

**II. Medizinische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar**

**Kultivierung und Charakterisierung
von Primärtumorzelllinien
aus Aszites und Pleuraergüssen
von Patienten mit fortgeschrittenen gastrointestinalen Tumoren**

vorgelegt von

Preißler Sieglinde

Sommer 2004

**II. Medizinische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar**

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid)

**Kultivierung und Charakterisierung
von Primärtumorzellen
aus Aszites und Pleuraergüssen
von Patienten mit fortgeschrittenen gastrointestinalen Tumoren**

Sieglinde Preißler

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. apl. Prof. Dr. Chr. Lersch

2. Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid

Die Dissertation wurde am 30.09.2004 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.11.2004 angenommen

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Bedeutung der Zellkultur.....	1
1.2 Bedeutung der primären Zellkultur.....	2
1.3 Fragestellung.....	2
2. Material und Methoden.....	4
2.1 Untersuchungsmaterial.....	4
2.2 Methoden.....	7
2.2.1 Benennung der Zelllinien.....	7
2.2.2 Zellkultur.....	7
2.2.2.1 Materialverarbeitung.....	7
2.2.2.2 Zellzählung.....	7
2.2.2.3 Percoll-dichtegradient.....	8
2.2.2.4 Zellkultivierung.....	8
2.2.2.5 Verwendung von 3T3-Feeder-Zellen bei niedriger Zellzahl.....	9
2.2.2.6 Ablösen der Zellen.....	9
2.2.2.7 Einfrieren und Auftauen der Zellen.....	10
2.2.3 Methoden zur Selektion der Tumorzellen.....	10
2.2.3.1 Magnetische Zellsortierung mit MicroBeads.....	10
2.2.3.2 Zellklonierung.....	11
2.2.3.2.1 Klonierung durch Verdünnung (limiting dilution).....	11
2.2.3.2.2 Weichagarklonierung.....	12
2.2.4 Methoden zum Nachweis von Tumorzellen.....	13
2.2.4.1 Durchflusszytometrische Messung.....	13

2.2.4.2 DNA-Messung.....	15
2.2.5 Induktion der Oberflächenantigenexpression.....	16
2.2.5.1 Galaktose Medium.....	16
2.2.5.2 Natrium-Butyrat.....	16
2.2.5.3 Phorbol 12-Myristat 13-Acetat.....	16
2.2.5.4 Human Transforming Growth Factor beta 1.....	17
2.2.6 Charakterisierung.....	17
2.2.6.1 Immunfluoreszenzfärbung mit anti-p53-Antikörper.....	17
2.2.6.2 Hormonbestimmung im Kulturmediumüberstand.....	18
2.2.6.2.1 Bombesinbestimmung.....	19
2.2.6.2.2 Somatostatinbestimmung.....	20
2.3 Statistik.....	20
3. Ergebnisse.....	21
3.1 Zellkultur.....	21
3.1.1 Etablierte Zelllinien.....	21
3.1.2 Morphologie und Differenzierungsgrad.....	22
3.2 Durchflusszytometrische Analyse der Zellen nach Kultivierung.....	23
3.3 Verhalten der Zellen in Kultur.....	24
3.3.1 Karzinomzellen.....	24
3.3.2 Fibroblasten.....	27
3.4 Selektion der Tumorzellen.....	27
3.4.1 Zellsortierung mit MicroBeads (MACS).....	27
3.4.2 Weichgarklonierung.....	28
3.4.3 Klonierung durch Verdünnung (limiting dilution).....	29
3.5 Messung des DNA-Gehaltes der Zellen.....	30

3.6 Induktion der Oberflächenantigenexpression zur Erhöhung des Differenzierungsgrades.....	33
3.7 Immunfluoreszenzfärbung mit anti-p53-Antikörper.....	35
3.8 Quantitative Bestimmung der Hormone Bombesin und Somatostatin.....	35
4. Diskussion.....	36
4.1 Allgemeines zur Morphologie und zur Identifizierung von Zellbestandteilen mit Antigencharakter durch Einsatz von Antigen-Antikörper-Reaktion.....	36
4.1.1 Fibroblasten.....	36
4.1.2 Mesothelzellen und Karzinomzellen.....	37
4.1.2.1 Intermediärfilamente.....	37
4.1.2.2 Anti-epitheliale Antikörper.....	38
4.1.2.3 Tumorassoziierte Antikörper.....	38
4.2 Nachweisverfahren zur Unterscheidung maligner und benigner Zellen.....	39
4.2.1 Mögliche Ursachen für die geringe Expression von tumorassoziierten bzw. antiepithelialen Oberflächenantigenen.....	39
4.2.1.1 Differenzierungsgrad des Primärtumors sowie der Metastasen.....	40
4.2.1.2 Veränderungen der Zellen unter Kulturbedingungen.....	40
4.2.1.3 Wachstumspotential von Fibroblasten in Kultur.....	41
4.2.2 Grenzen des Aussagewertes der DNA-Messergebnisse.....	42
4.3 Techniken zur Separation der Karzinomzellen.....	43
4.3.1 Weichgarklonierung.....	44
4.3.2 Limiting dilution.....	44
4.3.3 Zellsortierung mit MicroBeads.....	44
4.4 Einfluss von Differenzierungsinduktoren auf die Antigenexpression von Tumorzellen.....	46
4.4.1 Human transforming growth factor beta 1.....	46
4.4.2 Natrium Butyrat.....	47
4.4.3 Phorbol 12-Myristate 13-Acetate.....	47

4.4.4 Galactose.....	48
4.5 p53-Mutation.....	48
4.6 Synthese gastrointestinaler Peptide und deren Einfluss auf das Wachstum von Tumorzellen.....	49
4.6.1 Somatostatin.....	49
4.6.2 Bombesin.....	50
5. Zusammenfassung.....	51
6. Literaturverzeichnis.....	53
7. Danksagung.....	66
8. Lebenslauf.....	67

Verzeichnis der Abkürzungen

3T3	= Mausfibroblasten
ASO2	= Fibroblastenantikörper
BER-EP4	= Anti-Human-Epithelial-Antigen
BSA	= bovine serum albumin
CA 19.9	= Carbohydrates Antigen 19.9
CEA	= Carzinoembryonales Antigen
Ci	= Curie
CO ₂	= Kohlendioxid
cpm	= counts per minute
DMEM	= Dulbecco ´s Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	= Dimethylsulfoxid
DNA	= Desoxyribonukleinsäure
EMA	= Epithelial-Membran-Antigen
EDTA	= Ethylen-diamino-tetraacetat
EGF	= Epidermal Growth Faktor
EZM	= Epithelzellmedium
FACS	= flow cytometry
FCS	= fetal calf serum
FITC	= Fluoreszein-Iso-Thio-Cyanat
g	= Masseinheit "Gramm"
HCL	= Chlorwasserstoff bzw. Salzsäure
HEA-125	= Human-Epithelial-Antigen 125
HKM	= halbkonditioniertes Medium
HT 29	= humane Adenokarzinomzelllinie des Kolons
IgG	= Immunglobulin der Klasse G

IgM	= Immunglobulin der Klasse M
KM	= konditioniertes Medium
l	= Masseinheit "Liter"
M	= Stoffmengenkonzentration "molar"
m	= Präfix "milli"
McCoy's 5A	= Kulturmedium
MACS	= Magnetic Cell Sorting
N	= Stoffmengenkonzentration "normal"
n	= Präfix "nano"
NaCl	= Natriumchlorid bzw. Kochsalz
p	= Präfix "piko"
p53	= Tumorsuppressorgen
PBS	= phosphate buffered saline
pH	= "pondus hydrogenii": Protonenkonzentration (Maß für die Säurestärke)
PMA	= Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
rpm	= rounds per minute
SB	= Sodium Butyrat
SW 480	= humane Adenokarzinomzellline des Kolons
TGF-β1	= Human Transforming Growth Factor beta 1
UICC	= Union Internationale Contre le Cancer
U	= unit

1. Einleitung

1.1. Bedeutung der Zellkultur

Die Zellkultur hat ihre Wurzeln im 19. Jahrhundert, als Wissenschaftler begannen, die Gewebe und Organe des Körpers im Reagenzglas zu untersuchen. Anfänglich konnte lediglich das Absterben isolierter Zellen *in vitro* verfolgt werden. Heute ist es möglich Dauer- bzw. Langzeitkulturen von Zellen anzulegen, die in vielerlei Hinsicht den *in vivo* vorgefundenen Zellen gleichen.

Im Labor lassen sich Zellen kultivieren, die von den unterschiedlichsten Geweben und Organismen abstammen. Die ursprüngliche Fragestellung wie die Zellen wachsen, was sie dazu benötigen, oder weshalb und wann sie das Wachstum einstellen, ist auch heute noch ein wichtiger Gegenstand der Forschung, wenn es beispielsweise darum geht den Zellzyklus zu analysieren oder die auslösenden Faktoren für die Vermehrung von Tumorzellen und die Steuerung der Genexpression zu finden.

Ein weiterer Schwerpunkt liegt auf dem Gebiet der Entwicklungsbiologie. Um zu erklären, wie die vielen unterschiedlichen Zellen des fertigen Lebewesens aus einer einzigen befruchteten Eizelle hervorgehen können, wurde versucht vergleichbare Modelle zu etablieren. Die Zellkultur stellt dabei ein geeignetes System dar, um Entwicklungs- und Differenzierungsvorgänge zu studieren (Sachs 1987, S. 1981).

Um *in vivo*-Verfahren zumindest teilweise zu ersetzen wurden Zellkulturtechniken entwickelt, an denen beispielsweise Zytotoxizitäts- oder Genotoxizitätstests durchgeführt werden können. Die in den letzten Jahrzehnten zahlen- und mengenmäßig sprunghaft angestiegene Produktion chemischer Verbindungen, zwingt dazu, mit möglichst rationellen Methoden potentiell schädliche Wirkungen rechtzeitig zu erkennen und zu verhindern (Thust 1976, S. 539). Unter den biologischen Veränderungen spielen die genetischen eine besondere Rolle, da sie unter anderem zur Krebsentstehung und zu Erbschäden führen können. Erste Experimente, unter *in-vitro*-Bedingungen normale somatische Zellen aus Wirbeltieren durch chemische Kanzerogene (Tumorinduktion) in neoplastische Zellen umzuwandeln, sind bereits in den 30er Jahren unternommen worden (Thust und Schramm 1972, S. 250). Dabei stand zunächst die Untersuchung des Kanzerogenesmechanismus im Mittelpunkt des Interesses.

Dank ständiger Verbesserung der Techniken zur Kultivierung von Zellen, Geweben und Organen unter weitgehend kontrollierbaren Bedingungen fanden *in-vitro*-Methoden auch in der Krebsforschung immer mehr Einsatzmöglichkeiten (Thust und Schramm 1972, S. 249). Dies gilt u. a. für die Gewinnung von Erkenntnissen bezüglich Wirkung und Nebenwirkung antineoplastisch wirksamer Substanzen, wie Zytostatika und Hormone. Dank dieser Weiterentwicklung kann heute bereits auf eine Grosszahl von Tierexperimenten an grösseren Säugetieren verzichtet werden, weil z.B. an kultivierten Leberzellen Arzneimitteltests durchgeführt werden können (Häder und Häder 1993, S. 136).

Schliesslich gibt es auch einige Anwendungen die ohne die Zellkultur nicht möglich wären. Hier sind vor allem die transgenen Tiere zu nennen, die neue oder abgewandelte Gene exprimieren. Ohne die Methode der Zellkultur könnte man das fremde Erbmateriale nicht in die Empfängerzelle einschleusen (Bradley et al. 1984, S. 255; Capecchi 1989, S. 1288)

1.2 Bedeutung der primären Zellkultur

Primärzellen sind Zellen, die erst kurze Zeit zuvor aus dem Gewebe oder Organ isoliert wurden und im Regelfall unter Kulturbedingungen nur eine begrenzte Lebenserwartung besitzen.

Im Gegensatz dazu haben sowohl immortalisierte als auch transformierte Zellen die Fähigkeit, sich *in vitro* unbegrenzt zu vermehren, sie sind unsterblich. Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von fremder DNA in eine Empfängerzelle. Die erste Beschreibung einer erfolgreichen Transfektion von Zellen mit Fremd-DNA ohne die Verwendung eines intakten Virus stammt aus dem Jahr 1973 (Graham und Van der Eb S. 536). Zur Immortalisierung wird gerne das Epstein-Barr-Virus verwendet. Es besitzt die besondere Eigenschaft, dass sich in seinem Genom bestimmte Sequenzen befinden, die es ihm erlauben, sich extrachromosomal zu replizieren. Durch diesen Prozeß wird die Virus-DNA bei der Zellteilung auch dann weitergegeben, wenn sie nicht ins Wirtszellgenom integriert ist.

Primäre Zellkulturen werden den etablierten Zelllinien vorgezogen, weil man davon ausgeht, dass sie eher dem entsprechenden *in vivo*-Zelltyp ähneln (Spitzbart und Schmidt 1970, S. 201). Es zeigte sich, dass Primärzellen häufig auch unter *in vitro*-Bedingungen die Aktivitäten und die Funktionen widerspiegeln, die sie in der physiologischen Umgebung zeigen.

Ein Argument dafür, dass Primärzellen nützlicher sind als permanente Zelllinien, ist, dass viele Zelllinien mittlerweile einige Jahre in Kultur gehalten werden. Oft kann man die Beobachtung machen, dass signifikante Unterschiede bestehen, wenn man bereits länger kultivierte Zellen mit den Zellen der Ausgangskultur oder mit den gleichen, in anderen Laboratorien kultivierten Zellen vergleicht. Diese Diskrepanz des Phentyps kann zu Problemen führen, wenn die Ergebnisse zwischen verschiedenen Labors bzw. zu unterschiedlichen Zeiten interpretiert oder verglichen werden sollten. Beispielsweise nimmt die Wachstumsrate der Zellen mit der Dauer der Kultur zu. Es ist sehr wahrscheinlich, dass mit dieser offensichtlichen Anpassung der Zellwachstumsrate an die *in vitro*-Bedingungen eine Veränderung verschiedenster Charakteristika verbunden ist. Als Beispiel hierfür kann die etablierte Zelllinie HL-60 angeführt werden, wenn man die Eigenschaften zum Zeitpunkt der Etablierung (Collins et al. 1977, S. 347; Gallagher et al. 1979, S. 713) mit der erhöhten Wachstumsrate und der reduzierten Differenzierung dieser Zellen nach mehreren Jahren in Kultur vergleicht (Macfarlane et al. 1988 S. 291).

Ein Argument für permanente Zelllinien hingegen ist die meist einfachere Handhabung, sie vermehren sich unter Kulturbedingungen ständig weiter. Außerdem stehen sie sofort zur Verfügung und es existiert ein reichhaltiges Datenmaterial über sie.

1.3 Fragestellung

In unserem Labor wird der wachstumsregulierende Einfluss gastrointestinaler Hormone, deren Agonisten und Antagonisten, auf Tumorzellen unter anderem an Langzeitkulturen untersucht. Es stellte sich die Frage, ob es Unterschiede in den Reaktionen auf gastrointestinale Peptide zwischen Primär- und Permanent-Zelllinien gibt, bzw. ob es individuelle Unterschiede gibt, bei deren Kenntnis die Behandlung des jeweiligen Patienten mit Peptiden/Peptidantagonisten gezielt durchgeführt werden könnte.

Zur Beantwortung dieser Fragen sollten Primärzellkulturen hergestellt werden. Es sollte Zellmaterial von potentiell geeigneten Patienten verwendet werden, welches leicht zugänglich sowie leicht zu verarbeiten ist. Wir entschieden uns, Tumorzellen aus Ergüssen von Patienten mit gastrointestinalen Tumoren zu isolieren.

Ziel der Arbeit war es,

- die Ausbeute an primären Zellkulturen in Abhängigkeit von der Zahl der Ansätze zu erfassen,
- zu prüfen wie sicher Tumorzellen von Fibroblasten und Mesothelzellen abgrenzt werden können,
- die Veränderungen der Zellen anhand der Oberflächenantigenexpression in Kultur zu prüfen,
- möglichst reine Tumorzelllinien für die weiteren Untersuchungen zu etablieren. Die Methode sollte eine hohe Effizienz zeigen und die Primärzellkulturen sollten in kurzer Zeit zur Verfügung stehen,
- zu versuchen, den Differenzierungsgrad der Zellen zu erhöhen,
- und die Bildung von den gastrointestinalen Peptiden Bombesin und Somatostatin durch die Tumorzellen zu messen.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

Aszites bzw. Pleuraergüsse stammten von Patienten mit histologisch gesicherten gastrointestinalen Tumoren. Die Proben wurden von der onkologischen Tagesklinik der II. Medizinischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar zur Verfügung gestellt.

Im Zeitraum von Juni 1997 bis März 1999 wurden 24 Proben, 3 Pleuraergüsse und 21 Aszites, gesammelt.

Die Altersverteilung der Patienten lag zwischen 35 und 77 Jahren (Altersmittel: 66,6 Jahre). Das Verhältnis von Frauen zu Männern betrug 11/13.

Die Charakterisierung des Patientenkollektivs anhand der Tumorlokalisation, Ergussart, mittlerer Überlebenszeit, Grading, Tumorstadium nach UICC, systemischer Chemotherapie und Tumormarker im Serum kann den Tabellen 1-5 entnommen werden.

Tabelle 1: Lokalisation des Primärtumors, Art des Ergusses und mediane Überlebenszeit in Monaten bei Patienten mit gastrointestinalen Tumoren (n=24)

Tumorlokalisation	n-Zahl der Patienten	n-Zahl Aszites/Pleuraerguss	mediane Überlebenszeit in Monaten
Magenkarzinom	4	4 / 0	18
Hepatozelluläres Karzinom	3	3 / 0	15
Cholangiozelluläres Karzinom	1	1 / 0	6
Kolonkarzinom	3	2 / 1	72
Pankreaskarzinom	13	11 / 2	9

Tabelle 2: Grading bei Patienten mit gastrointestinalen Tumoren (n=24)

Grading	n-Zahl der Patienten
G 2	6
G 2-3	2
G3	10
G 3-4	1
G X	1
nicht vorhanden	4

Tabelle 3: Tumorstadium nach UICC bei Patienten mit gastrointestinalen Tumoren (n=24)

Tumorstadium	n-Zahl der Patienten
II	3
III	5
IV	15
nicht vorhanden	1

Tabelle 4: systemische Chemotherapie bei Patienten mit gastrointestinalen Tumoren (n=24)

Therapie	n-Zahl der Patienten
Monochemotherapie	6
Polychemotherapie	17
keine Chemotherapie	1

Tabelle 5: Tumormarker bei Patienten mit gastrointestinalen Tumoren (n=24)

CEA	n-Zahl der Patienten
im Normbereich	12
erhöht	12
<hr/>	
CA 19.9	n-Zahl der Patienten
im Normbereich	7
erhöht	17

Zu einigen Versuchen wurden folgende etablierten Zelllinien von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) verwendet:

- 1) 3T3, Mausfibroblasten, wachsen adhärent als Monolayer mit Kontaktinhibition, Verdopplungszeit ca. 40 Stunden, hypertriploider Karyotyp.
- 2) SW 480, humane Adenokarzinomzelllinie des Kolons, adhärentes, endothelial-ähnliches Zellwachstum, Verdopplungszeit ca. 25-30 Stunden, hypertriploider Karyotyp.
- 3) HT 29, humane Adenokarzinomzelllinie des Kolons, adhärentes, epitheloides Zellwachstum, Verdopplungszeit ca. 40-60 Stunden, hypertriploider Karyotyp

2.2 Methoden

2.2.1 Benennung der Zelllinien

Die Benennung der Zelllinien erfolgte nach folgendem Schema: XX - Y - Z;
XX bedeutet: Anfangsbuchstaben des Primärtumors (PA = Pankreaskarzinom, CO = Kolonkarzinom, HE = Hepatozelluläres Karzinom, CH = Cholangiozelluläres Karzinom, MA = Magenkarzinom); Y bedeutet: Aszites, Pleuraergüsse wurden mit einem "P" gekennzeichnet; Z bedeutet: organspezifische Nummerierung nach Erhalt der Ergüsse;

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Materialverarbeitung

Die Aszites- bzw. Pleuraergussflüssigkeit wurde für mindestens eine Stunde stehen gelassen, damit die Zellen sedimentieren konnten. Aus dem Sediment zentrifugierte¹ man einige Portionen à 50 ml bei 1000 rpm für 10 min., der Überstand wurde verworfen. Enthielt das Zellpellet viele Erythrozyten wurden diese durch Zugabe von 10 ml Aqua dest² für 5 min. lysiert und die Zellen anschliessend zweimal gewaschen. Hierfür wurden die Zellen in 10 ml PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)³ aufgenommen, bei 1000 rpm für 10 min sedimentiert, der Überstand abgesaugt und das Sediment in 2-5 ml PBS resuspendiert.

2.2.2.2 Zellzählung

Zur Ermittlung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit dem Vitalfarbstoff Trypanblau⁴ gemischt. Dieser Farbstoff kann die Plasmamembran lebender Zellen nicht durchqueren. Das Zytoplasma toter Zellen färbt sich blau, selbst wenn diese ansonsten völlig intakt erscheinen. Die Zählung erfolgte mit Hilfe eines Hämozytometers⁵ mit einer Einteilung nach Neubauer unter einem Standardmikroskop⁶.

¹ Laborzentrifuge Rotixa/KS, Fa. Hettich, Tuttlingen

² Aqua dest, Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München

³ PBS, Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München

⁴ Trypanblau, Fa. Sigma, Deisenhofen

⁵ Neubauer Zählkammer, Assistent, Fa. Zefa, Laborservice GmbH, Harthausen

⁶ Standardmikroskop, Fa. Olympus, Hamburg

2.2.2.3 Percolldichtegradient

Bei ausreichendem Zellmaterial wurde zur Aufreinigung ein Percolldichtegradient¹ durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine isoosmotische Gradienten-Zentrifugation zur Isolation und Aufreinigung von Zellen, Viren oder Zellpartikel. Durch Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung² kann eine Dichte zwischen 1.0 und 1.3 g/ml eingestellt werden. In ein 15 ml Zentrifugenröhrchen³ wurden zuerst 4 ml 50%ige und dann 4 ml 30%ige Percolllösung geschichtet. Zuletzt wurde die Percolllösung mit den in 4 ml Medium suspendierten Zellen überschichtet und bei 1000 rpm für 20 bis 30 min. zentrifugiert. Dies entspricht einer DichteEinstellung zwischen 1.04 und 1.06 g/ml. Die Tumorzellschicht zwischen den beiden Percollschichten wurde vorsichtig abpipettiert und zweimal mit PBS gewaschen.

2.2.2.4 Zellkultivierung

Die Zellzahl sollte hoch eingestellt werden, ca. 1×10^5 Zellen wurden in 10 ml Medium resuspendiert und in eine 25-cm³-Kulturflasche⁴ gegeben. Bei einer Temperatur von 37° C und 5%igem CO₂-Anteil wurden die Zellen in einem Brutschrank⁵ inkubiert.

Das verwendete Kulturmedium (Epithelzellmedium, EZM) setzte sich zusammensetzt aus Dulbecco´s Modifiziertem Eagle Medium (DMEM)⁶, 10% fötalem Kälberserum (FCS)⁷, 1% Penicillin/ Streptomycin⁸, 0.5% Amphotericin⁹ sowie den Wachstumsfaktoren 5 ng/ml Epidermal Growth Faktor (EGF)¹⁰, 1 µg/ml Hydrocortison¹¹ und 0,2 U/ml Alt-Insulin¹². Hydrocotison besitzt auch eine stimulierende Wirkung bezüglich der Zellproliferation und –differenzierung. Am zweiten Tag wurde das Medium gewechselt, am dritten bzw. vierten Tag die Zellen je nach Konfluenz des Kulturflaschenbodens im Verhältnis 1:3 neu angesetzt.

