

Aus der Medizinischen Klinik-Innenstadt der Universität München

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Durchflusszytometrie als Methode zur
Quantifizierung der Wirkung ionisierender
Strahlen auf dreidimensionale Organkulturen
von humanem Bronchialepithel und einer
Bronchialepithel- Tumorzelllinie**

Dissertation

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

vorgelegt von

Martin Edelmann

aus Ellwangen/ Jagst

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. R. M. Huber
2. Berichterstatter Priv. Doz. Dr. med. R. Zeidler
Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. H. Zitzelsberger
Prof. Dr. med. M. Schliwa
Prof. Dr. med. H. Bartels

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. A. Bergner
Dr. med. F. Gamarra

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 20.01.2005

gewidmet meinem Vater Hans Bäuerle, in memoriam

1 Inhaltsverzeichnis

1 INHALTSVERZEICHNIS.....	IV
2 TABELLENVERZEICHNIS.....	VII
3 ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
4 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	X
5 EINLEITUNG.....	1
5.1 Einleitung.....	1
5.2 Zielsetzung.....	12
6 MATERIALIEN UND METHODEN	13
6.1 Kultivierung des respiratorischen Epithels.....	13
6.1.1 Verwendetes Epithel.....	13
6.1.2 Gewinnung des Epithels.....	13
6.1.3 Präparation des Bronchialepithels.....	14
6.1.4 Kulturbedingungen.....	15
6.1.5 Verwendete Tumorzelllinie für die Kokultur.....	16
6.1.6 Verwendete Tumor-Zelllinien für die Monolayer-Versuche.....	18
6.1.7 Verwendete Normalepithel-Zelllinie.....	18
6.1.8 Herstellung der Kokulturen.....	19
6.1.9 Herstellung der Monolayer-Platten für die Bestrahlungsversuche.....	21
6.2 Vorbereiten der Kokulturen für die Durchflusszytometrie.....	21
6.2.1 Verwendete Materialien.....	21
6.2.2 Probleme bei der Gewinnung der Einzelzellsuspension.....	21
6.2.3 Herstellung der Einzelzellsuspension.....	23
6.3 Messung der Zellen im Durchflusszytometer.....	24
6.3.1 Durchflusszytometer.....	24
6.3.2 Messung.....	27
6.3.3 Einstellung der Messung am Durchflusszytometer.....	28
6.3.4 Statistische Auswertung der gewonnen Daten.....	36
6.4 Erstellen einer Wachstumskurve des Tumoranteils.....	36
6.5 Bestrahlung.....	36

Inhaltsverzeichnis

6.6 Messung des DNA-Gehalts.....	37
6.6.1 Vorbereitung zur Messung des DNA-Gehalts.....	37
6.6.2 Planung der Messung des DNA-Gehalts.....	37
6.6.3 Auswertung der Messung des DNA-Gehalts.....	39
6.6.4 Statistische Auswertung der erhobenen DNA-Analyse-Daten.....	39
7 ERGEBNISSE.....	40
7.1 Optimierung der Epithelpräparation.....	40
7.2 Ermöglichung und Optimierung der Einzelzellgewinnung.....	40
7.3 Trennung von Normal- und Tumorzellen durch Verwendung der GFP-transfizierten Tumorzelllinie.....	40
7.4 Ergebnis der Wachstumskurve.....	41
7.4.1 Ergebnisse der Bestrahlung der Kokulturen.....	42
7.5 Bestimmung des DNA Gehalts.....	45
7.5.1 Zellzahl.....	46
7.5.2 DNA-Gehalt der nicht-malignen Zellen.....	46
7.5.3 DNA-Gehalt der malignen Zellen.....	48
8 DISKUSSION.....	52
8.1 Diskussion der Materialien und Methoden.....	52
8.1.1 Verwendetes Epithel.....	52
8.1.2 Verwendete Tumorzelllinie.....	53
8.1.3 Kokultursystem.....	53
8.1.4 Herstellung der Einzelzellsuspension.....	54
8.1.5 Messen der Zellen im FACS.....	55
8.1.6 Erstellung der Wachstumskurve.....	55
8.1.7 Bestrahlung.....	55
8.1.8 DNA-Messung.....	56
8.2 Diskussion der Ergebnisse.....	57
8.2.1 Verwendung der GFP-transfizierten Tumor-Zelllinie.....	57
8.2.2 Wachstumskurve.....	57
8.2.3 Bestrahlung.....	58
9 ZUSAMMENFASSUNG, SCHLUSSFOLGERUNG, AUSBLICK.....	59
9.1 Zusammenfassung.....	59
9.2 Schlußfolgerung.....	61
9.3 Ausblick.....	62

Inhaltsverzeichnis

10 LITERATURVERZEICHNIS.....	65
11 DANKSAGUNG.....	76
12 LEBENSLAUF.....	78

2 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1 VOR- UND NACHTEILE DES KOKULTURSYSTEMS IM VERGLEICH ZUR MONOLAYERKULTUR.....	5
TABELLE 2 BEURTEILUNG DER QUALITÄT DER ORGANKULTUR.....	16

3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 EPLC 32m1 GFP im Fluoreszenzmikroskop, Vergrößerung 200-fach	18
Abb. 2 Schema der Herstellung der Kokulturen	21
Abb. 3 Kokultur im Fluoreszenzmikroskop, Vergrößerung 40-fach	21
Abb. 4 Medicon®	23
Abb. 5 FACS und Fluoreszenzen	27
Abb. 6 Negativkontrolle, Punktwolkendiagramm	30
Abb. 7 Negativkontrolle, Histogramm der GFP-Fluoreszenz	30
Abb. 8 Negativkontrolle, Punktwolkendiagramm der GFP-Fluoreszenz	30
Abb. 9 Positivkontrolle, Punktwolkendiagramm	32
Abb. 10 Positivkontrolle, Histogramm der GFP-Fluoreszenz	32
Abb. 11 Positivkontrolle, Punktwolkendiagramm der GFP-Fluoreszenz	32
Abb. 12 Kokultur, Punktwolkendiagramm	33
Abb. 13 Kokultur, Histogramm der GFP-Fluoreszenz	33
Abb. 14 Kokultur, Punktwolkendiagramm der GFP-Fluoreszenz	33
Abb. 15 DNA-Analyse, Punktwolkendiagramm	35
Abb. 16 DNA-Analyse, Histogramm der GFP-Fluoreszenz	35
Abb. 17 DNA-Analyse, Punktwolkendiagramm zur Doublettendiskriminierung der Normalzellen	35
Abb. 18 DNA-Analyse, Histogramm der roten Fluoreszenz der Normalzellen	35
Abb. 19 DNA-Analyse, Punktwolkendiagramm zur Doublettendiskriminierung der Tumorzellen	36
Abb. 20 DNA-Analyse, Histogramm der roten Fluoreszenz der Tumorzellen	36
Abb. 21 DNA-Analyse, Punktwolkendiagramm zur Bestimmung der absoluten Zellzahl	36
Abb. 22 Histogramm der GFP-Fluoreszenz einer Kokultur am Tag 4	43
Abb. 23 Punktwolkendiagramm GFP-Fluoreszenz einer Kokultur am Tag 4	43
Abb. 24 Histogramm GFP-Fluoreszenz einer Kokultur am Tag	43
Abb. 25 Punktwolkendiagramm der GFP-Fluoreszenz einer Kokultur am Tag 8	43
Abb. 26 Statistik des relativen Anteils der Tumorzellen in den Kokulturen	43
Abb. 27 Histogramm der GFP-Fluoreszenz einer bestrahlten Kokultur am Tag 0	46
Abb. 28 Histogramm der GFP-Fluoreszenz einer scheinbehandelten Kokultur am Tag 0	46

Abbildungsverzeichnis

Abb. 29 Histogramm der GFP-Fluoreszenz einer bestrahlten Kokultur am Tag 4	46
Abb. 30 Histogramm der GFP-Fluoreszenz einer scheinbehandelten Kokultur am Tag 4	46
Abb. 31 DNA-Verteilung der Normalzellen, Kontrollgruppe	50
Abb. 32 DNA-Verteilung der Normalzellen, mit 10 Gy bestrahlt	50
Abb. 33 DNA-Verteilung der Tumorzellen, Kontrollgruppe	51
Abb. 34 DNA-Verteilung der Tumorzellen, mit 10 Gy bestrahlt	51
Abb. 35 Statistik der apoptotischen Zellen	52
Abb. 36 Statistik der proliferierenden Zellen	52

4 Abkürzungsverzeichnis

7-AAD 7-Actinomycin

ADH Antidiuretisches Hormon

APC Allophycocyanin

BEGM bronchial epithelium growth factor

COC Organkokultur von normalem Bronchialepithel und einer Bronchialepithel-Tumorzelllinie, in unserem Fall EPLC 32m1

CY 3/5/7 synthetisches Cyanin mit jeweils. unterschiedlicher Exzitations-/Emissionscharakteristik

DMEM Dulbecco's modified eagle medium

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Desoxyribonucleotid acid

DRAQ5 deep red fluorescing bisalkylantraquinone Lebend-DNA Farbstoff

EDTA Ethyl Di Thiamid acid

EPLC 32m1 Bronchialepithel-Tumorzelllinie

eGFP enhanced GFP

FACS Fluorescence activated cell sorter (Durchflusszytometer)

FCS fetal calf serum

FITC Fluorescein

FSC Frontscatter oder Vorwärtsstreuung

GFP Green fluorescence protein (grün-fluoreszierendes Protein)

LDH Laktadehydrogenase

NCS Newborn calf serum

NdYAG Neodymium Doped Yttrium Aluminum Garnet (Neodym. Yttrium-Laser)

Abkürzungsverzeichnis

OC Organkultur von normalem Bronchialepithel

PBMC peripheral blood Monocytes

Penstrep Streptomycin

PE Phycoerythrin

PerCP Peridin chlorophyll protein

PI Propidiumiodid

PS Phosphatidylserin

Rpm rounds per minute (Umdrehungen/ min.)

SSC Sidescatter oder Seitwärtsstreuung

TUNEL Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling

YFP Yellow Fluorescence Protein

5 Einleitung

5.1 Einleitung

Das Bronchialkarzinom ist mit einer Inzidenz von 71/100.000 nach dem Prostata-Karzinom die zweit häufigste maligne Erkrankung beim Mann und mit einer Inzidenz von 20/100.000 bei der weiblichen Bevölkerung ebenfalls die zweit häufigste maligne Erkrankung nach dem Mamma-Karzinom {5, 15}. Es ist aber mit einer Mortalität von 31 % beim Mann, bzw. 25 % bei der Frau, die häufigste zum Tode führende maligne Erkrankung. Die bisherige Dominanz des männlichen Geschlechts ist dabei real nicht mehr existent. Epidemiologisch ist das zunehmende Risiko, an einem Lungenkarzinom zu versterben, für Frauen bereits belegt, aber noch nicht in das Bewusstsein der Raucherinnen vorgedrungen {23}.

In Deutschland verstarben 1997 37.248 Menschen an einem Bronchialkarzinom {5, 15}.

Die sozialmedizinischen Gesamtkosten werden auf jährlich 2,5 Mrd. € geschätzt, wobei die zusätzlichen Kosten in Höhe von 11 Milliarden €, die durch Folgekrankheiten des Tabakkonsums wie COPD, Gefäßkrankheiten und Tumore des Kopf-/ Halsbereichs entstehen, hinzu addiert werden müssen. Nicht mitberechnet sind auch die Kosten, die durch einen frühen Tod entstehen, und die zu 85 % die Gesellschaft zu tragen hat. Diese werden in den Vereinigten Staaten von Amerika auf 36 Milliarden Dollar für 2003 geschätzt {38}. Demgegenüber stehen staatliche Einnahmen aus der Tabaksteuer in Höhe von 16 Milliarden € für die Bundesrepublik Deutschland {DIE ZEIT 05.06.2003 Nr.24}. Die 5-Jahres-Überlebensrate von 60 % in einem sehr frühen Stadium, (T1 N0 M0) bis 1 % bei Vorliegen von Fernmetastasen sind nach wie vor entmutigend {59}. Verantwortlich hierfür sind vor allem die unspezifische Symptomatik und damit die späte Diagnosestellung. Wichtige Leitsymptome können ein persistierender Reizhusten, ein geänderter Hustencharakter bei COPD, oder neu aufgetretene Hämoptoe sein. Bei 30 %

der Patienten hat zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits ein Befall extrathorakaler, meist zervikaler, Lymphknoten stattgefunden, 20 % haben schon Knochenmetastasen, bei 10 % treten ZNS-Metastasen mit Schwindel, Kopfschmerz und neurologischen Ausfällen auf. Die Prävalenz paraneoplastischer Syndrome beträgt 10 bis 20 %, die wichtigsten hierbei sind das Cushing-Syndrom, das Syndrom der inadäquaten ADH Sekretion (SIADH), das Lambert-Eaton-Syndrom (pseudomyasthenisches Syndrom), sowie die hypertrophe pulmonale Osteoarthropathie (Pierre-Marie-Bamberger Syndrom) {59}.

