zwei unterschiedlich feinporige Nylon-Netze filtriert. Der gesamte Gewebeaufschluß erfolgte wegen der späteren Zellkultivierung unter sterilen Arbeitsbedingungen. Diese Art des kombinierten **mechanisch-enzymatischen Gewebeaufschlusses** wird kontrovers diskutiert. Einige Autoren propagieren allein die mechanische Präparation des Gewebes, da ihrer Meinung nach die enzyminduzierte Schädigung der Oberflächenstrukturproteine erheblich sei (Ferrero et al. 1990, S. 721). Im Vergleich zur Methode der Feinnadelpunktionstechnik oder der "Schabtechnik" konnte

ebenfalls eine höhere „Zellausbeute“ nachgewiesen werden (Lee et al. 1993, S. 197). Fowler konnte in seiner Arbeit zeigen, daß der Einsatz von Trypsin einen nachhaltigen Schaden an den Oberflächenepitopen der Zellen verursacht. So beobachtete er im Vergleich zu Kollagenase eine Andauung von CA 125 unter Trypsinbehandlung (Fowler et al. 1988, S. 842). In Kultur berichten Kemmner und Zaar über eine Aggregation von Kolonkarzinomzellen bei Anwendung von bereits geringsten Trypsinmengen (Kemmner et al. 1991, S.45). Durch mögliche Veränderungen am Bindungszentrum von Antigenen besteht die Gefahr, daß die Antikörper unfähig sind am Rezeptor anzubinden. König konnte bei erhöhter Kollagenase-Konzentration eine Zerstörung der Zellmembran nachweisen, unter gleichzeitiger Reduktion der intakten Zellen (König et al. 1993, S.808). Dr. Sabine Schwarze konnte ebenfalls an U 937-Zellen verdeutlichen, daß durch eine 0,005%ige Kollagenase D-Lösung eine optimale Desintegration mit nur minimaler Schädigung des uPA-Rezeptors erreicht wird, wohingegen mit steigender Konzentration der Kollagenase D-Lösung die Zerstörung der Antigene zunimmt (Schwarze 1997, S. 36 u. 37; Harbeck et al. 1995, S. 1952). Diese Versuchsergebnisse veranlaßten uns Kollagenase D-Lösung in 0,005%iger Form für den kombinierten mechanisch-enzymatischen Aufschluß des Gewebes zu verwenden. Einige Autoren befürworten ausschließlich die enzymatische Gewebeaufschließung, da nach deren Aussage der mechanische Gewebeaufschluß erhebliche Zellschäden durch die Scherkräfte an der Zellmembran, sowie Zellzerquetschung verursacht (Camplejohn 1992). Eine von Ljung, als auch von Hamburger durchgeführte Vergleichsstudie zwischen mechanischer und enzymatischer Gewebebehandlung, ergab eine höhere Rate an toten Zellen durch den mechanischen Aufschluß als durch den enzymatischen (Ljung et al. 1989, S. 156 u. 157; Hamburger et al. 1982, S. 947). Obwohl die mechanische Aufarbeitung des Tumorgewebes einen schnellen und einfachen Gewebeaufschluß ermöglicht, kann durch die fehlende Enzymeinwirkung ein erheblicher Anteil der Zellen nicht aus dem Zellverband gelöst werden und geht verloren. In Hinblick auf die Effizienz der Methode bestätigen Slocum und Pandis in ihren Arbeiten die Überlegenheit des kombinierten mechanisch-enzymatischen Aufschlusses gegenüber dem rein mechanischen und dem rein enzymatischen Aufschluß (Slocum et al. 1981, S. 225; Pandis et al. 1992, S. 17). Die ideale Gewebedisaggregation besteht damit aus einer optimalen mechanischen Zerkleinerung des Tumorgewebes und einer Zellmembran-schonenden Enzymdesintegration der Zellverbände.

## 5.2 Magnet-aktivierte Tumorzellisolierung – Gegenüberstellung verschiedener Zellsortierungssysteme

Nachdem sich Ovarialkarzinomgewebe aus einem Gemisch verschiedener Zellarten zusammensetzen, mußte eine einfache und schnelle Methode entwickelt werden, um die unterschiedlichen Zellarten voneinander zu separieren. Insbesondere galt es die Tumorzellen unter dem Gesichtspunkt der Primärkultivierung in einem hohen Reinheitsgrad und im vitalen Zustand anzureichern. Für diese Zwecke wurde die Magnet-aktivierte Tumorzellseparation aus einer Vielzahl verschiedener Methoden ausgewählt (siehe Tab. 2 unter Punkt 1.3.1).

Die Auftrennung des Zellgemisches in mehrere Zellschichten mit Hilfe eines **Dichtegradienten** ist eine einfache und schnelle Methode der Zellauftrennung. Dabei werden die verschiedenen homogenen Zellpopulationen je nach Zellgröße in einer bestimmten Flüssigkeitsphase angereichert und anschließend aus der gebildeten Zellbande abpipettiert. Laut Kedar lassen sich mit dieser Methode aus einer tumorzellangereicherten Suspension die Tumorzellen mit einer Reinheit von 70 – 90 % extrahieren (Kedar et al. 1982, S. 997). Andere Arbeitsgruppen sprechen von einer deutlich geringeren Ausbeute (30 – 40 %) und Wiederfindungsrate (20 – 30 %) an Tumorzellen (Durrant 1992, S. 61; Walle et al. 1983, S. 406). Das Problem liegt hauptsächlich an der Zellheterogenität der jeweiligen Tumorzellart. Im Falle der unterschiedlichen Zellgröße und Granularität der Tumorzellen aus Ovarialkarzinomgewebe gelingt keine einheitliche Anreicherung der Ovarialkarzinomzellen in einer Zellphase. Im Vergleich dazu können die heterogenen Ovarialkarzinomzellen aus einer Zellsuspension durch die MACS-Negativselektion mit einer Reinheit von 97 % bei einer Wiederfindungsrate zwischen 50 - 75 % angereichert werden (Harbeck et al. 1995, S. 1252).

Eine andere Möglichkeit der Zellseparation ist die **durchflußzytometrische Zellsortierung**. Diese Technik orientiert sich an einer Multiparameter-Analyse der Zellen. Sie stellt eine serielle und damit sehr langsame, aber genaue Separation der Zellen dar (Radbruch et al. 1995, S. 272). Die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung ist nur auf  $10^7$  Partikel pro Stunde ausgerichtet (Miltenyi et al. 1990, S. 236). Durrant verzeichnete in seinen Versuchen eine Ausbeute von 10 - 20 % an lebenden Zellen nach der Zellsortierung (Durrant 1992, S. 61). Diese Methode war

damit in Hinblick auf die geplante Kultivierung der Tumorzellen ungeeignet. Zusätzlich bedarf es für die Zellsortierung eines sehr teuren technischen Aufwandes und eines geschulten Personals.

Die **immunomagnetische Zellsortierung** arbeitet mit magnetbehafteten Partikeln, mit denen es gelingt Zellen, Zellorganelle und biologisch aktive Bestandteile aus einem Zellgemisch zu extrahieren. Dabei kann die Methode mit anderen Separationstechniken oder Identifikationsmethoden kombiniert werden. Die Technologie ist durch den geringen technischen Aufwand kostengünstig. Zudem ist diese Separationstechnik mit einer Rate von  $10^7 - 2 \times 10^8$  separierten Zellen innerhalb von 10-15 Minuten sehr schnell. Der Prozentsatz an lebenden Zellen liegt dabei mit ca. 70 % ebenfalls deutlich höher als bei der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung. Bei beiden Methoden ist jedoch zu bedenken, daß durch den zunehmenden Antikörpereinsatz die Wiederfindungsrate der Tumorzellen aufgrund von verstärkten unspezifischen Reaktionen abnimmt (Hata et al. 1993, S. 3362; Harbeck et al. 1995, S. 1252). In Abhängigkeit von den verwendeten Magnetpartikeln unterscheidet man im wesentlichen zwei Systeme: das in dieser Arbeit verwendete MACS-System und das Dynal-Verfahren (Firma Dynal, Oslo, Norwegen).

Das **MACS-System** basiert auf dem Einsatz von superparamagnetischen Partikeln (Microbeads) mit einer Größe von ca. 100 nm, wohingegen die großen ferromagnetischen Polystyrolkügelchen des **Dynal-Verfahrens** einen Durchmesser von 4,5 µm besitzen. Damit reicht ein einfacher Permanentmagnet zur Abtrennung der mit Dynabeads markierten und stark magnetisierten Zellen aus. Dies ermöglicht einen schnellen und einfachen Ablauf. Für die kleineren und magnetisch schwächeren Microbeads benötigt man dagegen ein stärkeres magnetisches Moment. Hierzu bedient man sich einer mit Stahlwolle gefüllten Säule, die durch einen starken, sie umgebenden Magneten magnetisiert wird. Der Vorgang der Zellauftrennung verläuft damit vergleichsweise langsamer als beim Dynal-Verfahren. Nichts desto trotz stellen die Größe der Polystyrolkügelchen und das starke Bindungsvermögen der Dynabeads an der Zelloberfläche eine Behinderung für weitere Antigenanalysen dar (Göttlinger et al. 1993, S. 534; Miltenyi et al. 1990, S. 236). Die Microbeads hingegen lassen sich aufgrund ihres geringen Bindungsvermögens leicht wieder von der Zelloberfläche ablösen (Miltenyi et al. 1990, S. 236). Darüber hinaus stellen die superparamagnetischen Partikel ein kleineres