¹ Percolldichtegradient, Fa. Pharmacia, Freiburg

² physiologische Kochsalzlösung, Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München

³ Zentrifugenröhrchen, Fa. Greiner, Frickenhausen

⁴ Kulturflasche 25-cm³, Fa. Greiner, Frickenhausen

⁵ Brutschrank CO₂-Auto-Zero, Fa. Kendro, Hannau

⁶ DMEM, Fa. Gibco, Karlsruhe

⁷ FCS, Fa. Gibco, Karlsruhe

⁸ Penicillin/Streptomycin, Fa. Gibco, Karlsruhe

⁹ Amphotericin, Fa. Gibco, Karlsruhe

¹⁰ EGF, Fa. Sigma, Deisenhofen

¹¹ Hydrocortison, Fa. Höchst, Frankfurt

¹² Alt-Insulin, Fa. Höchst, Frankfurt

2.2.2.5 Verwendung von 3T3-Feeder-Zellen bei niedriger Zellzahl

Lag die Gesamtzellzahl unter 10^4 kam die von Rheinwald und Green (1975, S. 331) etablierte Feeder-Layer-Methode zur Anwendung. Diese basiert auf der Aussat adhärent wachsender epithelialer Zellen auf einer Unterlage, dem sogenannten Feeder-Layer, welcher eine konfluent gewachsene Schicht von 3T3-Fibroblasten darstellt. Die Wirkung der 3T3-Feeder Zellen beruht darauf, dass sie bei niedriger Zelldichte die benötigten Wachstumsfaktoren und den benötigten Zellkontakt bereitstellen, sowie toxische Zellreste verdauen. Um einer Wachstumsdominanz der 3T3-Fibroblasten vorzubeugen, werden diese mit Hilfe des Zytostatikums Mitomycin C¹ wachstumsinhibiert (Inhibierung der Zellteilung). Dazu wurde der Zellrasen einer konfluent bewachsenen 25-cm³-Kulturflasche mit 5 ml PBS, welchem Mitomycin in einer Konzentration von 2 µl/ml zugesetzt war, für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach dreimaligem Spülen des Zellrasens mit je 10 ml PBS wurden die Feeder-Zellen zur Entfernung noch verbliebenen Zytostatikums für 4 Stunden mit 10 ml PBS im Brutschrank inkubiert. Schliesslich wurde die Salzlösung abgesaugt, der Zellrasen nochmals gespült und die Tumorzellen darauf ausgesät. Als Kulturmedium diente EZM.

2.2.2.6 Ablösen der Zellen

Nach Absaugen des Kulturmediums wurde der Zellrasen mit 10 ml PBS gewaschen, um Serum, welches im Kulturmedium enthalten ist und die Wirkung des Trypsin/EDTA-Gemisches inhibieren würde, zu entfernen. Anschliessend wurde, je nach Größe des Kulturgefäßes, 2–5 ml Trypsin/EDTA-Lösung² zugegeben und die Zellen für 3-5 min. im Brutschrank inkubiert. Trypsin spaltet die Adhärenzproteine, mit denen sich die Zelle an der Plastikoberfläche anhaften, EDTA bindet die zweiwertigen Kationen, welche zur Stabilisierung der Adhärenzproteine beitragen. Die daraufhin abgelöste Zellschicht wurde zur Neutralisierung des Trypsin/EDTA-Gemisches, welches bei zu langer Inkubation zur Zellschädigung bzw. zum Zelltod führen würde, in 10 ml DMEM aufgenommen, bei 1000 rpm für 10 min. zentrifugiert und das Sediment je nach weiterem Verwendungszweck der Zellen in 5-10 ml EZM, DMEM bzw. PBS resuspendiert.

¹ Mitomycin C, Fa. Sigma, Deisenhofen

² Trypsin/EDTA-Lösung, Fa. Gibco, Karlsruhe

2.2.2.7 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zuerst wurden die Zellen abgelöst und mit 10 ml DMEM resuspendiert, dann wurden sie gezählt und eine Zellzahl von 2×10^6 /ml eingestellt. Anschliessend wurde die gleiche Menge eines Einfriermediums (40% DMEM, 40% FCS, 20% DMSO) zugegeben und von der Suspension jeweils 1 ml in ein Kryoröhrchen¹ pipettiert. Die Röhrchen wurden in einem Behälter² mit flüssigem Stickstoff bei -180°C tiefgefroren. Ab Zugabe der toxischen Substanz Dimethylsulfoxid (DMSO)³ wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt.

Dimethylsulfoxid ist fettlöslich und kann schnell in die Zelle diffundieren. Es dient dazu, dass sich keine Eiskristalle mehr bilden können, die die Zellmembran schädigen und somit zur Zelllyse führen könnten.

Zum Auftauen der Zellen werden die Röhrchen in ein Wasserbad⁴ mit 37°C gegeben. Unmittelbar nach Verflüssigung erfolgte die Zugabe von 10 ml DMEM. Die Zellen wurden bei 1000 rpm für 10 min. sedimentiert, der Überstand abgesaugt, das Sediment in 10 ml EZM resuspendiert und die Zellen kultiviert.

2.2.3 Methoden zur Selektion der Tumorzellen

2.2.3.1 Magnetische Zellsortierung mit MicroBeads

Hierbei handelt es sich um eine Art der Zellsortierung mit magnetisch gekoppelten Antikörpern, die über eine Säule, welche in einem Magneten verankert ist, getrennt werden (Schmitz et al. 1994, S. 268, Harbeck et al. 1995, S. 1250).

Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurden die Zellen mit 2-5 ml (je nach Größe der Kulturflasche) einer 1mM EDTA-Lösung⁵ für max. 15 min. inkubiert und mit PBS gewaschen. Mit Trypanblau wurde die die Vitalität überprüft. Um die Säule nicht zu verstopfen, muss bei mehr als 20% avitalen Zellen eine Abzentrifugation über einen Ficoll Gradienten (Ficoll-Paque)⁶ durchgeführt werden. Hierfür wurden die Zellen in 10 ml DMEM resuspendiert, vorsichtig unter Erhaltung der Phasen über 10 ml Ficoll-Paque geschichtet und für 10 min. mit 750 rpm zentrifugiert. Entsprechend dem Dichtegradienten formieren sich verschiedene Schichten im Zentrifugationsmedium. Am Boden des Zentrifugationsröhrchens reichert sich das abgestorbene Zellmaterial an, die lebenden Zellen befinden sich in der Interphase. Diese wurde selektiv abpipettiert 2 x mit 10 ml PBS gewaschen und in 10 ml MACS-Puffer aufgenommen. MACS-Puffer setzt sich zusammen aus PBS, 0,5% FCS und 2mM EDTA.

¹ Kryoröhrchen, Fa. Nunc, Wiesbaden

² Stickstofftank, Arpege 140, Fa. Air Liquid, Berlin

³ DMSO, Fa. Sigma, Deisenhofen

⁴ Wasserbad, Fa. GFL, Ges. für Labortechnik mbH, Burgwedel

⁵ EDTA-Lösung, Fa. Gibco, Karlsruhe

⁶ Ficoll-Paque, Fa. Pharmacia, Freiburg

Um größere Zellklumpen zu entfernen, wurde die Suspension durch einen 30 µm großen Nylonfilter¹ gepresst. Die Zellen wurden gezählt, erneut bei 1000 rpm zentrifugiert und max. 10⁷ Zellen in 10 µl MACS-Puffer aufgenommen.

Anschließend erfolgte die Färbung mit einem Oberflächenmarker. Die Antikörpermenge sollte niedrig gewählt werden, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Die Antikörper CEA² (monoklonaler Mausantikörper, IgG) bzw. CA 19.9³ (monoklonaler Mausantikörper, IgM) wurden in einer Konzentration von 1:50, verdünnt mit Aqua dest, zugegeben und die Zellsuspension bei 4°C für 5-10 min. inkubiert. Zur Entfernung der nicht gebundenen Antikörper wurden die Zellen 2-3x vorsichtig mit 1 ml MACS-Puffer gewaschen (750 rpm für 10 min.) und dann in 80 µl MACS-Puffer aufgenommen. 20 µl Microbeads⁴ (Ratte anti Maus, IgG bzw. IgM) wurden zugegeben und bei 4°C für 15 min. inkubiert. Die Zellen wurden erneut wie oben beschrieben gewaschen und in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen. Nachdem die Separationssäule MS+⁵ an dem Zellseparator⁶ befestigt wurde, wurde sie mit 500 µl MACS-Puffer gereinigt. Die magnetisch markierte Zellsuspension wurde vorsichtig in die Säule gegeben und die Säule anschließend dreimal mit 500 µl MACS-Puffer gespült, um die unmarkierten Zellen zu entfernen. Zur Gewinnung der markierten Zellen wurde die Separationssäule aus dem Zellseparator entfernt und die Zellen durch Spülen der Säule mit 3x 500 µl MACS-Puffer gewonnen. Die selektierten Tumorzellen wurden erneut gewaschen und in Kultur gegeben.

2.2.3.2 Zellklonierung

Klonierung bezeichnet in der Zellkultur eine Technik, mit deren Hilfe man eine Zellpopulation aus einer einzigen Ursprungszelle erhalten kann, das heisst, man kann eine Zellkultur heranziehen, bei der jede Zelle mit allen anderen identisch ist.

2.2.3.2.1 Klonierung durch Verdünnung

Verwendet wurden Mikrotiterplatten⁷ mit 96 Vertiefungen. In jede Vertiefung wurden je 200 µl einer Zellsuspension gegeben, die 1,5 Zellen/ml enthielt, somit kommen rein rechnerisch in jede Vertiefung 0,3 Zellen. So ist zu erwarten, dass sich in jeder dritten Vertiefung eine Zelle befindet. Solange man die Klonierungseffizienz der Zellen noch nicht kennt, wird gleichzeitig eine Platte mit einer Zelle pro Vertiefung besetzt. Es ist darauf zu achten, die Zellen nicht zu schnell in ein zu großes Volumen EZM umzusetzen.

¹ Nylonfilter, Fa. Schubert & Weiss, München

² CEA, Anti-CD 66e, monoklonaler Mausantikörper, IgG1, Fa. Dianova, Hamburg

³ CA 19.9, Human Anti-Sialyl Lewis(a) Tumors CA 19.9, monoklonaler Mausantikörper, IgM, Fa. BMA, Schweiz, Augst

⁴ Microbeads, Ratte anti Maus IgM bzw. Ratte anti Maus IgG, Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

⁵ Separationssäule MS+, Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

⁶ Zellseparator, Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

⁷ Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen, Fa. Greiner, Frickenhausen

Als nächstes wurde eine 24-Loch-Platte¹ mit 1 ml EZM pro Vertiefung verwendet. Zur anfänglichen Unterstützung des Wachstums können 3T3-Feederzellen bzw. halbkonditioniertes Medium (HKM) verwendet werden. Zur Herstellung von HKM wird konditioniertes Medium (KM) benötigt. Hierbei handelt es sich um ein Kulturmedium, das zuvor zwei bis drei Tage zur Kultivierung von Zellen benutzt wurde. Die Zellen geben in dieser Phase Wachstumsfaktoren an das Medium ab. Es sollte von der zu klonierenden Zellkultur gewonnen werden. Das Medium wird nach ca. 2 Tagen von der Zellkultur abpipettiert, bei 1500 rpm für 10 min. zentrifugiert und der Überstand aufgenommen. Zur Herstellung des HKM wird dem KM zu einem gleichen Teil frisches Medium zugegeben und die FCS-Konzentration auf 20% eingestellt. Das HKM kann entweder sofort verwendet oder eingefroren werden.

2.2.3.2.2 Weichagarklonierung

Zur Herstellung eines 5%igen Agars wurden 5 g Agarpulver² in einen Glasbehälter³ gegeben, der mit Aqua dest bis 100 ml aufgefüllt war. Das Pulver wurde mit der Flüssigkeit vermengt, die Suspension für 45 min. bei 1 bar autoklaviert⁴ und anschliessend in einem Wasserbad bei 60° C flüssig gehalten.

Die Zellzahl wurde nach folgender Formel auf 2, 20, 200 und 2.000 Zellen/ml eingestellt, sodass die Endkonzentration des Agars 0,3% bei einer Agar-Ausgangskonzentration von 5% betrug:

$$\frac{VA}{VA+VZ} = \frac{KE}{KA}$$

VA = Volumen der Agarlösung; VZ = Volumen der Zellsuspension, die der Agarlösung zugefügt wurde; KA = Ausgangskonzentration des Agars; KE = Endkonzentration des Agars;

¹ Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen, Fa. Greiner, Frickenhausen

² Agar, Fa. Sigma, Deisenhofen

³ Glasbehälter, Immunologisches Labor, Klinikum r. d. Isar, München

⁴ Autoklav, Fa. KSG, Vertrieb Delta Trade Company, Hannover

Der Boden der 60-mm-Petrischalen¹ wurde dünn mit 0,5%igen Agar beschichtet, um ein Absinken und Anwachsen der Zellen auf dem Plastikboden zu verhindern. Als Kulturmedium wurde HKM verwendet. Nach Einstellung der Zellzahl wurden 5 ml der Zell-Agar-Suspension in die vorbereiteten Petrischalen gegeben. Die Petrischalen sollten nun für 30 min. bei Raumtemperatur stehen gelassen werden, bevor sie im Brutschrank inkubiert wurden. Unter dem Invertmikroskop² liess sich überprüfen, ob die Zellen in den Petrischalen auch tatsächlich einzeln suspendiert waren. Nach 24 Stunden sollte man 5 ml Medium hinzugeben, und nach weiteren 3-4 Tagen wurden 2-3 ml des Mediums ersetzt. Sobald die Kolonien einen Durchmesser von ca. 1 mm erreicht hatten, wurden sie mit einer Glaspasteurpipette³ ausgespuckt und mit 2 ml EZM in eine 24-Loch-Platte gegeben. Die Farbe des Mediums, welches sich bei Nährstoffverbrauch gelb färbt und die Konfluenz des Zellrasens sind Richtschnur für die weitere Expansion.

2.2.4 Methoden zum Nachweis von Tumorzellen

2.2.4.1 Durchflusszytometrische Messungen

Mit dem Durchflusszytometer werden optische Signale wie Fluoreszenz und Lichtstreuung gemessen. Die Zellen werden wie im "Gänsemarsch" an einer Lichtquelle vorbeigeleitet. Für das von uns benützte Fluorochrom Fluorescein (FITC) wurde ein Argonlaser mit der Wellenlänge 488 nm verwendet. Unter Fluoreszenz wird die rasch abklingende Lichtemission von Molekülen nach Absorption energiereicher Strahlung verstanden. Durch die Streuung von Licht können Informationen über Zellgrösse, Zellform, Zelloberfläche und Granularität der Zelle gewonnen werden .

Verwendet wurden folgende Antikörper:

Direkte Markierung:

- a) Ber-EP 4⁴, Anti-Human-Epithelial-Antigen, FITC-konjugiert, monoklonaler Mausantikörper, IgG1
- b) Fibroblasten-Antikörper AS02⁵, dia 120, FITC-konjugiert, monoklonaler Mausantikörper, IgG1
- c) Negativkontrolle mit dem Antikörper IgG1/2⁶

¹ Petrischalen 60-mm, Fa. Greiner, Frickenhausen

² Invertmikroskop, Fa. Zeiss, Oberkochen

³ Glaspasteurpipette, Fa. Eppendorf, Hamburg

⁴ Ber-EP4, Anti-Human-Epithelial-Antigen, FITC-konjugiert, monoklonaler Mausantikörper, IgG1, Fa. Dako, Bergisch Gladbach

⁵ Fibroblasten-Antikörper AS02, dia 120, FITC-konjugiert, monoklonaler Mausantikörper, IgG1, Fa. Dianova, Hamburg

⁶ IgG1/2, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg

Indirekt Markierung:

- a) CEA, Anti-CD 66e, monoklonaler Mausantikörper, IgG1
- b) Human Anti-Sialyl Lewis(a) Tumors CA 19.9, monoklonaler Antikörper, IgM
- c) FITC-konjugierter Zweitantikörper¹, Goat F(ab')² Anti-Mouse IgG+IgM, dient auch als Negativkontrolle für die indirekte Färbung.

Es wurde wie unter 2.2.2.1 eine Einzelzellsuspension hergestellt und in sechs 1 ml Reaktionsgefäße² je eine Zellzahl zwischen 10^6 und 10^7 /ml eingestellt. Die Zellen sedimentierten bei 1000 rpm für 10 min. und wurden in jeweils 100 µl PBS aufgenommen.

Die Markierung erfolgte nach folgendem Schema:

- 1) Negativkontrolle IgG1/2 1:10
- 2) direkte Markierung mit AS02 1:50
- 3) direkte Markierung mit Ber-EP 4 1:50
- 4) zusätzliche Negativkontrolle für die indirekte Markierung mit dem FITC-konjugiertem Zweitantikörper 1:50
- 5) indirekte Markierung mit CEA 1:50, FITC-konjugierter Zweitantikörper 1:50
- 6) indirekte Markierung mit CA 19.9 1:50, FITC-konjugierter Zweitantikörper 1:50

Die Zellen wurden mit dem Primärantikörper bei 4°C für 20 min. inkubiert, 500 µl PBS zugegeben, bei 750 rpm für 5 min. sedimentiert. Die direkt markierten Zellen sowie beide Negativkontrollen wurden in 500 µl PBS aufgenommen und im Kühlschrank gelagert. Die Zellen für die indirekte Markierung wurden in 100 µl PBS aufgenommen und mit dem FITC-markierten Sekundärantikörper Goat-anti-Mouse IgG+IgM 1:50 erneut für 20 min. bei 4°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen ebenfalls in 500 µl PBS aufgenommen. Bei der anschließenden durchflusszytometrischen Untersuchung (Radcliff und Jaroszeski 1998, S. 1) mit dem FACScan Analyser³ wurden 5 000 Zellen gemessen.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe angeschlossener, computerisierter Anwenderprogramme³.

¹ Goat F(ab')² Anti-Mouse IgG+IgM, Fa. Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA

² Reaktionsgefäße 1 ml, Fa. Eppendorf, Hamburg

³ Gerät und Software: FACScan Analyser, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg

2.2.4.2 DNA-Messung

Zytospinpräparate wurden einerseits aus den Tumorzellkulturen hergestellt, andererseits aus einer Suspension von Lymphozyten, welche durch einen Ficoll-Gradienten aus 10 ml humanem Vollblut gewonnen wurden. Letztere dienten als Negativkontrolle.

Nach Ablösen der Zellen wurde eine Zellkonzentration von 10^5 /ml eingestellt und auf unbeschichtete Objektträger¹ zentrifugiert. Pro Objektträger wurden dabei 500 µl Zellsuspension, entsprechend 5×10^4 Zellen, für 5 min. bei 600 rpm in der Zytozentrifuge² abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und noch verbliebene Flüssigkeit mit Hilfe von Zytofilter³, durch Zentrifugation für 3 min. bei 800 rpm entfernt. Die Präparate wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet, und anschliessend wurde eine Färbung nach Feulgen durchgeführt.

Durch das Eintauchen der Objektträger in 5 N HCL⁴ bei 22°C wurden durch Hydrolyse Purinbasen abgespalten und somit Aldehydgruppen frei. Dann wurde zweimal für 2 min. mit Aqua dest gewaschen. Zum Färben der freien Aldehydgruppen erfolgte eine Inkubation der Objektträger für 60 min. bei Dunkelheit mit dem Schiffschens Reagenz⁵. 1 g Natriumdisulfid⁶ wurde in 20 ml 1 N HCL und 360 ml Aqua dest gelöst, worin die Objektträger zweimal für 3 min. eingetaucht wurden. Dann erfolgte erneut eine zweimalige Waschung mit Aqua dest für 2 min. Zur Überbringung der Zellen von einem hydrophilen in einen lipophilen Zustand wurden die Objektträger für je 0,5 min. in 50, 70, 80 und 95%igen Alkohol⁷ eingetaucht. Zur Haltbarmachung wurden die Zellen noch kurz in ein 2:1 Xylol⁸-Alkohol-Gemisch und dann in Xylol gegeben.

Zur Messung des DNA-Gehaltes wurden 100 Zellen unter dem Mikroskop⁹ markiert und mit Hilfe angeschlossener, computerisierter Anwenderprogramme⁹ der DNA-Gehalt gemessen. Als Referenzzellen dienten Lymphozyten. Evaluiert wurden die Parameter DNA-Index (DI) und Ploidy.

Diploid (DI 1.80 – 2.20, das entspricht einer Abweichung von +/- 10 % von den Referenzzellen)

Hyperdiploid (DI 2.21 – 3.79)

Tetraploid (DI 3.80 – 4.20)

Hypertetraploid (DI > 4.20)

¹ Objektträger, Menzel, Fa. Zefa, Laborservice GmbH, Harthausen

² Zytozentrifuge, Cytospin, Fa. Shandon, Pennsylvania, USA

³ Zytofilter, Fa. Shandon, Pennsylvania, USA

⁴ HCL, Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München

⁵ Schiffschens Reagenz, Fa. Sigma, Deisenhofen

⁶ Natriumdisulfid, Fa. Merck, Ismaning

⁷ Alkohol, Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München

⁸ Xylol, Fa. Merck, Ismaning

⁹ Mikroskop und Software: CIRCRES = Cell Image Retrieval and Evaluation System, Fa. Roche, Mannheim

2.2.5 Induktion der Oberflächenantigenexpression

Das Wachstumsverhalten, die Morphologie sowie der Grad der Differenzierung stehen in einem engen Verhältnis zueinander. Es wurde versucht durch Veränderung der Wachstumsbedingungen bzw. dem Versuch die Oberflächenantigenexpression zu erhöhen, den Differenzierungsgrad zu verbessern.

2.2.5.1 Galactose-Medium

Der Differenzierungsgrad kann durch den Ersatz von Glukose durch Galaktose im Kulturmedium erhöht werden (Fantini et al. 1986, S. 235). Die Erhöhung der CEA-Expression zeigte nach 10 Tagen ein Maximum, der verbesserte Differenzierungsgrad war für viele Monate stabil (Fantini et al. 1989, S. 126).

Es wurde eine Zellzahl von 10^5 bzw. $10^6/25\text{ cm}^3$ Kulturflasche eingestellt. Als Medium wurde Leibovíc¹ mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 0,5% Amphotericin verwendet. Die Behandlung dauerte 10 Tage, das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt und die Zellen zwischenzeitlich nicht gesplittet.

2.2.5.2 Sodium Butyrat (SB)

SB führt über eine Steigerung der Proteinsynthese zu einer Erhöhung der CEA-Transkription, sowie zu einer erhöhten Stabilität der CEA mRNA (Saini et al. 1990, S. 541). Der Effekt ist jedoch stark von dem Grad der Differenzierung vor Beginn der Behandlung abhängig (Tsao et al. 1983, S. 1220).

2 Mio. Zellen wurden in einer 25-cm^3 -Kulturflasche angesetzt. EZM wurde ohne Zusatz von Hydrocortison und Insulin verwendet und ab dem zweiten Tag SB² in einer Konzentration von 5 mM zugesetzt. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Am 11. Tag wurden die Zellen 3:1 gesplittet. Am 25. Tag war die SB-Behandlung beendet und die Zellen wurden in herkömmlicher Weise kultiviert (Augeron 1984, S. 3961).

2.2.5.3 Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA)

Schuman et al. (1989, S. 11) beschreibt einen Einfluss auf die Differenzierung von B-Lymphozyten, weiterhin wird diese Substanz als ein Differentiator von malignen Leukämiezellen zu Effektorzellen mit antileukämischer Wirkung verwendet (Weinberg 1981, S. 655).

¹ Leibovíc, Fa. Gibco, Karlsruhe

² Sodium Butyrat, Fa. Merck, Ismaning

1 mg PMA¹ wurde in 1 ml DMSO gelöst. Durch Verdünnung mit DMEM wurden Konzentrationen von 10 und 100 ng/ml hergestellt. Die Zellen wurden für 1 bzw. 24 Stunden mit den beiden Konzentrationen inkubiert und dann zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte bei den Zellen, die 24 Stunden inkubiert waren, eine durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenstrukturen, während die Zellen mit nur 1 Stunde Inkubationszeit erst nach einer 23stündigen Kultivierung zur Untersuchung kamen.