Die histologische Klassifikation wird nach der WHO-Klassifikation von 1999 in einen kleinzelligen und drei nicht-kleinzellige Typen unterteilt. Beim nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom werden Plattenepithel-, Adeno- und Großzellige Karzinome unterschieden. Der histologische Differenzierungsgrad wird mit G1 (hochdifferenziert), G2 (mäßig differenziert), G3 (niedrig differenziert) und G4 (undifferenziert) beschrieben. Die Häufigkeit ist abhängig vom Untersuchungsgut (Alter, Risikofaktoren, berufliche Noxen, Geschlecht) und Technik (Autopsie, Biopsie) und schwankt unterschiedlich stark. Mit 30-40 % ist das Plattenepithelkarzinom am häufigsten, gefolgt vom Adenokarzinom mit 25-30 %, dem kleinzelligen Bronchialkarzinom mit 15-20 %, dem großzelligen Karzinom mit unter 10 % und dem kombiniert adeno-squamösen Karzinom mit weniger als 1 %. Die Geschlechtsverteilung ist ebenfalls unterschiedlich. Beim Mann überwiegen Plattenepithel- und kleinzelliges Bronchialkarzinom mit eindeutiger Zuordnung zum Risikofaktor inhalatives Rauchen, wobei die Gefahr jeweils durch zusätzliche berufliche Noxen (z. B. Asphaltverarbeitung) potenziert wird. Bei der Frau dominierte bisher das Adenokarzinom, dessen Entstehung nicht eindeutig an das inhalative Rauchen geknüpft werden kann. Kompliziert wird die Diagnosestellung oft durch die unterschiedliche Histologie einer Biopsie im Vergleich zur postoperativen Histologie aus Operationspräparaten. Zugrunde liegt eine Heterogenität des Tumors, die erst an

größeren Präparaten sicher erkannt wird. Dies muss vor allem bei der Therapieentscheidung auf dem Boden einer durch Biopsie gewonnenen Histologie Beachtung finden.

Für die Beurteilung der Prognose sind neben den vorgenannten Faktoren auch der prätherapeutische Gewichtsverlust und der Leistungsindex des Patienten von Bedeutung {59}.

Besorgniserregend ist die Zunahme des Lungenkrebsrisikos durch Passivrauchen, wobei auch hier gilt, dass weniger die Menge als die Dauer der Exposition schwer wiegt. Die Zahl der durch Passivrauchen verursachten Todesfälle wird in Deutschland auf jährlich 400 geschätzt, die Tendenz ist steigend. In USA gilt Passivrauchen seit 1992 als Karzinogen der Klasse A, also zu der Stoffgruppe die nachgewiesenermaßen eine Kanzerogenität beim Menschen hat {15}.

Die Therapie ist bei kleinzelligen und nicht -kleinzelligen Bronchialkarzinomen, jeweils abhängig vom Stadium, eingeteilt nach dem internationalen Stagingssystem {62, 63} unterschiedlich. Frühe Stadien werden mit kurativer Intention operiert, wobei hierfür anatomische Resektionen und Lungenteilresektion (Wedge-Resektion) mit oder ohne adjuvante und neoadjuvante Polychemotherapie zur Verfügung stehen. Bei Inoperabilität wird im Allgemeinen mit einer kombinierter Radiochemotherapie behandelt. Spätere Stadien werden palliativ mit dem Ziel einer verbesserten Lebensqualität und verlängerten Überlebenszeit mit einer kombinierten Radiochemo-oder Polychemotherapie therapiert. Neuere Studien empfehlen beim kleinzelligen Bronchialkarzinom auch bei Vollremission eine adjuvante Ganzschädelbestrahlung zur Prophylaxe von Hirnmetastasen. Bei fortgeschrittenen Stadien kann bei auftretenden Stenosen eine lokoregionären Radiotherapie {15, 8, 9} vorgenommen werden. Bei dieser Brachytherapie wird über das Bronchoskop eine Applikatorsonde platziert, über die die Anwendung künstlicher

Radioisotope wie Iridium 192 ermöglicht wird, die bei kurzer Bestrahlungsdauer und steilem Dosisabfall in Entfernung zur Strahlungsquelle das umliegende Gewebe schonen. Weitere palliative Maßnahmen umfassen die Rekanalisierung von Bronchusstenosen entweder mittels Bougierung und Stenteinlage {60}, oder mit Kryotherapie oder NdYAG-Laser {61}.

Für die Optimierung dieser multimodalen Therapiekonzepte ist es jedoch nötig, die noch lückenhaften Kenntnisse der Radiobiologie {28} des Respirationstraktes im Vergleich zum Tumorgewebe zu erweitern. Bisherige Versuche zur Wirkung von ionisierender Strahlung oder Chemotherapie auf Bronchialepithel oder Tumorgewebe arbeiten mit Monolayerkulturen. Dabei werden die jeweiligen Zelllinien als Einzelzellen in Nährmedium kultiviert {1}. Neue Erkenntnisse legen die Vermutung nahe, dass sich Einzelzellen abweichend zum dreidimensionalen Organverband verhalten. Es werden dabei zwei Mechanismen angenommen. Zum einen ist der Zell-Zell-Kontakt möglicherweise für eine erhöhte Strahlenresistenz der Zellen verantwortlich, wohingegen der Bystander -Effekt die Beobachtung bezeichnet, dass Medium von bestrahlten Zellen bei nichtbestrahlten Zellen zur Apoptose führen kann {10,11, 29, 31, 32}. Diese bei Monolayer-Kulturen entdeckten Effekte haben wahrscheinlich große Bedeutung für das Wachstum, die Invasion und das Verhalten nach Schädigung eines Tumors bei Patienten. Das Kokultur-System ist eher als die Monolayer-Kultur dazu geeignet, diese Effekte zu untersuchen.

Bei der alleinigen Verwendung von Tumor-Monolayer-Kulturen bleibt auch der in der Therapie des Bronchialkarzinoms oft limitierende Faktor der Schädigung des Normalepithels außer Acht.

Tabelle 1 Vor- und Nachteile des Kokultursystems im Vergleich zur Monolayerkultur

	Monolayer	Organkulturen
Vorteile	Homogene, bekannte Zusammensetzung einfache Handhabung geringer Aufwand und Kosten große Zellzahlen möglich	Komplexer Aufbau und Zell-Zell-Kontakte Erhaltene Struktur des Epithels mit Basalmembran Therapieeffekte auf das Normalgewebe und Tumor werden im selben System erfasst
Nachteile	Struktur eingeschränkt mit der in-vivo-Situation vergleichbar	eventuell Unterschiede der Kulturen bzgl. Größe, Zellzahl und Zusammensetzung großer Aufwand bei der Kultivierung Unterschiede durch wechselnde Präparatoren

Als Alternative für Tierversuche an Hund oder Schwein steht unserer Arbeitsgruppe ein Kokultursystem (COC) für Untersuchungen von Zellen im Epithelverband zur Verfügung. Es beinhaltet die Kombination einer dreidimensionalen Organkultur von humanem Bronchialepithel und einer Bronchialepithel-Tumorzelllinie. Dieses, ursprünglich für Kulturen von Nasenschleimhaut entwickelte System wurde für das Bronchialepithel angepasst und durch die Kokultivierung mit einer Tumorzelllinie erweitert {1}.

Das Kokultursystem erlaubt durch die Kokultivierung von Normal- und Tumorzellen die Beobachtung der Interaktion beider Populationen. So kann das unterschiedliche Verhalten beider Populationen im Rahmen einer Antitumorthherapie beurteilt werden. Entweder, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, durch ionisierende Strahlung, oder, wie in weiteren Projekten vorstellbar, durch Chemotherapeutika, photodynamische Therapie oder

Hyperthermie. Das Kokultursystem vereinfacht solche Untersuchungen merklich und könnte die Anzahl der Tierversuche vermindern.

Die bisherige Beurteilung und Analyse der Kokulturen erfolgt direkt mit Fluoreszenzmikroskopie oder Immunhistochemie, wobei der Nachteil dieser Methoden zum einen in den Techniken der Präparation liegen. Für die Untersuchung müssen die Kokulturen geschnitten werden. Dabei kann es passieren, dass der Tumoranteil nicht horizontal, sondern radial angeschnitten wird und so Schnitte entstehen, die vergleichsweise zu wenig oder zu viel Tumoranteil besitzen. Zum anderen liegt zwischen Behandlung und Untersuchung ein zum Teil erheblicher Zeitabstand. Die Messung einer direkten Auswirkung ist so limitiert. Eine weitere Möglichkeit ist die indirekte Untersuchung spezifischer Parameter einer Zellschädigung wie beispielsweise der Laktatdehydrogenase. Dieses Enzym wird bei massiver Schädigung der Zelle freigesetzt, wobei die Erhöhung der Werte mit der Schwere der Schädigung korreliert ist, und kann im Überstand des Mediums gemessen werden {4}. Eine direkte, getrennte Untersuchung der Normalepithel- und Tumorzellen, die die Auswirkung einer Therapie sofort darstellt, ist damit jedoch nicht möglich.

In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob sich die Durchflusszytometrie eignet, Normal- und Tumorzellen zu diskriminieren, und einen unterschiedlichen Effekt der Antitumorthherapie aufzuzeigen.

Dafür musste die Durchflusszytometrie auf das Kokultursystem angepasst werden.

Schwierigkeiten bereitete uns am Anfang die Separation von Einzelzellen aus den dreidimensionalen Kokulturen. Mit bisherigen Methoden wie Dissektion mittels Skalpell oder verschieden großer Kanülen oder enzymatischer beziehungsweise chemischer Lysemethoden {37, 39, 65} gelang uns lediglich eine Ausbeute von durchschnittlich 70 Zellen pro 4 Kokulturen.

Einleitung

Große Probleme ergaben sich bei der Trennung beider Populationen im Durchflusszytometer. Dieses wurde für die Analyse von Einzelzellen, wie zum Beispiel den Monozyten (peripheral blood monocytes) entwickelt. Eine der wichtigsten Anwendungen in der heutigen klinischen Routine besteht zum Beispiel in der Diskriminierung des CD4/CD8 Anteils der Lymphozyten bei der Verlaufskontrolle von AIDS {41, 45, 66}. Dabei können Populationen an Hand von Rezeptoren oder Stoffwechselprodukten, die mit Antikörpern markiert werden, differenziert werden. Beispielsweise sind Antikörper gegen Cytokeratine ein gängiges Verfahren zur Unterscheidung. Cytokeratine sind Stützproteine, die zusammen mit Aktin- und Mikrotubuli das Zytoskelett der Zelle bilden und charakteristisch für epitheliale Zellen sind. Die Fragmente der Cytokeratine sind serumlöslich und können bei Zerstörung der Zelle dort nachgewiesen werden. Sie werden als Marker für epitheliale Zellen benutzt und dienen zum Beispiel in der Pathologie zur Identifikation von Karzinomen {16, 17, 19}. Dies erwies sich als bei unseren Zellen nicht durchführbar, da kein Antikörper zu finden war, der beide Zellarten ausreichend sicher unterscheiden kann.

Durch die Verwendung einer speziellen Tumorzelllinie, die mit einem Green-Fluorescence-Protein (GFP) transfiziert wurde, gelang uns schließlich die Trennung. Das GFP ist ein Fluorochrom, dass, durch Laserlicht angeregt, grünes Licht bei 530 nm emittiert {12, 26}. Dieses wurde in den Nukleus integriert und wird mit dem normalen Zellzyklus repliziert. Es ist gewissermaßen ein Aktivitätsmarker, da es nur von den lebenden Zellen produziert wird und wegen der geringen Halbwertszeit von 2h schnell verloren geht. Wir können also lebende Tumorzellen von nicht-lebenden Tumorzellen oder Normalepithelzellen trennen.

Die Bestimmung des DNA-Gehalts von Zellen war eine der ersten Anwendungen für die Durchflußzytometrie in den frühen 70-iger Jahren. Man hatte erkannt, dass sich

bestimmte Fluorochrome wie BrDU, oder Propidiumiodid stöchiometrisch an die DNA anlagern {71}. Über den Gehalt des Farbstoffes konnte dann der Gehalt an DNA errechnet werden.

Voraussetzung ist die Linearität des Zytometers, die an Hand eines speziellen Qualitätskontroll-Sets kontinuierlich überprüft werden muss. Dabei werden Partikel mit bekanntem DNA-Gehalt wie Hühnererythrozyten oder Thymozyten gemessen. Über die ermittelten Werte kann die Linearität überprüft werden.

Heute ist eine Vielzahl von DNA-Farbstoffen auf dem Markt. Grob kann man sie nach folgenden Kriterien unterscheiden:

Lebend- und Totfarbstoffe: Lebendfarbstoffe lassen Untersuchungen an lebenden Zellen zu, sie werden über aktive Transportmechanismen in die Zelle transportiert. Totfarbstoffe benötigen fixierte und permeabilisierte Zellen.

Desweiteren unterscheidet man DNA-spezifische Farbstoffe, die sich an die AT- oder GC-Bindung der DNA anlagern, von unspezifischen Farbstoffen die sowohl DNA als auch RNA anfärben und eine Vorbehandlung mit RNA-se nötig machen.

Die ältesten Vertreter sind zum einen Propidiumiodid, ein mit Bindung an RNA/ DNA Fluoreszenz entwickelnder Farbstoff, der RNA-se Vorbehandlung und Permeabilisierung benötigt. Zum anderen wird das Bis-Benzimidazol HOECHST 33342 benutzt, ein DNA-spezifischer Lebendfarbstoff, der allerdings einen UV-Laser zur Exzitation braucht.

Die Mycine wie z. B. Chromomycin 3, ein grünes Fluorochrom, oder Actinomycin D, ein rotes Fluorochrom, sind durch ihre GC-Bindung DNA-spezifisch, benötigen aber fixierte und permeabilisierte Zellen.

Die Cyan-Farbstoffe benötigen ebenfalls permeabilisierte Zellen, und, je nach Ausführung (Blau/ Grün/ Rot) entsprechende Lichtquellen wie Argon-UV- oder Neodym-Laser oder Quecksilberdampflampen zur Anregung.