sterisches Problem dar und besitzen eine geringere magnetische Wirkung in Hinblick auf weitere Antigenanalysen (Miltenyi et al. 1990, S. 236). Dr. Nadia Harbeck konnte am Durchflußzytofluorometer nachweislich zeigen, daß die Dynabeads im Gegensatz zu den Mikrobeads nachhaltig das Streulichtbild beeinflussen, und durch chemische Vorgänge im Rahmen der Konjugation eine beträchtliche Autofluoreszenz verursachen (Harbeck et al. 1995, S. 1252; Miltenyi et al. 1990, S. 236). Das MACS-System bietet damit die Vorteile einer einfachen und schnellen Separationstechnik, mit hoher Leistungsfähigkeit und einem hohen Maß an Spezifität und Sensitivität, ohne nachhaltig auf nachfolgende Untersuchungsverfahren Einfluß zu nehmen oder zu behindern (Miltenyi et al. 1990, S. 236). Dieses elegante Verfahren zur Anreicherung oder kompletten Selektion von bestimmten Zellarten kann für zwei verschiedene Separationsprinzipien angewendet werden: **Positiv- und Negativselektion**. Owen verwendete 1984, als einer der ersten, Magnet-aktivierte Antikörper in Kombination mit einer magnetischen Filtration für die effiziente Separation einer Zellpopulation aus einer Zellsuspension (Owen et al. 1984, S. 46). Die von Owen angewandte **Positivselektion** bei Blutzellen wurde von Martin 1998 zur Separation von disseminierten epithelialen Tumorzellen aus peripherem Blut benützt. Durch die angereicherten Tumorzellen aus dem Knochenmark und dem peripheren Blut konnten die Immunhistochemie-, Immunfluoreszenz-, Durchflußzytofluorometrie- und PCR-Untersuchungen bezüglich der Quantifizierung und molekulare Charakterisierung der metastasierten Tumorzellen verbessert werden (Martin et al. 1998, S. 258 u. 259). Da die Magnet-aktivierte Zellseparation weder die interzellulären Interaktionen, noch die Zelloberfläche nachhaltig beeinflusst, können an den isolierten Zellen nachfolgende durchflußzytometrische Analysen, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung u.ä. durchgeführt werden (Schmitz et al. 1994, S. 272). Chalmers behauptete 1998 durch den Einsatz eines quadratisch gepolten, magnetischen Feldes das System der immunomagnetischen Zellseparierung weiter verbessert werden zu können, indem die markierten Partikel zusätzlich nach ihrer magnetischen Stärke aufgetrennt werden. (Chalmers et al. 1998, S. 146). Auf diese Weise gelang es ihm die Lymphozyten aus den Blutleukozyten mit einer Reinheit von 99 % und mit einer Spezifität von 86 % zu gewinnen (Chalmers et al. 1998, S. 145). Partington kombinierte zur Verbesserung des Wirkungsgrades zwei verschiedene immunomagnetische Zellselektionssysteme: erstens die Markierung eines Zelloberflächenmarkers mit Mikrobeads

und zweitens die weitere Zelloberflächenmarkierung mit Dynabeads (Partington et al. 1999, S. 201). Obwohl die Positivselektion eine elegante Methode ist, um Zellen in einem sehr hohen Reinheitsgrad zu gewinnen, beschränkt sie sich auf die Isolierung von Zellpopulationen mit einheitlichem Antigenmuster. So bald kein spezifischer Antikörper gegen die Zielzellen existiert oder die Zielzellen kein gemeinsames Antigen aufweisen, stößt die Positivselektion an ihre Grenzen. Für die Anreicherung der heterogenen Ovarialkarzinomzellen bedurfte es daher eines anderen Selektionsprinzips. Durrant ging deshalb einen Schritt weiter, und befaßte sich mit der Technik der **Negativselektion** von Zellen. Er stellte 1992 eine elegante Technik zur Isolierung von kolorektalen Tumorzellen mit Hilfe eines Antikörpercocktails gegen die Nicht-Tumorzellen vor. Mit Hilfe dieses Antikörpercocktails (CD 45 AK, CDw14 AK, Thy-1 Antigen AK) wurden die Leukozyten und die Stromazellen von den Tumorzellen in der Zellsuspension abgetrennt. Zurück blieb eine Tumorzellsuspension mit einer Reinheit von 70 - 87 % (Durrant 1992, S. 61). Durrant präsentierte damit eine gelungene Möglichkeit, die heterogenen Tumorzellen mit einer sehr hohen Reinheit anzureichern. Formanek gelang es mit der MACS-Methode, humane Keratinozyten aus Mundschleimhaut nach dem Prinzip der Negativselektion in einer Reinheit von 98 % zu gewinnen (Formanek et al. 1998, S. 213). Die Sensitivität der MACS-Methode kann nach Fillola noch mehr gesteigert werden, indem die Affinität der Mikrobeads zu den monoklonalen Antikörpern durch den Einsatz isotypengerechter Beads verstärkt wird (Fillola et al. 1995, S. 131). Zwerner konnte nachweisen, daß der Reinheitsgrad von Tumorzellen gesteigert werden kann, wenn die verwendeten Antikörper mit einer 93 - 97%igen Treffersicherheit die unerwünschten Blutzellen markieren und aus der Suspension eliminieren (Zwerner et al. 1996, S. 202). Sitar gelang es durch die Kombination des Ficoll-Dichtegradienten und der Magnet-aktivierten Negativselektion die Reinheit an fetalen Erythrozyten aus Nabelschnurblut bis zur Homogenität zu steigern. Hierzu wurden die fetalen Erythrozyten zusammen mit den Monozyten in der Interphase des Ficoll-Dichtegradienten angereicht und anschließend von den Monozyten (CD 14 AK) durch die nachfolgende Magnet-aktivierte Negativseparation gereinigt (Sitar et al. 1999, S. 341). Durch die Anwendung eines Dreifachgradienten und einer nachgeschalteten Magnet-aktivierten Negativseparation konnte die Arbeitsgruppe von Gänshirt fetale Erythrozyten im mütterlichen Blut isolieren (Gänshirt et al. 1998, S. 282; Rank 2001, S. 41).

Trotz der nachweislichen Steigerung des Reinheitsgrades durch die Kombination der Magnet-aktivierten Negativselektion mit Dichtegradienten, sind all diese Verfahren nicht für die Anreicherung von heterogenen Zellpopulationen, im speziellen von Tumorzellen, geeignet (Walle et al. 1983, S. 405). Der Vorschlag einer zweistufigen immunomagnetischen Selektion, wie sie Partington durchführte, scheiterte ebenfalls an negativen Einflüssen der Dynabeads bei der Charakterisierung der Zellen am Durchflußzytofluorometer (Partington et al. 1999, S. 201). Der Versuch die Dynabeads mittels einer aufsteigenden Säurereihe von der Zelloberfläche abzulösen, barg eine zu große Gefahr, die Antigene nachhaltig für den weiteren Epitopnachweis zu schädigen. Für unser gesetztes Ziel, heterogene Ovarialkarzinomzellen aus solidem Tumorgewebe zu isolieren, um diese nachfolgend anzuzüchten und am Durchflußzytofluorometer zu charakterisieren, kristallisierte sich **das MACS-Verfahren nach dem Prinzip der Negativseparation** als die idealste Methode heraus. Durch diese Technik können die Zellen nach einmaligem Durchlauf mit einer Mindestreinheit von 70 % gewonnen und durch einen zweiten Durchgang bis auf 97 % gesteigert werden (Durrant 1992, S. 61; Harbeck et al. 1995, S. 1252).

### 5.3 Tumorzellkultivierung

Die Entwicklung einer **Kurzzeit-Kultur aus angereicherten Ovarialkarzinomzellen** wurde hauptsächlich von der Vorstellung getragen, die Zellen unter *in vitro* Bedingungen genauer beobachten und analysieren zu können, um in einem späteren Schritt die Zellen in Co-Kultur mit anderen Zellpopulationen anzuzüchten. Mit Hilfe von kurzzeit-kultivierten Zellen will man den Tumorzellen *in situ* von Seiten ihrer Beschaffenheit und Eigenschaften bedeutend näher kommen, als dies durch Tumorzellen in Langzeitkulturen der Fall ist (Weigel et al. 1983 S. 5091; Durrant et al. 1986 b S. 42). Neben zellbiologischen, metabolischen und genetischen Untersuchungen sollten auch Austestungen von Medikamenten, einschließlich Antitumor-Reagenzien an den Zellen möglich.

Es gibt zahlreiche Wege, Zellen in Kultur zu bringen oder Zellen für die Zellkultur aus frischem Gewebe zu extrahieren. Möbus favorisiert die mechanische Einzelzellgewinnung ohne gezielte Tumorzellselektion (Möbus et al. 1992, S. 77). Finch hingegen befürwortet bei der

Anzüchtung von Brustzellen die enzymatische Aufspaltung des Gewebes und die anschließende Anreicherung mittels Dichtegradientenzentrifugation (Finch et al. 1996, S. 369). Aus dem Knochenmark isolierte epitheliale Tumorzellen wurden bei Putz mittels Ficoll-Dichtegradienten für die Zellkultur angereichert (Putz et al. 1999, S. 241). Der von Moyer und Pandis bevorzugte kombinierte mechanisch-enzymatische Gewebeaufschluß, wurde auch von uns zur Gewinnung einer Zellsuspension aus frischem Ovarialkarzinomgewebe angewendet (Moyer 1995, S. 161; Pandis et al. 1992, S. 16). Für die Tumorzellkultivierung wurden die Ovarialkarzinomzellen jedoch zusätzlich mittels MACS-Technik nach dem Prinzip der Negativseparation angereichert. Die Erfolgsrate der Kultivierung ist jedoch nicht nur alleinig von der Art des Gewebeaufschlusses, sondern auch eng mit der Beschaffenheit des Gewebes vergesellschaftet. Die größte Aussicht auf eine erfolgreiche Zelllinienetablierung haben Zellen, die aus metastasiertem Tumorgewebe, aus Tumoren mit hohem Metastasierungspotential, Tumoren von Blutzellen, Melanomen und soliden, aszitesausbildenden Tumoren stammen (Moyer 1995, S. 154).

Obwohl sich die Anzüchtung von Zellen in den letzten 40 Jahren stark weiterentwickelt hat, hat man immer noch mit zahlreichen Problemen zu kämpfen. Eines der Hauptprobleme ist die Gefahr der Kontamination der Zellen mit mikrobiologischen Organismen. Obwohl man intensivste Anstrengungen unternimmt, um für aseptische Arbeitsbedingungen und sterile Gerätschaften zu sorgen, kann ein Restrisiko nie ganz ausgeschaltet werden. Je zeitaufwendiger der Prozeß vom Aufschluß bis zur Inkulturnahme der Zellen ist, um so größer ist die Gefahr mikrobiologischer Verunreinigungen. Um dieser Situation vorzubeugen, bemüht man sich Puffer-, Waschlösung und Nährmedien mit antimikrobiellen Substanzen zu versetzen. Möbus verwendete Penicillin und Streptomycin in einer Konzentration von 100 U/ml und 100 µg/ml (Möbus et al. 1994, S. 423). In Anlehnung daran fügten wir ebenfalls Penicillin und Streptomycin den Puffer- und Waschlösungen zu. In der Zellkultur benützten wir dagegen als Antibiotikum Gentamycin (50 µg/ml). Unter diesen Voraussetzungen ergab sich bei den Kurzzeitkulturen bis zu 30 Tagen kein Hinweis auf ein mikrobielles Wachstum.