2.2.5.4 Human Transforming Growth Factor beta 1 (TGF-β1)

TGF-β1 führt über eine Hemmung der Proliferation und eine Erhöhung der Proteinsynthese (Chakrabarty et al. 1988, S. 4059) zu einem höheren Differenzierungsgrad und zu morphologischen Veränderungen der Zellen. TGF-β1 bindet an hochaffine Oberflächenrezeptoren, die Wirkung ist abhängig vom Ausmass der Rezeptorexpression.

1 µg TGF-β1² wurde in 1 ml Gemisch aus 20 µl 1 M HCL, 5 mg BSA³ und 4,98 ml Aqua dest gelöst. Als Medium, welches ohne Zusatz von TGF-β1 vor Beginn der Behandlung für 5 Tage zur Kultivierung der Zellen verwendet wurde, diente McCoy's 5A⁴ mit 10 % FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 0,5% Amphotericin und 5 ng/ml TGF-β1. Anschließend wurden die Zellen in einer 25-cm³-Kulturflasche angesetzt und die 7tägige Behandlung wurde begonnen, als die Kultur zu ca. 30-40% konfluent war. Ein Wechsel des Mediums erfolgte am 5. Tag, am 8. Tag wurden die Zellen gesplittet und für weitere 7 Tage ohne TGF-β1-Zusatz kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen auf ihre Oberflächenstrukturen durchflußzytometrisch untersucht.

2.2.6 Charakterisierung

2.2.6.1 Immunfluoreszenzfärbung mit anti-p53-Antikörper

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen auf sterilen Deckgläschen kultiviert. Hierfür wurde je ein 18x18mm Deckgläschen⁵ in die Vertiefungen einer 6-well-Platte⁶ gelegt, mit 2 ml EZM überschichtet und mit den Zellen beimpft. Die angesetzten Kulturen wurden im Brutschrank inkubiert, bis eine Konfluenz der Zellen von ca. 50-70% erreicht war. Dann wurden die Deckgläschen entnommen, durch kurzes Eintauchen in destilliertes Wasser abgewaschen und an der Luft getrocknet. Zur Fixierung der Zellen wurden die Deckgläschen für zwei Minuten in Aceton⁷ gegeben und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

¹ PMA, Fa. Sigma, Deisenhofen

² TGF-β1, Fa. R&D Systems, Wiesbaden

³ BSA, Rinderserumalbumin, Fa. Gibco, Karlsruhe

⁴ McCoy's 5A, Fa. Gibco, Karlsruhe

⁵ Deckgläschen 18x18mm, Menzel, Fa. Zefa, Laborservice GmbH, Harthausen

⁶ Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen, Fa. Greiner, Frickenhausen

⁷ Aceton, Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München

Vor Beginn der Färbung wurden die Deckgläschen zur besseren Handhabung mit einem Tropfen Pertex¹ Einbettmedium auf Objektträger fixiert. Die Objektträger wurden vor der Färbung kurz in PBS eingetaucht, um eventuelle Verunreinigungen zu entfernen. 100 µl des monoklonalen Maus-anti-human anti-p53-Antikörpers² IgG, der 1:100 mit PBS verdünnt war, wurden auf die noch feuchten Objektträger aufgetragen. Der Antikörper inkubierte in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4⁰C. Nach der Inkubation wurde der primäre Antikörper durch Spülen in PBS sorgfältig abgewaschen und der FITC-markierte Zweitantikörper³, Ziege anti Maus anti IgG, der ebenfalls 1:100 mit PBS verdünnt war, aufgetragen. Die Inkubationszeit in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur betrug ca. 30-60 min. Durch erneutes Eintauchen in PBS wurde der Sekundärantikörper abgewaschen. Anschliessend wurden 100 µl Einbettmedium auf den feuchten Objektträger pipettiert und die Zellen mit einem Deckgläschen eingeschlossen. Eine luftdichte Versiegelung erfolgte mit Nagellack⁴.

Positivkontrolle mit SW 480 (Kolonkarzinom), Negativkontrolle mit Lymphozyten.

Die Auswertung erfolgte mittels eines Fluoreszenzmikroskops⁵, Fluoreszein-Iso-Thio-Cyanat (FITC) führt bei einer Wellenlänge von 450 nm zu einer apfelgrünen Fluoreszenz.

2.2.6.2 Hormonbestimmung im Kulturmediumüberstand

Die quantitative Bestimmung der Peptide Somatostatin und Bombesin im Kulturmediumüberstand wurde mit Radioimmunoassays durchgeführt, die auf Grundlagenarbeiten von Yalow und Berson (1960, S. 1157) sowie Faloon und Unger (1974, S. 317) beruhen.

Zum Nachweis der Antigene Somatostatin und Bombesin in der Standardverdünnungsreihe bzw. in den Proben wurden spezifische Antikörper, radioaktiv markiertes Antigen (Tracer) und die zu messenden Antigene der Probe zusammengebracht. Dabei konkurrieren die unmarkierten und die radioaktiv markierten Antigene um eine begrenzte Anzahl von Bindungsstellen am spezifischen Antikörper. Durch Adsorption der freien markierten Antigene an dextranbeschichtete Aktivkohle erfolgte die Trennung zwischen antikörpergebundenem und freiem markiertem Antigen. Durch Zentrifugation und Dekantierung des Überstandes wird die an die Kohle adsorbierte Radioaktivität mit einem Szintillations-Gamma-Zähler⁶ gemessen. Die Standardkurve wird erstellt durch Auftragen des Quotienten, der sich zusammensetzt aus gebundener Radioaktivität/gebundene Radioaktivität in der Nullprobe, gegen die Konzentration in pg/ml.

¹ Einbettmedium Pertex, bezogen über Pathologisches Institut, Klinikum rechts der Isar, München

² monoklonale Maus-anti-human anti-p53-Antikörper IgG, Fa. Oncogene Science, Deutschland

³ FITC-markierte Zweitantikörper, Ziege anti Maus anti IgG, Fa. Dianova, Hamburg

⁴ Nagellack, Fa. Avon, München

⁵ Fluoreszenzmikroskop, Fa. Zeiss, Oberkochen

⁶ Clini-Gammacounter 1470, Fa. Wallac-ADL-GmbH, Freiburg

Die Proben wurden gewonnen, indem bei Konfluenz des Zellrasens der Tumorzelllinien und bei beginnender Gelbfärbung des Mediums der Kulturmediumüberstand abpipettiert wurde. Zur Entfernung eventuell vorhandener Zellen wurde das gewonnene Medium bei 1000 rpm für 10 min. zentrifugiert und vorsichtig abgenommen. Bei einer Temperatur von -20°C lagerten die Proben, bis die Hormonbestimmung durchgeführt wurde.

2.2.6.2.1 Bombesinbestimmung

Die Technik des Immunoassays für bombesinähnliche Immunoreaktivität wurde von Brown et al. (1978, S. 2722) beschrieben.

Als Assaypuffer diente ein 0,1 M Natriumphosphatpuffer, der 0,15 mM NaCl¹ und 0,1% BSA bei einem pH von 7,4 enthielt. Zu 1 mCi ¹²⁵Jod², gelöst in 10 µl eines 0,5 M Natriumphosphatpuffers wurden 1 µg Tyr⁴-Bombesin³ und 5 µg Chloramin T⁴ gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde nach 30 sec. auf eine Sephadex LH 20 Säule⁵ aufgetragen und mit einer Mischung aus Methanol⁶-Essigsäure⁷-Wasser (10:2:1) gereinigt, entsprechend der Anleitung von Brown et al. Das hierbei entstandene radioaktiv markierte Peptid wurde bei einer Temperatur von -20°C gelagert. Als Standard-Bombesin wurde synthetisches Bombesin⁸ verwendet. Durch die Standardverdünnungsreihe wurde ein Konzentrationsbereich von 50 bis 10 000 pg/ml für den Nachweis von synthetischen Bombesin erfasst. Jeweils 100 µl des an humanes alpha-Globulin gegundenen Antikörpers⁹ in einer Endverdünnung von 1:60 000, des Jod¹²⁵-Tyr⁴-Bombesin der Aktivität 15 000-18 000 cpm und der Probe wurden für 60 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Trennung erfolgte durch Zugabe von 500 µl Kohlelösung (Norit A Kohle¹⁰ und 0,01% Dextran T70¹¹ in 0,1 M Assaypuffer gelöst) und 100 µl Schafserum¹². Nach weiterer Inkubation von 40 min. bei 4°C wurden die Proben bei 4°C und 2 500 rpm für 20 min. zentrifugiert und die an die Kohle adsorbierte Radioaktivität mit einem Szintillations-Gamma-Zähler gemessen.

¹ NaCl, Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München

² 1 mCi ¹²⁵Jod, Fa. Behring, Stuttgart

³ Tyr⁴-Bombesin, Dr. J. Rivier, Salk Institute, La Jolla, CA, USA

⁴ Chloramin T, Fa. Merck, Ismaning

⁵ Sephadex LH 20 Säule, Fa. Amersham Laboratories, London, England

⁶ Methanol, Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München

⁷ Essigsäure, Fa. Merck, Ismaning

⁸ synthetisches Bombesin, Dr. J. Rivier, Salk Institute, La Jolla, CA, USA

⁹ spezifischer Antikörper gegen Bombesin, Dr. M. Brown, Salk Institute, La Jolla, CA, USA

¹⁰ Norit A Kohle, Fa. Sigma, Deisenhofen

¹¹ Dextran T70, Fa. Sigma, Deisenhofen

¹² Schafserum, Fa. Sigma, Deisenhofen

2.2.6.2.2 Somatostatinbestimmung

Die Bestimmung der somatostatinähnlichen Immunreaktivität erfolgte nach einer Modifikation der von Arimura et al. (1978, S. 1139) und Kronheim et al. (1976, S. 620) beschriebenen Methode.

Als Assaypuffer wurde ein 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH=7,5) verwendet, dem 0,1 % BSA, 0,25% EDTA und 100 KIU/ml Trasylol R¹ zugesetzt waren. Nach der Markierung von 2 µg synthetischem, zyklischem Tyr¹-Somatostatin² mit 1 µCi ¹²⁵Jod³ wurde das Gemisch durch Säulengelchromatographie (Sephadex G25, fine⁴) unter Anwendung einer Lösung aus 0,1 M Essigsäure und 0,1% Gelatine⁵ gereinigt. Mit Assaypuffer wurde die Tracerlösung auf eine Aktivität von 2000-3000 cpm/100 µl verdünnt und zur Stabilisierung mit 3000 KIU/ml Trasylol R versetzt. Das Antiserum 80c von Kaninchen⁶ wurde in einer Endverdünnung von 1:100 dem Assay zugesetzt. Als Standard-Somatostatin diente synthetisches, zyklisches Tyr¹-Somatostatin. Die Sensitivität des Assays reichte von 12,5 - 2000 pg Somatostatin/ml. 400 µl des oben hergestellten Assaypuffers, 100 µl der Probe und 100 µl des Antikörpers⁷ in einer Endverdünnung 1:100 000 wurden bei 4^o C 72 Stunden inkubiert. Durch Zugabe von 500 µl Kohlelösung (0,1% Norit A Kohle und 0,01% Dextran T70, gelöst in 0,05 M Natriumphosphatpuffer) wurden antikörpergebundenes und freies markiertes Somatostatin getrennt. Nach Zugabe von 100 µl Schafserum erfolgte eine weitere Inkubation für 40 min. bei 4^o C. Die Proben wurden bei 2500 rpm und 4^o C für 20 min. zentrifugiert und die an die Kohle adsorbierte Radioaktivität mit einem Szintillations-Gamma-Zähler gemessen.

2.3 Statistik

Für die Auswertung der erhobenen Daten wurde der T-Test verwendet. Die Berechnungen wurden mit der Statistiksoftware SPSS⁸ in der Version 11.5 für Windows durchgeführt.

¹Trasylol R, Fa. Bayer, Leverkusen

²Tyr¹-Somatostatin, Dr. J. River, Salk Institute, La Jolla, CA, USA

³1 µCi ¹²⁵Jod, Amersham Laboratories, London, England

⁴Sephadex Säule, G25 fine, Fa. Amersham Laboratories, London, England

⁵Gelatine, Fa. Merck, Ismaning

⁶Antiserum 80c von Kaninchen, Dr. R. H. Unger, Dallas, Texas, USA

⁷spezifischer Antikörper gegen Somatostatin, Dr. M. Brown, Salk Institute, La Jolla, CA, USA

⁸SPSS Statistiksoftware Version 11.5: SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA

3. Ergebnisse

3.1 Zellkultur

3.1.1 Etablierte Zelllinien

Die Anzahl der Patientenproben betrug 24, wovon 19 Zelllinien kultiviert werden konnten. Zwei der Proben mussten wegen einer bakteriellen Infektion verworfen werden. Bei einem Ergusspunktat zeigten die Zellen keine Adhärenz, in zwei Fällen kam es zu einer Anheftung der Zellen auf dem Plastikboden des Kulturflaschenbodens, die Zellen zeigten jedoch keine Proliferation. Die Zellen der 19 gewonnen Zelllinien stammten von 17 Aszites- und 2 Pleuraergusspunktaten. Bezüglich der Tumortypen setzten sie sich zusammen aus 2 Magen-, 2 Hepatozellulären-, 1 cholangiozellulären-, 2 Kolon- und 12 Pankreaskarzinomen (Tabelle 2).

Tabelle 2: Etablierung von Zelllinien aus Ergusspunktaten von Patienten mit gastrointestinalen Tumoren

Verhalten der Zellen in Kultur	gesamt	24
	keine Adhärenz	1
	fehlende Proliferation	2
	bakteriell infiziert	2
	erfolgreich kultiviert	19
Ergussart	Pleuraerguss	2
	Aszites	17
Erkrankung	Magenkarzinom	2
	Hepatozelluläres Karzinom	2
	Cholangiozelluläres Karzinom	1
	Kolonkarzinom	2
	Pankreaskarzinom	12

3.1.2 Morphologie und Differenzierungsgrad

Der Differenzierungsgrad der Zellen wurde beurteilt an der Höhe der Antigenexpression und dem lichtmikroskopisch erkennbaren Wachstumsverhalten der Zellen in Kultur.

Eine Zelllinie mit hohem Differenzierungsgrad zeigt ein fokales Wachstum, sie bildet immer eine Monolayerkultur aus, das heisst die Zellen wachsen auch nach Erreichen der Konfluenz nicht mehrlagig und sie zeigt eine hohe Antigenexpression. Eine Zelllinie mit niedrigem Differenzierungsgrad zeigt eine geringe Antigenexpression, wächst nicht fokal sondern diffus und nicht immer streng als Monolayer. Das Wachstumsmuster kann sowohl epitheloid als auch spindelzellig sein (siehe Abbildung 1 und 2).

Entsprechend dieser Kriterien befinden sich unter den von uns kultivierten Zelllinien eine differenzierte (PA-P-5) und achtzehn undifferenzierte Zelllinien.

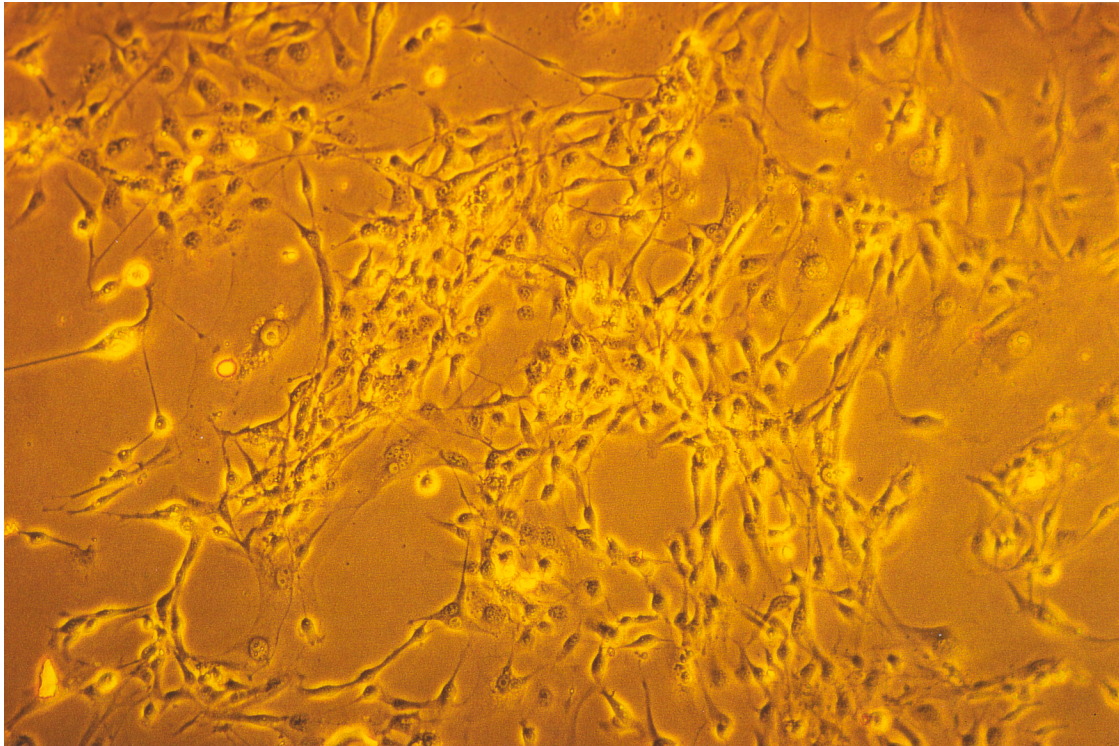


Abbildung 1: Lichtmikroskopische Morphologie der malignen Magenkarzinomzellkultur MA-2. Es fanden sich länglich ausgezogene, fokal dicht zusammengelagerte Zellen mit grossen Zellkernen und schmalem Zytoplasma.

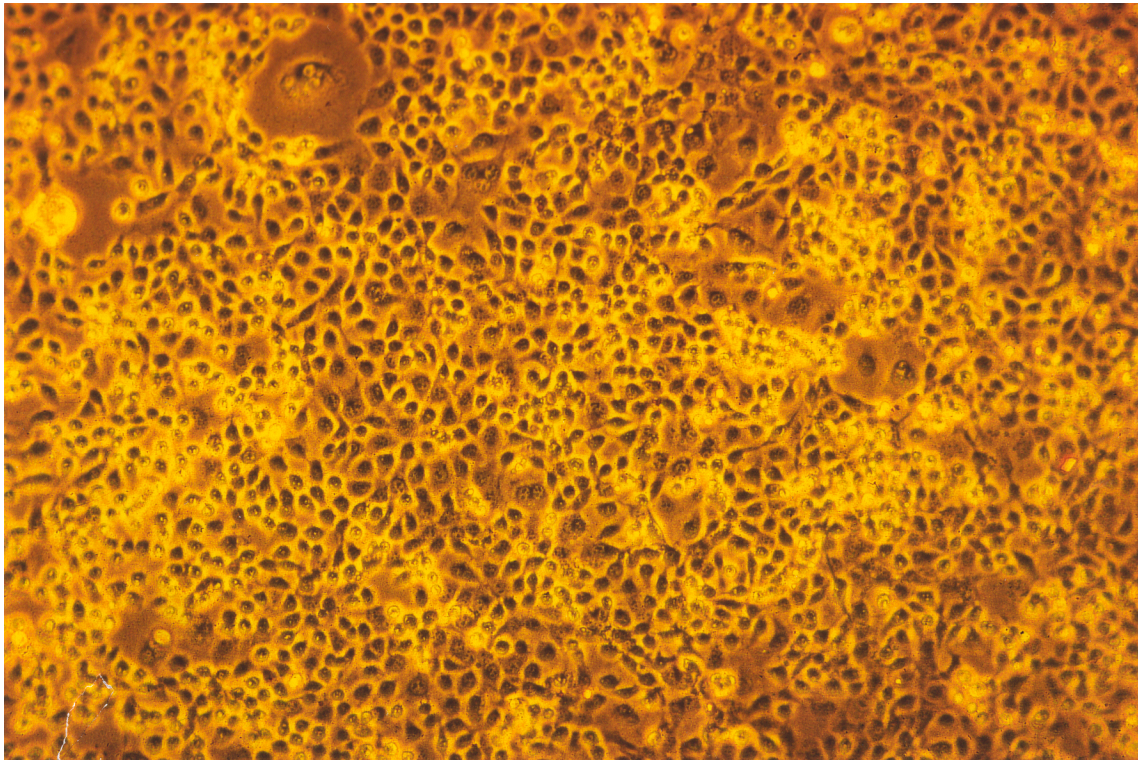


Abbildung 2: Lichtmikroskopische Morphologie der malignen Kolonkarzinomzellkultur CO-2. In der Zellkultur zeigten die Zellen ein epitheliales Wachstumsmuster mit zumeist dicht zusammengelagerten, kubischen bis rhomboiden oder polygonalen Zellen mit grossen Zellkernen und schmalen hellen Zytoplasma.

3.2 Durchflusszytometrische Analyse der Zellen nach Kultivierung

Die Zellen wurden nicht unmittelbar nach der Gewinnung auf ihre Oberflächenstrukturen hin untersucht, zuerst wurden sie in Kultur genommen und vermehrt. Nachdem genügend Zellmaterial vorhanden war, wurde durchflusszytometrisch der prozentuale Anteil der Fibroblasten sowie der Karzinomzellen ermittelt. Als Oberflächenmarker dienten der fibroblastenspezifische Antikörper ASO2, der anti-epitheliale-Marker Ber-EP4 sowie die tumorassoziierten Antikörper CEA und CA 19.9.

Wie Tabelle 3 zu entnehmen ist, konnten nur bei einer Zelllinie (PA-P-5) nahezu alle Zellen (97.5%) identifiziert werden, 69.2% Karzinomzellen und 28.3% Fibroblasten. Der Nachweis der Zellzugehörigkeit gelang bei zehn Tumorzelllinien für maximal 25% der Zellen, bei vier Zelllinien für 25-50% und bei vier Zelllinien für 50-75% der Zellen. Der höchste Anteil der Fibroblasten lag mit 33.7% bei der Zelllinie PA-1.

Tabelle 3: Durchflusszytometrische Analyse der Karzinomzellen und Fibroblasten nach Kultivierung unter Verwendung des fibroblastenspezifischen Antikörpers ASO2, des anti-epithelialen Antikörpers Ber-EP4 sowie der tumorassoziierten Antikörper CEA und CA 19.9, Angaben in Prozent.

Identifizierte Zellen insgesamt in % = Fibroblasten in % + höchster positiver Marker für Karzinomzellen in %

Zelllinie	Fibroblasten in %	Karzinomzellen in %			identifizierte Zellen insges. in %
	ASO2	Ber-EP4	CEA	CA19.9	
PA-1	33,70	26,50	24,10	36,20	69,90
PA-3	9,30	0,10	0,80	5,60	14,90
PA-4	9,20	0,60	0,00	4,10	13,30
PA-P-5	28,30	69,20	41,90	36,80	97,50
PA-6	1,50	1,00	4,30	0,80	5,80
PA-7	1,80	6,00	8,80	1,50	10,60
PA-P-8	14,50	32,30	28,30	56,70	71,20
PA-9	5,60	1,00	14,60	5,00	20,20
PA-10	4,40	0,50	28,00	10,80	32,40
PA-11	5,80	21,20	19,30	22,00	27,80
PA-12	17,30	3,90	21,70	17,90	39,00
PA-13	3,80	7,30	11,50	9,70	15,30
MA-2	22,50	3,40	0,00	20,80	43,30
MA-4	0,50	0,00	0,80	2,80	3,30
HE-2	9,50	1,40	3,40	1,50	12,90
HE-3	2,80	0,90	5,70	1,30	8,50
CO-1	6,40	4,50	0,00	10,50	16,90
CO-2	17,90	38,60	41,40	32,50	59,30
CH-1	21,40	26,10	30,30	28,70	51,40

3.3 Verhalten der Zellen in Kultur

3.3.1 Karzinomzellen

Der Anteil der Oberflächenmarker Ber-EP4, CEA und CA 19.9, die zur Identifizierung der Karzinomzellen dienen, wurde bei vierzehn Zelllinien im Verlauf durchflußzytometrisch dokumentiert.