Relativ neu sind die SYTO-Farbstoffe, die es als Totfarbstoff (CYTOX) oder als Lebendfarbstoff (SYTO) gibt (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA), die jeweils mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt werden können (grün blau, orange, rot). Diese Farbstoffe sind nicht DNA-spezifisch und erreichen nicht die stöchiometrische Zuverlässigkeit wie HOECHST 33342 oder Propidiumiodid. Sie sind daher nicht zur quantitativen DNA-Analyse geeignet, können aber zur Totfärbung genutzt werden.

Ein neuer Farbstoff ist das deep-red-anthraquinone (DRAQ5), der DNA-spezifisch ist und sich innerhalb von Sekunden in lebenden Zellen verteilt. Es ist keine weitere Vorbehandlung nötig, und er lässt sich sowohl von Argon- als auch Diodenlaser anregen. Das Emissionsspektrum liegt bei 670 nm, weit vom Spektrum des GFP entfernt. DRAQ5 erreicht dabei die gleiche stöchiometrische Genauigkeit wie Propidiumiodid und ist damit sehr gut zur quantitativen DNA-Bestimmung geeignet {54, 55, 56}.

Den meisten Farbstoffen sind gewisse Einschränkungen gemein, die sie für unsere Messung unbrauchbar machen. Um die Tumor- von den Normalzellen diskriminieren zu können, müssen die Tumorzellen die Fähigkeit zur GFP-Produktion behalten, also lebendig sein. Es kommt daher nur ein Lebend-DNA-Farbstoff in Frage. Zusätzlich darf das Fluoreszenz-Emissionsspektrum nicht zu sehr mit dem des GFP interferieren, und der Farbstoff muß mit normalen Argon- bzw. Diodenlasern anregbar sein. Farbstoffe, die einen UV-Laser benötigen, schießen aus, weil diese Laser in Anschaffung und Wartung sehr kostenintensiv sind. Aus diesen Gründen kommt nur DRAQ5 für die Lebend-DNA-Färbung in Frage.

Die Bestimmung des DNA-Gehalts und des Zellzyklus ist seit Jahren Gegenstand vieler Arbeiten. Besonders interessant scheint die Zellzyklusphase und deren prognostische Bedeutung zu sein {35, 36, 40, 74}. Außerdem lässt der DNA-Gehalt bzw. die Zellzyklusphase Aussagen über den Zustand der Zelle zu. Der DNA-Gehalt ist abhängig

von der Zellzyklusphase, in der sie sich befindet. Wenn Zellen aus der G₀/G₁-Phase in die S-Phase eintreten, nimmt der DNA-Gehalt zu. In der G₂-Phase hat er sich verdoppelt. Apoptotische Zellen können einen DNA-Gehalt zeigen, der geringer ist als der von Zellen in der G₀/G₁-Phase. Die G₀/G₁-Phase gilt als Ruhephase, die Synthese- oder S-Phase und die G₂/M-, die Mitose-Phase indizieren proliferierende Zellen. Apoptotische Zellen zeigen weniger Fluoreszenz als Zellen in G₀/G₁, daher erscheint ein sogenannter Sub-G₁-Peak {2, 3}. Eine andere Möglichkeit zur Detektion apoptotischer Zellen ist die TUNEL-Methode, bei der lichtmikroskopisch die während der Apoptose entstehenden DNA-Strangbrüche markiert werden, die durch die Aktivität der Nukleasen entstehen. TUNEL steht für "Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling". Grundsätzlich kann man solche Tests mikroskopisch und durchflusszytometrisch auswerten. Die Sensitivität dieser Methode ist extrem hoch: Im Prinzip kann damit jede einzelne apoptotische Zelle identifiziert werden und das bereits in einer sehr frühen Phase der Apoptose. Eine weitere Möglichkeit, die oft in der Durchflusszytometrie eingesetzt wird, ist die Markierung von Membranbestandteilen durch Annexin V. Die Plasmamembran von Zellen ist asymmetrisch aufgebaut. Der Verlust dieser Asymmetrie ist ein frühes Zeichen der Apoptose. Phosphatidylserin (PS), das unter normalen Bedingungen auf der cytoplasmatischen Innenseite der Membran lokalisiert ist, tritt dabei vermehrt in der nach außen gerichteten Membranseite auf. Das Protein Annexin V bindet spezifisch an PS. Der Nachweis von PS an der Zelloberfläche dient daher dem Nachweis von Apoptose. Annexin V ist ein 35-36 kD großes Protein, das PS Ca²⁺-abhängig binden kann. Durch Annexin V, an das ein Fluoreszenzfarbstoff wie FITC oder PE gekoppelt ist, können apoptotische Zellen durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Da auch bei nekrotischen Zellen aufgrund der permeabilisierten Membran Annexin V binden kann, muß gleichzeitig eine Ausschlussfärbung mit Propidiumjodid oder 7-Aminoactinomycin (7-

AAD) durchgeführt werden. Diese Farbstoffe färben nur die DNA von toten Zellen an. Zellen, die sich sowohl mit Annexin V als auch mit Propidiumiodid oder 7-AAD färben lassen, sind daher tot. Sie können durch Apoptose oder Nekrose untergegangen sein. Zellen, die sich nur mit Annexin V färben lassen, sind im Prozeß der Apoptose begriffen. Mit den Annexin V-Kits kann man frühe Apoptose von später Apoptose und Nekrose unterscheiden. Die Zellen können sowohl im Fluoreszenzmikroskop, als auch im Durchflusszytometer untersucht werden. Mit der Bestimmung der Sub G0 Population ist es möglich, die apoptotischen Zellen allein über den DNA-Gehalt zu detektieren {46, 49, 50, 51, 53, 58}. Zusätzlich lässt sich über den Anteil der S-Phasen Population der Anteil der proliferierenden Zellen bestimmen. Damit kann man in einer gemischten Population den Effekt einer antiproliferativen Therapie nachweisen, da hierbei die Zellen der Sub-G0-Phase zunehmen.

5.2 Zielsetzung

Für die Analyse der Kokulturen im Durchflusszytometer sind Einzelzellen notwendig. Erstes Ziel dieser Arbeit war es, aus den dreidimensionalen Kokulturen genügend Einzelzellen für eine Analyse in der Durchflusszytometrie zu gewinnen.

Zweites Ziel war, eine Methode zur Analyse und Trennung der Tumor- von den Normalepithelzellen im Durchflusszytometer zu entwickeln.

Drittes Ziel war, an einem Anwendungsbeispiel die Methodik zu überprüfen. Hierzu wurde eine Bestrahlung mit ionisierender Strahlung gewählt.

Viertes Ziel war die Etablierung einer Methode zur Analyse des DNA-Gehalts getrennt für beide Zellpopulationen.

Fünftes Ziel war die Analyse des Einflusses ionisierender Strahlung auf den DNA-Gehalt der Kokulturen im Vergleich zu einer Tumor- bzw. einer Bronchialepithel-Zelllinie in Monolayer-Kultur.

6 Materialien und Methoden

6.1 Kultivierung des respiratorischen Epithels

6.1.1 Verwendetes Epithel

Als respiratorisches Epithel wurde humanes Bronchialepithel verwendet. Die Gewinnung des Epithels aus Operationspräparaten war durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität München genehmigt.

Die Operationspräparate wurden als Quelle gewählt, da so eine ausreichende Anzahl an Kulturen vom selben Spender zu erreichen waren.

6.1.2 Gewinnung des Epithels

Die verwendeten Präparate stammten von Resektionen der Lunge, die in den Asklepios-Lungenfachkliniken, Gauting bei München durchgeführt wurden. Indikation zur Operation waren in der Regel periphere Bronchialkarzinome. Wir bedanken uns an dieser Stelle bei Herrn Prof. Dr. med. Thetter, Herrn OA Prof. Dr. med. B. Passlick und Herrn Dr. med. Müller für die freundliche Unterstützung. Unmittelbar im Anschluss an die Lobektomie wurde der Bronchus vom Operateur präpariert und das OP-Präparat, das aus Epithel, Knorpelspangen und Bindegewebe bestand, in Phosphate buffered Saline (PBS, Gibco-Lifetechnologies LTD., Paisley, Schottland) verbracht und zur weiteren Verarbeitung in die Medizinische Klinik, Klinikum Innenstadt, transportiert. Zwischen Lobektomie und Aufbereitung zur Kultivierung lagen in der Regel 90 bis 120 min., jedoch nicht mehr als 180 min.

6.1.3 Präparation des Bronchialepithels

Das OP-Präparat wurde unter weitgehend sterilen Bedingungen in einer Reinluftarbeitsbank (Laminair, Heraeus, Hanau, Germany) verarbeitet. Hierzu

wurden die ca. 1-2 cm großen Präparate mehrmals in Phosphate buffered Saline (PBS, Gibco-Lifetechnologies LTD., Paisley, Schottland) gewaschen, um Schleim und Blutreste abzuspielen. Dann wurde, nach optischer Identifikation der Epithelseite und Zerteilung des Bronchus in leicht zu handhabende Stücke, jeweils ein Teil auf einer sterilen Arbeitsfläche befestigt. Diese wurde aus einem dreieckigen Stück Styropor angefertigt, das mit einem sterilen Handschuh überzogen wurde. Die Standfestigkeit konnte durch Miteinbau einer Glasscheibe erhöht werden. Zur besseren Verarbeitung wurde ein handelsübliches Gestell mit montierter Lupe verwandt (sog. 3. Hand) um eine leichtere Identifikation zu ermöglichen. Der Fuß dieses Gestells wurde mit dem zweiten Handschuh ebenfalls steril bedeckt. Das Einschlagpapier der Handschuhe wurde als sterile Arbeitsfläche genutzt. Es wurde mit einem Skalpell (Gr. 22, Feather Co., Osaka, Japan) eine Inzision des Epithels vorgenommen. Mit Hilfe einer Pinzette konnte so das Epithel ab präpariert werden. Große Stücke wurden dann zu kleineren Stücken von ca. 2 x 2 mm zerteilt. Die Epithelstücke wurden in 14 ml Röhren (Falcon Lincoln Park, New Jersey, USA) mit PBS verbracht und vorsichtig mit PBS gespült. Dieser Waschvorgang wurde 3 mal wiederholt und die Kulturen dann auf agarbeschichtete (Agar Nobel, DIFCO-Laboratories, Detroit, USA) 24-Well Multiplatten (Multiwell Tissue Culture Plate, 24 Well, Falcon Lincoln Park, New Jersey, USA) verbracht.

6.1.4 Kulturbedingungen

Die Multiwellplatten waren mit 0,75 % Agar Noble (DIFCO-Laboratories, Detroit, USA) beschichtet. Der Agar war mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco-Lifetechnologies Ltd. Paisley, Scotland) gelöst und mit 10 % Newborn-Calf-Serum (NCS, Gibco-Lifetechnologies Ltd. Paisley, Scotland), nicht-essentiellen

Material und Methoden

Aminosäuren (1,1 µl/ml, Gibco-Lifetechnologies Ltd. Paisley, Scotland), Streptomycin (Penstrep, 1,8 µl/ml, Gibco-Lifetechnologies Ltd. Paisley, Scotland), und Amphotericin B (Fungizone, 3,6 µl/ml, Gibco-Lifetechnologies Ltd. Paisley, Scotland) supplementiert. Auf den Agar wurden ca. 300 µl BEGM (bronchial epithelium growth medium, Promocell, Heidelberg) pipettiert. Pro Well wurde ein Schleimhautstück kultiviert. Die Kultivierung erfolgte im Inkubator (Typ B5060 EC/CO², Heraeus, Hanau) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit. Das BEGM wurde alle 2 Tage, die Multiwellplatte alle 7 Tage gewechselt. Die Dauer der Kultivierung betrug mindestens 14 Tage, maximal 30 Tage.

Nach ca. 10 Tagen hatte sich das Epithel um einen bindegewebigen Kern von ca. 1 mm Durchmesser organisiert und zeigte einen koordinierten Flimmerschlag. Die Kontinuität des Flimmerepithels wurde als Qualitätsmerkmal genutzt. Dabei wurde folgendes Schema verwandt:

Tabelle 2 Beurteilung der Qualität der Organkultur

Kategorie	Flimmerepithel	unzilisiertes Epithel
1	Vollständig	
2	Bis 70 % der Oberfläche	Ja
3	Bis 50 % der Oberfläche	Ja
4	Weniger als 50 % der Oberfläche	Ja
5	Nein	Ja
6	Nein	nicht vollständig

Zur Herstellung der Kokulturen wurden nur Organkulturen der Kategorie 1 bis 3 verwendet.

6.1.5 Verwendete Tumorzelllinie für die Kokultur

Es wurde die Tumorzelllinie EPLC 32m1 verwendet, die wegen ihrer guten Adhäsionsfähigkeit und ihrer Invasivität für die Herstellung von Kokulturen besonders geeignet ist {1}. Um den Tumor von normalen Zellen unterscheiden zu können, benötigten wir ein eindeutiges Merkmal zu seiner Identifikation. Die Suche nach einem geeigneten Antikörper erwies sich als schwierig, da die Tumorzelllinie als Plattenepithel-Karzinom einem Bronchialepithel entstammt und somit sämtliche ansonsten verwandte Marker, wie z. B. Cytokeratine, nicht benutzt werden können, da beide Populationen sie besitzen. Vom Laserforschungszentrum Großhadern wurde uns eine Green-Fluorescence-Protein (GFP-) transfizierte EPLC 32m1 Zelllinie zur Verfügung gestellt. Wir bedanken uns bei Frau M. Castro und Herrn Dr. rer. nat. Baumgärtner für die freundliche Unterstützung. Das Green fluorescence protein ist ein in seiner Urform von Korallen abstammender natürlicher Fluoreszenzfarbstoff. Man kann über Transfizierung ein für GFP kodierendes Plasmid in eukaryontische Zellen transportieren, dass für die Reproduktion des GFP im Rahmen des Zellzyklus sorgt. Wegen seiner kurzen Halbwertszeit von ca. 2h ist das degenerierte GFP als Vitalitätsmarker geeignet. Wir haben dieses Merkmal zur Identifikation lebender, GFP-produzierender Tumorzellen genutzt.