Des weiteren bedürfen die Zellen noch einer Vielzahl anderer wichtiger Faktoren in Zellkultur. So benötigen manche Zellen zum Beispiel verschiedene Wachstumsfaktoren und essentielle Nährstoffe in Kultur, die ihnen zuvor durch den Organismus oder Zellverband zur Verfügung

standen. Möbus versuchte durch Zugabe von nicht-essentiellen Aminosäuren, Pyruvatsalzen und L-Glutamin die Tumorzellen optimal zu versorgen (Möbus et al. 1994, S. 423). Manche Arbeitsgruppen "füttern" die Zellen auch mit Wachstumsfaktoren, um das Anwachsen zu stimulieren. Finch fügte dem Nährmedium in den ersten 24 Stunden die laktationsfördernden Hormone Hydrokortison und Insulin für Brustzellen hinzu (Finch et al. 1996, S. 369). Durch Zugabe von Insulin und Androgen versuchte Putz die Zellen in ihrem Wachstum zu stimulieren (Putz et al. 1999, S. 242). Wir beschränkten uns lediglich auf die Anwendung von L-Glutamin. Neben den Schwierigkeiten die richtigen Nährstoffe für die Zellen *in vitro* einzusetzen, tritt bei der Kultivierung von Zellen aus dem Primärtumor ein weiteres Problem auf. Nachdem diese Zellen mehr an das Wachstum im Gewebeverband gewöhnt sind als Metastasen- oder Asziteszellen, ist es hier gerade entscheidend, die Zellen in der richtigen Zelldichte auszusäen. Eine zu geringe Zelldichte führt oftmals dazu, daß die Zellen nicht adhären können und in Kultur absterben (Moyer 1995, S. 156). Zu diesem Zwecke versuchten wir die Zellen in einer Größenordnung von  $0,5 \times 10^5$  Zellen pro ml Nährmedium anzuzüchten. Moyer behauptete, die zwei- bis vierfache Menge an Zellen pro ml Nährmedium wäre ideal (Moyer 1995, S. 162). Möbus setzte eine weitaus geringere Zahl an Zellen ein (Möbus et al. 1994, S. 423).

Ein weiteres Schlüsselproblem ist die Tatsache, daß Tumore sich nicht nur aus Tumorzellen, sondern auch aus mesenchymalen Zellen (z.B. Fibroblasten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen), Blutzellen (z.B. Makrophagen, Granulozyten, Lymphozyten und Erythrozyten) und Normalzellen aus dem Ursprungsgewebe zusammensetzen. Diese können zum einen durch bestimmte Selektionsmethoden weitgehend von den Tumorzellen eliminiert und / oder durch den Einsatz von speziellen wachstumshemmenden Substanzen in ihrer Vermehrung unterdrückt werden. Wir gebrauchten, wie Möbus, Finch und Moyer, speziell das fetale Kälberserum. Der Prozentsatz an fetalem Kälberserum schwankt je nach Arbeitsgruppe zwischen 5 bis maximal 20 % (Möbus et al. 1994, S. 423; Moyer 1995, S. 162). Um das Fibroblastenwachstum verstärkt zu hemmen, wurden bei Möbus und Putz die Kulturflaschen zuvor selektiv trypsiniert (Möbus et al. 1994, S. 423; Putz et al. 1999, S. 242). Finch setzte zusätzlich 20%iges Pferdeserum ein, um die mesenchymalen Zellen aus der Kultur zu verdrängen (Finch et al. 1996, S. 396). Dennoch darf bei all diesen Maßnahmen nicht außer Acht gelassen werden, daß gerade in soliden Primärtumoren mesenchymale Zellen als Energielieferanten für die

Tumorzellen fungieren. Einige Autoren sind deshalb besonders darauf bedacht, die mesenchymalen Zellen so weit zu erhalten, daß sie die Tumorzellen vor allem in der Anfangszeit bei der Adhärenz und Vermehrung unterstützen. Hierzu werden die Kulturflaschen mit Fibroblasten beschichtet. Die Fibroblasten werden danach durch Bestrahlung oder Behandlung mit Mitomycin C oder anderen nicht-trypsinhaltigen Substanzen irreversibel in ihrer Mitosefähigkeit geschädigt (Moyer 1995, S. 156).

Zusammenfassend sind für eine erfolgreiche Kultivierung von Tumorzellen folgende Punkte notwendig: eine Mindestanzahl an lebenden, isolierten Tumorzellen, eine ausreichende Zellkonzentration in Kultur, ein optimales Nährmedium und Keimfreiheit. Im Falle der optimalen Kultivierung der Tumorzellen aus frischem Ovarialkarzinomgewebe bedeutete dies: 70 % an lebenden, separierten Tumorzellen in einer Konzentration von  $0,5 \times 10^5$  Zellen pro ml Nährmedium, versetzt mit 20%igem fetalen Kälberserum, L-Glutamin und 50 µg Gentamycin pro ml Nährmedium, um für Keimfreiheit zu sorgen.

#### **5.4 Immunfluoreszente Tumorzelldetektion mit Hilfe von Antikörpern gegen CK 8/18/19 und uPA-R am Durchflußzytofluorometer**

Das **Durchflußzytofluorometer** ist ein komplexer Multiparameter-Analysator. Mit Hilfe eines Laserstrahls können die durch eine Meßküvette hindurchfließenden Einzelzellen hinsichtlich optischer Dichte, Streulicht und Fluoreszenzemission analysiert werden. Über Photomultiplier werden die optischen Meßergebnisse digital verarbeitet und in Form von Histogrammen, Scatterbildern oder dot-plot-Bildern präsentiert. Durch diese Multiparameteranalyse lassen sich Zellen und Zellpopulationen genauer charakterisieren. Diese Immunfluoreszenzanalyse diente in der vorliegenden Arbeit zur Charakterisierung der Zellpopulation der Ovarialkarzinomzellen und zur Berechnung der Effizienz der Magnet-aktivierten Zellseparation.

Oud setzte bereits 1985 CK-Antikörper zur Identifizierung von Tumorzellen aus Endometriumkarzinomen am Durchflußzytofluorometer ein (Oud et al. 1985, S. 161). Hierdurch konnte er die Tumorzellfraktion genauer analysieren. Zur weiterführenden Diagnostik von Leukämien verwendete Knapp spezifische Antikörper gegen die verschiedenen Leukozyten (CD 3, CD 15 etc.), um die entartete Leukozyten-Subpopulation zu detektieren

und anschließend in ihrer molekularbiologischen Beschaffenheit zu untersuchen (Knapp et al. 1994, S. 195). Im Falle des Ovarialkarzinoms wurden die angereicherten Ovarialkarzinomzellen, welche ein aus den Zytokeratinsubklassen 8/18/19 bestehendes Zytokeratingerüst besitzen, mit dem gegen Zytokeratin 8/18/19 gerichtete Antikörper CAM 5.2 markiert (Moll et al. 1982, S. 20). Damit der Antikörper an die intrazellulär lokalisierten Filamente anbinden konnte, mußte die Zellmembran permeabel gemacht werden. Dies geschah durch Fixierung in Paraformaldehyd- oder Ethanollösung, ohne nachhaltige chemisch-induzierte Veränderung zu verursachen (Feitz et al. 1985, S. 350). Diese Antikörper-Detektion ist jedoch nicht eindeutig spezifisch für die malignen Ovarialkarzinomzellen, da benigne Ovarialzellen, die ebenfalls epithelialen Ursprungs sind, aus den gleichen filamentären Zytokeratinen 8/18/19 aufgebaut sind (Moll et al. 1982, S. 20). Feitz befürwortete daher die simultane Detektion von zwei Antigenen auf einer Zellen, um: erstens die von Interesse bestehenden Zellen gezielt charakterisieren zu können, zweitens Subpopulation einer Zellart differenzieren zu können, drittens anteilig kleinere Zellfraktionen besser abzugrenzen (Feitz et al. 1985, S. 355). Unser Interesse in Bezug auf ein zweites Antigen für die simultane Detektion der Ovarialkarzinomzellen galt dabei dem uPA-Rezeptor. Dieser Rezeptor befindet sich auf der Zelloberfläche, sowie im Zytoplasma von invasiven bzw. metastasierungsfähigen Zellen, wie Tumorzellen, Leukozyten und Knochenmarkszellen usw. (Wohn et al. 1997, S. 544; Knapp et al. 1994, S. 195 ; Luther et al. 1997, S. 1238). Zum Nachweis des uPA-Rezeptors verwandten wir den gegen den uPA-Rezeptor gerichteten polyklonalen Antikörper #399R, welcher an keine definierte Region des Rezeptors anbindet. Damit ist er nicht für den quantitativen uPA-Rezeptor-Nachweis geeignet, welcher durch die konfokale Lasermikroskopie weiter verfeinert und visualisiert werden kann (Chucholowski et al. 1992, S. 209). Dennoch bedurfte es der Verwendung des polyklonalen uPA-R-AK #399R aus dem Tiersystem Kaninchen, da nur so bei der simultanen Detektion der Ovarialkarzinomzellen ungewollte Kreuzreaktionen mit dem CK-AK CAM 5.2 aus dem Tiersystem Maus vermieden werden konnten. Zugleich konnte der uPA-Rezeptor-AK #399R, im Gegensatz zum FITC beladenen CK-AK CAM 5.2, mit dem Fluoreszenzfarbstoff PE markiert werden. Damit wurde die Gefahr von unspezifischen Bindungsreaktionen hinsichtlich der fluoreszierenden Sekundärantikörper deutlich reduziert. Diese **simultane Doppelmarkierung der Ovarialkarzinomzellen mit dem CK-Antikörper**

**CAM 5.2 gegen Zytokeratin 8/18/19 und mit dem gegen den uPA-Rezeptor gerichteten Antikörper #399R** ermöglichte eine exakte Charakterisierung der Ovarialkarzinomzellen, als Zytokeratin 8/18/19-positive und uPA-Rezeptor-exprimierende Zellen (Knapp et al. 1994, S. 195). Zusätzlich diente der Nachweis des intakten uPA-Rezeptors dazu, die zell- und proteinschonende Wirkung des mechanisch-enzymatischen Gewebeaufschlusses und der Magnet-aktivierten Zellseparation nachzuweisen. Das Verfahren der kombinierten Antikörperdetektion läßt sich beliebig auf andere Antigene, Rezeptoren oder Proteine übertragen (Lianidou et al. 1999, S. 753; Knapp et al. 1994, S. 194).