Die Zelllinie PA-P-5 zeigte eine weitere Zunahme der Expression von Oberflächenantigenen (siehe Abbildung 3), nach einer Kulturdauer von zwei Monaten lag der Anteil der Karzinomzellen bei 98,4%.

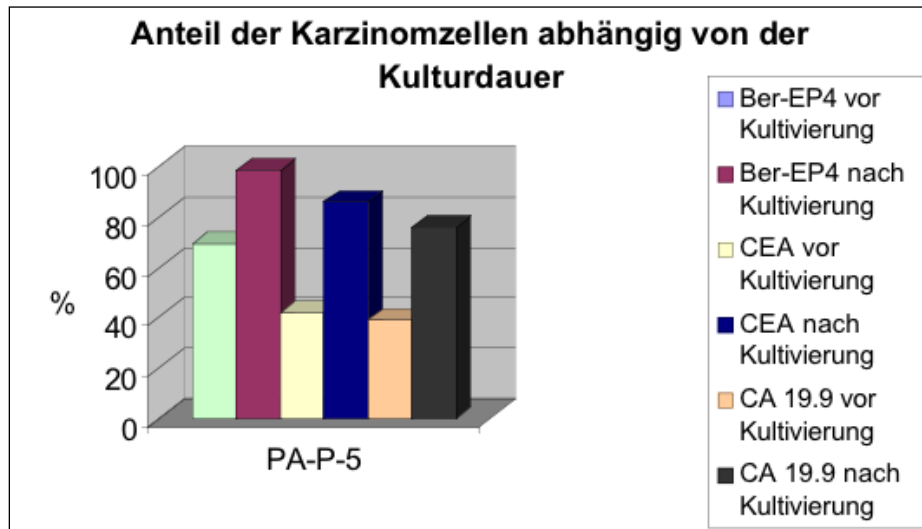
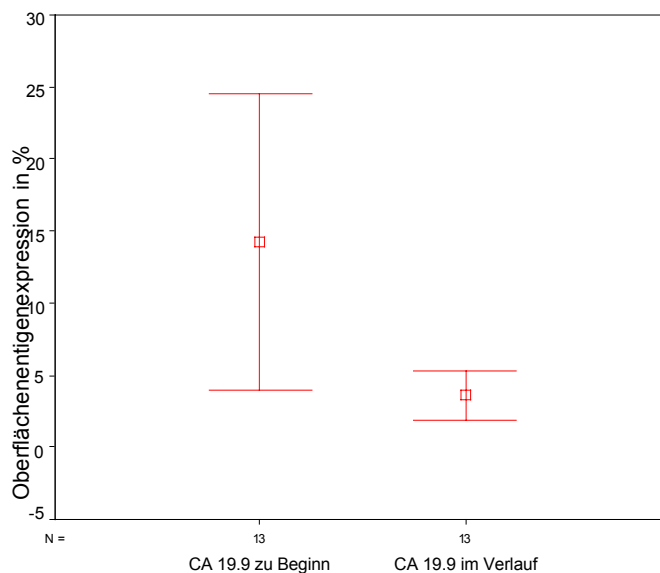


Abbildung 3: Durchflusszytometrische Bestimmung der Ber-EP4, CEA und CA 19.9 positiven Zellen der Zelllinie PA-P-5 vor und nach einer Kulturdauer von 2 Monaten, Angaben in Prozent.

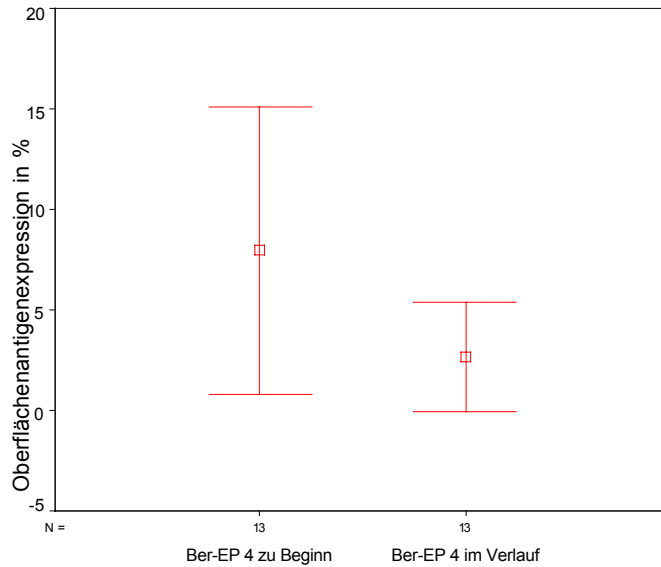
Die restlichen dreizehn Zelllinien zeigten eine unveränderte Expression, eine Abnahme bzw. einen vollständigen Verlust der Oberflächenmarker nach 4-6 Kulturpassagen. Für die Oberflächenantikörper CA 19.9, Ber-EP4 und CEA wurden die Mittelwerte für die Markierungsrate in % im Verlauf errechnet (siehe Abbildung 4-6), es zeigte sich eine deutliche Abnahme des Mittelwertes bei allen drei Antikörpern.



Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SA): zu Beginn: MW 14,24 SA 17,00
im Verlauf: MW 3,59 SA 2,86

Signifikanzniveau p: $p < 0,05$

Abbildung 4: Durchflusszytometrische Messung der CA 19.9 positiven Zellen von 13 Zelllinien im Verlauf, d.h. nach 4-6 Kulturpassagen, Angaben in Prozent

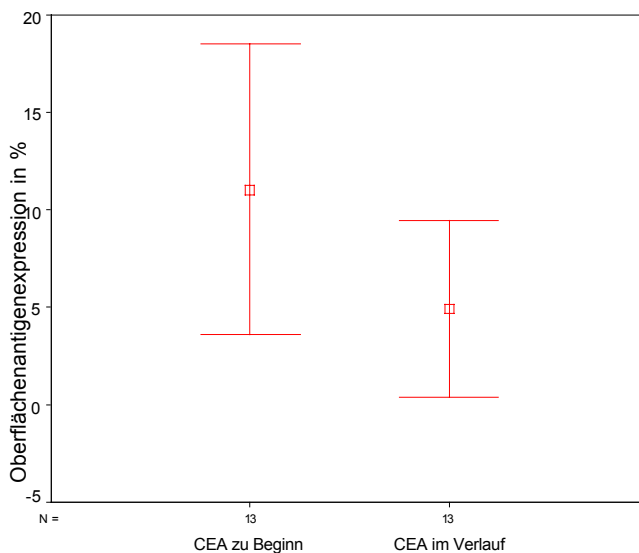


Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SA): zu Beginn: MW 7,95 SA 11,82

im Verlauf: MW 3,02 SA 4,5

Signifikanzniveau p: nicht signifikant

Abbildung 5: Durchflusszytometrische Messung der Ber-EP 4 positiven Zellen von 13 Zelllinien im Verlauf, d.h. nach 4-6 Kulturpassagen, Angaben in Prozent.



Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SA): zu Beginn: MW 11,03 SA 12,33

im Verlauf: MW 4,92 SA 7,55

Signifikanzniveau p: $p < 0,05$

Abbildung 6: Durchflusszytometrische Messung der CEA positiven Zellen von 13 Zelllinien im Verlauf, d.h. nach 4-6 Kulturpassagen, Angaben in Prozent.

3.3.2 Fibroblasten

Die Zelllinien PA-P-5, PA-P-8, MA-2 und CH-1 wurden anfänglich auf ihren Fibroblastengehalt überprüft, nach einem Zeitraum, währenddessen die Zellen kultiviert waren, wurde erneut der Fibroblastenanteil gemessen. Der Abstand zwischen den beiden Analysen betrug bei den Zelllinien PA-P-5, PA-P-8 und MA-2 zwei Monate, bei der Zelllinie CH-1 drei Monate.

Mit Zunahme der Kulturdauer zeigte sich eine deutliche Abnahme der Fibroblastenzahl bei allen vier Zelllinien (siehe Abbildung 7), bei der Zelllinie PA-P-8 waren keine Fibroblasten mehr nachweisbar.

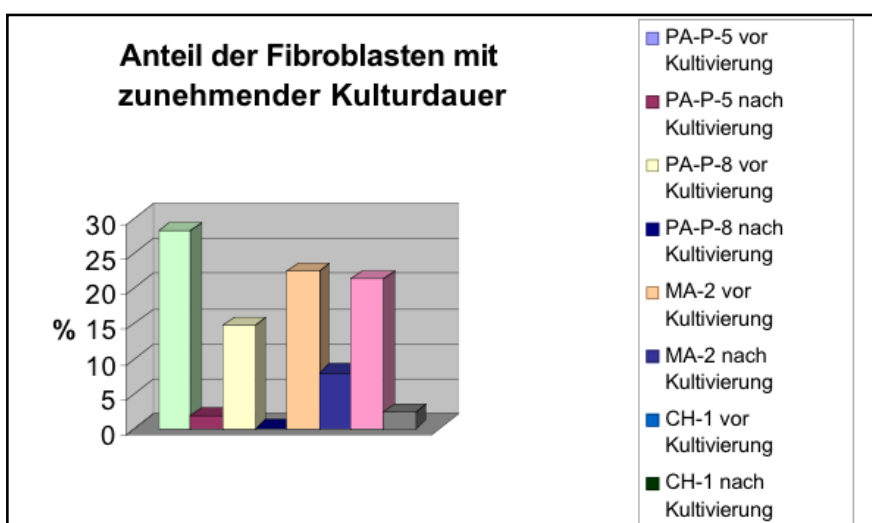


Abbildung 7: Anteil der Fibroblasten (bestimmt mit dem fibroblastenspezifischen Oberflächenantikörpers ASO2) in der Zellsuspension, vor und nach einer Kulturdauer von 2-3 Monaten, Angaben in Prozent.

3.4 Selektion der Karzinomzellen

3.4.1 Zellsortierung mit MicroBeads

Vor und nach Durchführung einer Zellsortierung mit MicroBeads wurde bei den Zelllinien PA-3, PA-4, PA-10, MA-2 und CH-1 durchflußzytometrisch der Fibroblastenanteil bestimmt.

Nach der Zellsortierung zeigte sich eine deutliche Abnahme der Fibroblastenzahl (siehe Abbildung 8). Bei den Zelllinien PA-4, PA-10 und CH-1 waren keine Fibroblasten mehr nachweisbar, bei PA-3 und MA-2 waren noch Fibroblasten in deutlich vermindertem prozentualen Anteil vorhanden. Im Durchschnitt konnte eine Reinheit der Zelllinien von 98% erreicht werden.

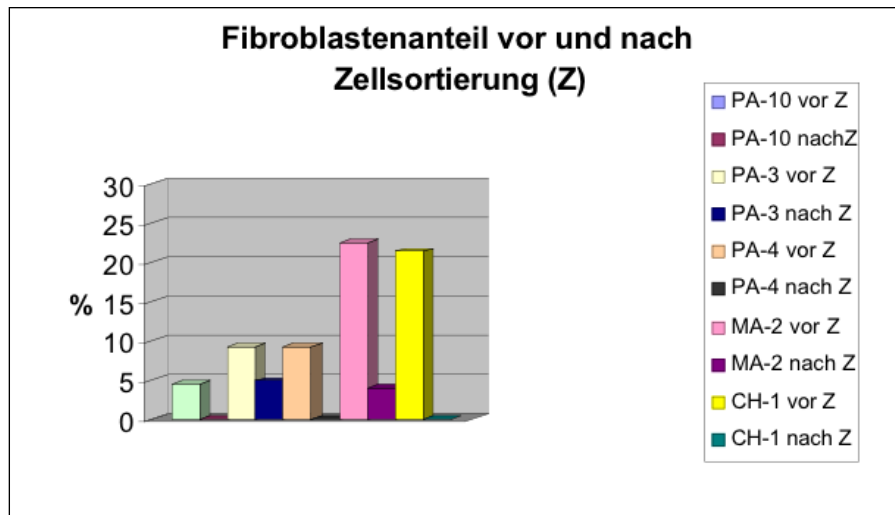


Abbildung 8: Anteil der Fibroblasten in den Zellsuspensionen, bestimmt mit dem fibroblastenspezifischen Oberflächenantikörper ASO2, vor und nach einer Zellsortierung mit MicroBeads, Angaben in Prozent.

Mittelwert = vorher 13,38, nachher 1,80; Standardabweichung = vorher 8,07, nachher 2,48

Die Signifikanz wurde wegen der geringen Fallzahl nicht berechnet.

3.4.2 Weichagarklonierung

Die Weichagarklonierungsmethode wurde bei 4 Zelllinien getestet, CO-2, PA-1, PA-P-5 und MA-2. Die Klonierungseffizienz (cloning efficiency), sie gibt den Prozentsatz der Zellen einer Kultur an, die die Fähigkeit besitzen ausgehend von einer einzelnen isolierten Zelle eine Zellkolonie zu bilden, wurde berechnet. Die Klone wurden durchflußzytometrisch auf ihre Oberflächenstrukturen hin untersucht.

Eine Erhöhung der Oberflächenantikörper Ber-EP4, CEA und CA 19.9 konnte nicht erzielt werden.

CO-2:

Von jeder Zellzahl wurden 2 Petrischalen beimpft. Unter dem Inversmikroskop ließ sich überprüfen, ob die Zellen in den Petrischalen auch einzeln suspendiert waren. Nach einer Woche war bereits eine Koloniebildung mit bloßem Auge erkennbar. Nach 3 Wochen hatten die Kolonien im Durchmesser eine Größe von ca. 1 mm, so dass sie ausgepickt werden konnten. In den Petrischalen mit 2 Zellen/ml konnten aus einer Schale 4 Kolonien und aus der anderen 6 Kolonien geerntet werden. Somit lag hier die Klonierungseffizienz bei ca. 50%. Aus den Petrischalen mit 20 Zellen/ml wurden weitere acht Klone geerntet. Eine Fibroblastenverunreinigung konnte durchflußzytometrisch bei einer Kolonie, welche aus einer Petrischale mit 20 Zellen/ml stammte, nachgewiesen werden.

PA-1:

Die Zelllinie zeigte ein ähnliches Klonierungsverhalten wie CO-2. Nach dreieinhalb Wochen konnten die Klone gepickt werden. In den Petrischalen mit 2 Zellen/ml waren in einer Schale 3 und in der anderen 4 Kolonien gewachsen. Die Klonierungseffizienz lag somit bei ca. 35%. Aus den Petrischalen mit 20 Zellen/ml wurden 10 Klone geerntet. Eine Fibroblastenkontamination konnte jeweils bei einem Klon der Verdünnungsstufe 2 Zellen/ml und 20 Zellen/ml nachgewiesen werden.

PA-P-5:

Hierbei handelte es sich um eine Zelllinie mit hoher Antigenexpression. Die Zellen wuchsen langsam, mit bloßem Auge konnte nach 3 Wochen eine Koloniebildung erkannt werden. Geerntet werden konnten die Klone nach 6 Wochen. In den Petrischalen mit niedriger Zellkonzentration (2 bzw. 20 Zellen/ml) zeigte sich kein Wachstum. In den Petrischalen mit 200 Zellen/ml, das heißt 1000 Zellen/Schale war nur in einer Schale eine Kolonie gewachsen. Somit lag die Klonierungseffizienz bei max. 0,1%. Es wurden noch fünf Klone aus den höher konzentrierten Verdünnungsstufen entnommen. Die Morphologie der einzelnen Zelle sowie das Wachstum im Zellverband hatte sich deutlich verändert, die CEA und Ca 19.9 Oberflächenexpression war auf unter 10 % gesunken. Die durchflusszytometrische Untersuchung ergab keinen Hinweis auf eine Fibroblastenkontamination.

MA-2:

Trotz zweimaliger Durchführung des Versuchs zeigte sich kein Wachstum.

Insgesamt wurden 41 Klone untersucht, 3 zeigten davon eine Verunreinigung mit Fibroblasten, dies entspricht einem prozentualen Anteil von 7%.

3.4.3 Klonierung durch Verdünnung (limiting dilution)

Diese Methode wurde an 4 Zelllinien CO-1, CO-2, PA-P-5 und CH-1 getestet. Die Klonierungseffizienz wurde bestimmt. Es konnten Zellklone gewonnen werden, die nicht mit Fibroblasten kontaminiert waren. Eine Erhöhung der Expression der Oberflächenmarker Ber-EP4, CEA und CA-19.9 konnte nicht erreicht werden. Eine reine Fibroblastenkultur befand sich unter den gewonnen Zellkolonien nicht.

CO-1:

Es wurde ein Ansatz mit rechnerisch 0,3 Zellen/well und halbkonditioniertem Medium gewählt. In 13 wells kam es zur Koloniebildung. Somit lag bei diesem Ansatz die Klonierungseffizienz bei ca. 70%. Die weitere Expansion gestaltete sich komplikationslos. Zwei der 13 Zellklone zeigten eine niedrige Fibroblastenkontamination.

CO-2:

Auch hier wurde der selbe Ansatz wie bei CO-1 gewählt. Es konnten 9 Kolonien geerntet werden. Die weitere Expansion war komplikationslos. Die Klonierungseffizienz lag hier bei ca. 50%. Durchflußzytometrisch konnte bei zwei Kolonien eine Fibroblastenkontamination nachgewiesen werden.

PA-P-5:

Da die Zellen der niedrigen Verdünnungsstufen unter dem Einsatz von HKM nicht gewachsen sind, wurden feeder-Zellen verwendet. Die Mikrotiterplatten wurden mit 0,3, 1 und 10 Zellen/well besetzt. Bei dem Ansatz 0,3 Zellen/well kam es in einem well zu einer Koloniebildung, somit liegt die Klonierungseffizienz bei ca. 5%. Der Ansatz mit 1 Zelle/well zeigte 12 Koloniebildungen. Nach dem Umsetzen sind nur die Zellen einer Kolonie angewachsen. Ein weiterer Ansatz mit 10 Zellen/well zeigte auch ohne die Verwendung von feeder-Zellen ein gutes Wachstum, in 51 well kam es zur Koloniebildung. Die weitere Expansion zeigte ein Anwachsen von 32 Zellklonen, wovon jeder dritte Klon durchflußzytometrisch untersucht wurde. Von den untersuchten Klonen wies nur einer eine Fibroblastenverunreinigung auf .

CH-1:

Unter Verwendung von HKM und einer Verdünnungsstufe von 0,3 Zellen pro Vertiefung, kam es zu einem Anwachsen von 15 Kolonien. Die Zellen konnten problemlos vermehrt werden. Die Klonierungseffizienz betrug hier ca. 80%. Jeder zweite Klon wurde untersucht, Fibroblasten konnten nicht nachgewiesen werden.

Insgesamt wurden 41 Klone untersucht, 5 zeigten davon eine Verunreinigung mit Fibroblasten, dies entspricht einem prozentualen Anteil von 12%.

3.5 Messung des DNA-Gehaltes der Zellen

Bei allen 19 Zelllinien wurde mittels image-cytometry die Zellploidy durch Messung des DNA-Gehaltes bestimmt. Die Messung wurde an Zellen mit unterschiedlicher Vorbehandlung durchgeführt. Die Vorbehandlung kann der Tabelle 6 entnommen werden.

Tabelle 6: Bestimmung der Zellploidy durch Messung des DNA-Gehaltes an unterschiedlich vorbehandelten Zelllinien; *Kontamination mit diploiden Zellen

Zelllinie	Vorbehandlung	Ploidy
PA-1	unslektioniert, ohne länger Kulturdauer	tetraploid
PA-3	Zellsortierung mit Microbeads	tetraploid
PA-4	Zellsortierung mit Microbeads	hypertetraploid
PA-P-5	unselektioniert, 3 Monate in Kultur	hyperdiploid
PA-6	Zellsortierung mit MicroBeads	hyperdiploid
PA-7	unselektioniert, ohne längere Kulturdauer	hypertetraploid *
PA-P-8	unselektioniert, ohne längere Kulturdauer	hyperdiploid*
PA-9	unselektioniert, ohne längere Kulturdauer	diploid
PA-10	Zellsortierung mit MicroBeads	hypertetraploid
PA-11	unselektioniert, ohne längere Kulturdauer	diploid
PA-12	unselektioniert, ohne längere Kulturdauer	hyperdiploid *
PA-13	unselektioniert, ohne längere Kulturdauer	diploid
MA-2	Zellsortierung mit MicroBeads	tetraploid
MA-4	Zellsortierung mit MicroBeads	hypertetraploid
HE-2	Zellsortierung mit MicroBeads	hyperdiploid
HE-3	unselektioniert, ohne längere Kulturdauer	hyperdiploid *
CO-1	selektioniert durch Verdünnung	hyperdiploid
CO-2	selektioniert durch Verdünnung	hypertetraploid
CH-1	selektioniert durch Verdünnung	hyperdiploid

Von den gemessenen Zelllinien zeigten zwei ein diploides, acht ein hyperdiploides, drei ein tetraploides und fünf ein hypertetraploides Muster (siehe Tabelle 5).

Eine Kontamination mit einer diploiden Zellpopulation konnte bei vier Zelllinien festgestellt werden, hierbei handelte es sich jeweils um eine Zelllinie, die weder selektiv behandelt wurde, noch für längere Zeit in Kultur gehalten worden ist.

Eine Kontamination mit Fibroblasten konnte bei den diploiden Zelllinien weder anhand der DNA-Histogramme noch des DNA-Index sicher ausgeschlossen werden.

Interpretation von DNA-Histogrammen (Abbildung 9-11) bezüglich einer möglichen Kontamination mit Fibroblasten, unter Einbeziehung der Ploidy.

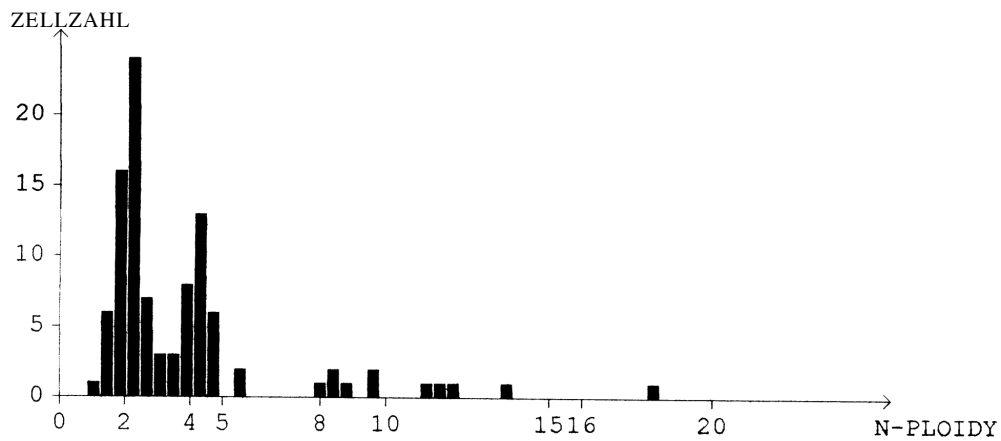


Abbildung 9: Zelllinie PA-13, diploid; es stellen sich eine diploide und eine aneuploide Zellpopulation dar, eine Kontamination mit Fibroblasten kann nicht ausgeschlossen werden.