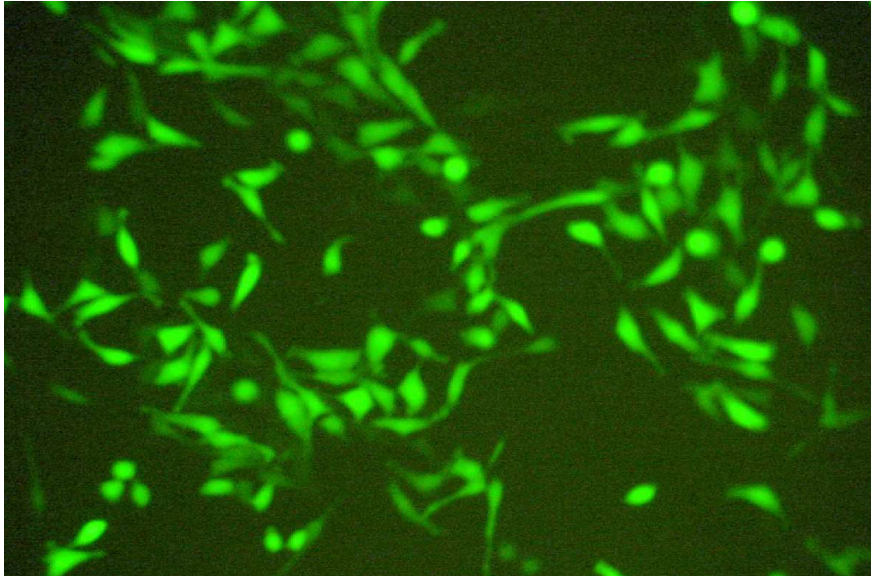


Abbildung 1 GFP-produzierender EPLC 32 ml als Monolayer im Fluoreszenzmikroskop, Vergrößerung 200 -fach

Die Kultivierung der Monolayer-Tumorzellkultur erfolgte analog der Kultivierung der OC im Heraeus Inkubator. Die Tumorzellen wurden mit einem speziellen Tumor-Medium (RPMI, Promocell, Heidelberg) kultiviert, dem 10 % Newborn Calf-Serum (NCS, Gibco Lifetechnologies LTD, Paisley, Schottland), L-Glutamin (Gibco Lifetechnologies LTD, Paisley, Schottland), Fungizone (4,8 µl/ml, Gibco Lifetechnologies LTD, Paisley, Schottland) und Streptomycin (Penstrep, 2,4 µl/ml, Gibco Lifetechnologies LTD, Paisley, Schottland) zugesetzt waren. Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt. Wenn die Monolayer-Tumorzellen ein annähernd konfluentes Stadium erreichten, wurden sie gesplittet {1}. Für die Kokulturen wurden durchgehend nur Tumorzellkulturen der selben Generation benutzt, um eine gleichmäßige Expression des GFP zu gewährleisten.

6.1.6 Verwendete Tumor-Zelllinien für die Monolayer-Versuche

Für die Monolayer-Versuche wurde mit dem EPLC 32m1 dieselbe Tumorzelllinie wie für die Kokulturen verwandt. Dabei wurden jeweils 10.000 Zellen in ein Well einer 6-Well-Platte verbracht und mit 2 ml RPMI-Medium kultiviert. Nach 4 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel, danach wurde eine Gruppe mit 10 Gy bestrahlt

6.1.7 Verwendete Normalepithel-Zelllinie

Um Vergleichsmöglichkeiten zu haben, wurde die DNA-Analyse auch mit der Beas-2B-Zelllinie durchgeführt. Beas-2B ist eine humane Bronchialepithelzelllinie, die durch Transfektion mit SV-40 Adenoviren immortalisiert wurde. Diese Zelllinie wird weitverbreitet als Standard für normales humanes Bronchialepithel verwendet. Unsere Zelllinie stammt von Prof. D. A. Gillissen, Pneumologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn, Deutschland. Die Zellen wurden analog zur EPLC 32m1-Tumorzelllinie kultiviert.

6.1.8 Herstellung der Kokulturen

Kulturen der Kategorie 1-3 wurden nach ca. 10 Kulturtagen zu Kokulturen verarbeitet {1}. Hierzu wurden die Kulturen in der Mitte halbiert, der bindegewebige Kern freigelegt, und die Kulturen mit der Schnittfläche nach 3 Uhr ausgerichtet, auf eine neue Platte verbracht. Tumorzellen wurden subkonfluent geerntet, das alte Medium ab zentrifugiert, einmal gewaschen und alles Medium abgesaugt. Dadurch entstand ein Zell-Pellet von zähflüssiger Konsistenz. Es wurde mit einer Micropipette (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) 1 µl Tumorsuspension auf die Schnittstelle aufgebracht. Nach einer Stunde Anhaftzeit wurde 50 µl Kokulturmedium (90 % BEGM + 10 % RPMI) zugegeben. Nach 24 h wurde der nicht haftende Tumor

Material und Methoden

abgespült und die Kokulturen auf eine frische 24-Well Platte verbracht. Es wurden 400 µl Medium zugegeben.

Die Kulturen wurden unter Standardbedingungen für je 2 , 4 oder 8 Tage kokultiviert und dann zur Messung mittels FACS verarbeitet. Die Beurteilung der Qualität, die Beobachtung im Verlauf und auch die Kontrolle des Wachstums der Monolayer-Tumorzellkultur erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Diaphot-TMD, Nikon Corporation, Japan; Zubehör: Quecksilberdampfampe Hb 101 AF und 510 nm Emissionsfilter B-2A, beides Nikon Corporation, Japan).

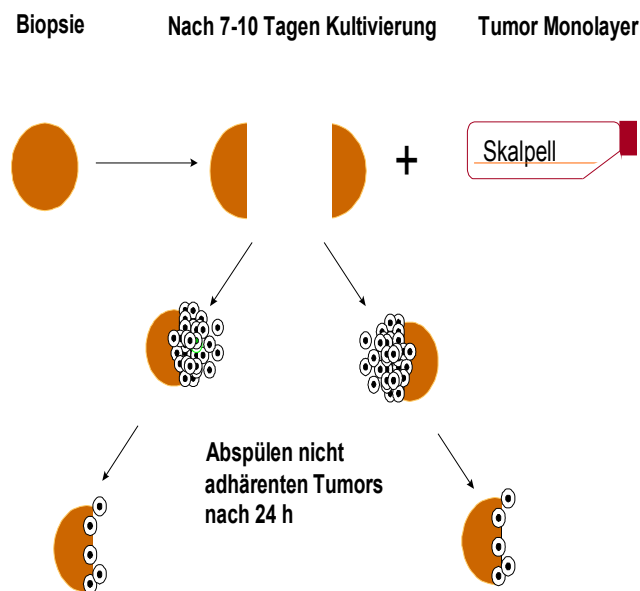


Abbildung 2 Schema der Herstellung der Kokulturen

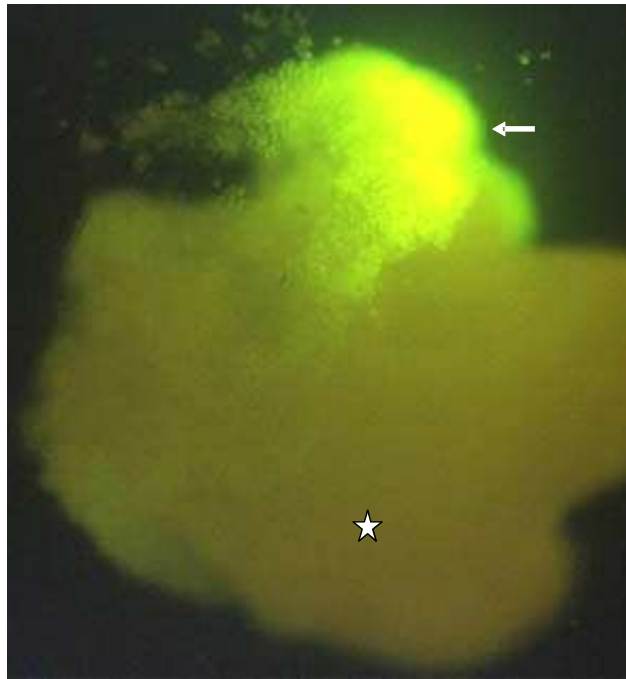


Abbildung 3 Kokultur im Fluoreszenzmikroskop, der Anteil der grün-fluoreszierenden Tumorzellen ist mit Pfeil, die Normalkultur mit Stern markiert. Vergrößerung 40-fach

6.1.9 Herstellung der Monolayer-Platten für die Bestrahlungsversuche

Für die Bestrahlung der Monolayer Kulturen wurden Tumor- bzw. Beas-2B-Zellen subkonfluent geerntet, und einmal gewaschen. Dazu wurde die abgelöste Tumorsuspension für 5 min. bei 800 Rpm zentrifugiert. Das alte Medium wurde abgesaugt, durch neues Medium ersetzt und das Zell-Pellet re-suspendiert. Danach wurden je 10000 Zellen pro Well in einer 6-Well-Platte (Falcon Lincoln Park, New Jersey, USA) angesetzt. Je Well wurden 2 ml RPMI-Medium zugegeben. Am Tag der Bestrahlung wurde das Medium vor der Bestrahlung gewechselt.

6.2 Vorbereiten der Kokulturen für die Durchflusszytometrie

6.2.1 Verwendete Materialien

Die Durchflusszytometrie wurde auf einem Durchflusszytometer (FACSCalibur, Becton & Dickinson San Jose CA., USA) durchgeführt, und mit der CellQuest Software, einem Programm zur Darstellung und Analyse von im FACS gewonnenen Daten (Becton & Dickinson San Jose CA., USA) auf einem Apple Mac Computer analysiert.

Die Separierung der dreidimensionalen Kokulturen erfolgte mit der MediMashine® mit 50 µm Medicons (Art.-Nr. rn 017) und 50µm Filcons (Art.-Nr. rn 047, alle Becton & Dickinson San Jose CA., USA)

6.2.2 Probleme bei der Gewinnung der Einzelzellsuspension

Enzymatische Vorverdauung, mechanische Separierung mit Hilfe von Kanülen verschiedener Größen, Skalpellen oder Kombinationen aus verschiedenen Methoden haben für unsere Anforderungen zuwenig Zellen erbracht. In mehreren Vorversuchen konnten wir Zellzahlen von maximal 70 Zellen aus 4 Kokulturen erreichen. Für die Durchflusszytometrie sollten aber einige tausend Zellen zur Verfügung stehen. Durch die Verwendung der MediMashine® konnte nach der Anpassung verschiedener Protokolle {37, 39, 64, 65} eine wesentlich höhere Zellausbeute bei verminderter Schädigung erreicht werden.

Die Kulturen werden hierbei durch ein spezielles Medicon, das aus einer Reibe mit 50 µm Löchern, scharfkantigen Zacken und einem Metallschaber besteht, der die Zellen durch die Poren drückt. (**Abb. 4**). Durch die vorherige Inkubation mit EDTA werden die Zell-Zell-Kontakte gelöst, so dass durch die mechanische Bearbeitung die Zellen aus dem Epithelverband gelöst werden.



Abbildung 4 Darstellung eines Medicon der Firma BD, man erkennt den rotierenden Schaber und die Lochplatte mit 50 μm Öffnungen

6.2.3 Herstellung der Einzelzellsuspension

Hierzu werden je nach Größe 4-5 Kokulturen pro Ansatz in den Medicons für 15 min. mit 1 ml EDTA (Gibco Lifetechnologies LTD, Paisley, Schottland) inkubiert, um die Zell-Zell-Kontakte zu lösen. Dann werden die Kokulturen für 15 sek in der MediMashine bearbeitet. Dadurch werden die Epithelzellen und die Tumorzellen vom Bindegewebe getrennt, das als Pellet im Medicon verbleibt. Längere Einwirkzeiten bewirken mehr Zellschädigung, kürzere ergeben eine schlechtere Ausbeute.

Die Zellsuspension wird mit einer Spritze abgezogen und durch die 50µm Filcons filtriert. Es folgt ein Waschgang. Dabei werden die Zellen bei 1200 Umdrehungen/min. zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Pellet mit 1 ml BEGM re-suspendiert. Dann erfolgte je nach Versuchsansatz direkt die Messung, oder die Färbung der DNA mit DRAQ5.