### **5.5 Immunfluoreszente DNA-Analyse an Tumorzellen mit Hilfe von PI, CK 8/18/19 und uPA-R am Durchflußzytofluorometer**

Die Untersuchung von Prognosefaktoren bei Ovarialkarzinomen ist wichtig für die risikoadaptierte Behandlung und Nachsorge. Neben der Invasions- und Metastasierungsfähigkeit eines Tumors, sind Proliferationsfaktoren der Tumorzellen mitentscheidend für die Einstufung eines Tumors hinsichtlich seiner Malignität (Harbeck et al. 1994, S. 63). Die Ploidie des Tumors hat, wie die Studie von Kallioniemi zeigte, neben den klassischen klinischen Einstufungskriterien eine prognostische Signifikanz bei Ovarialkarzinomen, sowohl im Früh-, als auch im fortgeschrittenen Stadium (Kallioniemi et al. 1988, S. 337). Die DNA-Analyse im Zellzyklus liefert hierbei wichtige Informationen bezüglich des Wachstumspotentials des Tumors. Verglichen mit anderen Techniken hat die Durchflußzytofluorometrie für die DNA-Analyse stetig an Bedeutung zugenommen. Hinsichtlich der Stabilität und der Fluoreszenzintensität kristallisierte sich die Behandlung der Zellen mit RNase und PI im Vergleich zu den anderen Aufschluß- und Färbemethoden als besonders geeignet für Ethanol- und PFA-fixierte Zellproben heraus (Fried et al. 1976, S. 178; Krishan 1977, S. 342). Sehr häufig wird die Auswertung der DNA-Histogramme durch die noch vorhandenen Stroma- und Entzündungszellen behindert. Durch die Kombination der PI/RNase-Methode mit einem spezifischen Antikörper gegen Tumorzell-eigene filamentäre Zytokeratine konnte die DNA-Analyse der Tumorzellen am Durchflußzytofluorometer verbessert werden (Oud et al. 1985, S. 159; Kimmig et al. 1995, S. 108). Leers beobachtete

eine deutliche Anreicherung der aneuploiden Zellpopulation im Histogramm durch die selektive DNA-Analyse der Zytokeratin-positiven Tumorzellen (van der Linden et al. 1992, S. 163; Leers et al. 1995, S. 105). Auch bei Kimmig hatte die Zellzyklus-Analyse an den Zytokeratin-markierten Proben im Vergleich zu den unmarkierten Proben eine signifikant höhere S-Phase- und G<sub>2</sub>/M-Phase-Fraktion zum Ergebnis (Kimmig et al. 1995, S. 111). Die gezielte Separation der störenden Nicht-Tumorzellen aus dem Zellgemisch gestattet eine präzisere DNA-Analyse der angereicherten Tumorzellen (Park et al. 1988, S. 707; Harbeck et al. 1994, S. 66). Insgesamt kann die Multiparameter-Analyse bis auf drei Untersuchungsparameter erweitert werden. So konnte die Arbeitsgruppen von Ramaekers gleichzeitig im Durchflußzytofluorometer die DNA, verschiedene Zytokeratine und Proliferationsantigene bei Zellen untersuchen (Leers et al. 1997, S. 183; Schutte et al. 1995, S. 183). In unserem Falle führte die simultane Dreifachmarkierung von DNA, uPA-R und CK an den Ovarialkarzinomzellen im Durchflußzytofluorometer zu keinem Erfolg. Die Ursache lag an der all zu großen Überschneidung der Emissionsspektren, v.a. im Rotlichtbereich der Fluoreszenzfarbstoffe R-PE und PI (siehe Tab. 13 unter Punkt 4.6.3). Hierdurch war keine eindeutige Analyse der Fluoreszenzsignale möglich. Durch die begrenzte Auswahl an Fluoreszenzfarbstoffen innerhalb des Anregungsbereiches des Argonlaserlichtes konnten keine anderen Fluoreszenzfarbstoffe gewählt werden. Gleichzeitig waren die Photomultiplier an unserem FACS-Gerät ausschließlich auf diese drei Emissionsspektren ausgerichtet. Das Problem wäre nur mit der Verwendung eines anderen Lasers oder Zweitlasers, und der Erweiterung des Emissionsspektrums durch weitere Photomultiplier zu lösen gewesen.

Über die Wertigkeit der DNA-Ploidie und die prognostische Relevanz der S-Phasen-Fraktion sind sich die einzelnen Autoren noch nicht einig. Unklar ist, ob die Proliferationsmarker DNA und S-Phase in Zusammenschau mit den klassischen Prognosefaktoren gesehen werden müssen, oder ob sie unabhängig davon zu sehen sind. Die Antworten zu diesen Fragen können die Ergebnisse der noch laufenden Langzeitstudien liefern (Harbeck et al. 1994, S. 72).

In Zusammenschau aller Für und Wider stellt der kombinierte mechanisch-enzymatische Gewebeaufschluß des Ovarialkarzinomgewebes und die Magnet-aktivierte Zellseparation der Ovarialkarzinomzellen eine schnelle und einfache Methode dar, um Tumorzellen schonend aus einem Gewebeverband zu isolieren. Dies stellte eine maßgebliche Voraussetzung für die

erfolgreiche Kultivierung der Ovarialkarzinomzellen dar. Mittels dieser Technik konnte der Tumorzellanteil in der Negativfraktion im Vergleich zur Originalsuspension von durchschnittlich 22 % auf 83 % erhöht werden. Hierdurch wird eine Steigerung um das Vierfache erreicht, wobei der Anteil an vitalen Zellen bei 72 % lag.

## 6. Zusammenfassung

Der Schwerpunkt der Tumorforschung liegt in der Entwicklung eines individuellen, patientenorientierten Therapiekonzeptes. Die Tumorzellanalyse an frischem Karzinomgewebe auf der Zell- bzw. Proteinebene soll wichtige Informationen über Aggressivität und Proliferationstendenz eines tumorösen Prozesses liefern.

Das Ziel dieser Doktorarbeit war die Tumorzellseparation aus frischem Ovarialkarzinomgewebe zur immunzytochemischen Identifizierung mittels Durchflußzytofluorometrie und zur Primärkultivierung. Zur Gewinnung einer Zellsuspension wurde das Ovarialkarzinomgewebe durch ein **kombiniertes mechanisch-enzymatisches Gewebeaufschlußverfahren** aufgeschlossen. Das frische Tumorgewebe wurde mechanisch zerkleinert, mit Kollagenase-D-Lösung behandelt und anschließend zweimalig fraktioniert filtriert. Die Ovarialkarzinomzellen wurden nachfolgend durch das **MACS-Verfahren** nach dem Prinzip der **Negativseparation** in der Zellsuspension angereichert. Hierzu mußten die Nicht-Tumorzellen durch Antigen-spezifische Primärantikörper, gebunden an ferromagnetische Mikrobeads, markiert werden. Der Antikörper-Cocktail bestand aus Antikörpern, die gegen Leukozyten, inkl. Makrophagen, gegen Endothelzellen und gegen Fibroblasten gerichtet waren. Die markierten Nicht-Tumorzellen wurden durch die magnetisierte Stahlwolle-Säule der MACS-Vorrichtung aus der Zellsuspension extrahiert. Nach Fixierung der einzelnen Zellfraktionen erfolgte die **Multiparameter-Analyse am Durchflußzytofluorometer**. Durch simultane Doppelmarkierung der intrazellulären CK-Filamente und des uPA-Rezeptors wurden die Ovarialkarzinomzellen identifiziert. Als Antikörper dienten der direkt mit FITC konjugierte Antikörper CAM 5.2 gegen CK 8/18/19, und der indirekt mit PE detektierte Antikörper #399R gegen uPA-R.

Von den 36 mechanisch-enzymatisch aufgeschlossenen Ovarialkarzinomgeweben konnten bei 17 Zellsuspensionen die Ovarialkarzinomzellen mittels Magnet-aktivierter Separation angereichert und durchflußzytometrisch analysiert werden. Dabei betrug der mittlere Reinheitsgrad an Tumorzellen nach zwei Separationsdurchläufen 83 % mit einem 72%igen Anteil an vitalen Zellen. Dies entspricht einer Anreicherung um das Vierfache, ausgehend von einem durchschnittlichen Tumorzellanteil von 22 % in der Ausgangszellsuspension. Bei den

restlichen 18 Ovarialkarzinomgeweben scheiterte die weitere Zellseparation an der mangelnden Zellausbeute von unter 10 Mio. Zellen in der Zellsuspension, ausgehend von zu wenig erhaltenen Gewebematerial. Bei 10 aufgeschlossenen Zellfraktionen wurde zusätzlich die DNA-Verteilung (Ploidie, S-Phase) der einzelnen markierten Zellpopulationen am Durchflußzytofluorometer anhand von Histogrammen veranschaulicht und analysiert. Dazu wurden die fixierten Zellen vor der Messung mit RNase und PI behandelt. Bei 5 exemplarisch ausgewählten, separierten Tumorzellfraktionen aus frischem Ovarialkarzinomgewebe ist die Kultivierung der Ovarialkarzinomzellen über 30 Tage gelungen. Die kultivierten Zellen wurden anschließend über die simultane Doppelmarkierung mit CK-AK und uPA-R-AK charakterisiert. Hierbei zeigte sich eine erhöhte Bindungsdichte des Antikörpers #399R gegen uPA-R, möglicherweise bedingt durch ein verstärktes Bindungsvermögen des AK (Affinität) oder eine vermehrte uPA-R-Expression.

In dieser Dissertation konnte ein kombiniertes Verfahren zur Tumorzellgewinnung aus solidem Tumorgewebe erarbeitet werden. Durch die Kombination aus mechanisch-enzymatischem Gewebeaufschluß und Magnet-aktivierter Tumorzellisolierung mittels Negativseparation konnten die heterogenen Ovarialkarzinomzellen unter sterilen Bedingungen bis zu max. 91 % angereichert werden. Aufgrund des besonders Zell- und Antigen-schonenden Verfahrens ist es uns gelungen die separierten Ovarialkarzinomzellen zu kultivieren. Diese Voraussetzungen waren auch entscheidend für die erfolgreiche Immunfluoreszenzanalyse der Zellen am Durchflußzytofluorometer.

Aufbauend auf den erarbeiteten Verfahren sind weitere Studien von Interesse: Erweiterte durchflußzytometrische Multiparameteranalyse, z.B. in Bezug auf Strukturproteine oder Onkogene, Wirkungsanstestung von Chemotherapeutika an primärkultivierten Tumorzellen, Co-Primärkultivierung von Tumorzellen und Fibroblasten, Untersuchung der veränderten Expression bestimmter Oberflächenantigene und Enzyme in Einzelzellkultur und Co-Kultur.

Das nachfolgende Fernziel all dieser Untersuchungen ist die Erarbeitung eines auf den Patienten abgestimmten Therapiekonzeptes. Diese Doktorarbeit sollte mit der Etablierung einer schonenden Methode zur Isolierung vitaler und intakter Tumorzellen aus primären Ovarialkarzinomgewebe einen ersten Beitrag leisten.