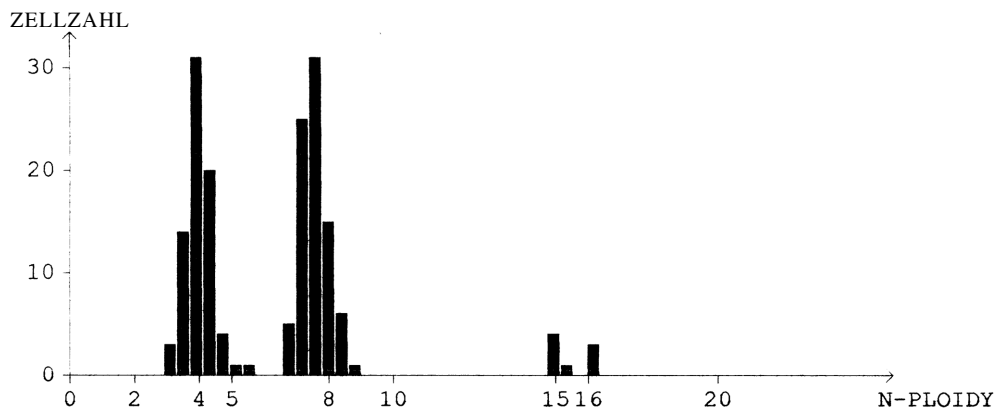


Abbildung 10: Zelllinie MA-2, tetraploid; das Histogramm zeigt eine Zelllinie mit zwei aneuploiden Zellpopulationen, diploide Zellen sind nicht vorhanden, eine Fibroblastenkontamination ist unwahrscheinlich.

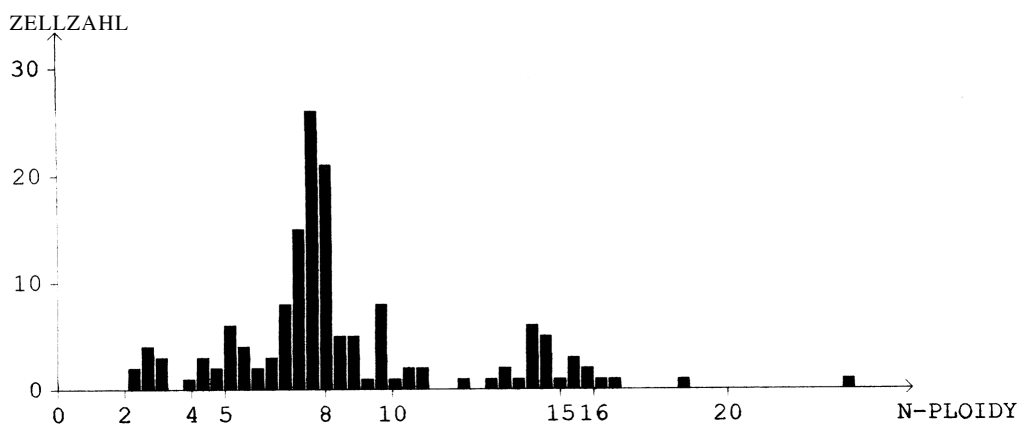


Abbildung 11: Zelllinie PA-7, hypertetraploid; zu sehen sind mehrere unregelmäßige peaks mit unterschiedlichen Zellpopulationen, diploide Zellen sind vorhanden, hierbei handelt es sich vermutlich um eine Kontamination mit Fibroblasten.

3.6 Induktion der Oberflächenantigenexpression zur Erhöhung des Differenzierungsgrades

Durch Veränderungen des Kulturmediums, Ersatz von Glukose durch Galaktose, bzw. Zugabe von Zusätzen wie TGF- β 1, PMA bzw. Natrium-Butyrat wurde versucht die Oberflächenantigenexpression zu erhöhen.

Die Untersuchungen wurden an den Zelllinien MA-2, CH-1 und CO-2 durchgeführt. Mittels Durchflusszytometrie wurden die prozentualen Veränderungen der CEA-, CA 19-9 und Ber-EP4-Antigenexpression vor und nach den unterschiedlichen Behandlungen gemessen.

Der anti-epitheliale-Antikörper Ber-EP4 war zu keiner Zeit der Messungen nachweisbar.

Tabelle 4: Durchflusszytometrisch gemessene CEA-Antigen-Expression (%) der Zelllinien MA-2, CH-1 und CO-2 nach Verwendung eines galaktosehaltigen Mediums bzw. der Inkubation mit TGF- β 1, PMA und Natrium-Butyrat; x = schlechtes Wachstum, keine Messung möglich;

Differenzierungsinduktoren	CEA-Antigenexpression in % bei den Zelllinien		
	MA-2	CH-1	CO-1
Galaktose			
hohe Zellzahl	0,0	2,2	0,8
niedrige Zellzahl	x	0,1	0,0
TGF- β 1	0,0	0,0	0,9
PMA			
10 ng/ml, 1 h Inkubation	5,2	8,7	7,3
10 ng/ml, 24 h Inkubation	2,3	0,0	1,3
100 ng/ml, 1 h Inkubation	0,0	4,2	2,3
100 ng/ml, 24 h Inkubation	0,0	0,0	0,0
Natrium-Butyrat	x	1,7	0,0

Tabelle 5: Durchflusszytometrisch gemessene CA 19.9-Antigen-Expression (%) der Zelllinien MA-2, CH-1 und CO-2 nach der Verwendung eines galaktosehaltigen Mediums bzw. der Inkubation mit TGF- β 1, PMA und Natrium-Butyrat; x = schlechtes Wachstum, keine Messung möglich;

Differenzierungsinduktoren	CA 19.9-Antigenexpression in % bei den Zelllinien		
	MA-2	CH-1	CO-1
Galaktose			
hohe Zellzahl	1,0	2,1	10,8
niedrige Zellzahl	x	2,9	3,8
TGF- β 1	0,0	1,3	5,2
PMA			
10 ng/ml, 1 h Inkubation	8,3	20,8	6,7
10 ng/ml, 24 h Inkubation	5,9	0,4	6,4
100 ng/ml, 1 h Inkubation	6,5	1,3	4,5
100 ng/ml, 24 h Inkubation	0,0	0,0	0,0
Natrium-Butyrat	x	6,0	5,9

Die Werte der Tabellen 4 und 5 zeigen die prozentualen Veränderungen der CEA- und CA 19.9-Antigenexpression nach dem Einsatz von Differenzierungsinduktoren.

Die Ausgangswerte lagen bei beiden Tumormarkern zwischen 0 und 2,2%.

CEA-Expression:

Eine Erhöhung der CEA-Expression auf Werte zwischen 5 und 10 % zeigte sich bei der PMA-Behandlung (10 ng/ml, Inkubationszeit 1 h) bei allen drei Zelllinien. Eine Erhöhung der PMA-Konzentration bzw. der Inkubationszeit führte zu keiner weiteren Steigerung. Durch den Einsatz von TGF- β 1, Natrium-Butyrat bzw. einem galaktosehaltigen Medium konnte keine relevante CEA-Erhöhungen erzielt werden.

CA 19.9 Expression:

Bei der parallel durchgeführten CA 19.9 Messung zeigten sich deutlichere Veränderungen. Bei hoch eingestellter Zellzahl und einem galaktosehaltigen Medium konnte bei der Zelllinie CO-2 eine Erhöhung der Antigenexpression auf 10,8% erreicht werden. Der Zusatz TGF- β 1 führte bei der gleichen Zelllinie zu eine Erhöhung auf einen Wert zwischen 5-10%. Natrium-Butyrat zeigte den gleichen Effekt bei zwei Zelllinien, der Wert für die dritte Zelllinie konnte wegen schlechtem Wachstums nicht bestimmt werden. Der höchste Wert von 20,8% wurde bei der Zelllinie CH-1, welche mit PMA (10 ng/ml, Inkubationszeit 1 h) behandelt wurde, gemessen. Die Zelllinien MA-2 und CO-2 zeigten bei der gleichen Konzentration und Inkubationszeit Werte zwischen 5-10%. Eine weitere Erhöhung der Konzentration und Inkubationszeit führte zu keinem weiteren Anstieg der Antigenexpression.

3.7 Immunfluoreszenzfärbung mit anti-p53-Antikörper

Zum Nachweis von mutiertem p53 im Zellkern wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Gefärbt wurden die Zellen der Linien CH-1, CO-1, CO-2, PA-1 und MA-2.

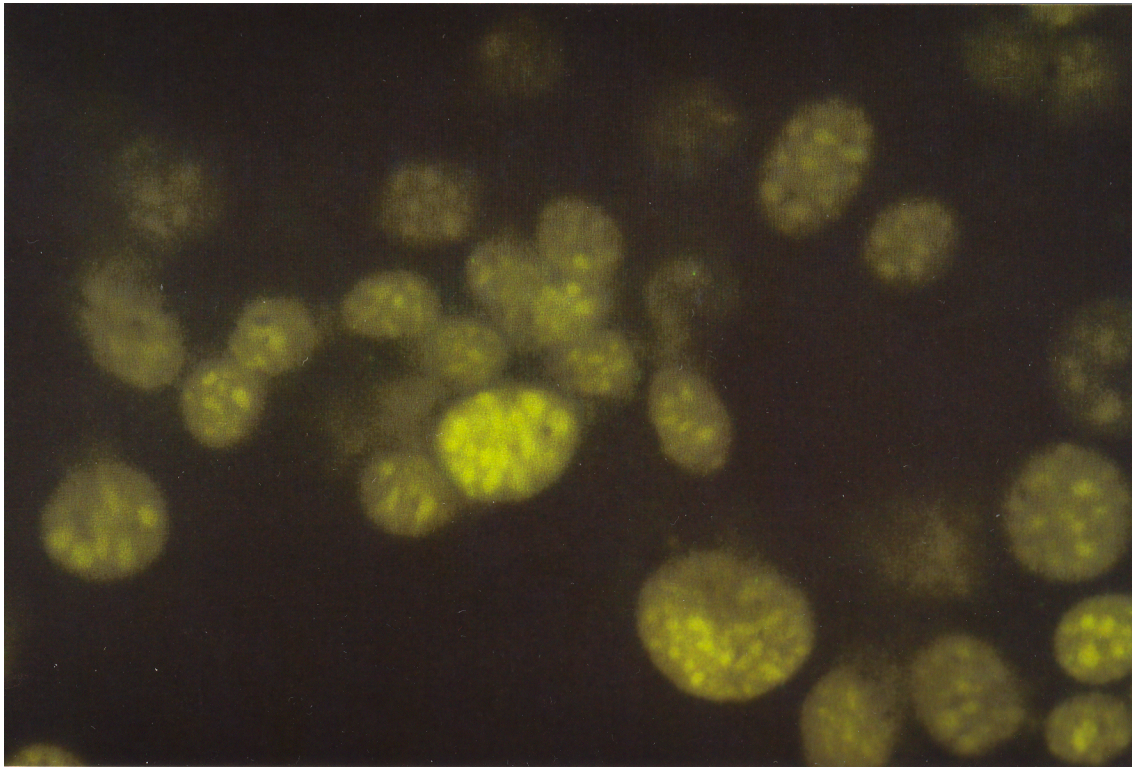


Abbildung 12: anti-p53-Färbung, positive Reaktion der Zelllinie CO-1

Die Zelllinie CO-1 und PA-1 zeigten eine positive Reaktion mit dem anti-p53-Antikörper, die anderen Präparate zeigten keine spezifische Fluoreszenz.

3.8 Quantitative Bestimmung der Hormone Bombesin und Somatostatin

Die quantitative Bestimmung der Peptide Bombesin und Somatostatin wurde bei allen 19 Zelllinien durchgeführt.

Die gemessenen Werte für Bombesin lagen bei 18 Proben zwischen 114 und 209 pg/ml, bei einer Probe lag der Wert unter 50 pg/ml. Normbereich (für Serum) 50 bis 250 pg/ml.

Die Zelllinien mit normalen Werten für Bombesin zeigten eine geringe bis fehlende Expression von Zellmembranantigenen wie Ber-EP4, CEA und CA19.9 sowie einen niedrigen Differenzierungsgrad, bei der Zelllinie mit hoher Zellmembranantigenexpression lag der Wert unter der Nachweisgrenze.

Die Werte für Somatostatin lagen bei 17 Proben unter dem Normbereich (für Serum) von 12,5 pg/ml, bei zwei Proben lagen die Werte mit 13 bzw. 15 pg/ml im unteren Normbereich.

4. Diskussion

Maligner Aszites bzw. Pleuraerguss enthält hämatologische Zellen, mesenchymale Zellen und Tumorzellen. Zu den mesenchymalen Zellen gehören Fibroblasten und die Körperhöhlen auskleidenden Mesothelzellen.

4.1 Allgemeines zur Morphologie und zur Identifikation von Zellbestandteilen mit Antigencharakter durch Einsatz von Antigen-Antikörper-Reaktionen

4.1.1 Fibroblasten

Die Fibroblasten werden traditionell als Zellen mit flach gestrecktem Zellkörper, verzweigten zytoplasmatischen Ausläufern, ovalem Zellkern und der Fähigkeit Interzellulärsubstanz zu synthetisieren und zu sezernieren beschrieben.

Sie stellen jedoch eine sehr heterogene Zellpopulation dar. Bereits in den frühen 60er Jahren wurden von Castor et al. (1962, S. 711) Unterschiede bezüglich Morphologie und Proliferation von Fibroblasten in Zellkultur unterschiedlichen anatomischen Ursprungs beschrieben. Auch Fibroblasten des gleichen anatomischen Ursprungs weisen Unterschiede in ihrer Aktivität und Funktion auf. Verschiedene Kriterien wurden verwendet, um Fibroblasten mit ähnlicher Morphologie in funktionelle Untergruppen zu unterteilen. Elias et al. (1987, S. 57) konnten mittels eines Percoll-Dichte-Gradienten Lungenfibroblasten in drei Fraktionen auftrennen. Die Zellen unterschieden sich im Volumen und im Wachstumspotential. Mollenhauer und Bayreuther (1986, S. 165) etablierten anhand der Morphologie und der proliferativen Eigenschaften sowie des Typs der Kollagensynthese drei unterschiedliche Fibroblastenzellkulturen von der Haut und der Lunge von Ratten. Es wurde vermutet, dass die Veränderungen in der Funktion der Zellen in einem Zusammenhang mit dem Alter des Spendertiers stehen. Die Zellen einer etablierte Fibroblastenlinie WI-38 wurden auf morphologische Unterschiede in Abhängigkeit von der Kulturdauer licht- und elektronenmikroskopisch untersucht (Wolosewick und Porter 1977, S. 197). Die Lungenfibroblasten zeigten unabhängig vom Alter eine intrakulturelle Heterogenität bezüglich Zellgröße und -form. Sie konnten in zwei morphologische Untergruppen, den typischen Fibroblastentyp und einen nicht spindelförmigen, etwas grösseren Zelltyp unterschieden werden. Abhängig von der Zellpassage zeigten die Zellen Unterschiede in der Beschaffenheit der Zelloberfläche und dem Auftreten von zytoplasmatischen "Bläschen". Unter bestimmten Kulturbedingungen können andere Zellarten, wie z.B. maligne Mesothelzellen (Klominek et al. 1989, S. 6118) ebenfalls eine spindelförmige Zellform ausbilden. Alleinige morphologische Bestimmungen reichen somit nicht aus, um zweifelsfrei Fibroblasten von anderen Zellen unterscheiden zu können, weshalb zur Identifizierung weitere Merkmale herangezogen werden müssen. Zum Nachweis von Fibroblasten wurden unterschiedliche monoklonale Antikörper, wie Thy-1, 6-19, 1B10, 5B5 verwendet. Bei den meisten Antikörpern kommt es jedoch zu einer

Kreuzreaktion mit der Extrazellulärmatrix (Van Vliet et al. 1986, S. 888) oder anderen Zelltypen wie Gewebsmakrophagen, Monozyten, Plasmazellen, endothelialen oder neuronalen Zellen (Singer et al. 1989, S. 166; Abboud et al. 1986, S. 1196; Janin et al. 1990, S. 237; Linge et al. 1989, S. 519).

Ein neuer fibroblastenspezifischer Antikörper, der ein membrangebundenes Protein mit hoher Spezifität erkennt, ist der AS02. Er bindet nicht an Blutzellen, Keratinozyten oder Endothelzellen sowie Komponenten der extrazellulären Matrix. Gleichzeitig ermöglicht er den Nachweis humaner Fibroblasten unterschiedlichen Ursprungs (Saalbach et al. 1996, S. 1314, 1997, S. 593).

4.1.2 Mesothelzellen und Karzinomzellen

Mesothelzellen gleichen morphologisch Epithelzellen, bilden ein einschichtiges, die serösen Körperhöhlen auskleidendes Plattenepithel, stammen aber von undifferenzierten Mesenchymzellen ab.

Für eine zuverlässige zytologische Beurteilung von Aszites und Pleuraergüssen ist die Differenzierung zwischen Mesothelzellen und Karzinomzellen von zentraler Bedeutung.

Die alleinige zytologische Beurteilung weist bei hoher Spezifität eine unbefriedigend niedrige Sensitivität von 30-60% auf (Mezger et al. 1991, S. 33; Spehn et al. 1995, S. 1197). Die wesentliche Ursache für diese niedrige Sensitivität liegt in der oft schwierigen Abgrenzung reaktiv veränderter Mesothelzellen und Makrophagen von Tumorzellen, bei niedriger Zellkonzentration und -degeneration und häufig starker entzündlicher Begleitreaktion (Bross et al. 1986, S. 468).

4.1.2.1 Intermediärfilamente

In letzter Zeit wurden zahlreiche Untersuchungen publiziert, die zum Ziel hatten, die Unterscheidung zwischen Mesothelzellen und Karzinomzellen durch zusätzliche immunzytochemische Verfahren zu verbessern. Einige Arbeiten gingen davon aus, dass es sich bei Zellen in Aszites- und Pleuraergüssen, die für einen epithelialen histogenetischen Ursprung charakteristische Antigen exprimieren, nur um Karzinomzellen handeln kann. Um eine möglichst große Sensitivität zu erreichen, wurden für solche Studien Antigene ausgewählt, die von einer Vielzahl verschiedener Epithelien exprimiert werden. Verwendet wurden Antikörper gegen Intermediärfilamente. Hierbei handelt es sich um intrazytoplasmatische Filamente mit einem Durchmesser von 8-10 nm. Sie bestehen aus Polypeptiden unterschiedlicher Aminosäuren und unterscheiden sich aufgrund dessen in 5 Klassen. Für die Beurteilung von Aszites sind vor allem Zytokeratin und Vimentin von Bedeutung. Zytokeratin findet sich in Epithelzellen, Vimentin wird in Zellen mesenchymalen Ursprungs gefunden. Die Untersuchung auf Zytokeratin, die sich bei histologischen Präparaten bewährt hat, konnte sich in der Ergusszytologie nicht

durchsetzen, da Zytokeratinantikörper mit mesothelialen Zellen reagieren können (Ghosh et al. 1987, S. 27). Tumorzellen können auch gleichzeitig verschiedene Klassen von Intermediärfilamenten exprimieren. Eine Koexpression von Vimentin und Zytokeratin konnte bereits bei einigen bestimmten Tumorgruppen (z.B. in Nierenzell-, Schilddrüsen-, Endometrium-, Ovarial-, Lungen- oder Mammakarzinomen) nachgewiesen werden. Die Vimentinexpression bei zytokeratin-positiven Tumoren könnte mit ihrer histogenetischen Nähe zum mesenchymalen Zellsystem zusammenhängen (Moll 1986, S. 38).

4.1.2.2 Anti-epitheliale-Antikörper

Die Zellmembranantigene EMA, epg34 und Ber-EP4 kommen auf fast allen benignen und malignen epithelialen Zellen vor und können mit Hilfe monoklonaler Antikörper nachgewiesen werden.

Das epitheliale Membranantigen EMA wurde für den immunhistochemischen Nachweis von Mikrometastasen im Knochenmark und in Lymphknoten sehr erfolgreich eingesetzt (Dearnaley et al. 1981, S. 85; Wells et al. 1984, S. 193). Für die sichere Unterscheidung von Mesothel- und Karzinomzellen aus Aszites- oder Pleuraergüssen scheint dieser Antikörper jedoch nicht geeignet zu sein, da eine Expression von EMA auf proliferierenden Mesothelzellen nachgewiesen werden konnte (O'Brien et al. 1980 S. 251; Lüttges et al. 1988, S. 137).

Der von Momburg et al. (1987, S. 2883) erstmals beschriebene monoklonale Antikörper HEA-125 ist gegen das Oberflächenglykoprotein epg34 gerichtet. Mit diesem Antikörper könne sicher zwischen epitheliale und nicht-epitheliale Gewebe unterschieden werden, auch Karzinomzellen mit einem sehr niedrigem Differenzierungsgrad könnten identifiziert werden. Dass epg34 streng spezifisch für epitheliale Zellen ist (Hastka und Pfister 1988, S. 245; Lüttges et al. 1988, S. 137), wurde von Mezger et al. (1991, S. 33) widerlegt. In 4 von 55 benignen Ergusspunktionen fanden sich wenige positiv reagierende Mesothelzellen, auch bei zwei Mesotheliomen konnte eine epg34-Expression nachgewiesen werden.

Ein neuer monoklonaler Antikörper, Ber-EP4, gerichtet gegen ein humanes epitheliales Antigen, bestehend aus zwei Glykoproteinen von 34 und 49 kDa, welches auf der Zelloberfläche und im Zytoplasma von allen epithelialen Zellen exprimiert wird, sei bisher der einzige monoklonale Antikörper, der bei deutlich höherer Sensitivität im Vergleich zur Nativzytologie eine Spezifität von 100% im Rahmen immunzytochemischer Untersuchungen von Punktatergüssen zeige (Latta et al. 1990, S. 213; Spehn et al. 1995, S. 1197; De Angelis et al. 1992, S. 111).

4.1.2.3 Tumorassoziierte Antikörper

Eine weitere Möglichkeit, maligne Zellen in Ergüssen zu identifizieren, ist die Anwendung von tumorassoziierten Antikörpern. Für gastrointestinale Tumoren findet vor allem das karzi-noembryonale Antigen (CEA) und das carbohydrate Antigen 19.9 (CA 19.9) Verwendung.

Das von Gold und Freedman 1965 (S. 467) entdeckte karzinoembryonale Antigen gehört zur Gruppe der onkofetalen Tumorantigene, es handelt sich um ein normalerweise nur von embryonalen Zellen synthetisiertes und sezerniertes hochmolekulares Glykoprotein. Immunhistologisch wird es im fetalen Gastrointestinaltrakt und Pankreas sowie vorwiegend in entodermalen Tumoren und sehr gering konzentriert im normalen Darmgewebe nachgewiesen. Der wichtigste Zieltumor der CEA-Bestimmung ist das Kolon- bzw. Rectumkarzinom. Erhöhungen können aber auch bei Magen-, Pankreas-, Bronchial- und Mammakarzinomen sowie dem C-Zell-Karzinom der Schilddrüse gemessen werden. Die klinische Anwendung betrifft vor allem die Verlaufsbeurteilung sowie die Prognose der Tumorerkrankung. CEA-positive Tumore sind in der Regel höherdifferenzierte Tumore mit einer besseren Prognose (Kloppel und Caselitz 1987, S. 109). Zu den nicht-neoplastischen gastrointestinalen Veränderungen, bei denen Epithelzellen gelegentlich oder konstant CEA-positiv sind, gehören Magenschleimhautmetaplasien und papilläre Ganghyperplasien (Kloppel 1986, S. 162). In der Ergussdiagnostik zeigt CEA eine relativ hohe Spezifität bei der Erkennung von Karzinomzellen (Ghosh et al. 1987, S. 19; Permanetter und Wiesinger 1987, S. 104). Kreuzreaktionen mit reaktiv veränderten Mesothelzellen und Granulozyten, welche jedoch zytologisch erkannt werden können, wurden beobachtet (Tickman et al. 1990, S. 494; Mezger et al. 1988, S. 634).