6.3 Messung der Zellen im Durchflusszytometer

6.3.1 Durchflusszytometer

Das Durchflusszytometer ist ein Gerät, das spezielle Zellmerkmale wie Größe, Granularität und verschiedene Fluoreszenzen detektieren kann. Es besteht aus einem Leitungssystem, das aus der Zellsuspension Zellen aufnimmt, um sie dann einzeln an einem Laserstrahl vorbei zuleiten. Dabei werden die Zellen hydrodynamisch fokussiert, indem dem schnell fließenden Transportstrom in einer Düse der langsam fließende Probenstrom zugemischt wird. Das stellt sicher, dass die Zellen einzeln am Laser vorbei geleitet werden. Danach werden die Zellen verworfen. Das optische System besteht bei dem benutzten FACSCalibur aus einem luftgekühlten Argon Laser mit 15 mW Leistung, der Licht bei 488 nm emittiert, und einem zusätzlichen, bei 635 nm emittierenden Dioden Laser, was die Bandbreite der anregbaren Fluoreszenzen erweitert. Das Laserlicht wird durch die vorbeifließende Zelle gestreut und gelangt dann zu einem Detektorsystem aus Bildverstärkerröhren. Das eingehende Signal wird über einzelne Verstärker geregelt und zu einem Analog-Digital-Wandler geleitet. Die digitalisierten Daten werden dann in einem entsprechenden Personal Computer weiterverarbeitet. Dabei wird die Vorwärtsstreuung als Maß für die Größe, die Seitwärtsstreuung als Maß für die Granularität der Zelle erfasst. Weiter können die durch den Laser angeregten

Material und Methoden

Farbstoffe mit ihren Fluoreszenzen erfasst werden. Dabei wird jeweils mit dem Argon-Laser bei 488 nm oder mit dem Dioden Laser bei 635 nm exzitert.

Die Emission wird dann am FACSCalibur über bis zu 4 Kanäle erfasst:

Kanal 1 (FI 1): Emissionsmaximum 530 nm, z. B. FITC, GFP, Alexa, Fluo 3

Kanal 2 (FI 2): Emissionsmaximum 585 nm, z. B. PE, YFP

Kanal 3 (FI 3): Emissionsmaximum 670 nm, z. B. Cy5-PE Cy5.5-PE TexasRed-PE

Cy5.5-PerCP, PI, 7-AAD dsRed APC

Kanal 4 (FI 4): Emissionsmaximum 661 nm, z. B. Cy7-PE Cy5.5-PerCP, Toto 3,

To-Pro

Experimentelle FACS-Geräte können bis zu 12 Kanäle detektieren.

Die aufgezählten Farbstoffe können heute mit einer Vielzahl von Antikörpern gegen ein spezielles Zellmerkmal oder Stoffwechselprodukte kombiniert werden. Auch das Koppeln verschiedener Farbstoffe, z. B. PerCP und CY 5 ist möglich. Damit lässt sich das Exzitationsmaximum des PerCP und das Emissionsspektrum des CY5 nutzen. In unserem Fall wurde das von den Tumorzellen produzierte GFP detektiert, das bei 450 nm emittiert, und für die DNA-Messung DRAQ5, das bei 670 nm emittiert.

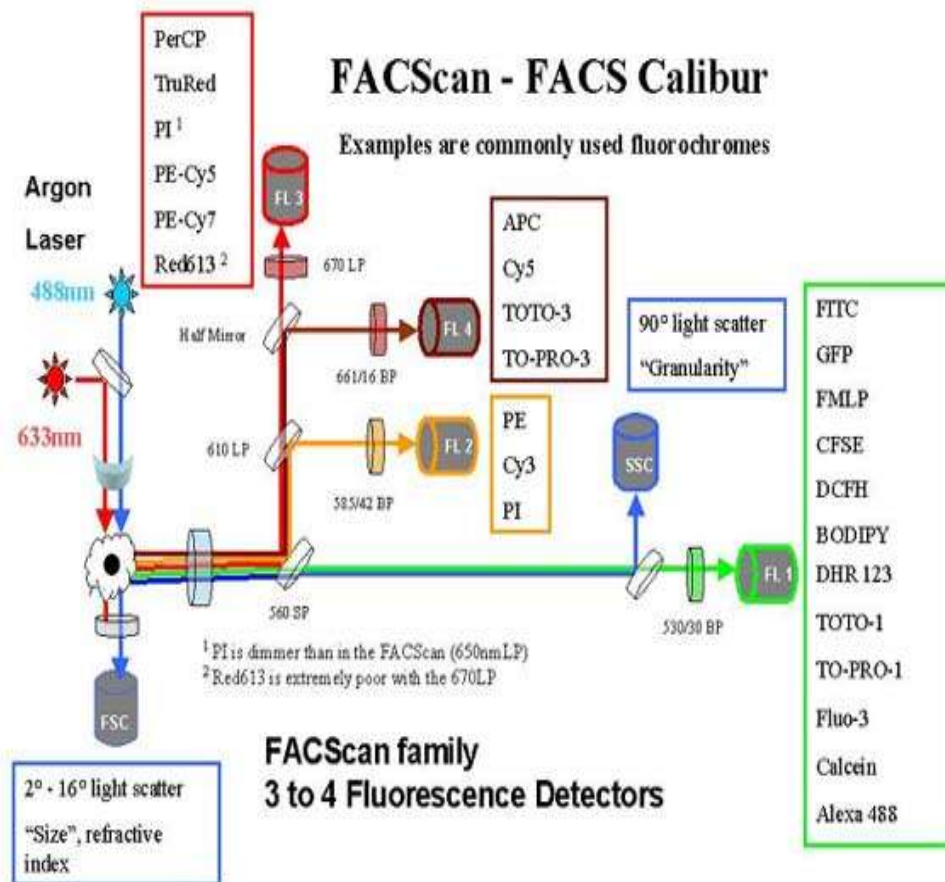


Abbildung 5 Darstellung des optischen Systems des FACS der Firma BD, es sind die Kanäle und die einzelnen Farbstoffe aufgeführt. © BD, San Jose CA., USA

6.3.2 Messung

Die Messung und Analyse der Daten erfolgte in enger Zusammenarbeit mit der klinischen Pharmakologie, deren Leiter Herr Prof. Dr. med. S. Endres und Mitarbeiter hier für die freundliche Unterstützung gedankt werden soll.

Es wurden die Größe, die Granularität, die FITC- und die DRAQ5-Fluoreszenz erfasst und mit der CellQuest Software verarbeitet. Dabei wurde in einer Einstellungsmessung über die Bestimmung der Größe und Granularität der zu erfassende Bereich ausgewählt. Es wurde über eine Lebend-Tot-Färbung mit Propidiumiodid der Bereich der lebenden Zellen ausgewählt. Propidiumiodid färbt die DNA der toten Zellen an und lässt sie so von den lebenden Zellen unterscheiden. Dann wurde in weiteren Messungen bei einer Positivkontrolle, die nur aus Monolayer-Tumorzellen bestand, und bei einer Negativkontrolle, die nur Epithelzellen enthielt, der Bereich der eindeutigen GFP-Fluoreszenz festgelegt. So war es möglich, den lebenden, also GFP produzierenden Tumor, von Normalepithel und nicht-GFP-produzierenden Tumor zu differenzieren.

Für die DNA-Bestimmung wurde die Linearität des Zytometers überprüft. Dazu wurde ein handelsübliches Qualitätskontroll-Kit benutzt (DNA-QC, Becton & Dickinson, San Jose, CA, USA). Dabei werden zuerst Hühner-Erythrozyten gemessen, deren DNA-Gehalt bekannt ist. Damit wird die Geräteeinstellung wie Verstärkung und Spannung der Photomultiplier vorgenommen. Um die Linearität nachzuweisen, wird der Mittelwert der Doubletten durch den Mittelwert der Singletten dividiert. Dieser Wert soll $2 \pm 0,5$ betragen. Gleichzeitig wird der Variationskoeffizient, Coefficient of Variety (CV), überprüft, der $< 3 \%$ betragen soll. Diese Qualitätskontrolle wird in regelmäßigen Abständen durchgeführt.

Zusätzlich wurde die Doubletten-Diskrimination eingerichtet. Diese dient dazu, Verfälschungen durch Doubletten, also aneinander haftende Zellen zu erkennen. Dazu wird die Pulsweite der DRAQ5 Fluoreszenz gegen ihre Pulshöhe aufgetragen. Doubletten produzieren bei gleichem DNA-Gehalt mehr Streulicht und lassen sich so ausklammern. Die Doubletten Diskriminierung wurde bei jeder Messung vorgenommen. Mit einer Negativkontrolle ohne DRAQ5 wurden Interferenzen ausgeschlossen.

6.3.3 Einstellung der Messung am Durchflusszytometer

6.3.3.1 Negativkontrolle

Die Negativkontrolle dient dazu, die Autofluoreszenz, die durch Streuung von Laserlicht an Zellorganellen entsteht, zu erkennen und diese von der richtigen Fluoreszenz zu trennen. Dafür wird in einem ersten Fenster in einem Punktwolkendiagramm (**Abb. 6**) die Größe und Granularität detektiert und nach der Lebend-/ Totfärbung mit Propidiumiodid der Bereich der lebenden Zellen markiert (**R1** in **Abb. 6**). Diese Zellen werden dann in ein Histogramm (**Abb. 7**) gelegt, das die Fluoreszenz des gewünschten Bereichs darstellt, in diesem Fall die grüne Fluoreszenz bei 530 nm. Der Darstellungsbereich wird, da sehr unterschiedliche Werte zu erwarten sind, logarithmisch dargestellt {3, 71}. Dabei wurde festgelegt, dass Werte kleiner 10^1 als Autofluoreszenz, Werte größer 10^3 als eindeutige Fluoreszenz gelten. **Abb. 8** zeigt eine ähnliche Darstellung, wobei hier in einem Punktwolkendiagramm die Fluoreszenz zur Größe in das Verhältnis gesetzt wird. Dann werden die Verstärker- und Bildverstärkerspannung so einreguliert, dass die Negativkontrolle keine Fluoreszenz enthält, also auf Werte kleiner 10^1 .

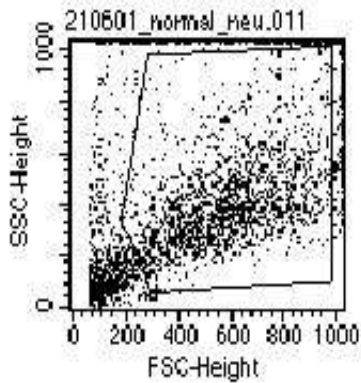


Abbildung 6 Punktwolkendiagramm der Vorwärts- im Verhältnis zur Seitwärtsstreuung der Negativkontrolle. Die Vorwärtsstreuung, Frontscatter, ist auf der X-Achse, die Seitwärtsstreuung, Sidescatter, auf der Y -Achse aufgetragen. Dementsprechend sind Zellen im rechten Teil der x -Skala größer, solche im oberen Teil der Y -Skala granulierter.

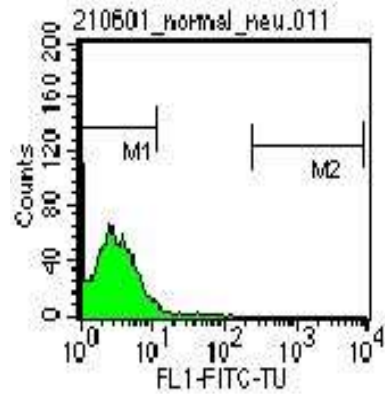


Abbildung 7 Histogramm der GFP-Fluoreszenz der Negativkontrolle. Es ist die relative Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl aufgetragen.

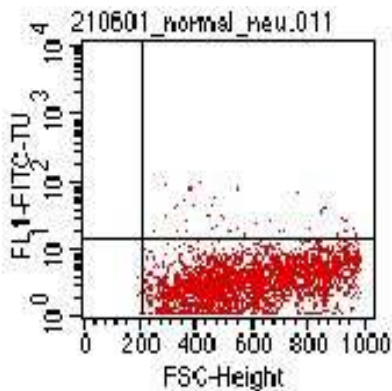


Abbildung 8 Punktwolkendiagramm zur Darstellung der GFP-Fluoreszenz der Negativkontrolle im Verhältnis zur Größe.

6.3.3.2 Positivkontrolle

Die Positivkontrolle dient dazu, das Maß der zu erwartenden Fluoreszenzintensität einschätzen zu können. Dazu werden in einem zweiten Schritt nur Tumorzellen gemessen. Diese müssen Werte größer 10^3 erreichen.

So konnten die Marker für die jeweils fluoreszenz-negativen bzw. -positiven Zellen, M1 und M2, eingerichtet werden. M1, fluoreszenz-negativ waren alle Zellen bis zu einer relativen Fluoreszenzintensität von 10^2 . M2 und eindeutig fluoreszenz-positiv waren alle Zellen größer 10^2 .

Die Fluoreszenz-positiven Zellen produzieren das GFP und sind somit stoffwechselaktive Tumorzellen, Fluoreszenz-negative Zellen produzieren kein GFP und können somit Normalepithelzellen, nicht-GFP-produzierende Tumorzellen, tote Tumorzellen, Granulozyten oder Makrophagen darstellen. Diese grundsätzliche Erklärung gilt gleichermaßen für alle folgenden FACS-Diagramme.

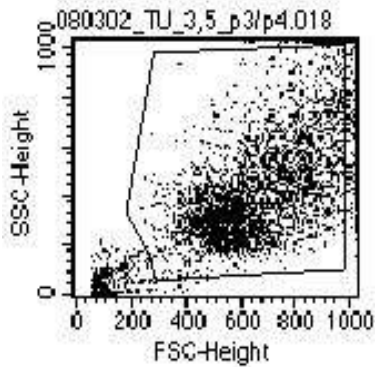


Abbildung 9 Punktwolkendiagramm zur Bestimmung von Größe und Granularität der Positivkontrolle.

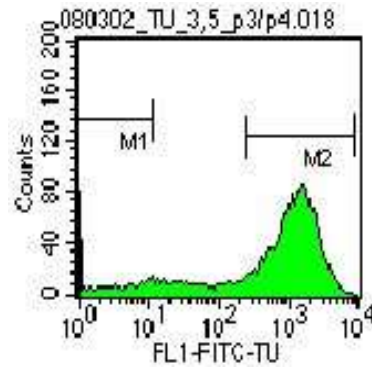


Abbildung 10 Histogramm der GFP-Fluoreszenz der Positivkontrolle. Der Anteil der GFP-positiven Zellen entspricht 93,3 %.