## 7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

	Seite
Abb. 1: uPA-Molekül	4
Abb. 2: uPA-Rezeptor	6
Abb. 3: Proteolysekaskade des Urokinase-Systems	7
Abb. 4a: Prinzip der Positivseparation	9
Abb. 4b: Prinzip der Negativseparation	9
Abb. 5: Immunomagnetische Zellsortierung nach dem Prinzip der Negativseparation	18
Abb. 6: Prinzip des Durchflußzytometers	27
Abb. 7: Prinzip der Doppelmarkierung	29
Abb. 8: Vergleich der verschiedenen Leukozytenantikörper an PBL aus humanem Vollblut	43
Abb. 9: Spezifische Bindung des CK-AK CAM 5.2-FITC	45
Abb. 10: Spezifische Bindung des uPA-R #399R	45
Abb. 11: Durchflußzytometrisches Scatterbild eines mechanisch-enzymatisch aufgeschlossenen Ovarialkarzinoms	47
Abb. 12: Kreisdiagramm über die Vitalität der Einzelzellen vor und nach dem kombinierten mechanisch-enzymatischen Aufschluß	47
Abb. 13: Durchflußzytometrische Scatterbilder der Ausgangszellsuspension, Negativ- und Positivfraktion aus frischem Ovarialkarzinomgewebe	51
Abb. 14: Vergleich von Originalsuspension, Positiv- und Negativfraktion in Hinblick auf die prozentuelle Zellzusammensetzung	52
Abb. 15: Durchflußzytometrische Darstellung der kultivierten Ovarialkarzinomzellen in Gegenüberstellung zur Negativzellfraktion	54
Abb. 16: Doppelmarkierung der Ovarialkarzinomzellen mittels CAM 5.2 gegen CK 8/18/19 und uPA-R-AK #399R: Spezifischer Nachweis der angereicherten Ovarialkarzinomzellen in der Negativfraktion im Vergleich zur Ausgangszellsuspension	56

---

Abb. 17:	Vergleichende dot-plot-Bilder von Ausgangszellsuspension, Negativzellfraktion und kultivierten Zellen anhand immunzytochemischer Doppelmarkierung mit CK-AK CAM 5.2 und uPA-R-AK #399R	58
Abb. 18:	histographische DNA-Analyse mit PI an Originalsuspension und Negativfraktion in Zusammenschau mit der PBL-Kontrollpopulation	60
Abb. 19:	Vergleich von DNA-Analyse an separierten Ovarialkarzinomzellen mit und ohne Zytokeratin-Markierung	62
Abb. 20:	Schematische Darstellung der Absorptions- und Emissionsspektren der drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe FITC, PE und PI	64
Tab. 1:	Übersicht über die einzelnen Prognosefaktoren	2
Tab. 2:	Vor- und Nachteile der Separationstechniken	12
Tab. 3:	Verteilungsmuster der Gewebeprobe	14
Tab. 4:	Verwendete Antikörper für die Magnetseparation	21
Tab. 5:	Verwendete Antikörper für die Doppelmarkierung	31
Tab. 6:	Versuchsprotokoll der simultanen Antikörperdetektion CK / uPA-Rezeptor	33
Tab. 7:	Versuchsprotokoll der Doppelmarkierung von DNA und CK	36
Tab. 8:	Liste der weiteren ausgetesteten Antikörper	38
Tab. 9:	Versuchsprotokoll zur Austestung von unmarkierten Antikörpern am Beispiel von II D 7	40
Tab. 10:	Endgültiges Versuchsprotokoll zur Magnet-aktivierten Zellseparation von vitalen Tumorzellen aus frischem Ovarialkarzinomgewebe mittels Negativseparation	49
Tab.11:	Schematisches DNA-Histogramm einer diploiden und aneuploiden Zellpopulation	59
Tab. 12:	Prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen bei negativseparierten OVCA-Zellen mit und ohne CK-Markierung (siehe Versuch Abb. 19)	61
Tab. 13	Wellenlängendaten über die Absorptions- und Emissionsmaxima der Fluoreszenzfarbstoffe FITC, R-PE und PI in nm Angaben	64

## 8. Abkürzungsverzeichnis

$\alpha_2$ -AP	$\alpha_2$ - <u>A</u> nti <u>p</u> lasmin
ATF	<u>a</u> mino <u>t</u> erminal <u>f</u> ragment
BRCA 1-Gens	<u>B</u> reast <u>C</u> ancer Gene 1
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin
CD 87	uPA-Rezeptor (uPA-R)
CHO-uPA-R <sub>1-277</sub>	durch CHO-Zellen produzierter freier und rekombinanter uPA-R
CK	<u>C</u> yto <u>k</u> eratin
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>m</u> odified <u>E</u> agle's <u>m</u> edium
DNA	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> uclein <u>a</u> cid
DSS	N,N- <u>d</u> isuccinimidyl <u>s</u> uberat
DTAF	<u>D</u> ichloro <u>t</u> hiazinyl <u>A</u> mino <u>F</u> luorescein
EDTA	<u>E</u> thylendiamin <u>t</u> etra <u>e</u> ssigsäure (Triplex III)
em.	<u>e</u> meritiert
EMA	<u>E</u> pithelial <u>M</u> embrane <u>A</u> ntigen
EZM	<u>E</u> xtrazelluläre <u>M</u> atrix
FACS	<u>f</u> luorescenc <u>a</u> ctivated <u>c</u> ell <u>s</u> orter
FIGO	<u>F</u> édération <u>I</u> nternationale de <u>G</u> ynécologie et d' <u>O</u> bstétrique
FITC	<u>F</u> luorescein- <u>i</u> sothi <u>c</u> yanat
FKS	<u>f</u> etales <u>K</u> älberserum
FN	<u>F</u> ibro <u>n</u> ektin
FSC	<u>f</u> orward light <u>s</u> catter
G	<u>G</u> auge
g	Erdbeschleunigung
gr	Gramm
GFD-Domäne	<u>g</u> rowth <u>f</u> actor like <u>d</u> omain
GPI-Anker	<u>G</u> lykosyl <u>p</u> hosphatidyl <u>i</u> nositol
HCl	<u>H</u> ydrogen <u>ch</u> lorid
HMW-uPA	<u>H</u> igh- <u>m</u> olecular- <u>w</u> eight uPA

---

IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
KCl	<b>K</b> alium <b>ch</b> lorid
kDa	Kilo Dalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
LMW-uPA	<i>low-<b>m</b>olecular- <b>w</b>eight</i> uPA
MACS	<b>m</b> agnetic <b>a</b> ctivated <b>c</b> ell <b>s</b> orting
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
MMP	<b>M</b> atrix <b>m</b> etallo <b>p</b> roteinase
NaCl	<b>N</b> atrium <b>ch</b> lorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
nm	Nanometer
NaOH	Natriumhydroxid
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
OVCA	<b>O</b> varial <b>k</b> arzinom
OV-MZ-6#8	humane Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6 Klon 8
PAI	<b>P</b> lasminogen <b>A</b> ctivator <b>I</b> nhibitor
PAI-1	<b>P</b> lasminogen- <b>A</b> ktivator- <b>I</b> nhibitor Typ 1
PAI-2	<b>P</b> lasminogen- <b>A</b> ktivator- <b>I</b> nhibitor Typ 2
pAK	polyklonaler <b>A</b> ntikörper
PBL	<b>p</b> eriphere <b>B</b> lut <b>l</b> ymphozyten
PBS	<i><b>P</b>hosphate-<b>b</b>uffered <b>s</b>aline</i>
PCR	<i><b>P</b>olymerase <b>c</b>hain <b>r</b>eaction</i>
PCI	<b>P</b> rotein- <b>C</b> - <b>I</b> nhibitor
Penstrep	<b>P</b> enicillin + <b>S</b> treptomycin
PE-R	<b>R</b> - <b>P</b> hyco <b>e</b> rythrin
PFA	<b>P</b> ara <b>f</b> orma <b>l</b> dehyd
PI	<b>P</b> ropidium <b>J</b> odid
PL	<b>P</b> uffer <b>l</b> ösung

---

PN	<b><u>P</u>rotease <u>N</u>exin</b>
PN-1	<b><u>P</u>rotease <u>N</u>exin-1</b>
RNAse	<b><u>R</u>ibon<u>u</u>cle<u>a</u>se</b>
RPMI 1640	<b><u>R</u>oswell <u>P</u>ark <u>M</u>emorial <u>I</u>nstitute (Life Technologies, Faisley)</b>
RT	<b><u>R</u>aum<u>t</u>emperatur</b>
Serpin	<b><u>S</u>erinproteasen <u>I</u>nhibitor</b>
S-Phase	<b><u>S</u>ynthese-Phase</b>
SSC	90° <b><u>s</u>ide light <u>s</u>catter</b>
tPA	<b><i>t</i>issue-type <u>P</u>lasminogen <u>A</u>ctivator</b>
U	Unit
uPA	<b><u>U</u>rokinase-type <u>P</u>lasminogen <u>A</u>ctivator</b>
uPA-R	<b><u>U</u>rokinase-type <u>P</u>lasminogen <u>A</u>ctivator-<u>R</u>eceptor</b>
VN	<b><u>V</u>itron<u>e</u>ktin</b>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

## 9. Literaturverzeichnis

Abeln, E.C.A., Corver, V.E., Kuipers-Dijkshoorn, N.J., Fleuren, G.J., Cornelisse, C.J.

“Molecular genetic analysis of flow-sorted ovarian tumour cells: improved detection of loss of heterozygosity” *Br. J. Cancer* 70 (1994) 255-262

Andreasen, P.A., Kjoller, L., Christensen, L., Duffy, M.J.

“The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review” *Int. J. Cancer* 72 (1997) 1-22

Appella, E., Robinson, E.A., Ulrich, S.J., Stoppelli, M.P., Corti, A., Cassani, G., Blasi, F.

“The receptor-binding sequence of urokinase. A biological function for the growth-factor module of proteases” *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 4437-4440

Åstedt, B.

“Immunological identity of urokinase and ovarian carcinoma plasminogen activator released in tissue culture” *Nature* 261 (1976) 595-597

Bauer, J., Hymer, W.C., Morrison, D.R., Kobayashi, H., Seaman, G.V., Weber, G.

“Electrophoresis in space” *Adv. Space Biol. Med.* 7 (1999) 163-212

Becton Dickinson

“Einführung in die analytische Durchflußzytometrie” in: “FACScan” (1992) 4

Behrendt, N., Ploug, M., Pathy, L., Houen, G., Blasi, F., Dano, K.

“The ligand-binding domain of the cell surface receptor for urokinase-type plasminogen activator” *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 7842-7847

Behrendt, N., Ronne, E., Dano, K.

“The structure and function of the urokinase receptor, a membrane protein governing plasminogen activation on the cell surface” *Bio. Chem. Hoppe-Seyler* 376, (1995) 269-279

Bertoncello, I., Bradley, T.R., Watt, S.M.

“An improved negative immunomagnetic selection strategy for the purification of primitive hemopoietic cells from normal bone marrow” *Exp. Hematol.* 19 (1991) 95-100

Blasi, F.

“uPA, uPAR, PAI-1: Key intersection of proteolytic adhesive and chemotactic highways?” *Trends Immunol. Today* 18 (1997) 415 – 417

Blasi, F.