1979 entdeckte Koprowski mit dem Antikörper 1116 NS 19-9, welchen er auf der humanen Kolonkarzinomzelllinie SW 1116 testete, das Muzinantigen CA 19.9. Das Epitop für die antigene Eigenschaft von CA 19.9 wurde als Sialyl-lacto-N-fucopentaose identifiziert (Magnani et al. 1983, S. 5489). Immunhistologisch kann CA 19.9 vor allem in Tumorzellen von Kolon-, Pankreas-, Leber- und Magenkarzinomen nachgewiesen werden. Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass die Expression von CEA und CA 19.9 stark vom Sitz und von der histologischen Differenzierung des Primärtumors abhängt und nur bei bestimmten Karzinomtypen können Tumorzellen mit Hilfe dieser Antigene identifiziert werden (Mezger et al. 1991, S. 30).

4.2 Nachweisverfahren zur Unterscheidung maligner und benigner Zellen

4.2.1 Erklärungsansätze für die geringe Expression von tumorassoziierten bzw. anti-epithelialen Oberflächenantigenen

Zur quantitativen Analyse der Tumorzellen wurden die Zellen der etablierten Linien durchflusszytometrisch auf das Vorhandensein von Oberflächenantigenen untersucht. Zur Anfärbung wurden wegen ihrer hohen Spezifität der antiepithelialen Antikörper Ber-EP4 und die tumorassoziierten Antikörper CEA und CA 19.9 verwendet. Die Zellen zeigten in 95% der Fälle bereits zu Beginn der Kultivierung eine durchschnittlich niedrige Expression von Oberflächenantigenen, welche mit Zunahme der Kulturdauer noch weiter abnahm. Es stellte sich die Frage, um welche Zellart es sich bei den antigennegativen Zellen handelt, und warum diese Zellen, wenn es Karzinomzellen sind, keine antigenen Strukturen exprimieren.

4.2.1.1 Differenzierungsgrad des Primärtumors sowie der Metastasen

Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad der Zellen, ihrem Proliferations- und Wachstumsverhalten sowie der Expression von Oberflächenantigenen. Zellen von Tumoren mit einem hohen Malignitätsgrad zeigen eine geringe Differenzierung und Antigenexpression. Die Schlussfolgerung, dass es sich somit um einen Primärtumor mit hohem Malignitätsgrad handelt, kann nicht gezogen werden, da man weiss, dass Zellen von Metastasen eine selektierte Zellpopulation darstellen können (Riede et al 1995, S. 373). Metastasen können histomorphologisch dem Primärtumor entsprechen, häufig sind sie jedoch weniger differenziert und stärker proliferierend (Riede et al. 1995 S. 377). Beispielsweise hat eine immunhistochemische Untersuchung des Estrogen-Rezeptorstatus von Mamma-Karzinomen und ihrer Lymphknotenmetastasen gezeigt, dass dieser in etwa 20% der Fälle nicht übereinstimmt. Im Falle der Diskordanz hatten die Metastasen ganz überwiegend einen negativen Rezeptorstatus im Gegensatz zum Primärtumor (Nedergaard et al. 1995, S. 20). Auch konnte gezeigt werden, dass Zellkulturen, die aus unterschiedlichen Metastasen von demselben Patienten isoliert wurden, unterschiedliche Merkmale aufwiesen (Sprengli et al. 1983, S. 3828).

4.2.1.2 Veränderungen der Zellen unter Kulturbedingungen

Die Abnahme der Expression von Antigenen auf der Zelloberfläche kann möglicherweise als Reaktion der Zellen auf die veränderten Bedingungen in der Ergussflüssigkeit bzw. unter Kulturbedingungen gesehen werden.

Es gibt Untersuchungen, die zeigen, dass die Zusammensetzung des Mediums (Klominek et al. 1989, S. 6118; Auersperg 1978, S. 1872; O'Neill und Hsie 1978, S. 169; Boyer et al. 1989, S. 1495; Lane und Miller 1976, S. 147) sowie die Art der verwendeten Unterlage auf der die Zellen wachsen (Tateyama et al. 1990, S. 14; Rovinsky et al. 2001, S. 617; Greenburg und Hay 1988, S. 605) Auswirkungen auf den Differenzierungsgrad und die biologischen Aktivitäten der Zellen ausüben. Klominek verwendete beispielsweise für die Kultivierung von menschlichen Mesotheliomzellen Serum von unterschiedlichen Spezies. Die Zugabe von menschlichem Serum führte dazu, dass die Zellen eine epitheliale Morphologie ausbildeten, wobei die Verwendung von fetalem Kälberserum zur Ausbildung eines fibroblastenähnlichen Phenotyps führte. Sie schlussfolgerten, dass der Serumwechsel zu einer selektiven Stimulation verschiedener Subpopulationen führt. Boyer führte ähnliche Versuche an Blasenkarzinomzellen der Ratte durch und beschrieb die reversiblen Veränderungen der Zellen als epithelialen-mesenchymalen-Übergang. Unter Verwendung von fetalem Kälberserum lösten sich die Zellen aus dem Zellverband, zeigten ein spindelförmiges Aussehen und exprimierten Vimentin. Die Expression von Vimentin und den Verlust von Zytokeratin beobachtete auch Greenburg, als er eine mit Kollagen beschichtete Unterlage zur Kultivierung von Schilddrüsenzellen verwendete.

Neben den Kulturbedingungen sind weitere Faktoren für das Wachstumverhalten und die biologische Aktivität der Zellen von Bedeutung. Es gibt in der Literatur bereits mehrere Belege für die gegenseitige Beeinflussung kokultivierter Zellen, welche als mesenchymale-epitheliale Interaktionen bezeichnet werden. In einer 1989 (S. 197) veröffentlichten Arbeit konnten Senoo et al. zeigen, dass es zu metabolischen Veränderungen von Leberparenchymzellen und Fibroblasten kommt, wenn sie gemeinsam kultiviert werden. Die Kollagensynthese der Fibroblasten nahm ab, wohingegen die Albuminsynthese der Hepatozyten gesteigert war. Das Ausmass der mesenchymalen-epithelialen Interaktionen ist wesentlich vom Alter der Fibroblasten abhängig (Pourreyaon et al. 2003, S. 28). Unabhängig von ihrem Ursprung zeigten Fibroblasten in Primärkultur mit Zunahme der Zellpassagen eine Veränderung ihres Aussehens und ihrer Funktion. Wurden diese Zellen nun nach wenigen Zellpassagen mit epithelialen Zellen kokultiviert, induzierten sie deren Proliferation, Ausbreitung und Adhäsion, wohingegen ältere Fibroblasten die Proliferation kokultivierter epithelialer Zellen hemmten.

Eine Veränderung von Zelleigenschaften mit Zunahme der Kulturdauer konnte auch bei permanenten Zelllinien beobachtet werden. Die Zelllinie HL-60 wies nach mehreren Jahren in Kultur eine erhöhte Wachstumsrate und eine reduzierte Differenzierung (Macfarlane et al. 1988, S. 291) im Vergleich zum Zeitpunkt ihrer Etablierung auf (Collins et al. 1977, S. 347; Gallagher et al. 1979, S. 713).

4.2.1.3 Wachstumspotential von Fibroblasten in Kultur

Ein anderer möglicher Erklärungsansatz für die Abnahme der Oberflächenmarker wäre eine Überwucherung der Kultur durch Fibroblasten. Zur Identifizierung der Fibroblasten wurden die Zellen mit dem fibroblasten-spezifischen Antikörper ASO2 gefärbt. Es zeigte sich auch hier eine Abnahme des prozentualen Anteils dieser Zellpopulation mit zunehmender Kulturdauer. Über etablierte Tumorzelllinien aus Aszites von Patienten mit Ovarialkarzinom wird berichtet, dass nach einer Kulturdauer von 6 Monaten (Giancotti et al. 1989, S. 330) bzw. nach mehreren Zellpassagen (Alama et al. 1996, S. 83; Horowitz et al. 1985, S. 333; Lounis et al. 1994, S. 305) keine Fibroblasten mehr nachweisbar waren (siehe Tabelle 7). Eine mögliche Theorie für dieses Phänomen wäre, dass es sich hierbei um bereits absterbendes, nicht mehr proliferierendes Zellmaterial handelt. Anders verhält es sich bei einer primären Zellkultur, gewonnen aus solidem Gewebe. Hier stellt die Fibroblastenkontamination bereits bei einer niedrigen Ausgangsmenge ein großes Problem dar und es kommt häufig zu einer Überwucherung der Kultur durch die schneller proliferierenden Fibroblasten (Singer et al. 1989, S. 166; Linge et al. 1989, S. 519).

Tabelle 7: Kultivierung von Tumorzellen aus Ergusspunktaten; Dauer bzw. Anzahl der Zellpassagen bis keine Fibroblasten mehr nachweisbar waren.

Primärtumor	Nachweis	Fibroblastenfreiheit	Literaturstelle
Ovarialcarcinom	DNA-Messung	nach 6 Mon.	Giancotti et al. 1989
Ovarialcarcinom	DNA-Messung	nach 4-5 Zellpassagen	Alama et al. 1995
Ovarialcarcinom	Morphologie; Zytokeratin-AK	nach wenigen Zellpassagen	Horowitz et al. 1985
Ovarialcarcinom	Morphologie; Zytokeratin-AK; DNA-Messung	nach 2-3 Zellpassagen	Lounis et al. 1994
Cholangiocelluläres Karzinom	Fibroblasten-AK ASO2; DNA-Messung	nach 3 Mon.	unsere Ergebnisse

4.2.2 Grenzen des Aussagewertes der DNA-Messergebnisse

Zur weiteren Identifizierung der Zellen wurde eine DNA-Messung durchgeführt. Sie nimmt einen immer wichtigeren Stellenwert in der Tumorforschung ein. Patienten mit vergleichbarem Tumorstadium und vergleichbarer Histopathologie zeigen große Unterschiede im klinischen Verlauf. Es wird versucht, die Tumorzellen weiter zu charakterisieren und zu klassifizieren. Tumorzellen zeigen häufig eine Abweichung des Chromosomensatzes vom normalen, euploiden Bestand, die als Aneuploidie bezeichnet wird. Die damit verbundene Veränderung des DNA-Gehaltes lässt sich mit Hilfe des DNA-Index quantifizieren, der als Quotient aus dem Mittelwert des aneuploiden GO/1-Peaks und dem diploiden Wert berechnet wird. Diploide Tumoren haben eine signifikant bessere Prognose als aneuploide (Atkin 1976, S. 909). Zur Messung des DNA-Gehaltes finden vorwiegend die flow-cytometry (FC) und die image-cytometry (IC) Verwendung. Die IC gibt weiterhin Informationen über histologische Merkmale der Zellen wie Zellgröße, -form und -grenze. Das Zytoplasma kann hinsichtlich der Färbung und des Vorhandenseins von Vacuolen, der Zellkern bezüglich Form und Lokalisation beurteilt werden. Zelltrümmer, Zellaggregate und andere Zelltypen wie hämatologische Zellen können erkannt werden und fließen nicht in die Messung ein, weshalb wir uns zur Durchführung dieser Methode entschieden haben.

Wenn davon ausgegangen wird, dass es sich bei den mesenchymalen Zellen, also Fibroblasten und Mesothelzellen, um euploide Zellpopulationen handelt, kann bei aneuploiden Zelllinien anhand des DNA-Index und -Histogramms eine Kontamination mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Ein Nachweis bzw. Ausschluß einer Kontamination mit mesenchymalen Zellen kann nicht sicher geführt werden, wenn es sich um eine Tumorzelllinie mit normalem Chromosomensatz handelt bzw. ein Tumor mit unterschiedlichen Zellpopulationen vorliegt. Genetische Aberrationen führen zu einem polyclonalen Tumor mit unterschiedlichen Zelllinien in unterschiedlichen Regionen des Tumors oder in der gleichen Region. Der Grad der intratumoralen Heterogenität hängt ab von der Balance zwischen der genetischen Instabilität der proliferierenden Zellen und dem Überleben der bereits vorhandenen Zellen (Sasaki et al. 1995, S. 323; Vogelstein et al. 1988, S. 525; Chang et al. 1987, S. 184).

Des Weiteren wird über eine Assoziation von Tumor-DNA-Aneuploidy und tetraploiden Hautfibroblasten bei Patienten mit Karzinomen des Gastrointestinaltrakts berichtet (Danes et al. 1987, S. 584). Diese Korrelation besteht nicht nur bei hereditären Erkrankungen, sondern auch bei spontan aufgetretenen kolorektalen Tumoren (Svendsen et al. 1989, S. 755, 1990, S. 139). Inwieweit diese Tetraploidy auch bei Fibroblasten, die nicht von der Haut stammen auftritt, ist noch nicht untersucht. Agapova et al. (1996, S. 129) beschreiben, dass Fibroblasten, denen die endogene p53-Expression fehlt, einen instabilen Karyotypen besitzen. Während sie in Kultur wachsen, kann eine starke Tendenz zur Zunahme des Ploidylevels beobachtet werden.

Durch die alleinige Messung der Zellploidy kann eine Kontamination mit Fibroblasten nicht immer ausgeschlossen werden, weshalb auf die zusätzliche durchflusszytometrische Analyse nicht verzichtet werden sollte.

4.3 Techniken zur Separation der Karzinomzellen

Für die Eliminierung von Fibroblasten wurden viele unterschiedliche Methoden entwickelt, die entweder alleine oder in Kombination verwendet werden. Unterschiedliche Trypsinisierung (Kirkland und Bailey. 1986, S. 779), Verwendung von Dispase, eine Protease, die zur Ablösung von Fibroblasten und epithelialen Zellen führt, wobei sich die Fibroblasten, nicht aber die epithelialen Zellen vollständig voneinander lösen (Nagata und Matsumura 1986, S. 297), Percoll-Dichte-Gradienten-Zentrifugation, hier wird die unterschiedliche Dichte von epithelialen und mesenchymalen Zellen genutzt, um die Zellen zu trennen (Buitrago et al. 1977, S. 823), die Verwendung des monoklonalen Antikörper Thy-1 konjugiert mit dem Toxin Ricin, welches an die Fibroblasten bindet und sie abtötet (Paraskeva et al. 1985, S. 131), um nur einige zu nennen.

Wir haben uns für die Techniken der Zellklonierung und magnetischen Zellsortierung entschieden, weil wir Zellkulturen erhalten wollten, die zum einen keine Fibroblastenkontaminationen mehr aufweisen und zum anderen die Oberflächenmarker Ber-EP4, CEA und CA 19.9 in höherem Ausmaß exprimieren sollten als die Ausgangskulturen.

4.3.1 Weichagarklonierung

Eine von Courtenay und Mills (1978, S. 261) beschriebene modifizierte Softagar-Methode ist eine weit verbreitete Technik, bei welcher die Zellen unter niedriger Sauerstoffzufuhr und unter Zugabe von roten Blutzellen inkubiert werden. Diese Methode sollte eine Fibroblastenproliferation verhindern. Diese jahrelang gültige These wurde jedoch bereits durch einige Studien widerlegt (Lawton et al. 1994, S. 218; Gron et al. 1995, S. 87), weshalb wir uns zur Durchführung der einfacheren herkömmlichen Soft-Agar-Methode entschieden haben. Hierbei sollte die Proliferationsrate von Fibroblasten deutlich niedriger liegen als bei einem Wachstum auf Plastikboden (Lawton et al. 1994, S. 218). Ursächlich hierfür ist, dass die Zellen keine Möglichkeit haben, sich auf dem Untergrund anzuheften. Der Nachteil dieser Methode liegt jedoch darin, dass nicht alle Zellen in Weichagar wachsen.

4.3.2 Limiting dilution

Eine weitere gängige Methode stellt die Technik der Klonierung durch Verdünnung dar. Da man hier die Zelldichte massiv reduzieren muss, kann es sein, dass die Zellen nur schlecht oder überhaupt nicht wachsen. Die Klonierungseffizienz variiert bei den verschiedenen Zelltypen und kann zwischen 0,1% und 80-90% liegen (Morgan und Darling 1994, S. 120). Dies kann damit zusammenhängen, dass das Medium von der einzelnen Zelle nur unzureichend konditioniert wird und deshalb bestimmte Wachstumsfaktoren fehlen, oder dass es den Zellen an physischem Kontakt mangelt. Aus diesem Grund ist oft der Einsatz von Feeder-Zellen nötig, die das Zellwachstum und die Zellteilung anregen. Die Klonierungseffizienz bei den von uns durchgeführten Tests lag zwischen 5% und 80%. Eine reine Fibroblastenkultur wurde bei der Verdünnungsmethode nicht gewonnen, was die These unterstützt, dass es sich bei den Fibroblasten, die im Ergusspunktat enthalten sind, um nicht mehr proliferierendes Zellmaterial handelt.

4.3.3 Zellsortierung mit Microbeads

Die Zellsortierung mit magnetgekoppelten Antikörpern (MACS) wurde entwickelt zur Selektion von Zellen, Bakterien oder Mikroorganismen. Verwendung fand sie bisher zur Sortierung von humanen T- und B-Zellen (Semple et al. 1996, S. 955; Manyonda et al. 1992, S. 1), hämatopoetischen Stammzellen (Handgretinger et al. 1998, S. 987; Richel et al. 2000, S. 243) oder Tumorzellen aus solidem Tumorgewebe (Harbeck et al. 1995, S. 1249). Hierfür verwendeten Harbeck et al. operativ entferntes Tumorgewebe, stellten eine Einzelzellsuspension her und gewannen die Ovarialkarzinomzellen durch negative Tumorzellselektion. Dies bedeutet, dass nicht die Tumorzellen, sondern Lymphozyten, Leukozyten und Fibroblasten mit magnetgekoppelten Antikörpern markiert und entfernt wurden. Die so gewonnenen Zelllinien enthielten zu 93% Tumorzellen, durch Wiederholung der Prozedur konnte eine

Reinheit von 97% erzielt werden. Bei der von uns durchgeführten positiven Tumorzellselektion, die Tumorzellen wurden mit magnetgekoppelten Antikörpern markiert, erzielten wir eine durchschnittlich Reinheit von 98%.

Tabelle 8: Sortierung von Zellen durch magnetgekoppelte Antikörper (MACS): erreichter durchschnittlicher Reinheitsgrad (%).

Selektierte Zellart	Reinheit	Literaturstelle
Tumorzellen (Ovarialkarzinom)	93%, nach Wiederholung der Prozedur 97%	Harbeck et al. 1995
CD4+ T-Zellen CD 19+ B-Zellen	97% für CD4+ Zellen 92% für CD19+ Zellen	Semple et al. 1993
CD 34+ hämatopoetische Stammzellen	96,1%	Richel et al. 2000
CD 45R+ T-und B-Zellen	>98%	Manyonda et al. 1992
CD 34+ hämatopoetische Stammzellen	98,8%	Handgretinger et al. 1998
Tumorzellen (GI-Tumoren)	98%	unsere Ergebnisse

Abschliessend lässt sich sagen, dass sich sowohl die Techniken der Zellklonierung als auch die magnetische Zellsortierung zur Eliminierung von Fibroblasten eignen.

Eine höhere Expression von Oberflächenmarkern wäre theoretisch bei allen von uns durchgeführten Selektionsmethoden zu erwarten gewesen, was jedoch nicht der Fall war. Bei der Klonierung hätte man sich erhofft, Zellen mit erhöhter Antigenexpression zu vermehren, bei der magnetischen Zellsortierung wurden die Zellen separiert, die die entsprechenden Antigene exprimierten. Bis eine ausreichend hohe Zellzahl erreicht wurde, um sie durchflußzytometrisch auf ihre Oberflächenstrukturen untersuchen zu können, wurden sie erneut kultiviert. Wie bereits oben angeführt, könnte auch hierfür die Veränderung der Zelloberfläche durch die Kulturbedingungen bzw. genetische Veränderungen während der Vermehrung der Zellen ursächlich sein.

Es stellt sich die Frage, warum eine Selektionsbehandlung durchgeführt werden sollte, wenn die Fibroblastenzahl mit zunehmender Kulturdauer abnimmt, wie bereits in der Literatur beschrieben und durch unsere Tests bestätigt. Die Antwort ist, dass die Zellen nicht für einige Monate kultiviert werden müssen. Durch die Selektionsbehandlung, welche leicht durchgeführt werden kann, können die Zelllinien innerhalb kürzester Zeit für Untersuchungen verwendet werden, und somit können die Vorteile der Primärzellkultur genutzt werden.

4.4 Einfluss von Differenzierungsinduktoren auf die Antigenexpression von Tumorzellen

Es wurde versucht durch den Zusatz von TGF- β 1, PMA in unterschiedlichen Konzentrationen und mit unterschiedlichen Inkubationszeiten, durch Natrium-Butyrat und den Ersatz von Glucose durch Galactose im Kulturmedium Einfluss auf die Proliferationsrate, den Differenzierungsgrad und die Expression von Oberflächenantigenen wie CEA und CA 19.9 zu nehmen. Je höher der Differenzierungsgrad, desto höher ist die Expression von Oberflächenantigenen und desto niedriger ist die Proliferationsrate.

4.4.1 Human transforming growth factor beta 1

TGF- β 1 gehört zu einer Familie von Polypeptiden, die regulierend auf Wachstum und Differenzierung Einfluss nehmen (Massague 1987, S. 437; Cheifetz et al. 1987, S. 409). Eine ihrer biologischen Aktivitäten ist ihre Fähigkeit, in vitro das Wachstum von vielen unterschiedlichen epithelialen Zellen einschliesslich vieler humaner Karzinomzellen zu hemmen (Moses et al. 1987, S. 1; Knabbe et al. 1987, S. 417; Russell et al. 1988, S. 5126). TGF- β bindet an hochaffine Oberflächenrezeptoren. Der intrazelluläre Mechanismus, durch welchen die biologischen Aktivitäten vermittelt wird, ist noch wenig verstanden (Boyd und Massague 1989, S. 2272). Hoosein et al. (1989, S. 442) beobachteten eine Korrelation zwischen dem Grad der Differenzierung von Kolonkarzinomzellen und der Sensitivität gegenüber dem antiproliferativem und differenzierungsinduzierenden Effekt von TGF- β 1, wenig differenzierte Zellen zeigten keine Veränderungen. Ein Mangel an TGF- β -Rezeptor-Expression in malignen Zellen schützt diese vor einer Wachstumsinhibition (Kimchi et al. 1988, S. 196).

Die zellulären Auswirkungen von TGF- β 1 sind vielfältig (Chakrabarty et al. 1988, S. 4059), es kommt zu morphologischen Veränderungen der Zelle, die Proteinexpression von Glykoproteinen wie CEA und Extrazellulärmatrixbestandteilen wie Laminin und Fibronectin nimmt zu. Laminin und Fibronectin inhibieren wiederum das Zellwachstum (Chakrabarty et al. 1990, S. 493). CEA verhält sich wie ein interzelluläres Adhäsionsmolekül (Benchimol et al. 1989, S. 327), eine vermehrte Produktion führt zu einem höheren Differenzierungsgrad.

4.4.2 Natrium-Butyrat (SB)

SB führt zu reversiblen Veränderungen der Morphologie, Wachstumsrate und Enzymaktivitäten bei verschiedenen Zelltypen, die teilweise durch cAMP vermittelt werden (Prasad und Sinha 1976, S. 125). Mit SB behandelte Kolonkarzinomzellen zeigten eine Veränderungen in der Proteinzusammensetzung der Zellmembran, eine Zunahme der Alkalischen-Phosphatase-Aktivität und eine Abnahme der Wachstumsrate (Kim et al. 1980, S. 1185). Eine ausreichend lange Exposition von SB führt zu dauerhaften Veränderungen hinsichtlich des Wachstumsverhaltens und des Differenzierungsgrades (Augeron und Laboisie 1984, S. 3961). Ausserdem ist die durch SB induzierte CEA-Synthese dosisabhängig. Es wird beschrieben, dass die CEA-Produktion durch den Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid und durch Actinomycin D, einen Inhibitor der RNA-Transkription, geblockt werden kann (Tsao et al. 1983, S. 1217). Neben der erhöhten Transkription ist aber auch eine Zunahme der Stabilität der CEA mRNA für die steigende CEA-Expression und somit für einen höheren Differenzierungsgrad verantwortlich (Saini et al. 1990, S. 541). Die Wirkung von SB ist abhängig vom ursprünglichen Differenzierungsgrad der Zellen (Tsao et al. 1983, S. 1217).