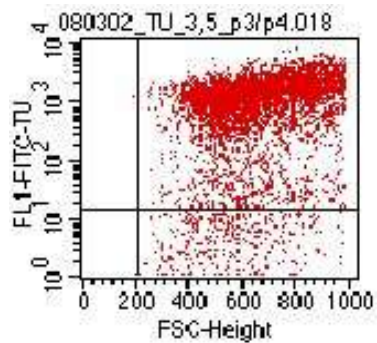


Abbildung 11 Punktwolkendiagramm zur Darstellung der GFP-Fluoreszenz der Positivkontrolle im Verhältnis zur Größe.

6.3.3.3 Kokultur

Bei Messung der Kokultur konnten so beide Populationen getrennt werden und jeweils die relativen Zellzahlen für M1 und M2 bestimmt werden.

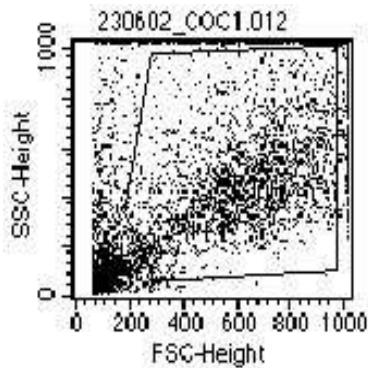


Abbildung 12 Punktwolkendiagramm einer Kokultur, es ist die Größe auf der X-Achse, die Granularität auf der Y-Achse abgebildet.

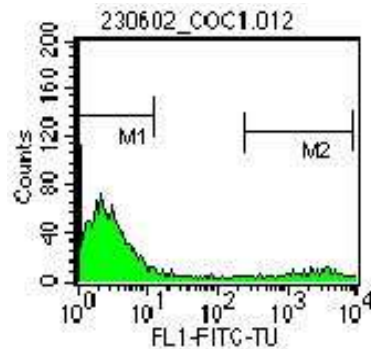


Abbildung 13 Histogramm der GFP-Fluoreszenz der Kokultur. Man erkennt beide Zellpopulationen. Die Normalzellen sind dabei kleiner 10^2 , die Tumorzellen größer 10^2 .

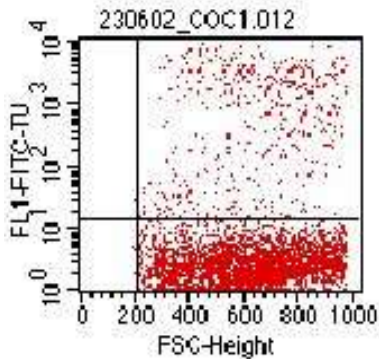


Abbildung 14 Punktwolkendiagramm zur Darstellung der GFP-Fluoreszenz der Kokultur im Verhältnis zur Größe. Man erkennt wieder beide Populationen.

6.3.3.4 Einrichtung der DNA-Analyse

Die DNA-Analyse erfolgte ebenfalls mit der CellQuest Software. Hier wurden die Populationen anhand eines Punktwolkendiagramms erfasst (**Abb. 15**) und analog zu den vorherigen Messungen in einem Lebend-Gate zusammengefasst. Dann wurde die GFP-Fluoreszenz mit der Größe im Histogramm korreliert (**Abb. 16**) und damit Tumor- von Nicht-Tumor Zellen diskriminiert. Über einzelne Messbereiche (R2 und R3 in Abb. 16) wurden die relativen Zahlen der beiden Gruppen bestimmt. Für die DNA-Bestimmung wurde für die GFP negativen- und GFP-positiven Zellen je ein Fenster für die Doubletten-Diskrimination (**Abb. 17, Abb. 19**) und ein DNA-Histogramm (**Abb. 18, Abb. 20**) eingerichtet. Diese dient dazu, Verfälschungen durch Doubletten, also aneinander haftende Zellen zu erkennen. Dazu wird die Pulsweite der DRAQ5 Fluoreszenz gegen ihre Pulshöhe aufgetragen. Doubletten produzieren bei gleichem DNA-Gehalt mehr Streulicht als Singletten. Im DNA-Histogramm wurde an Hand einer Einstellungsmessung mit Beas-2B die normale Zellzyklus-Verteilung eingestellt. Dabei wurde je ein Statistik-Bereich für die subG0-, G0/1-, S- und G2M-Phase definiert (**Abb. 18, Abb. 20**).

Für die Bestimmung der absoluten Zellzahl wurde ein weiteres Punktwolkendiagramm eingerichtet. (**Abb. 21**) Dazu wurde einer Messung eine definierte Anzahl fluoreszenzmarkierter Latexpartikel beigemischt, sogenannte Microbeads (Truecounts, Becton & Dickinson San Jose CA., USA). Diese erscheinen bei einer Größe von 2 μm im Totbereich, und stören so die Messung der lebenden Zellen nicht. In einem Punktwolkendiagramm werden dann alle toten Zellen dargestellt. Da die Latexpartikel mit 3 Farbstoffen markiert sind, kann man nun alle toten Partikel, die in 2 Fluoreszenzen deutlich leuchten, zählen und erhält so die Anzahl der Microbeads.

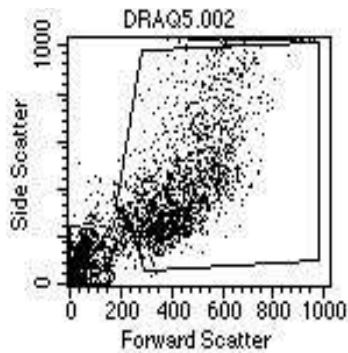


Abbildung 15 Punktwolkendiagramm einer Kokultur, auf der X-Achse ist die Größe, auf der Y-Achse die Granularität aufgetragen. Dieses Diagramm dient der Identifikation der lebenden Zellen.

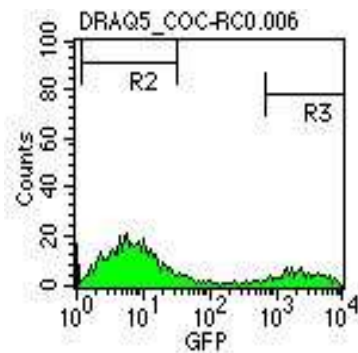


Abbildung 16 Histogramm der GFP-Fluoreszenz; auf der X-Achse ist die relative Intensität, auf der Y-Achse die Anzahl der Zellen aufgetragen.

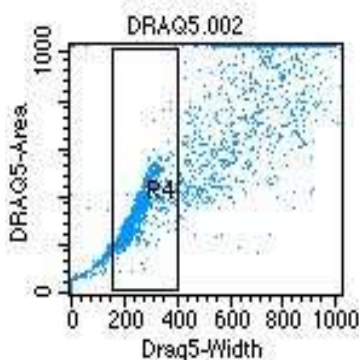


Abbildung 17 Punktwolkendiagramm zur Doubletten-Diskriminierung der Normalzellen, auf der X-Achse ist die Pulsweite, auf der Y-Achse die Pulshöhe der roten Fluoreszenz aufgetragen, alle Zellen innerhalb des Rahmens sind Einzelzellen.

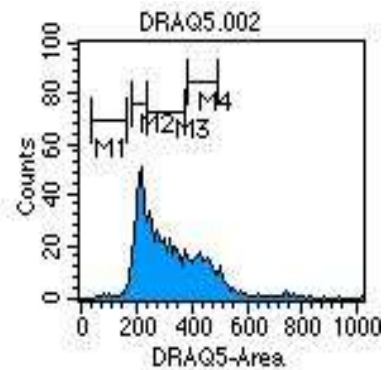


Abbildung 18 Punktwolkendiagramm der roten Fluoreszenz der Normalzellen, auf der X-Achse ist die Intensität, auf der Y-Achse die Anzahl der Zellen aufgetragen. Man erkennt den G0/1 Peak (M2) die S Phase (M3), den G2/M Peak (M4).

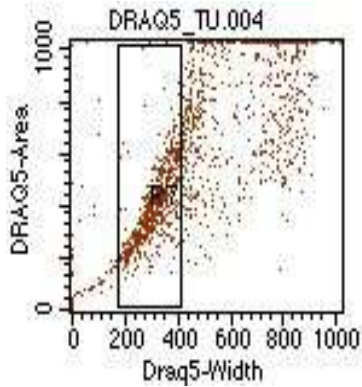


Abbildung 19 Punktwolkendiagramm zur Doubletten-Diskriminierung der Tumorzellen, auf der X-Achse ist die Pulsweite, auf der Y-Achse die Pulshöhe der roten Fluoreszenz aufgetragen, alle Zellen innerhalb des Rahmens sind Einzelzellen.

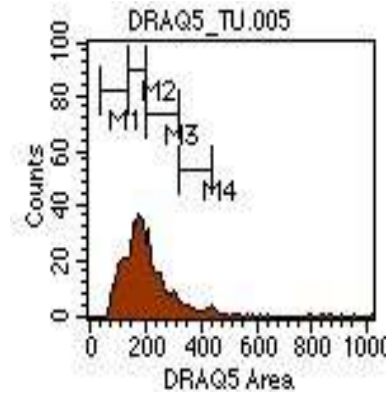


Abbildung 20 Punktwolkendiagramm der roten Fluoreszenz der Tumorzellen, auf der X-Achse ist die Intensität, auf der Y-Achse die Anzahl der Zellen aufgetragen. Man erkennt den G0/1 Peak (M2) die S Phase (M3), den G2/M Peak (M4) und den subG0 Peak (M1).

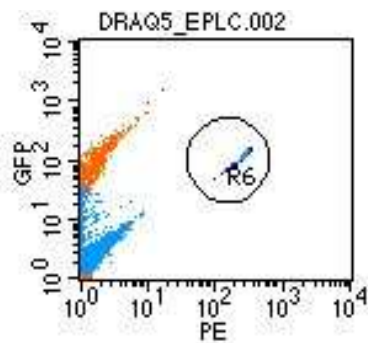


Abbildung 21 Punktwolkendiagramm der orangen und grünen Fluoreszenz. Man erkennt die Microbeads zur absoluten Zellzahlbestimmung in R6.

6.3.4 Statistische Auswertung der gewonnenen Daten

Die statistische Analyse der DNA erfolgte mit SigmaStat (SPSS Inc., Software, Chicago, IL, USA). Zuerst wurden mit einer deskriptiven Statistik der statistische Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt. Diese Daten wurden dann mit dem One-way-Anova-Test, bzw. für nicht normal verteilte Daten mit dem Student-Keuler-Test überprüft.

Die graphische Darstellung der statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von SigmaPlot für Windows (SPSS Inc., Software, Chicago, IL, USA).

6.4 Erstellen einer Wachstumskurve des Tumoranteils

In einem ersten Schritt sollte eine Wachstumskurve des Tumoranteils der Kokultur erstellt werden. Hierzu wurden in Übereinstimmung mit vorhergehenden Messungen die Tage 2, 4, 8, 16 und 24 ausgewählt {4}. Dazu wurden Kokulturen hergestellt und jeweils zum Tag 2, 4, 8, 16 und 24 nach Herstellung der Kokulturen gemessen. Es wurden je 4 Kokulturen in 5 Messansätze pro Zeitraum zusammengefasst.

6.5 Bestrahlung

Die Bestrahlung wurde am Tag 4 vorgenommen, da zwischen Tag 4 und 8 eine deutliche Zunahme des relativen Tumoranteils an der Gesamtzellzahl gemessen werden konnte. Es wurde mit einem Linearbeschleuniger Sli 15 (Elektra, Hamburg, Germany) mit einer Gesamtleistung von 10 Gy bei einer Dosisleistung von 4 Gy/min. bestrahlt. Der Strahlenklinik und Herrn Dipl. phys. Winklhofer sei an dieser Stelle gedankt. Es wurden Messungen für Tag 0, 1, 2 und 4 nach Bestrahlung geplant, mit je 5 Ansätzen zu 4 Kulturen. Außerdem wurde eine scheinbehandelte Serie angelegt und zum einen an Tag 0 nach Bestrahlung ausgewertet, um eventuelle

Traumatisierung der Kulturen durch den Transport auszuschließen, zum anderen an Tag 4 nach Bestrahlung, da hier der direkte Vergleich zum Tag 8 der Wachstumskurve gegeben war.

6.6 Messung des DNA-Gehalts

6.6.1 Vorbereitung zur Messung des DNA-Gehalts

Die Bestimmung des DNA-Gehalts erforderte intensive methodische Vorarbeiten. Allein die Suche nach dem geeigneten Farbstoff und die Etablierung eines entsprechenden Protokolls nahm viel Zeit in Anspruch. Es wurde überprüft, welcher der Farbstoffe in der Lage ist, die DNA entsprechend anzufärben, praxistauglich ist, und ob das Zytometer die erforderliche Linearität leisten konnte. Zuerst wurde der DNA Gehalt von Beas-2B-Zellen bestimmt, die im weiteren auch als diploide Kontrolle genutzt wurden. Dann wurde der DNA Gehalt der Organkulturen und der Tumorzellen jeweils für sich bestimmt. In einem weiteren Schritt wurde dann ein Protokoll zur getrennten Messung des DNA-Gehalts erarbeitet. Für die Bestimmung des DNA-Gehalts wurden Kokulturen analog zu den vorbeschriebenen hergestellt. Diese wurden, wie beschrieben, in Einzelzellen separiert. Nach Abzentrifugieren des PBS wurde 1 ml Medium zugegeben. Nach vorsichtigem Vortexen wurde 1 µl DRAQ 5 (Biostatus Ltd., Leicestershire, UK) zugegeben. Die Zielkonzentration war 20 µM/ml. Die Zellen wurden dann sofort im Zytometer analysiert.