“Urokinase and urokinase receptor: A paracrine / autocrine system regulating cell migration and invasiveness” *BioEssays* 15 (1993) 105-111

Boyer, M., Townsend, L.E., Vogel, L.M., Falk, J., Reitz-Vick, D., Trevor, K.T., Villalba, M., Bendick, P.J., Glover, J.L.

“Isolation of endothelial cells and their progenitor cells from human peripheral blood” *J. Vasc. Surg.* 31 (2000) 181-189

Camplejohn, R.S.

“Flow cytometry in clinical pathology. Diagnostic molecular pathology: a practical approach” IRL Press, Oxford, 1992

Carr, T., Evanx, P., Campell, S., Bass, P., Albano, J.

“Culture of human renal tubular cells: positive selection of kallikrein-containing cells” *Immunopharmacology* 44 (1999) 161-167

Casslén, B., Bossmar, T., Lecander, I., Åstedt B.

“Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in blood and tumor fluids of patients with ovarian cancer” *Europ. J. Cancer* 30A (1994) 1302-1309

Casslén, B., Gustavsson, B., Åstedt, B.

“Cell-membrane receptors for urokinase plasminogen activator are increased in malignant ovarian tumors” *Europ. J. Cancer* 27 (1991) 1445-1448

Chalmers, J.J., Zborowski, M., Sun, L., Moore, L.

“Flow through, immunomagnetic cell separation” *Biotechnol. Prog.* 14 (1998) 141-148

Cheng, J., Sheldon, E.L., Wu, L., Heller, M.J., O’Connell, J.P.

“Isolation of cultured cervical carcinoma cells mixed with peripheral blood cells on a bioelectronic chip” *Anal. Chem.* 70 (1998) 2321-2326

Chucholowski, N., Schmitt, M., Goretzki, L., Schüren, E., Moniwa, N., Weidle, U., Kramer, M., Wagner, B., Jänicke, F., Graeff, H.

“Flow cytometry in tumour cell receptor analysis. Survey of the literature and recent developments concerning the urokinase-type plasminogen activator (uPA)” *Bioch. Soc. Transactions* 20 (1992) 208-216

Clevenger, C.V., Shankey, T.V.

"Cytochemistry II: Immunofluorescence measurement of intracellular antigens"

in : "Clinical flow cytometry: Principles and application" Bauer, K.D., Duque, R.E., Shankey, T.V. (Hrsg.), Williams & Wilkins Verlag, Baltimore-Hong Kong-London-Munich-Philadelphia-Sydney-Tokyo (1993) 1. Auflage, 157 – 161

Conese, M., Blasi, F.

“Urokinase / urokinase receptor system: Internalization / degradation of urokinase-serpin complexes: Mechanism and regulation” *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376 (1995) 143-155

Durrant, L.G.

“A rapid method for separating tumour infiltrating cells and tumour cells from colorectal tumours” *J. Immunological Methods* 147 (1992) 57-64

Durrant, L.G.

“A rapid method for separating tumour infiltrating cells and tumour cells from colorectal tumours” *J. Immunol. Methods* 147 (1992) 57-64

Durrant, L.G., Robins R.A., Pimm M.V., Perkins A.C., Armitage N.C., Hardcastle J.D. Baldwin R.W.

“Antigenicity of newly established carcinoma cell lines” *Br. J. Cancer* 53 (1986 b) 37-45

Dvorak

“Tumors: Wounds that do not heal” *N. Engl. J. Med.* 315 (1986) 1650-1659

Ethier, S.P., Mahacek, M.L., Gullick, W.J., Frank, T.S., Weber, B.L.

“Differential isolation of normal luminal mammary epithelial cells and breast cancer cells from primary and metastatic sites using selective media” *Cancer Res.* 53 (1993) 627-635

Feitz, W.F.J., Beck, H.L.M., Smeets A.W.G.B.

"Tissue-specific markers in flow cytometry of urological cancers: Cytokeratins in bladder carcinoma" *Int. J. Canc.* 36 (1985) 111-116

Ferrero, M., Spyrtos, F., Le Doussal, V., Desplaces, A., Rouesse, J.

“Flow Cytometric analysis of DNA content and keratins by using CK 7, CK 8, CK 19, and KL 1 monoclonal antibodies in benign and malignant human breast tumors” *Cytometry* 11 (1990) 716-724

Feunteun, J., Lenoir, G.M.

“BRCA1, a gene involved in inherited predisposition to breast and ovarian cancer” *Biochimica et Biophysica Acta* 1242 (1996) 177-180

Fillola, G., Müller, C., Bousquet, R., Fontanilles, A.M., Laharrague, P., Corberand, J.X.

“Isolation of bone marrow plasma cells by negative selection with immunomagnetic beads” *J. Immuno. Meth.* 190 (1995) 127-131

Finch, L.M.B., Craig, V.A., Kind, A.J., Schnieke, A., Scott, A., Wells, M., Wilde, C.J.  
“Primary culture of ovine mammary epithelial cells” *Bioch. Society Transactions* 24 (1996)  
369

Formanek, M., Temmel, A., Knerer, B., Willheim, M., Millesi, W., Kornfehl, J.  
“Magnetic cell separation for purification of human oral keratinocytes: an effective method  
for functional studies without prior cell subcultivation”  
*Eur. Arch. Otorhinolaryngol* 255 (1998) 211-215

Fowler, W.C., Maddock, M.B., Moore, D.N., Haskill, S.  
“Significance of multiparameter flow cytometric analysis of ovarian cancer” *Am. J. Obstet.  
Gynecol.* 158 (1988) 838-845

Fox, C.H., Johnson, F.B., Whiting, J., Roller, P.P.  
"Formaldehyde fixation" *J. Histochem. Cytochem.* 8 (1985) 845 – 853

Fried, J., Perez, A.G., Clarkson, B.C.  
“Flow cytofluorometric analysis of cell cycle distributions using propidium iodide” *J. Cell  
Bio.* 71 (1976) 172-181

Ganshirt, D., Smeets, F.W., Dohr, A., Walde, C., Stehen, I., Lapucci, C., Falcinelli, C., Sant,  
R., Velasco, M., Garritsen, H.S., Holzgreve, W.  
“Enrichment of fetal nucleated red blood cells from the maternal circulation for prenatal  
diagnosis: experiences with triple density gradient and MACS based on more than 600 cases”  
*Fetal Diagn. Ther.* 13 (1998) 276-286

Garau, D., Regazzi, E., Savoldo, B., Sammarelli, G., Rizzoli, V., Carlo-Stella, C.  
“Detection of breast cancer cells using the magnetic cell separation (MACS) system:  
implications for stem cell purging” *Eur. J. Histochem. Supp.* 41 (1997) 17-18

Göttlinger, C., Radbruch, A.

„Methoden der Zelltrennung“ Mta. 8,5 (1993) 530-536

Griwatz, C., Brandt, B., Assmann, G., Zanker, K.S.

„An immunological enrichment method for epithelial cells from peripheral blood“ J. Immunol. Methods 183 (1995) 251-265

Hamburger, A.W., White, C.P., Tencer, K.

“Effect of enzymatic disaggregation on proliferation of human tumor cells in soft agar” J. Nat. Cancer Inst. 68 (1982) 945-949

Harbeck, N., Schüren, E., Yamamoto, N., Schmitt, M., Höfler, H., Graeff, H.

"Development of a technique for isolation of intact tumor cells from fresh breast and ovarian cancer tissue use in analysis of tumour-associated proteolytic factors" Gyn. Geb. Runds. Suppl. 33 (1993) 277 – 279

Harbeck, N., Schwarze, S., Schüren, E., Yamamoto, N., Moniwa, N., Schmitt, M., Dettmar, P., Nathrath, W., Jänicke, F., Höfler, H., Graeff, H.

“Modell system for isolation of competent ovarian carcinoma cells from fresh tumor tissue” Int. J. Oncology 6 (1995) 1249-1254

Harbeck, N., Yamamoto, N., Moniwa, N., Schüren, E., Ziffer, P., Dettmar, P., Höfler, H., Schmitt, M., Graeff, H.

“Flow cytometry DNA analysis in primary breast cancer: technical pitfalls and clinical applications” Br. J. Cancer (1994) 63-74

Hata, H., Xioa, H., Petrucci, M.T., Woodliff, J., Chang, R., Epstein, J.

“Interleukin-6 gene expression in multiple myeloma: a characteristic of immature tumor cells” Blood 81 (1993) 3357-3364

Herbert, D.J., Nishiyama, R.H., Bagwell, C.B.

"Effects of several commonly used fixatives on DNA and total nuclear protein analyses by flow cytometry" *Amer. J. Clin. Pathol.* 91 (1989) 535 – 541

Hoffmann, G., Pollow, K., Weikel, W., Strittmatter, H.J., Bach, J., Schaffrath, M., Knapstein, P., Melchert, F., Pollow, B.

"Urokinase and plasminogen activator-inhibitor (PAI-1) status in primary ovarian carcinomas and ovarian metastases compared to benign ovarian tumors as a function of histopathological parameters" *Clin. Chem. Lab. Med.* 37 (1999) 47-54

Hoyer-Hansen, G., Ronne, E., Solberg, H., Behrendt, N., Ploug, M., Lund, L.R., Ellis, V., Dano, K.

"Urokinase plasminogen activator cleaves its cell surface receptor releasing the ligand-binding domain." *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 18224-18229

Jänicke, F., Hölscher, M., Kuhn, W., von Hugo, R., Pache, L., Siewert, J.R., Graeff, H.  
"Radikal surgical procedure improves survival time in patients with recurrent ovarian cancer"  
*Canc.* 70 (1992) 2129-2136

Jardi, M., Inglés-Esteve, J., Burgal, M., Azqueta, C., Velasco, F., López-Pedrera, C., Miles, L.A., Félez, J.

"Distinct patterns of urokinase-receptor (uPAR) expression by leukemic cells and peripheral blood cells" *Thromb. Haemost.* 76 (1996) 1009-1019

Kallioniemi, O.-P., Punnonen, R., Mattila, J., Lehtinen, M., Koivula, T.

"Prognostic significance of DNA index, multiploidy, and S-phase fraction in ovarian cancer"  
*Canc.* 61 (1988) 334-339

Kanse, S.M., Kost, C., Wilhelm, W.G., Andreasen, P.A., Preissner K.T.

"The urokinase receptor is a major vitronectin-binding protein on endothelial cells" *Exp. Cell Res.* 244 (1996) 344-353

Kedar, E., Ikejiri, B., Bonnard, G.D., Herberman, R.B.

“A rapid technique for isolation of viable tumor cells from solid tumors: use of the tumor cells for induction and measurement of cell-mediated cytotoxic responses” *Euro. J. Cancer Clin. Oncol.* 18 (1982) 991-1000

Kemmner, W., Zaar, P.