4.4.3 Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA)

Der Phorbolster PMA führt zu einer Erhöhung der Protein-Kinase-C (PKC), Kinasen ändern die Aktivität verschiedener Proteine in vielen Zellen, indem sie sie phosphorylieren. Gong et al. (1992, S. 847) beschreiben eine Veränderung der Zellmorphologie, eine Proliferationshemmung und eine Zunahme der Proteinsynthese, wobei diese Veränderungen nicht bei allen Zelllinien, bei denen PMA zugegeben wurde, aufgetreten sind. Weiterhin wird beschrieben, dass der Effekt, der durch PMA auftritt, durch die Zugabe eines PKC-Inhibitors bzw. eines Proteinsyntheseinhibitors geblockt werden konnte. Grunberg et al. (2000, S. 211) führten Untersuchungen an humanen Mammakarzinomzellen durch und stellte ebenfalls fest, dass Zellen unterschiedlich sensitiv auf PMA reagieren. Eine weitere Eigenschaft von PMA ist, dass die Wirkung vom Differenzierungsgrad der Zellen und von der eingesetzten Dosis abhängig ist. PMA führt zu einer Zunahme der Differenzierung bei Zellen mit einem vergleichsweise niedrigen Differenzierungsgrad, sowie zu einer dosisabhängigen Hemmung der Proliferation und der Klonierungseffizienz. Im Gegensatz dazu zeigten Zellen mit einem höheren Differenzierungsgrad nur eine geringe Antwort (Salge et al. 1990, S. 1143). Hsu et al. (1998, S. 57) konnten durch den Einsatz an Leberzellen zeigen, dass eine niedrige Dosis zu einer Zunahme der PKC-Aktivität führt, wohingegen sich bei einer hohen Dosis ein zytostatischer Effekt zeigte, die PKC-Aktivität nahm ab. Die PKC besteht aus mindesten sechs Isoenzymen, eine hohe PMA-Dosis führt zur down-Regulation von drei dieser Isoenzyme.

4.4.4 Galactose

Eine weitere und sehr einfache Möglichkeit, auf den Differenzierungsgrad und das Proliferationsverhalten Einfluß zu nehmen, ist ein Kulturmedium zu verwenden, welchem statt Glucose Galactose zugesetzt wird. Diese Untersuchungen wurden an der Kolonkarzinomlinie HT 29 durchgeführt. (Fantini et al. 1986, S. 235). Der genaue Mechanismus, dem eine erhöhte CEA-Expression und Proteinbiosynthese zugrunde liegt ist nicht genau geklärt. Es gibt leider auch keine Aussagen darüber, inwieweit die Wirkung abhängig ist vom Differenzierungsgrad der Zellen vor der Galaktosebehandlung.

Bei den eigenen Untersuchungen konnte durch den Einsatz von PMA eine Erhöhung des Differenzierungsgrades der Zellen erreicht werden, wobei noch Tests mit niedrigeren Konzentrationen durchgeführt werden sollten, da diese vermutlich zu hoch gewählt wurden. Der ursprünglich niedrige Differenzierungsgrad der Zellen ist vermutlich dafür verantwortlich, dass der Einsatz von Natrium-Butyrat bzw. einem galactosehaltigem Medium nicht erfolgreich war. Die Testung weiterer Differenzierungsinduktoren wie z. B. Retinoide bzw. Doxetexal erschien uns nicht sinnvoll, da die Wirkung von Doxetexal ebenfalls vom vorherigen Differenzierungsgrad abhängt (Eckert et al. 1997, S. 7) und die Retinoide über Rezeptoren wirken, die bei der malignen Transformation abnehmen (Kaiser et al. 1997, S. 920). Dies trifft vermutlich auch für TGF- β 1 zu, da maligne Zellen die zur Wirkung benötigten Oberflächenrezeptoren vermindert exprimieren können.

4.5. p53-Mutation

Zur weiteren Charakterisierung von fünf Zelllinien wurde eine p53-Färbung durchgeführt. p53 ist ein Tumorsuppressorgen. Die Wildform, nicht jedoch ihre Mutanten, induzieren eine Regulation des Zellzyklus und führen zum Arrest der Zelle in der G1-Phase. Nach einer DNA-Schädigung, die nicht repariert werden kann, führt p53 zur Apoptose. Der Organismus wird so vor malignen Veränderungen geschützt, da davon ausgegangen wird, dass Mutationen oder ein Funktionsverlust von p53 zu Transformationen von Zellen und/oder zum Tumorwachstum führt. Das Protein der p53-Mutationen akkumuliert innerhalb der Zellkerne und hat eine verlängerte Halbwertszeit, weshalb es immunhistochemisch mit viel höherer Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden kann als der Wildtyp (Harris und Hollenstein 1993, S. 1320). Bei Karzinompatienten ist auch der Nachweis eines anti-p53-Antikörpers im Serum möglich (Crawford et al. 1982, S. 403). Eine Mutation des Tumorsuppressorgens p53 ist die häufigste genetische Veränderung in menschlichen Tumorzellen (Harris 1990, S. 6). Ein Verlust des Tumorsuppressorgens wird meist in fortgeschrittenem Tumorstadium beobachtet. p53 kann bei den unterschiedlichsten Tumorentitäten nachgewiesen werden: Mammakarzinom (Davidoff et al. 1992, S. 3439), Lungenkarzinom (Winter et al. 1992, S. 4168), B-Zell-Lymphom (Caron de Fromentel et al. 1987, S. 185), Ovarialcarcinom (Labrecque et al. 1993, S. 3468) und bei verschiedenen anderen Karzinomtypen (Lubin et al. 1993, S. 5872).

In Studien über den Nachweis maligner Zellen in Aszites bzw. Pleuraerguß zeigte die p53-Färbung eine Sensitivität zwischen 32,4% (11/34) (Zoppi et al. 1995, S. 721) und 68% (19/28) (Lee et al. 1997, S. 1719), bei sehr hoher Spezifität. Saleh et al. (1998, S.1334) begründeten diese Unterschiede damit, dass unterschiedliche Antikörper bzw. Färbetechniken verwendet wurden, des weiteren sei auch die Zahl der Karzinomzellen im Erguss entscheidend. Die von ihnen durchgeführten Untersuchungen belegten eine positive Reaktion bei 46% (12/26) malignen und keine positive Reaktion bei benignen Ergüssen. Die Frage ist, inwieweit sich die Ergebnisse bei einer höheren Fallzahl angleichen würden. Bei den von uns gefärbten fünf Präparaten zeigten zwei ein positives Ergebnis, dies entspricht 40%.

Tabelle 9: Sensitivität der p53-Färbung von malignen Zellen in Ergusspunkttaten

Fallzahl	positive p53-Färbung		Literaturstelle
	in absoluten Zahlen	in Prozent	
34	11	32,4	Zoppi et al. 1995
28	19	68,0	Lee et al. 1997
26	12	46,0	Saleh et al. 1998
5	2	40,0	unsere Ergebnisse

4.6 Synthese gastrointestinaler Peptide und deren Einfluss auf das Wachstum von Turmozellen

4.6.1 Somatostatin

Der Neurotransmitter Somatostatin ist im gesamten Gastrointestinaltrakt in endokrinen Zellen und Nerven lokalisiert. Es ist der potenteste Inhibitor für die Gastrin-, Glukagon- und Insulinfreisetzung einschließlich der Magen- und Pankreassekretion.

Somatostatin und seine Analoge (z.B. Octreotid) besitzen antiproliferative Effekte und zeigen antineoplastische Wirksamkeit bei einer Reihe von lymphomatösen und epithelialen Neoplasien. Vermutet wird ein antagonistischer Effekt von Somatostatin zu der durch Zytokinen vermittelten Proliferation. Die Wirkung von Somatostatin wird über membrangebundene Rezeptoren in normalen und transformierten Zellen vermittelt (Robbins 1996, S. 98). Somatostatinrezeptoren können im Gewebe unterschiedlichster gastrointestinaler, nicht endokriner Neoplasien wie Magen- und Kolonkarzinom (Miller et al. 1992, S. 391), Pankreaskarzinom (Fisher et al. 1996, S. 234), cholangiozelluläres Karzinom (Tan et al. 1995, S. 1908) nachgewiesen werden. Bei den von uns durchgeführten Messungen zeigten die Zellen keine erhöhte Somatostatinsynthese, Rezeptoren wurden nicht untersucht.

4.6.2 Bombesin

Bombesin (Gastrin-Releasing-Hormon, GRP), ein Tetradekapeptid wurde in neuroendokrinen Zellen in hohen Konzentrationen im Magen, Jejunum und Ileum, in kleineren Mengen im Duodenum, Pankreas und Kolon nachgewiesen (Brown et al. 1978, S. 2721; Polak et al. 1976, S. 1109; Price et al. 1984, S. 1). Extraintestinal kommt es in der fetalen und erwachsenen Lunge sowie im ZNS vor.

Eine Wirkung als autokriner Wachstumsfaktor wird für das kleinzellige Bronchialkarzinom (Mahmoud et al. 1989, S. 367), das Ovarialkarzinom (Sun et al. 2000, S. 77), das Prostatakarzinom (Hansson und Abrahamsson 2001, S. 145) und das Kolonkarzinom (Chave et al. 2000, S. 124) beschrieben. Bombesin führt über GRP-Rezeptoren, welche bis zu 40% in Kolonkarzinomgewebe exprimiert werden, zu einer Zunahme der Proliferationsrate (Ferris et al. 1997, S. 2530). Die Expression von GRP-Rezeptoren an intestinalen epithelialen Zellen spielt vermutlich eine Rolle bei der Karzinogenese (Guo et al. 2001, S. 22941). Die Zunahme der Rezeptorexpression korreliert mit dem histologischen Differenzierungsgrad (Seretis et al. 2001, S. 445).

Eine relevante Bombesinsynthese zeigte sich bei 95% der von uns etablierten Zelllinien. Hierbei handelte es sich ausschliesslich um Zellen mit niedrigem Differenzierungsgrad. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass Bombesin nicht nur auf Kolonkarzinomzellen sondern auch auf Zellen anderer gastrointestinaler Neoplasien eine proliferationsfördernde Wirkung ausübt und von den Zellen anderer gastrointestinaler Neoplasien gebildet wird.

5. Zusammenfassung

Für die Untersuchung des Einflusses von gastrointestinalen Peptiden bzw. deren Agonisten und Antagonisten auf Tumorzellen des Gastrointestinaltraktes sollten Primärzellkulturen etabliert werden. Wegen der ständigen Verfügbarkeit und leichten Verarbeitung maligner Ergüsse, verwendeten wir Aszites bzw. Pleuraergüsse von 24 Patienten mit histologisch gesicherten gastrointestinalen Tumoren (Pankreas-, Magen-, Kolon-, cholangiozelluläre- und hepatozelluläre Karzinome).

Die Primärzellkultur aus Ergussflüssigkeit stellt jedoch eine Sonderform dar. Sie unterscheidet sich in vielerlei Hinsicht von Primärzellkulturen gewonnen aus solidem Gewebe des Primärtumors.

1. Zellen isoliert aus Metastasen stellen eine selektionierte Zellpopulation dar, sie können histomorphologisch dem Primärtumor entsprechen, häufig sind sie jedoch weniger differenziert und stärker proliferierend.
2. Die Zellen befinden sich bereits seit längerer Zeit in der Ergussflüssigkeit, die veränderten Bedingungen können zu Veränderungen der Zelloberfläche führen.
3. Die in der Ergussflüssigkeit enthaltenen Fibroblasten zeigen eine deutlich niedrigere Proliferationsrate als Fibroblasten aus solidem Gewebe.
4. Die Verwendung von gängigen anti-epithelialen Antikörpern ist eingeschränkt, da diese mit evtl. vorhandenen reaktiv veränderten Mesothelzellen kreuzreagieren können.

Zur Identifizierung der Zellen wurden Oberflächenantigene mit monoklonale Antikörpern markiert und anschliessend durchflusszytometrisch analysiert. Verwendet wurden der anti-epitheliale-Antikörper Ber-EP4, die tumorassoziierten Antikörper CEA und CA 19.9 sowie der fibroblastenspezifische Antikörper AS02.

95% der Zelllinien (18/19) zeigten einen niedrigen Differenzierungsgrad und somit eine geringe Expression von Oberflächenantigenen, die mit Zunahme der Kulturdauer noch weiter abnahm, eine Zellzuordnung war deshalb nur bedingt möglich. Die Abnahme der Oberflächenantigenexpression kann als Reaktion der Zellen auf die Kulturbedingungen gesehen werden.

Zusätzlich wurde die Zellploidy durch Messung des DNA-Gehaltes (Flow-Zytometrie) bestimmt. Ein Nachweis bzw. Ausschluss einer Kontamination mit mesenchymalen Zellen kann nicht sicher geführt werden, wenn es sich um eine Tumorzelllinie mit diploiden Chromosomensatz handelt bzw. ein Tumor mit unterschiedlichen Zellpopulationen vorliegt. Es erscheint uns daher sinnvoll, zum Ausschluss einer Fibroblastenkontamination beide Nachweismethoden zu kombinieren.

Zur Entfernung der mesenchymalen Zellen, wie Fibroblasten und Mesothelzellen wurden die Zellen selektiert. Geeignet zeigten sich sowohl die Weichgarklonierung, die Klonierung durch Verdünnung und die Zellseparation mit magnetgekoppelten Antikörpern. Eine Selektionsbehandlung erscheint trotz niedriger Proliferationsrate der Fibroblasten sinnvoll, da die Primärzellkultur dann sofort zur Verfügung steht und eine Veränderung der

Zellen durch längere Kultivierung vermieden werden kann.

Das gewonnene Zellmaterial gaben wir zur weiteren Expansion in Kultur, die Methode zeigte eine hohe Effizienz, 19 Zelllinien konnten etabliert werden.

Zur Erhöhung des Differenzierungsgrades der Zelllinien wurden Differenzierungsinduktoren wie PMA, TGF- β 1, Natrium-Butyrat bzw. galaktosehaltiges Medium eingesetzt. Eingeschränkt wird deren Einsatz dadurch, dass die Wirkung einiger Substanzen (Natrium-Butyrat, vermutlich auch galaktosehaltiges Medium) bei niedrigem Differenzierungsgrad deutlich vermindert bis aufgehoben ist, andere Substanzen, wie Retinoide und TGF- β 1 über Rezeptoren wirken, die bei einer malignen Transformation vermindert exprimiert werden können. Eine erhöhte Antigenexpression konnte durch die Anwendung von PMA erreicht werden. Zur weiteren Charakterisierung der Tumorzelllinien wurde eine quantitative Bestimmung der Peptide Somatostatin und Bombesin im Kulturmediumüberstand sowie bei fünf Zelllinien eine p53-Färbung durchgeführt.

Eine relevante Bombesinsynthese zeigten alle Zelllinien mit niedrigem Differenzierungsgrad (18/19). Die Ergebnisse lassen einen Zusammenhang zwischen dem Proliferationsverhalten, dem Differenzierungsgrad und der Bombesinsekretion bei verschiedenen gastrointestinalen Neoplasien vermuten. Ob tatsächlich ein Zusammenhang besteht, sollte durch Stimulierungsversuche mit Bombesin weiter geklärt werden.

6. Literaturverzeichnis

- Abbound C. N., Duerst R. E., Frantz C. N., Ryan D.H., Liesveld J. L., Brennan J. K.:
Lysis of human fibroblast colony-forming cells and endothelial cells by monoclonal antibody and complement. *Blood*, 68 (1986) 1196-1200.
- Agapova L. S., Ilyinskaya G. V., Turovets N. A., Ivanov A. V., Chumakov P. M.,
Kopin B. P.: Chromosome changes caused by alteration of p53 expression. *Mutat. Res.*, 354 (1996)129-38.
- Alama A., Barbieri F., Favre A., Cagnoli M., Noviello E., Pedulla F., Viale M., Foglia G., Ragni N.: Establishment and characterization of three new cell lines derived from the ascites of human ovarian carcinomas. *Gynecol. Oncol.*, 62 (1996) 82-8.
- Arimura A., Lundquist G., Rothman J., Chang R., Fernandez-Durango R., Elde R., Coy D. H., Meyers C., Schally A. V.: Radioimmunoassay of Somatostatin. *Metabolism*, 27 (1978) 1139-44.
- Atkin N. B.: Prognostic significance of ploidy level in human tumors. I. Carcinoma of the uterus. *J. Natl. Cancer Inst.*, 56 (1976) 909-10.
- Auersperg N.: Effects of culture conditions on the growth and differentiation of transformed rat adrenocortical cells. *Cancer Res.*, 38 (1978) 1872-4.
- Augeron C., Labois C. L. : Emergence of Permanently Differentiated Cell Clones in a Human Colonic Cancer Cell Line in Culture after Treatment with Sodium Butyrate. *Cancer Res.*, 44 (1984) 3961-9.
- Benchimol S., Fuks A., Jothy S., Beauchemin N., Shirota K., Stanners T.:
Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell*, 57 (1989) 327-34.
- Boyd F. T., Massague J.: Transforming growth factor- β inhibition of epithelial cell proliferation linked to the expression of a 53-kDa membran receptor. *J. biol. Chem.*, 264 (1989) 2272-8.
- Boyer B., Tucker G. C., Valles A. M., Franke W. W., Thiery J. P.: Rearrangements of desmosomal and cytoskeletal proteins during the transition from epithelial to fibroblastoid organization in cultured rat bladder carcinoma cells. *J. Cell. Biol.*, 109 (1989) 1495-509.

- Bradley A., Evans M., Kaufman M. H., Robertson E.: Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 309 (1984): 255-6.
- Bross K. J., Guzman J., Kressin V., Kuhlmann S., Costabel U.: Die Anwendung von Tumormarkern an malignen Pleuraergüssen. Eine Verbesserung der zytologischen Routinediagnostik. *Verh. Dtsch. Ges. Path.*, 70 (1986) 468.
- Brown M., Allen R., Villarreal J., Rivier J., Vale W.: Bombesin-like activity: Radioimmunologic assessment in biological tissues. *Life Sci.*, 23 (1987) 2721-8.
- Buitrago A., Gylfe E., Henrikson C., Pertoft H.: Rapid isolation of pancreatic islets from collagenase digested pancreas by sedimentation through at unit gravity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 79 (1977) 823-8.
- Capecchi M. R.: Altering the genome by homologous recombination. *Science*, 244 (1989) 1288-92.
- Caron de Fromental C., May-Levin F., Mouriesse H., Lemerle J., Chandrasekaran K., May P. : Presence of circulating antibodies against cellular protein p53 in notable proportion of children with B-cell lymphoma. *Int. J. Cancer*, 39 (1987) 185-9.
- Castor C. W. , Prince R. K., Dorstewitz E. L.: Characteristics of human fibroblasts cultivated in vitro from different anatomical sites. *Lab. Invest.*, 11 (1962) 703-13.
- Chakrabarty S., Tobon A., Varani J., Brattain M. G.: Induction of Carcinoembryonic Antigen Secretion and Modulation of Protein Secretion/Expression and Fibronectin/Laminin Expression in Human Colon Carcinoma Cells by Transforming Growth Faktor- β 1. *Cancer Res.*, 48 (1988) 4059-64.
- Chakrabarty S., Mustain S., Willson J. K.: Induktion of carcinoembryonic antigen and its crossreactive gene products in human colonic adenomas and carcinomas by transforming growth factor-beta. *Mol. Biother.*, 2 (1990) 27-31.
- Chakrabarty S., Fan D., Varani J.: Modulation of differentiation and proliferation in human colon carcinoma cells by transforming growth factor beta 1 and beta 2. *Int. J. Cancer*, 46 (1990) 493-9.
- Chang K. J., Enker W. E., Melamed M.: Influence of tumor cell DNA ploidy on the natural history of rectal cancer. *Am. J. Surg.*, 153 (1987) 184-8.

- Chave H. S., Gough A. C., Palmer K., Preston S. R., Primrose J. N.: Bombesin family receptor and ligand gene expression in human colorectal cancer and normal mucosa. *Br. J. Cancer*, 82 (2000) 124-30.
- Cheifetz S., Weatherbee J. A., Tsang M. L-S., Anderson J. K., Mole J. E., Lucas R., Massague J.: The transforming growth factor system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell*, 48 (1987) 409-15.
- Collins S. J., Gallo R. C., Gallagher R. E.: Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature*, 270 (1977) 347-9.
- Courtenay V. D., Mills J.: An in vitro colony assay for human tumours grown in immune-suppressed mice and treated in vivo with cytotoxic agent. *Br. J. Cancer*, 37 (1978) 261-8.
- Crawford L. V., Pim D. C., Bulbrook R. D.: Detection of antibodies against the cellular protein p53 in the sera from patients with breast cancer. *Int. J. Cancer*, 30 (1982) 403-8.
- Danes B. S., Boyle P. D., Traganos F., Melamed M. R. : Hyperploidy of cultured dermal fibroblasts from patients with aerodigestive squamous carcinoma. *Cytometry*, 8 (1987): 584-9.
- Davidoff A. M., Iglehart J. D., Marks J. R.: Immune response to p53 is dependent upon p53/HSP70 complexes in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89 (1992) 3439-42.
- De Angelis M., Buley I., Heryet A., Gray W.: Immunocytochemical staining of serous effusions with the monoclonal antibody Ber-EP4. *Cytopathology*, 3 (1992) 111-7.
- Dearnaley D. P., Sloane J. P., Ormerod M. G., Steele K., Coombes R. C., Clink H. M. D., Powles T. J., Ford H. T., Gazet J-C., Neville A. M.: Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen. *Br. J. Cancer*, 44 (1981) 85-90.
- Eckert K., Fuhrmann-Selter T., Maurer H. R.: Docetaxel enhances the expression of E-cadherin and carcinoembryonic antigen on human colon cancer cell lines in vitro. *Anticancer-Research*, 17 (1997) 7-12.
- Elisa J. A., Rossman M. D., Phillips P. D.: Phenotypic variability among density-fractionated human lung fibroblasts. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 135 (1987) 57-61.

- Faloon G. R., Unger R. H.: *Methods in hormone radioimmunoassay*. Academic Press, New York, (1974) 317-330.
- Fantini J., Abadie B., Tirard A., Remy L., Ripert J. P., el Battari A., Marvaldi J.: Spontaneous and induced dome formation by two clonal cell population derived from a human adenocarcinoma cell line, HT29. *J. Cell. Sci.*, 83 (1986) 235-49.
- Fantini J., Rognoni J. B., Culouscou J. M., Pommier G., Marvaldi J., Tirard A.: Induction of polarized apical expression and vectorial release of carcinoembryonic antigen (CEA) during the process of differentiation of HT29-D4 cells. *J. Cell. Physiol.*, 141 (1989) 126-34.
- Ferris H. A., Carroll R. E., Rasenick M. M., Benya R. V.: Constitutive activation of the gastrin-releasing peptide receptor expressed by the nonmalignant human colon epithelial cell line. *J. Clin. Invest.*, 100 (1997) 2530-7.
- Fisher W. E., Muscarella P., O`Dorisio T. M., O`Dorisio M. S., Kim J. A., Doran T. A., Sabourin C. L., Schirmer W. J.: Expression of the somatostatin receptor subtyp-2 gene predicts response of human pancreatic cancer to octreotide. *Surgery*, 120 (1996) 234-41.
- Gallagher R., Collins S., Trujillo J., McCredie K., Ahearn M., Tsai S., Metzgar R., Aulakh G., Ting R., Ruscetti F., Gallo R.: Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 54 (1979) 713-33.
- Ghosh A. K., Gatter K. C., Dunnhill M. S., Mason D. Y.: Immunohistological staining of reactive mesothelium, mesothelioma, and lung carcinoma with a panel of monoclonal antibodies. *J. Clin. Pathol.*, 40 (1987) 19-25.
- Giancotti F. R., Dorsett B. H., Weaver S. C., Bharathur R., Ioachim H. L., Barber H. R. K.: Description of an Endometrioid Ovarian Cancer Cell Line. *Gynecol. Oncol.*, 35 (1989) 330-7.
- Gold P., Freedman S. O.: Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp. Med.*, 122 (1965) 467-81.
- Gong Y., Alkhalaf B., Murphy L. J., Murphy L. C.: Differential effects of phorbol esters on proliferation and calcyclin expression in human endometrial carcinoma cells. *Cell Growth Differ.*, 3 (1992) 847-53.