6.6.2 Planung der Messung des DNA-Gehalts

Zur Überprüfung der Eignung von DRAQ5 als DNA-Farbstoff wurde zuerst die Beas-2B-Zelllinie gemessen. Zum einen dient ihr normaler DNA-Gehalt als Kontrolle für euploide Zellen, zum anderen als Qualitätskontrolle, um die Kriterien der DNA-

Bestimmung zu erfüllen. Diese wurden von einer europäischen Expertenkommission aufgesetzt, ursprünglich um klinisch relevante Zytometriedaten zwischen einzelnen Laboren vergleichbar zu machen {77}. Sie wurden für Einzelzellsuspensionen bzw. Tumorproben erlassen und, soweit für unsere gemischten Populationen möglich, umgesetzt. Geregelt ist unter anderem die Nomenklatur für DNA-Messung, die Vorbereitung der Zellen zur Messung und die Analyse der gewonnenen Daten. Gefordert wird z. B. ein Coefficient of Variety (CV) von <10 , und die parallele Messung eines euploiden Standards, wie Hühnererythrozyten. In unserem Fall wurden BEAS-2B als Standard mitgemessen, bei den Kokulturen kann diese Aufgabe praktischerweise von den Normalepithelzellen übernommen werden. Für alle verwandten Zelltypen wurden jeweils zuerst Negativkontrollen durchgeführt. Dazu wurde eine Probe ohne DRAQ5 gemessen. Dabei wurde kein Streulicht in Kanal 4 gefunden, in dem DRAQ5 gemessen wird. Dann wurde DRAQ5 zugegeben. Eine Kompensation der Fluoreszenzkanäle war nicht nötig, da das Emissionsspektrum von DRAQ5 außerhalb des Spektrums von GFP liegt. Als nächstes wurde die Doublettendiskrimination eingerichtet. Das Flüssigkeitssystem des Zytometers kann nicht gänzlich verhindern, dass mehrere Zellen gleichzeitig am Laser vorbei geleitet werden. Wenn nun 2 Zellen mit einfachem DNA-Gehalt vorbei fließen, imponieren sie als 1 Zelle mit doppeltem DNA-Gehalt. Aus diesem Grund wird die Pulsweite der Fluoreszenz zur Intensität in einem Punktwolkendiagramm in das Verhältnis gesetzt {3}. Die so identifizierten Singletten werden dann in einem Histogramm dargestellt und zeigen die typische DNA- Verteilungskurve.

6.6.3 Auswertung der Messung des DNA-Gehalts

Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe der Cell Quest Software (Becton & Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA) analysiert. Dazu wurde durch die Analyse der BEAS-2B als euploide Kontrolle der G1 Peak, die S-Phase und der G2/M Peak identifiziert. Danach wurden die erhobenen Daten in dieses Auswertungsfenster geladen. Die prozentualen Anteile der jeweiligen Phasen wurden statistisch ausgewertet.

6.6.4 Statistische Auswertung der erhobenen DNA-Analyse-Daten

Die statistische Auswertung erfolgte wieder mit der SigmaStat Software, die graphische Darstellung mit der SigmaPlot Software. Es wurden zum einen die einzelnen Zellzyklusphasen getrennt für Normalzellen jeweils in Organ- und Kokultur und für Tumorzellen in Monolayer- und Kokultur analysiert. Zum anderen wurde die Verteilung der einzelnen Populationen in den Zellzyklusphasen im Verlauf der Zeit betrachtet.

7 Ergebnisse

7.1 Optimierung der Epithelpräparation

Während der Vorbereitungsphase und dem Erlernen der für die Arbeit wichtigen Techniken wie Gewinnung, Aufbereitung und Kultivierung der Bronchialepithelkulturen wurden Änderungen der bestehenden Protokolle vorgenommen. Durch Verbesserung der Präparationsmethoden mit Hilfe einer Lupe konnte die Ausbeute an Kulturen der Kategorie 1 bis 3 stark erhöht werden. Die Kategorie 4 kam selten, die Kategorie 5 bis 6 praktisch nie vor.

7.2 Ermöglichung und Optimierung der Einzelzellgewinnung

Zur Ermöglichung der Einzelzellgewinnung wurden verschiedene Protokolle erprobt und an unsere Bedürfnisse angepasst. Als ideal erwies sich die Kombination aus chemischer Vorlösung der Zell-Zell-Kontakte mit 0,025 % EDTA-Lösung für 15 min. bei 37 °C, 5 % CO₂ im Inkubator. Darauf folgte die mechanischer Dissoziation für 30 sek. in der Medimashine. So konnte die Zellausbeute von anfangs 70 Zellen pro 4 Kulturen, auf nun mehrere 100.000 pro 4 Kulturen gesteigert werden.

7.3 Trennung von Normal- und Tumorzellen durch Verwendung der GFP-transfizierten Tumorzelllinie

Die Diskriminierung der 2 Populationen im Kokultursystem war anfangs nicht möglich. Zur Identifikation von Bronchialepithel kann man Cytokeratine, andere Elemente des Zytoskeletts, Junctional Proteine, Zelladhäsionsmoleküle, Lektine oder vor allem sekretorische Enzyme nutzen. Tumorzelle und Normalepithelzelle ließen sich, wegen ihrer engen Verwandtschaft, durch normal verwendete Marker

wie Cytokeratin C18 nicht zuverlässig differenzieren, da sie morphologisch zu eng verwandt sind.

Deshalb machten wir uns die als Aktivitätsmarker gedachte Green-Fluorescence-Transfizierung der EPLC-Zelllinie zunutze. So konnten zuverlässig aktive Tumorzellen von nicht-stoffwechselaktiven bzw. toten Tumorzellen, Normalepithelzellen oder Zellen der Immunabwehr getrennt werden. Dazu war es wichtig, Normal- und Tumorzellen im FACS zu trennen. Zuerst wurde als Negativkontrolle eine mit der Medimashine verarbeitete Normalkultur von humanem Bronchialepithel (OC) gemessen.

7.4 Ergebnis der Wachstumskurve

Für die Wachstumskurve wurden Kokulturen hergestellt und dann in jeweils 5 Messungen a 5 Kokulturen am Tag 2, bzw. Tag 4, 8, 16 und 24 nach Herstellung analysiert. Es konnte eine signifikante Zunahme des prozentualen Tumoranteils von Tag 2 ($5,4 \pm 1,84 \%$) bis Tag 8 ($32,94 \pm 10,73 \%$) gezeigt werden ($Mw \pm Stabw.$; $p < 0,01$ $N = 25$). Zum Tag 16 nahm die Anzahl der Tumorzellen wiederum ab, zwischen Tag 16 und 24 war kein signifikanter Unterschied zu messen. Auf Grund dieser Untersuchungen wurde für die Radiatio der Tag 4 gewählt, da hier Wachstum zu erwarten war.

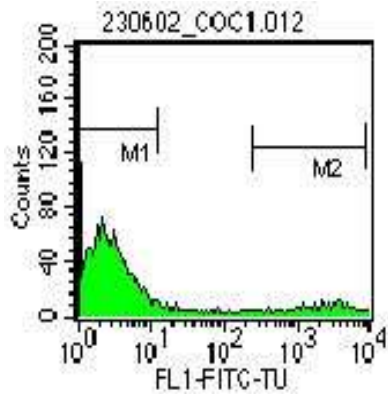


Abbildung 22 Histogramm der GFP-Fluoreszenz einer Kokultur am Tag 4.

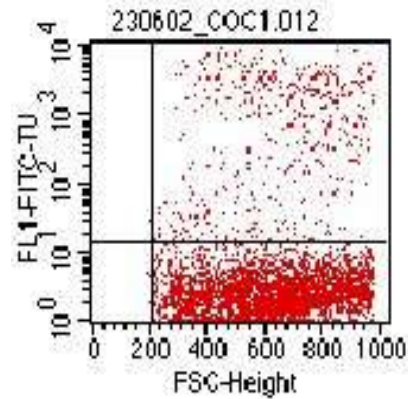


Abbildung 23 Punktwolkendiagramm der GFP-Fluoreszenz einer Kokultur am Tag 4.

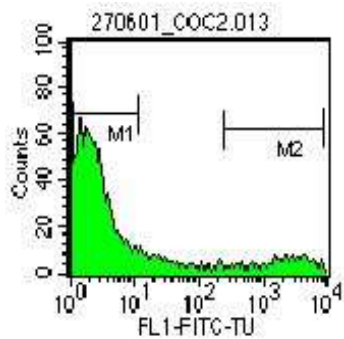


Abbildung 24 Histogramm der GFP-Fluoreszenz einer Kokultur am Tag 8.

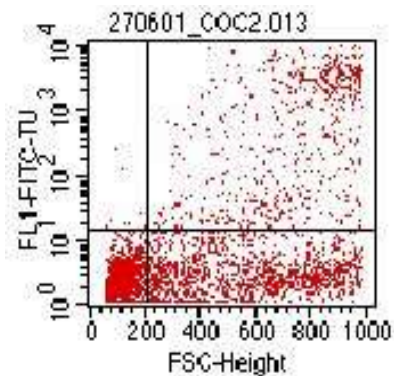


Abbildung 25 Punktwolkendiagramm der GFP-Fluoreszenz einer Kokultur am Tag 8.

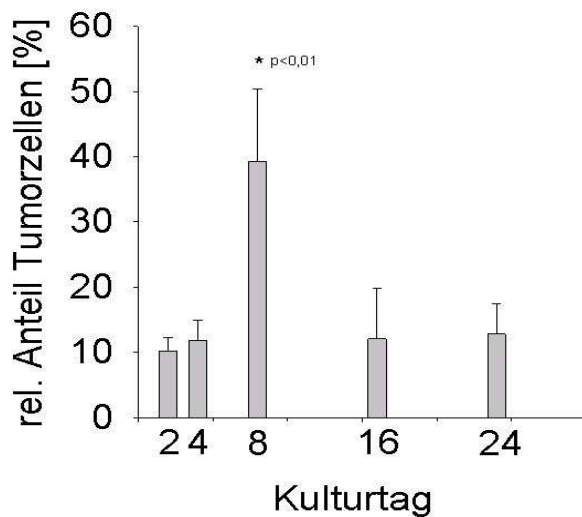


Abbildung 26 Statistik des relativen Anteils der Tumorzellen an der Gesamtzellzahl im Verlauf in %.

7.4.1 Ergebnisse der Bestrahlung der Kokulturen

Für die Bestrahlung wurden Kokulturen hergestellt und am Tag 4 nach Herstellung bestrahlt. Es wurden Messungen an Tag 0, 1, 2 und 4 nach Bestrahlung vorgenommen. Es wurden jeweils 5 Kulturen pro Messzeitpunkt analysiert. Die Kulturen wurden dafür auf eine neue 24-Well-Multiplatte (Falcon Lincoln Park, NJ, USA) umgesetzt und mit jeweils 300 µl neuem Medium versorgt. Dann wurden sie von Hand in das Gebäude der Strahlentherapie transportiert. Dort wurden sie mit 10 Gy bestrahlt. Zusätzlich wurde dieselbe Anzahl Kulturen scheinbehandelt. Diese wurden exakt gleich behandelt, nur waren diese während der Bestrahlung im Kontrollraum keiner ionisierenden Strahlung ausgesetzt. Nach der Bestrahlung wurden die Kulturen wieder zum Labor transportiert, und dort nach dem Zufallsprinzip in die einzelnen Messzeitpunkte aufgeteilt. Der Zeitpunkt Tag 0 wurde dann sofort weiter für die FACS Messung aufbereitet. Zwischen der Bestrahlung und der FACS Messung lagen mindestens 60, maximal 120 min. Die Gesamtzellzahl betrug ca. $60-80 \cdot 10^3$ pro Kokultur.

Sofort nach der Bestrahlung nahm der Anteil der GFP-produzierenden Tumorzellen auf $1,990 \pm 3,54$ % ab (Mittelwert \pm Stabw; n = 25). Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Die Kulturen erholten sich nicht wieder. Der prozentuale Anteil der Tumorzellen am Tag 8 betrug $2,240 \pm 0,849$ % (Mittelwert \pm Stabw.; n = 25). Wir vermuten eine direkte Zellschädigung der Tumorzellen durch die ionisierende Strahlung, da sich ein Bleichen des Green Fluorescence Protein (GFP) durch Licht, das beim Umsetzen der Kulturen hätte stattfinden können, bis zum Tag 4 nach Bestrahlung wieder hätte zurückbilden müssen.

Im Gegensatz dazu waren die Ergebnisse der Kontrollgruppe, die scheinbehandelt wurde, mit denen der Wachstumskurve identisch.

Ergebnisse

Dabei war die Anzahl der Tumorzellen der bestrahlten Kulturen im Vergleich zur Kontrollgruppe am Tag 0 der Bestrahlung statistisch signifikant niedriger ($P = 0,008$), ebenso beim Vergleich der bestrahlten Kulturen am Tag 4 nach Radiatio ($P = 0,008$). Der direkte Vergleich der Kontrollgruppe am Tag 0, der Tag 4 der Wachstumskurve entspricht, zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied ($P = 1,000$), genauso wie der Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und der Anzahl der Tumorzellen in der Wachstumskurve am Tag 8 ($P = 0,841$).

Dies untermauert unsere Annahme, dass die Abnahme des prozentualen Tumoranteils auf eine direkte Schädigung der Tumorzellen durch die ionisierende Strahlung zurückzuführen ist, da durch die Kontrollgruppe eventuelle Transportschäden wie Ablösen des Tumoranteils während des Umbettens vor und nach der Bestrahlung hätten erkannt werden müssen.