“Rapid aggregation and tight junction formation in single cell suspensions of tumor cells after very low dose trypsin treatment” *FEBS Lett.* 281 (1991) 43-46

Kimmig, R., Kapsner, T., Spelsberg, A., Untch, M., Hepp, H.

“DNA cell-cycle analysis of cervical cancer by flow cytometry using simultaneous cytokeratin labelling for identification of tumour cells” *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 121 (1995) 107-114

Knapp, W., Strobl, H., Majdic, O.

“Flow cytometric analysis of cell-surface and intracellular antigens in leukemia diagnosis” *Cytometry* 18 (1994) 187-198

Konig, J.J., van Dongen, J.W., Schroder, F.H.

“Preferential loss of abnormal prostate carcinoma cells by collagnase treatment” *Cytometry* 14 (1993) 805-810

Krishan, A.

“Flow cytometry: long-term storage of propidium iodide/citrate-stained material” *Stain Technology* 52 (1977) 339-343

Kuhn, W., Meier, W.

“Epidemiologie und Früherkennung”

in: “Maligne Ovarialtumoren: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge” Tumorzentrum München (Hrsg), München (1998) 5. Auflage, 1-6

Kuhn, W., Pache, L., Schmalfeldt, B., Dettmar, P., Schmitt, M., Jänicke, F, Graeff, H.  
“Urokinase (uPA) and PAI-1 predict survival in advanced ovarian cancer patients (FIGO III)  
after radical and platinum-based chemotherapy” *Gynecol. Oncol.* 84 (1994) 401-409

Lee, T.K., Wiley, A.L. Jr., Esinhart, J.D., Riley, R.S., Blackburn, L.D.  
“Variations associated with disaggregation methods in DNA flow cytometry” *Anal. Quant.  
Cytol. Histol.* 15 (1993) 195-200

Leers, M.P.G., Theunissen, P.H.M.H., Koudstaal, J., Schutte, B., Ramaekers, F.C.S.  
“Trivariate flow cytometric analysis of paraffin-embedded lung cancer specimens: application  
of cytokeratin subtype specific antibodies to distinguish between differentiation pathways”  
*Cytometry* 27 (1997) 179-188

Leers, M.P.G., Theunissen, P.H.M.H., Schutte, B., Ramaekers, F.C.S.  
“Bivariate Cytokeratin/DNA flow cytometric analysis of paraffin-embedded samples from  
colorectal carcinomas” *Cytometry* 21 (1995) 101-107

Lianidou, E.S., Levesque, M.A., Katsaros, D., Angelopoulou, K., Yu, H., Genta, F., Arisio,  
R., Massobrio, M., Bharaj, B., Diamandis, E.P.  
“Immunofluorometric assay of p53 protein versus sequencing of p53 exons 5 to 9 for  
detection of p53 abnormalities in ovarian carcinoma” *Am. Cancer Res.* 19 (1999) 749-756

Ljung, B.M., Mayall, B., Lottich, C., Boyer, C., Sylvester, S.S., Leight, G.S., Siegler, H.F.,  
Smith, H.S.  
“Cell dissociation techniques in human breast cancer- variation in tumor cell viability and  
DNA ploidy” *Breast Cancer Research and Treatment* 13 (1989) 153-159

Luther, T., Magdolen, V., Albrecht, S., Kasper, M., Riemer, C., Kessler, H., Graeff, H., Müller, M., Schmitt, M.

"Technical advance epitope-mapped monoclonal antibodies as tools for functional and morphological analyses of the human urokinase receptor in tumor tissue" *Am. J. Pathol.* 150 (1997) 1231-1244

Maas, R.A.

"Immuno magnetic purification of human breast carcinoma cells allows tumour specific detection of multidrug resistance gene 1-mRNA by reverse PCR in fine needle aspirates" *Labor. Invent.* 72 (1995) 760 – 764

Marks, J.R., Davidoff, A.M., Kerns, B.J., Humphrey, P.A., Pence, J.C., Dodge, R.K., Clarke-Pearson, D.L., Iglehart, J.D., Bast, R.C., Berchuck, A.

"Overexpression and mutation of p53 in epithelial ovarian cancer" *Canc. Research* 51 (1991) 2979-2984

Martin, V.M., Siewert, C., Scharl, A., Harms, T., Heinze, R., Ohl, S., Radbruch, A., Miltenyi, S., Schmitz, J.

„Immunomagnetic enrichment of disseminated epithelial tumor cells from peripheral blood by MACS" *Exp. Hematol.* 26 (1998) 252-264

Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W., Radbruch, A.

"High gradient magnetic cell separation with MACS" *Cytometry* 11 (1990) 231-238

Möbus, V., Gerharz, C.D., Press, U., Moll, R., Beck, T., Mellin, W., Pollow, K., Knappstein, P.G., Kreienberg, R.

"Morphological, immunohistochemical and biochemical characterization of 6 newly established human ovarian carcinoma cell lines" *Int. J. Cancer* 52 (1992) 76-84

Möbus, V.J., Moll, R., Gerharz, C.D., Kieback, D.G., Weikel, W., Hoffmann, G., Kreienberg, R.

“Establishment of new ovarian and colon carcinoma cell lines: differentiation is only possible by cytokeratin analysis” *Br. J. Cancer* 69 (1994) 422-428

Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B., Krepler, B.

"The catalogue of human cytokeratins: Pattern of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells" *Cell* 31 (1982) 11-24

Moller, L.B.

“Structure and function of the urokinase receptor” *Review Blood Coagul. Fibrinol.* 4 (1993) 293-303

Moyer, M.P.

“Tumor Cell Culture” *Meth. in Enzymology* 254 (1995) 153-165

Mutch, D.G., Williams, S.

“Biology of epithelial ovarian cancer” *Clin. Obstetr. Gynecol.* 37 (1994) 406-422

Nielsen, L.S., Kellerman, G.M., Behrendt, N., Picone, R., Dano, K., Blasi, F.

“A 55,000 – 60,000  $M_r$  receptor protein for urokinase-type plasminogen activator” *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 2358-2363

Nykjær, A., Conese, M., Christensen, E.I., Olson, D., Cremona, O., Gliemann, J., Blasi, F.

“Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA: serpin complexes” *EMBO J.* 16 (1997) 2610- 2620

Nykjær, A., Møller, B., Todd III, R.F., Christensen, T., Andreasen, P. A., Gliemann, J., Petersen, C.M.

“Urokinase receptor: An activation antigen in human T-lymphocytes” *J. Immunol.* 152 (1994) 505 – 516

Oud, P.S., Henderik, J.B.J., Beck, H.L.M., Veldhuizen, J.A.M., Vooijs, G.P., Herman, C.J., Ramaeckers, F.C.S.

“Flow cytometric analysis and sorting of human endometrial cells after immunocytochemical labeling for cytokeratin using a monoclonal antibody” *Cytometry* 6 (1985) 159-164

Owen, C.S., Sykes, N.L.

“Magnetic labeling and cell sorting” *J. Immunol. Methods* 73 (1984) 41-48

Pandis, N., Heim, S., Bardi, G., Limon, J., Mandahl, N., Mitelman, F.

“Improved technique for short-term culture and cytogenetic analysis of human breast cancer” *Genes Chromosomes Cancer* 5 (1992) 14-20

Park, C.H., Lee, S.H., Stephens, R.L., Smith, T.K., Park, M.H.

“Flow cytometry DNA analysis on tumor cell subpopulation of human tumor specimens by exclusion of lymphohemopoietic cells” *J. Histochem. Cytochem.* 36 (1988) 705-709

Partington, K.M., Jenkinson, E.F., Anderson, G.

“A novel method of cell separation based on dual parameter immunomagnetic cell selection” *J. Immunol. Methods* 223 (1999) 195-205

Plesner, T., Ralfkiaer, E., Wittrup, M., Johnsen, H., Pyke, C., Pedersen, T.L., Hansen, N.E, Dano, K.

“Expression of the receptor for urokinase-type plasminogen activator in normal and neoplastic blood cells and hematopoietic tissue” *Am. J. C. P.* 102 (1994) 835-841

Ploug, M., Behrendt, N., Lober, D., Dano, K.

“Protein structure and membrane anchorage of the cellular receptor for urokinase-type plasminogen activator” *Sem. Thromb. Hemost.* 17 (1991) 183-192

Ploug, M., Ellis, V., Dano, K.

“Ligand interaction between urokinase-type plasminogen activator and its receptor probed with 8-anilino-1-naphthalenesulfonate. Evidence for a hydrophobic binding site exposed only on the intact receptor” *Biochem.* 33 (1994) 8991-8997

Plow, E.F., Herren, T., Redlitz, A., Miles, L.A., Hoover-Plow, J.L.

“The cell biology of the plasminogen system” *FASEB J.* 9 (1995) 939-945

Pujade-Lauraine, E., Lu, H., Mirshahi, S., Soria, J., Bernadou, A., Kruithof, E.K.O., Lijnen, H.R., Burtin, P.

“The plasminogen-activation system in ovarian tumors” *Int. J. Cancer* 55 (1993) 27-31

Putz, E., Witter, K., Offner, S., Stosiek, P., Zippelius, A., Johnson, J., Zahn, R., Riethmüller, G., Pantel, K.

“Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow for patients with solid epithelial tumors: Establishment of working models for human micrometastases” *Can res* 59 (1999) 241-248

Radbruch, A., Recktenwald, D.

„Detection and isolation of rare cells” *Current Opinion in Immunology* 7 (1995) 270-273

Rank, K.

“Modellsystem zur Isolierung fetaler Erythrozyten aus frischem Plazentagewebe mit Hilfe der magnetisch aktivierten Zellseparation.” *Dissertation TU München* (2001)

Renolds, C.P., Seeger, R.C., Vo, D.D., Black, A.T., Wells, J., Ugelstad, J.

“Model system for removing neuroblastoma cells from bone marrow using monoclonal antibodies and magnetic immunobeads” *Canc. Res.* 46 (1986) 5882 – 5886

Reuning, U., Hapke, S., Fischer, K., Lutz, V., Wilhelm, O., Magdolen, V., Graeff, H., Schmitt, M.

“Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis (review)” *Int. J. Oncol.* 13 (1998) 893-906

Schmalfeldt, B., Kuhn, W., Reuning, U., Pache, L., Dettmar, P., Schmitt, M., Jänicke, F., Höfler, H., Graeff, H.

“Primary tumor and metastasis in ovarian cancer differ in their content of urokinase-type plasminogen activator, its receptor, and inhibitors types 1 and 2” *Cancer Research* 55 (1995) 3958-3963

Schmitt, M., Harbeck, N., Thomssen, C., Wilhelm, O., Magdolen, V., Reuning, U., Ulm, K., Höfler, H., Jänicke, F., Graeff, H.

“Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: Prognostic relevance and target for therapy” *Thromb. Haemost.* 78 (1997) 285-296

Schmitt, M., Wilhelm, O., Jänicke, F., Magdolen, V., Reuning, U., Ohi, H., Moniwa, N., Kobayashi, H., Weidle, U., Graeff, H.

“Urokinase-Type plasminogen activator (uPA) and its receptor (CD87): A new target in tumor invasion and metastasis” *J. Obstet. Gynaecol.* 21 (1995) 151-165

Schmitz, B., Radbruck, A., Kümmel, T., Wickenhauser, C., Korb, H., Hansmann, M.L., Thiele, J., Fischer, T.

“Magnetic activated cell sorting (MACS) – a new immunomagnetic method for megakaryocytic cell isolation: Comparison of different separation techniques” *Eur. J. Haematol.* 52 (1994) 267-274

Schutte, B., Tinnemans, M.M.G.J., Pijpers, G.F.P., Lenders, M.H.J.H., Ramaekers, F.C.S.

“Three parameter flow cytometric analysis for simultaneous detection of cytokeratin, proliferation associated antigens and DNA content” *Cytometry* 21 (1995) 177-186

Schwarze, S.

“Modellsystem zur Isolierung maligner Zellen aus frischem Tumorgewebe mit Hilfe magnetisch aktivierter Zellseparation“ Dissertation TU München (1997)

Sitar, G., Garagna, S., Zuccotti, M., Falcinelli, C., Montanari, L., Alfei, A., Ippoliti, G., Redi, C.A., Moratti, R., Ascari, E., Forabosco, A.

“Fetal erythroblast isolation up to purity from cord blood and their culture in vitro” *Cytometry* 35 (1999) 337-345

Slocum, H.K., Pavelic, Z.P., Kanter, P.M., Nowak, N.J., Rustum, Y.M.

“The soft agar clonogenicity and characterization of cells obtained from human solid tumors by mechanical and enzymatic means” *Chemother. Pharamcol* 8 (1981) 219-225

Stimpfl, M., Schmid, B.C., Schiebel, I., Tong, D., Leodolter, S., Obermair, A., Zeillinger, R.

“Expression of mucins and cytokeratins in ovarian cancer cell lines” *Cancer Lett.* 145 (1999) 133-141

Torhorst J.

“Eierstöcke” in: “Allgemeine und spezielle Pathologie” Riede U.N., Schaefer H.E. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 1993, 3. Auflage, 846-855

van der Burg, M.E.L., Henzen-Logmans, S.C., Berns, E.M.J.J., van Putten, W.L.J., Klijn, J.G.M., Foekens, J.A.

“Expression of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in benign, borderline, malignant primary and metastatic ovarian tumors” *Int. J. Cancer* Vol. 69 (1996) 475-479

van der Linden, J.C., Herman, C.J., Boenders, J.G.C., van des Sandt, M.M., Lindeman, J.

“Flow cytometric DNA content of fresh tumor specimens using keratin-antibody as second stain for two-parameter analysis” *Cytometry* 13 (1992) 163-168

Vassalli, J.D., Baccino, D., Belin, D.

“A cellular binding site for the Mr 55,000 form of the human plasminogen activator, urokinase” *J.Cell Biol.* 100 (1985) 86-92

Vogelstein, B., Kinzler, K.W.

„The multistep nature of cancer“ *Trends Genet. Review* 9 (1993) 138 – 141

von Schonfeldt, V., Krishnamurthy, H., Foppiani, L., Schlatt, S.

„Magnetic cell sorting is a fast and effective method of enriching viable spermatogonia from Djungarian hamster, mouse, and marmoset monkey testes” *Biol. Reprod.* 61 (1999) 582-589

Vona, G., Sabile, A., Louha, M., Sitruk, V., Romana, S., Schutze, K., Capron, F., Franco, D., Pazzagli, M., Vekemans, M., Lacour, B., Brechot, C., Paterlini-Brechot, P.

“Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells” *Am. J. Pathol.* 156 (2000) 57-63

Waggoner, A.S.,

"Fluorescent reagents for flow cytometry"

in: "Clinical flow cytometry: Principles and application" Bauer, K.D., Duque, R.E., Shankey, T.V. (Hrsg.), Williams & Wilkins Verlag, Baltimore-Hong Kong-London-Munich-Philadelphia-Sydney-Tokyo, 1993, 1. Auflage, 111-116

Walle, A., Dodama, T., Melamed, M.R.

“Simple density gradient for enriching subfractions of solid tumor cells” *Cytometry* 3 (1983) 402-407

Wang, X.B., Yang, J., Huang, Y., Vykoukal, J., Becker, F.F., Gascoyne, P.R.

“Cell separation by dielectrophoretic field-flow-fractionation” *Anal. Chem.* 72 (1998) 832-839

Weigel, P.H., Oka, K.H.

“The surface content of asialoglycoprotein receptors on isolated hepatocytes is reversibly modulated by changes in temperature” *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 5089-5094

White, W.F., Barlow, G.H., Mozen, M.M.

“The isolation and characterization of plasminogen activators (urokinase) from human urine” *Bioch.* 5 (1966) 2160-2169

Wie, Y., Waltz, A.D., Rao, N., Drummond, R.J., Rosenberg, S., Chapman, H.A.

“Identification of the urokinase receptor as an adhesion receptor for vitronectin” *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 32380-32388

Wilhelm, O., Hafter, R., Henschen, A., Schmitt, M., Graeff, H.

“Role of plasmin in the degradation of the stroma-derived fibrin in human ovarian cancer” *Blood* 75 (1990) 1673-1678

Wohn, K.D., Kanse, S.M., Deutsch, V., Schmidt, T., Eldor, A., Preissner, K.T. “The urokinase-receptor (CD 87) is expressed in cells of the megakaryoblastic lineage.” *Thromb Haemost* 77 (1997) 540-547

Wood, J.C.S.

"Clinical flow cytometry instrumentation" in: "Clinical flow cytometry: Principles and application" Bauer, K.D., Duque, R.E., Shankey, T.V. (Hrsg.), Williams & Wilkins Verlag, Baltimore-Hong Kong-London-Munich-Philadelphia-Sydney-Toky (1993) 1. Auflage, 71-92

Xue, W., Kindzelskii, A.L., Todd III, R.F., Petty, H.R..

“Physical association of complement receptor type 3 and urokinase-type plasminogen activator receptor in neutrophil membranes” *J. Immunol.* 152 (1994) 4630 – 4640

Yaremko, M.L., Keleman, P.R., Kutza, C., Barker, D., Westbrook, C.A.

“Immunomagnetic separation can enrich fixed solid tumors for epithelial cells” *Am. J. Pathol.* 148 (1996) 95-104

Young, T.N., Rodriguez, G.C., Moser, T.L., Bast, R.C., Pizzo, S.V., Stack, M.S.

“Coordinate expression of urinary-type plasminogen activator and its receptor accompanies malignant transformation of the ovarian surface epithelium” *Am. J. Obstet. Gynecol.* 170 (1994) 1285-1296

Zwerner, R.K., Schmittling, R.J., Russell, T.R.

“A simple and rapid method for removal of specific cell population from whole blood” *J. Immuno. Meth.* 198 (1996) 199-202

## 10. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Claudia Wasmeier  
geboren: 02. Jan.1972 in Plattling  
Eltern: Helmut und Margot (geb. Blenklein) Wasmeier

### Schulausbildung:

1978-1982 Besuch der Grundschule, Plattling  
1982-1991 Besuch des Comenius-Gymnasiums, Deggendorf  
Abschluß: Allg. Hochschulreife

### Hochschulausbildung:

1991-1998 Studium der Humanmedizin  
1991-1994 Vorklinischer Abschnitt an der Universität Regensburg  
1994-1997 Klinischer Abschnitt an der Technischen Universität München  
1997-1998 Praktisches Jahr

- Chirurgie: Waidspital, Zürich
- Gynäkologie / Geburtshilfe: Frauenklinik rechts der Isar, München
- Innere: Stadtkrankenhaus München-Bogenhausen, München

### Promotionsarbeit:

Anfertigung der Dissertation in der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik der TU München, Klinikum rechts der Isar  
(Leiter Prof. Dr. M. Schmitt, ehemaliger Direktor bis Oktober 2000  
Prof. em. Dr. H. Graeff, Direktorin Prof. Dr. Marion Kiechle)

**Berufspraxis:**

- 09/1998-03/1999    ÄiP in der I. Frauenklinik der LMU München,  
Direktor Prof. Dr. G. Kindermann
- 04/1999-02/2000    ÄiP in der Abteilung Urologie des Stadtkrankenhauses München-  
Bogenhausen, Chefarzt Prof. Dr. A. Schilling
- 03/2000-05/2000    Assistenzärztin in der Abteilung Urologie des Stadtkrankenhauses  
München-Bogenhausen, Chefarzt Prof. A. Schilling
- 06/2000-12/2001    Assistenzärztin in der Abteilung Chirurgie in der Ilmtalklinik  
Pfaffenhofen, Chefarzt Dr. R. Burgert und ltd. Arzt Dr. B. Mrozek,
- seit 01/2002        Assistenzärztin in der Abteilung Urologie des Klinikums Landshut,  
Chefarzt Dr. K.-H. Rothenberger

## 11. Danksagung

### **Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei:**

- OÄ PD Dr. Nadia Harbeck als Betreuerin und Doktormutter für die Einweisung in das Thema, für die fachkundigen Ratschläge, Diskussionen und für die Durchsicht dieser Arbeit.
- Prof. Dr. Manfred Schmitt, Leiter der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik der TU München, Klinikum rechts der Isar, für die Vergabe des Themas, für hilfreiche Diskussionen, Anregungen und kritische Betrachtungen der Ergebnisse.
- Prof. em. Dr. Henner Graeff, ehemals Direktor der Frauenklinik der TU München, Klinikum rechts der Isar, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in der Frauenklinik der TU München und sein stetes Interesse am Fortgang der Doktorarbeit.
- Prof. Dr. Marion Kiechle, Direktorin der Frauenklinik der TU München, Klinikum rechts der Isar für die weitere Bereitstellung des Arbeitsplatzes.
- Dr. Sabine Schwarze für die Einweisung in die Arbeitsmethoden und Hilfestellung bei methodischen Problemen.
- Dr. Peer Dettmar für die fachkundige Unterstützung auf dem Gebiet der Pathologie.
- Dominik Helmecke, BTA, für die aufopfernde Mithilfe bei den Experimenten und Messungen.
- Allen Laborkolleginnen und -kollegen der Klinischen Forschergruppe für die Anregungen, die Unterstützung bei den Experimenten und besonders für das angenehme Arbeitsklima.
- Meinen Eltern für ihre stete Unterstützung, Sieglinde und Dieter Wochnik für die Durchsicht der Arbeit, und Florian für seine Geduld und unermüdliche Hilfe am Computer.