- Graham F. L., Van der Eb A. J.: Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology*, 54 (1973) 536-9.
- Greenburg G., Hay E. D.: Cytoskeleton and thyroglobulin expression change during transformation of thyroid epithelium to mesenchymal-like cells. *Development* 102 (1988) 605-22.
- Gron B. S., Nielsen O. S., Bentzen S. M., Overgaard J.: Selective assessment of in vitro radiosensitivity of tumour cells and fibroblasts from single tumour biopsies using immunocytochemical identification of colonies in the soft agar clonogenic assay. *Radioth. and Oncol.*, 37 (1995) 87-99.
- Grunberg E., Eckert K., Karsten U., Maurer H. R.: Effects of differentiation inducers on cell phenotypes of cultered nontransformed and immortalized mammary epithelial cells: a comparative immunocytochemical analysis. *Tumour Biol.*, 21(2000) 211-23.
- Guo Y. S., Hellmich M. R., Wen X. D., Townsend C. M.: Activator protein-1 transcription factor mediates bombesin-stimulated cyclooxygenase-2 expression in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 22941-7.
- Haeder D. P., Haeder M.: Kulturverfahren. In: "Moderne Labortechniken, Geräte und Methoden". Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 1993, 1. Auflage, 136-159.
- Handgretinger R., Lang P., Schumm M., Taylor GJ, Neu S., Koscielnak E., Niethammer D., Klingebiel T.: Isolation and transplantation of autologous peripheral CD34+ progenitor cells highly purified by magnetic-activated cell sorting. *Bone Marrow Transplant*, 21 (1998) 987-93.
- Hansson J., Abrahamsson P. A.: Neuroendocrine pathogenesis in adenocarcinoma of the prostata. *Ann. Oncol.*, 12 (2001) 145-52.
- Harbeck N., Schwarzen S., Schüren E., Yamamoto N., Moniwa N., Schmitt M., Dettmar P., Nathrath W., Jänicke F., Höfler H., Gräff H.: Model System für Isolation of Competent Ovarian Carcinoma Cells from Fresh Tumor Tissue by a Magnetic Separation Technique (MACS). *Internat. J. Oncology.*, 6 (1995) 1249-1254.
- Harris A. L.: Mutant p53: the commonest genetic abnormality in human cancer? *J. Pathol.*, 162 (1990) 5-6.

Harris C. C., Hollenstein M.: Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. N. Engl. J. Med. 329 (1993) 1318-27.

Hastka J., Pfiester P.: Zellmarker zur Differentialdiagnose maligner Mesotheliome. Pathologie, 9 (1988) 245-7.

Hoosein N. M., McKnight M. K., Levine A. E., Mulder K. M., Cildress K. E., Brattain D. E., Brattain M. G.: Differential sensitivity of subclasses of human colon carcinoma cell lines to the growth inhibitory effect of transforming growth factor-B. Exp. Cell Res., 181 (1989) 442-53.

Horowitz A. T., Treves A. J., Voss R., Okon E., Fuks Z., Davidson L., Biran S.: A new human ovarian carcinoma cell line: Establishment and analysis of tumor-associated markers. Oncology, 42 (1985) 332-7.

Hsu S. L., Chou Y. H., Yin S. C., Liu J. Y. : Differential effects of phorbol ester on growth and protein kinase C isoenzyme regulation in human hepatoma Hep3B cells. Biochem. J., 333 (1998) 57-64.

Janin A., Konttinen Y. T., Grönblad M., Karhunen P., Gosset D., Malmström M.: Fibroblast markers in labial salivary gland biopsies in progressive systemic sclerosis. Clin. Exp. Rheumatol., 8 (1990) 237-42.

Kaiser A., Herbst H., Fisher G., Koenigsmann M., Berdel W. E., Riecken E. O., Rosewicz S.: Retinoic acid receptor beta regulates growth and differentiation in human pancreatic carcinoma cells. Gastroenterology, 113 (1997) 920-9.

Kim Y. S., Tsao D., Siddiqui B., Whitehead J. S., Arnstein P., Bennett J., Hicks J.: Effects of sodium butyrate and dimethylsulfoxide on biochemical properties of human colon cancer cells. Cancer, 45 (1980) 1183-92.

Kimchi A., Wang X. F., Weinberg R. A., Cheifetz S., Massague J.: Absence of TGF-beta receptors and growth inhibitory responses in retinoblastoma cells. Science, 240 (1988) 196-9.

Kirkland S. C., Bailey I. G.: Establishment and characterisation of six human colorectal adenocarcinoma cell lines. Br. J. Cancer, 53 (1986) 779-85.

Klominek J., Robert K. H., Hjerpe A., Wickstrom B., Gahrton G.: Serum-dependent growth patterns to two, nearly established human mesothelioma cell lines. Cancer Res., 49 (1989) 6118-22.

- Kloppel G.: Crucial diagnostic points of tumor markers: gastrointestinal tumors. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.*, 70 (1986) 159-71.
- Kloppel G., Caselitz J.: Epithelial tumor markers: oncofetal antigens (CEA, AFP) and epithelial membrane antigene. *Curr. Top. Pathol.*, 77 (1987) 103-32.
- Knabbe C., Lippman M. E., Waderfield L. M., Flanders K. C., Kasid A., Derynck R., Dickson R. B.: Evidence that transforming growth factor- β is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. *Cell*, 48 (1987) 417-28.
- Kronheim S., Berelowitz M., Pimstone B. C.: A radio-immunoassay for growth hormone release inhibiting hormone: method and quantitative tissue distribution. *Clin. Endocrinol.*, 5 (1976) 619-30.
- Labrecque S., Naor N., Thomson D., Matlashewski G.: Analysis of the anti-p53 antibody response in cancer patients. *Cancer Res.*, 53 (1993) 3468-71.
- Lane B. P., Miller S. L.: Preparation of large numbers of uniform tracheal organ cultures for long term studies. Effects of serum on establishment in culture. *In Vitro*, 12 (1976) 147-54.
- Latza U., Niedobitek G., Schwarting R., Nekarda H., Stein H.: Ber-EP4: new monoklonal antibody which distinguishes epithelia from mesothelia. *J. Clin. Pathol.*, 43 (1990) 213-19.
- Lawton P. A., Hodgkiss R. J., Eyden B. P., Joiner M. C.: Growth of fibroblasts as a potential confounding factor in soft agar clonogenic assays for tumour cell radiosensitivity. *Radiother. Oncol.*, 32 (1994) 218-25.
- Lee J. S., Lee M. C., Park C. S., Juhng S. W.: Diagnostic value of p53 protein and flow cytometric DNA analysis in the study of serous effusions. *Acta Cytol.*, 41 (1997) 1719-25.
- Linge C., Green M. R., Brooks R. F.: A method for removal of fibroblasts from human tissue culture systems. *Exp. Cell. Res.*, 185 (1989) 519-28.
- Lounis H., Provencher D., Godbout C., Fink D., Milot m. J., Mes-Masson A. M.: Primary cultures of normal and tumoral human ovarian epithelium: a powerful tool for basic molecular studies. *Experimental cell Res.*, 215 (1994) 303-9.

- Lubin R., Schlichtholz B., Bengoufa D., Zalcmann G., Tredaniel J., Hirsch A., et al.: Analysis of p53 antibodies in patients with various cancers define B-cell epitopes of human p53: distribution on primary structure and exposure on protein surface. *Cancer Res.*, 53 (1993) 5872-6.
- Lüttges J., Neumann K., Pflüger K-H., Schmitz-Moormann P.: Differentialzytologie von Ergussflüssigkeiten unter Anwendung von monoklonalen Antikörpern. *Pathologie*, 9 (1988) 137-42.
- Macfarlane D. E., Gailani D., Vann K.: A phorbol ester tolerant (PET) variant of HL-60 promyelocytes. *Br. J. Haematol.*, 63 (1988): 291-302.
- Magnani J. L., Steplewski Z., Koprowski H., Ginsburg V.: Identification of the gastrointestinal and pancreatic cancer-associated antigen detected by monoclonal antibody 19-9 in the sera of patients as a mucin. *Cancer Res.*, 43 (1983) 5489-92.
- Mahmoud S., Palaszynski E., Fiskum G., Coy D. H., Moody T. W.: Small cell lung cancer bombesin receptors are antagonized by reduced peptide bond analogues. *Life Sci.*, 44 (1989) 367-73.
- Manyonda I. T., Soltys A. J., Hay F. C.: A critical evaluation of the magnetic cell sorter and its use in the positive and negative selection of CD45RO+ cells. *J. Immunol. Methods*, 149 (1992) 1-10.
- Massagué J.: The TGF- β family of growth and differentiation factors. *Cell*, 49 (1987) 437-8.
- Mezger J., Permanetter W., Gerbes A. L., Wilmanns W., Lamerz R.: Tumor associated antigens in diagnosis of serous effusions. *J. Clin. Pathol.*, 41 (1988) 633-43.
- Mezger J., Stötzer O., Schilli G., Bauer S., Wilmanns W.: Können Karzinomzellen in Aszites- und Pleurapunktaten durch den immunzytochemischen Nachweis der „panepithelialen Antigene“ EMA, epg34, BW-495 und TAG-72 zuverlässig identifiziert werden? *Pathologie*, 12 (1991) 30-4.
- Miller G. V., Farmery S. M., Woodhouse L. F., Primrose J. N.: Somatostatin binding in normal and malignant human gastrointestinal mucosa. *Br. J. Cancer*, 66 (1992) 391-5.
- Moll R., Epithelial tumor markers *Verh. Dtsch Ges. Pathol.*, 70 (1986), 28-50.

- Mollenhauer J., Bayreuther K.: Donor-age-related changes in the morphology, growth potential, and collagen biosynthesis in rat fibroblast subpopulations in vitro. *Differentiation*, 32 (1986) 165-72.
- Momburg F., Moldenhauer G., Hämmerling G. J., Möller P.: Immunohistochemical study of the expression of a M 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues. *Cancer Res.*, 47 (1987) 2883-91.
- Moses H. L., Coffey Jr. R. J., Leof E. B., Lyons R. M., Keskkioja J.: Transforming growth factor beta regulation of cell proliferation. *J. cell. Physiol.*, 5 (1987)1-7.
- Nagata M., Matsumura T.: Action of the bacterial neutral protease, dispase, on cultured cells and its application to fluid suspension culture with a review on biomedical application of this protease. *Jpn. J. Exp. Med.*, 56 (1986) 297-307.
- Nedergaard L., Haerslev T., Jacobsen G. K.: Immunohistochemical study of estrogen receptors in primary breast carcinomas and their lymph node metastases including comparison of two monoclonal antibodies. *APMIS*, 103 (1995) 20-4.
- O'Brien M. J., Kirkham S. E., Burke B., Ormerod M. G., Saravis C. A., Gottlieb L. S., Neville A. M., Zamcheck N.: CEA, ZGM and EMA localization in cells of pleural and peritoneal effusion: A preliminary study. *Invest. Cell Pathol.*, 3 (1980) 252-8.
- O'Neill J. P., Hsie A. W.: Growth arrest of chinese hamster ovary cells in serum-free medium: changes in cell morphology and the intracellular and prostaglandin-induced levels of cyclic AMP. *J. Cyclic Nucleotide Res.*, 4 (1978) 169-74.
- Paraskeva C., Buckle B. G., Thorpe P. E.: Selective killing of contaminating human fibroblasts in epithelial cultures derived from colorectal tumors using an anti Thy-1 antibody-ricin conjugate. *Br. J. Cancer*, 5 (1985) 131-4.
- Permanetter W, Wiesinger H.: Immunohistochemical study of Isoenzym, alpha 1-anti-chymotrypsin, tissue polypeptide antigen, keratin and carcinoembryonic antigen in effusion sediments. *Acta Cytol.*, 31 (1987) 104-12.
- Polak J. M., Bloom S. R., Hobbs A., Solcia E., Pearse A. G. E.: Distribution of a bombesin-like peptide in human gastrointestinal tract. *Lancet*, 1 (1976) 1109-10.

- Pourreyron C., Dumortier J., Ratineau C., Nejjari M., Olivier B., Jacquier M-F., Remy L., Chayvialle J-A., Scoazec J-Y.: Age-dependent variations of human and rat colon myofibroblasts in culture: Influence on their functional interactions with colon cancer cells. *Int. J. Cancer*, 104 (2003) 28-35.
- Prasad K. N., Sinha P. K.: Effect of sodium butyrate on mammalian cells in culture: a review. *In Vitro*, 12 (1976) 125-32.
- Price J., Penman E., Wass J. A. H., Rees L. H.: Bombesin-like immunoreactivity in human gastrointestinal tract. *Reg. Pept.*, 9 (1984) 1-10.
- Radcliff G., Jaroszeski M. J.: Basics of flow cytometry. *Methods Mol. Biol.*, 91 (1998) 1-24.
- Rheinwald J.G., Green H.: Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocyte: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*, 6 (1975) 331-43.
- Richel D. J., Johnsen H. E., Canon J., Guillaume T., Schaafsma M. R., Schenkeveld C., Hansen S. W., McNiece I., Gringeri A. J., Briddell R., Ewen C., Davies R., Freeman J., Miltenyi S., Symann M.: Highly purified CD34+ cells isolated using magnetically activated cell selection provide rapid engraftment following high-dose chemotherapy in breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant*, 25 (2000) 243-9.
- Riede U. N., Wiestler O. D., Müller HJ.: Autonomes Zellwachstum (Tumorpathologie), Metastasierung In: "Allgemeine und spezielle Pathologie", Riede U. N., Schaefer H. E. (Hrsg), Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1995, S. 344-392.
- Robbins R. J.: Somatostatin and cancer. *Metabolism.*, 45 (1996) 98-100.
- Rovensky Yu A., Domnina L. V., Ivanova OYu, Vasiliev J. M.: Responses of epithelial and fibroblast-like cells to discontinuous configuration of the culture substrate. *Membr. Cell. Biol.*, 14 (2001) 617-27.
- Russell W. E., Coffey Jr. R. J., Quellette A. J., Moses H. L. : Type B transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 85 (1988) 5126-30.
- Saalbach A., Anderegg U., Bruns M., Schnabel E., Herrmann K., Haustein U. F.: Novel fibroblast-specific monoclonal antibodies: properties and specificities. *J. Invest. Dermatol.*, 106 (1996) 1314-19.

- Saalbach A., Aust G., Haustein U. F., Herrmann K., Anderegg U.: The fibroblast-specific Mab ASO2: a novel tool for detection and elimination of human fibroblasts. *Cell Tissue Res.*, 290 (1997) 593-9.
- Sachs L.: Cell differentiation and bypassing of genetic defects in the suppression of malignancy. *Cancer Res.*, 47 (1987) 1981-6.
- Saini K., Steele G., Thomas P.: Induction of carcinoembryonic-antigen-gene expression in human colorectal carcinoma by sodium butyrate. *Biochem. J.*, 272 (1990) 541-4.
- Saleh H. A., Bober P., Tabaczka P.: Improved detection of adenocarcinoma of serous fluids with p53 immunocytochemistry. *Acta Cytol.*, 43 (1998) 1330-5.
- Salge U., Kilian P., Neumann K., Elsasser H. P., Havemann K., Heidtmann H. H.: Differentiation capacity of human non-small-cell lung cancer cell lines after exposure to phorbol ester. *Int. J. Cancer* 45 (1990) 1143-50.
- Sasaki K., Kurose A., Uesugi N., Sugai T.: Intratumoral regional heterogeneity of DNA ploidy patterns in colorectal carcinomas. *Anal. Cell Pathol.*, 8 (1995) 323-30.
- Schmitz B., Radbruch A., Kümmel T., Wickenhauser C., Korb H., Hansmann M. L., Thiele J., Fischer R.: Magnetic Activated Cell Sorting (MACS). A New Immunomagnetic Method for Megakaryocytic Cell Isolation: Comparison of different Separation Techniques. *Eur. J. Hämatol.*, 52 (1994) 267-275.
- Schuman L. D., Baxter C. S., Petro T. M.: Effect of the ornithine decarboxylase inhibitor α,α -difluoromethylornithine on phorbol diester-induced inhibition of murine B lymphocyte differentiation. *Cancer Letters*, 47 (1989) 11-19.
- Semple J. W., Allen D., Chang W., Castaldi P., Freedman J.: Rapid separation of CD4+ and CD19+ lymphocyte populations from human peripheral blood by a magnetic activated cell sorter (MACS). *Cytometry*, 14 (1993) 955-60.
- Senoo H., Tsukada Y., Sato T., Hata R.: Co-culture of fibroblasts and hepatic parenchymal cells induces metabolic changes and formation of a three-dimensional structure. *Cell. Biol. Int. Rep.*, 13 (1989) 197-206.
- Seretis E., Gavrill A., Agnantis N., Golematis V., Voloudakis-Baltatzis I. E.: Comparative study of serotonin and bombesin in adenocarcinomas and neuroendocrine tumors of the colon. *ultrastruct. Pathol.*, 25 (2001) 445-54.

- Singer K. H., Scaerco R. M., Tuck D. T., Whichard L. P., Denning S. M., Haynes B. F.: Removal of fibroblasts from human epithelial cell cultures with use of a complement fixing monoclonal antibody reactive with human fibroblasts and monocytes/macrophages. *J. Invest. Dermatol.*, 92 (1989)166-70.
- Spehn J., Iwanetz S., Schmitz-Hübner U.: Immunzytochemische Untersuchung von Pleuraerguß und Aszites mit Ber-EP-4-Antikörpern. *Dtsch. med. Wschr.*, 120 (1995) 1197-1200.
- Spitzbart H., Schmidt F.: Results of in vitro culturing of ovarian neoplasms and testing with cytostatic agents. *Zentralbl. Gynaekol.*, 92 (1970) 201-5.
- Spremulli E. N., Scott C., Campbell D. E., Libbey N. P., Shochat D., Gold D. V., Dexter D. L.: Characterisation of two metastatic subpopulations originating from a single colon carcinoma. *Cancer Res.*, 43 (1983) 3828-35.
- Sun B., Schally A. V., Halmos G.: The presence of receptors for bombesin/GRP and mRNA for three receptor subtypes in human ovarian epithelial cancers. *Regul. Pept.*, 90 (2000) 77-84.
- Svendsen L. B., Thorup J., Larsen J. K., Norgard T., Willumsen H., Hansen O. H.: Association between tumor DNA aneuploidy and in vitro tetraploidy of skin fibroblast in patients with colorectal neoplasma. *Scand. J. Gastroenterol.*, 24 (1989) 755-60.
- Svendsen L. B., Thorup J., Larsen J. K., Bulow S., Horn T.: Correlation between in vitro tetraploidy in skin fibroblasts and development of sporadic colorectal carcinomas. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 50 (1990) 139-48.
- Tan C. K., Podila P. V., Taylor J. E., Nagorney D. M., Wiseman G. A., Gores G. J., La Russo N. F.: Human cholangiocarcinomas express somatostatin receptors and respond to somatostatin with growth inhibition. *Gastroenterology* 108 (1995) 1908-16.
- Tateyama S., Furukawa H., Yamaguchi R., Nosaka K., Kondo F.: Plate and collagen-gel cultures of normal canine mammary epithelial cells. *Res. Vet. Sci.*, 49 (1990) 14-9.
- Thust R.: Screening of potential chemical carcinogens by means of mammalian cells in vitro. *Arch. Geschwulstforsch.*, 46 (1976) 538-48.
- Thust R. und Schramm T.: Neoplastische Alterationen durch chemische Kanzerogene in vitro. *Arch. Geschwulstforsch.*, 39 (1972) 249-63.

- Tickman R. J., Cohen C., Varma V. A. Fekete P. S., DeRose P. B.: Distinction between carcinoma cells and mesothelial cells in serous effusions. Usefulness of immunohistochemistry. *Acta Cytol.*, 34 (1990) 491-96.
- Tsao D. Shi Z., Wong A., Kim Y. S.: Effekt of Sodium Butyrate on Carcinoembryonic Antigen Production by Human Colonic Adenocarcinoma Cells in Culture. *Cancer Res.*, 43 (1983) 1217-22.
- Van Vliet E., Melis M, Foidart J. M., Ewijk W. van: Reticular fibroblasts in peripheral lymphoid organs identified by a monoclonal antibody. *J. Histochem. Cytochem.*, 34 (1986) 883-90.
- Vogelstein B., Fearon E. R., Hamilton S. R., Kern S. E., Preisinger A. C., Leppert M., Nakamura Y., White R., Smits A. M., Bos J.L.: Genetic alterations during colorectal tumor development. *N. Engl. J. Med.* 319 (1988) 525- 32.
- Weinberg J. B.: Tumor Cell Killing by Phorbol Ester-Differentiated Human Leukemia Cells. *Science*, 213 (1981) 655-7.
- Wells C. A., Heryet A., Brochier J., Gatter K. C., Mason D. Y.: The immunocytochemical detection of axillary micrometastases in breast cancer. *Br. J. Cancer*, 50 (1984) 193-97.
- Winter S. F., Minna J. D., Johnson B. E., Takahashi T., Gazdar A. F., Carbone D. P.: Development of antibodies against p53 in lung cancer patients appears to be dependent on the type of p53 mutation. *Cancer Res.*, 52 (1992) 4168-74.
- Wolosewick J. J., Porter K. R.: Observations on the morphological heterogeneity of WI-38 cells. *Am. J. Anat.*, 149 (1977) 197-225.
- Yalow R. S., Berson S. A.: Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.*, 39 (1960) 1157-1175.
- Zoppi J. A., Pellicer E. M., Sundblad A. S.: Diagnostic value of p53 protein in the study of serous effusions. *Acta Cytol.*, 39 (1995) 721-4.

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Christian Lersch danke ich vielmals für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung von Arbeitsplatz und Mitteln sowie für die stets gewährte Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Nicole Endres für Ihre kompetente und freundschaftliche Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Ebenfalls möchte ich Frau Monika Werb für die Einführung in Zellkulturtechniken und Frau Christine Herda für die Unterstützung bei der Durchführung der Radioimmunoassays danken.

Lebenslauf**Persönliche Daten:**

Name: Sieglinde Preißler
Anschrift: Ortsstrasse 4, 85354 Freising
Geburtsdatum/-ort: 24. Juni 1967 in Röhrnbach
Familienstand: ledig, 1 Tochter
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1973 - 1979 Grund- und Hauptschule in Röhrnbach
1979 - 1983 Realschule in Freyung
1990 - 1993 Berufsoberschule in München

Berufsausbildung/-ausübung:

1983 - 1984 FSJ, Arbeiterwohlfahrt in Passau
1984 - 1987 Krankenpflegeschule in Freyung
10/87 - 9/90, 8/92 - 12/93, 11/99 - 7/00 Krankenschwester im Krankenhaus
München-Neuperlach

Studium:

11/93 - 5/00 Humanmedizin, Technische Universität München
August 1995 Ärztliche Vorprüfung
August 1996 I Staatsexamen
März 1999 II. Staatsexamen
Mai 2000 III. Staatsexamen

Arzt im Praktikum:

7/00-10/00 Hämato-Onkologie im Klinikum Passau
11/00-1/02 Hämato-Onkologie im Krankenhaus
München-Neuperlach

8/02 - 05/04

Erziehungszeit

Medizinische Weiterbildung:

seit 06/04 Allgemeinmedizin
Dr. med R. Bungartz, Freising