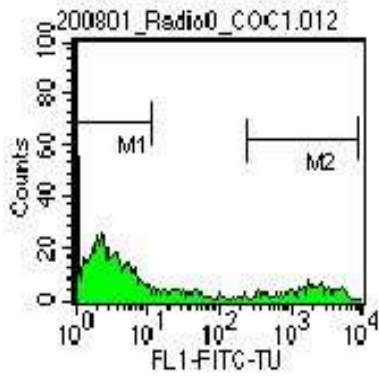


Abbildung 27 Histogramm der GFP-Fluoreszenz einer bestrahlten Kokultur am Tag 0.

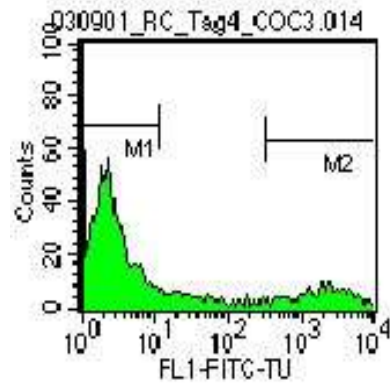


Abbildung 28 Histogramm der GFP-Fluoreszenz einer scheinbehandelten Kokultur am Tag 0.

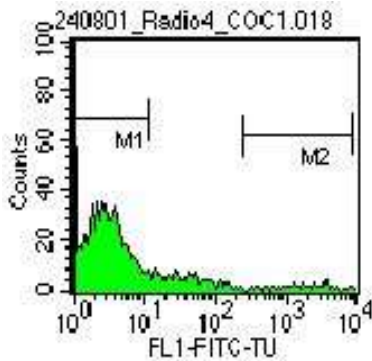


Abbildung 29 Histogramm der GFP-Fluoreszenz einer bestrahlten Kokultur am Tag 4 nach Bestrahlung.

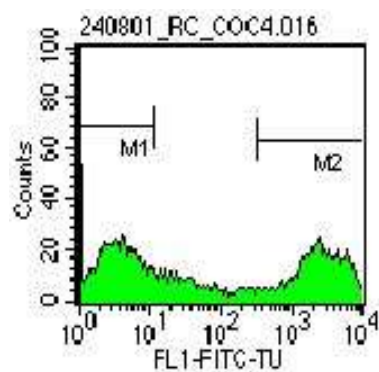


Abbildung 30 Histogramm der GFP-Fluoreszenz einer scheinbehandelten Kokultur am Tag 4 nach Bestrahlung.

7.5 Bestimmung des DNA Gehalts

Um die Auswirkung ionisierender Strahlung auf dreidimensionale Kulturen zu untersuchen wurden Kokulturen aus Bronchialepithel und der GFP-transfizierten Bronchialepithel-Tumorzelllinie bestrahlt, der relative Anteil der Tumorzellen und die Verteilung der Zellzyklusphasen analysiert.

Die Zelllinien EPLC 32m1, Abkömmling eines humanen Plattenepithel-Karzinoms und Beas-2B, immortalisierte Bronchialepithel-Zellen, wurden als Monolayer kultiviert, mit 10 Gy bestrahlt, die absolute Zellzahl und der DNA-Gehalt bestimmt.

7.5.1 Zellzahl

In der EPLC 32m1 Monolayer Kultur wurde die absolute Zellzahl bestimmt. Am Tag 0 der Bestrahlung betrug sie 152474 und stieg bis zum Tag 4 nach Bestrahlung auf 474098 Zellen. In der Kontrollgruppe betrug die absolute Zellzahl 218530. Diese stieg bis zum Tag 4 auf 2934272.

Die absolute Zellzahl der Beas-2B wurde ebenfalls bestimmt. Am Tag 0 nach Bestrahlung betrug sie 565135 und stieg bis zum Tag 4 nach Bestrahlung auf 11874827. In der Kontrollgruppe betrug die absolute Zellzahl 773634. Diese stieg bis zum Tag 4 auf 15108459.

Die absolute Zellzahl der Kokulturen betrug 60-80.000 pro Kokultur.

7.5.2 DNA-Gehalt der nicht-malignen Zellen

Um den Effekt der ionisierenden Strahlung auf normales Bronchialepithel zu charakterisieren wurden Organkulturen von humanem Bronchialepithel, Beas-2B als Monolayer Kultur, und der Anteil der normalen Zellen an Kokulturen aus humanem Bronchialepithel und der Bronchialepithel-Tumorzelllinie EPLC 32m1 mit 10 Gy bestrahlt und nach oben beschriebener Methode analysiert. Es können damit Aussagen zu Monolayer-Kulturen und Kokulturen, die Zell-Zell-Interaktionen zwischen Normal- und Tumorzellen zulassen, gemacht werden. Es wurde jeweils Tag 0, 1, 2 und 4 nach Bestrahlung analysiert. Dies entspricht Tag 4, 5, 6 und 8 nach Herstellung der Kokultur.

Beas-2B and EPLC 32m1 Zellen waren semi-konfluent zum Zeitpunkt der Bestrahlung. Die Kontrollgruppen erreichten jedoch schon am Tag 2 nach Scheinbehandlung ein überkonfluentes Stadium und waren zu einem hohen Anteil apoptotisch. Daher wurde für die Monolayer-Kulturen die Analyse am Tag 2 nach Bestrahlung durchgeführt.

In der Kontrollgruppe war der Anteil der Zellen in der subG0-Phase und damit der apoptotischen Zellen in absteigender Reihenfolge Beas-2B > OC > COC (10.4 ± 2.2 % in Beas-2B, 5.6 ± 0.6 % in OCs and 4.2 ± 0.6 % in COCs, mean \pm SEM, $n = 5$, $P < 0.01$).

In der bestrahlten Gruppe stieg der Anteil der apoptotischen Zellen in SubG0 in allen Gruppen an. Den höchsten Anstieg hatten wieder die Beas-2B Zellen (23.9 ± 2.7 % in Beas-2B, 6.9 ± 1.0 % in OCs and 5.6 ± 0.5 % in COCs, $P < 0.01$).

In der Kontrollgruppe war der Anteil der Zellen in der S- and G2/M- Phase, die die proliferierenden Zellen repräsentieren in absteigender Reihenfolge Beas-2B > OC >

COC (42.8 ± 4.5 % in Beas-2B, 36.0 ± 2.2 % in OCs und 27.0 ± 1.0 % in COCs, mean \pm SEM, $n = 5$, $P > 0.01$).

Besonders bemerkenswert ist hier die niedrigere Proliferationsrate der Normalzellen, wenn sie sich in Kokultur mit Tumorzellen befinden.

Nach Bestrahlung nahm die Rate der proliferierenden Zellen in allen Zellarten ab, jedoch war der Abfall bei den Beas-2B nicht signifikant (41.6 ± 2.9 % in Beas-2B, 21.8 ± 0.5 % in OCs und 23.1 ± 1.4 % in COCs, $P < 0.01$ für OCs und COCs).

7.5.3 DNA-Gehalt der malignen Zellen

Um den Effekt ionisierender Strahlung auf maligne Zelllinien zu charakterisieren, wurden EPLC 32m1 Monolayer und der Tumoranteil an Kokulturen von humanem Bronchialepithel und der Bronchialepithel-Tumorzelllinie EPLC 32m1 bestrahlt und nach oben beschriebener Methode analysiert.

In der Kontrollgruppe war der prozentuale Anteil der malignen Zellen in Apoptose, also in subG0-Phase, wenn sie sich in Kokultur befanden signifikant niedriger als im Monolayer.

Auch war der prozentuale Anteil der malignen Zellen, die sich in Proliferation befanden, also der S-/ G2M-Phase, höher beim malignen Anteil der Kokulturen als im Monolayer.(COC: 5.2 ± 0.6 % in subG0-Phase, 64.4 ± 1.9 % in der S- und G2/M-Phase; Monolayer: 7.9 ± 1.1 % subG0-Phase, 33.6 ± 2.3 % S- und G2/M-Phase; mean \pm SEM; $P < 0.01$).

Nach Bestrahlung der Kokulturen mit 10 Gy, kam es zu einem Anstieg der apoptotischen Zellen, wohingegen der Anteil der proliferierenden Tumorzellen abnahm. Dagegen war bei den EPLC 32m1 im Monolayer nach Bestrahlung ein abnehmender Anteil an apoptotischen Zellen und ein Anstieg der proliferierenden

Ergebnisse

Zellen zu verzeichnen.

Phase; Monolayer: 4.8

0.01).

$\pm 1.9\%$ S- and G2/M-

and G2/M-Phase; $P <$

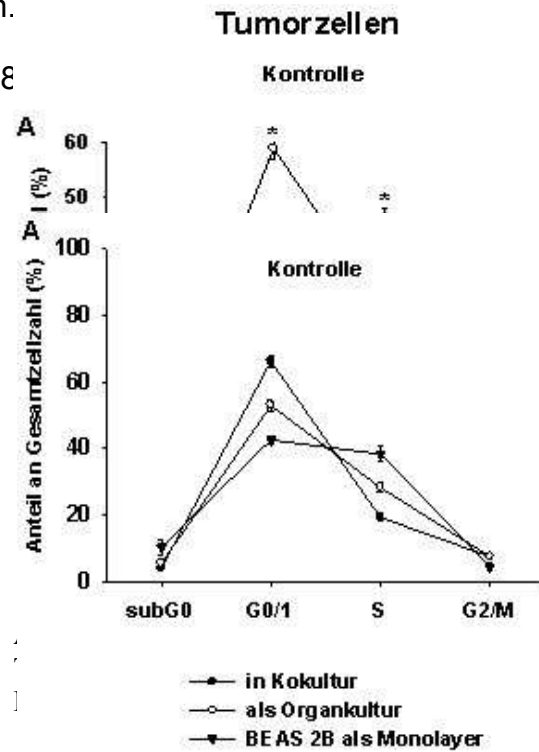


Abbildung 31 DNA- Verteilung der Normalzellen, Kontrollgruppe.

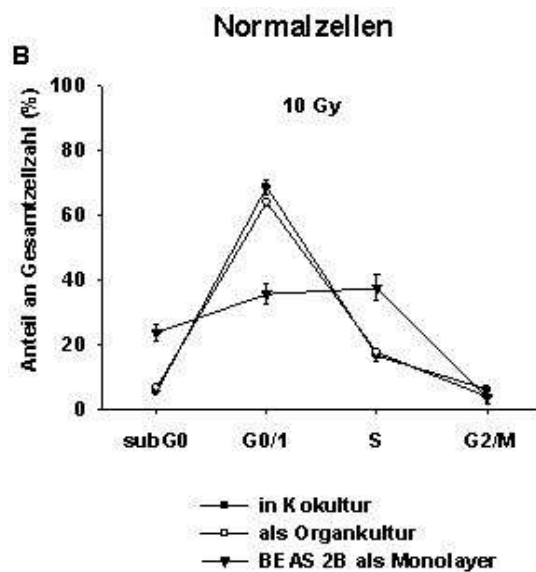


Abbildung 32 DNA-Verteilung der Normalzellen, mit 10 Gy bestrahlt.

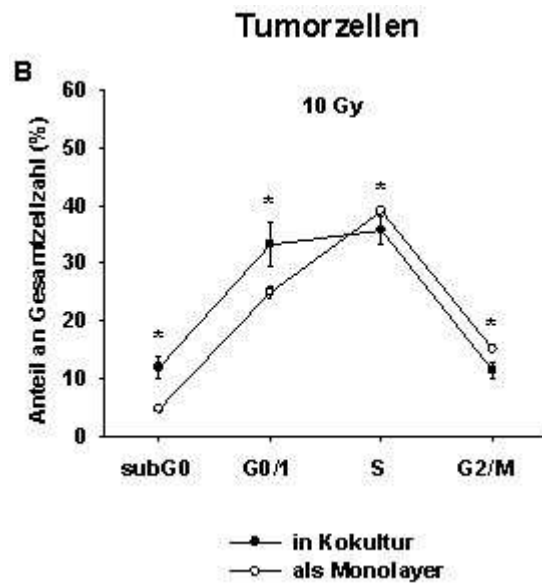


Abbildung 34 DNA-Verteilung der Tumorzellen, mit 10 Gy bestrahlt, am Tag 4 nach Bestrahlung (*= $P < 0,01$).

8 Diskussion

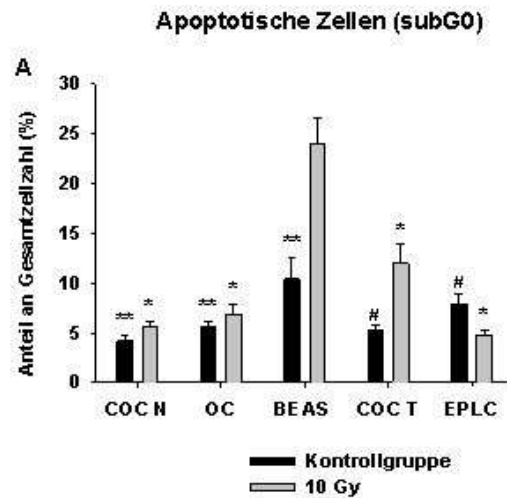


Abbildung 35 Apoptotische Zellen anteilig der Normalzellen in Kokultur (COC N), der Normalzellen in Organkultur (OC), der Normalzellen in Monolayer (Beas), der Tumorzellen in Kokultur (COC T) und der Tumorzellen in Monolayer (EPLC) (*= P<0,01), am Tag 4 nach Bestrahlung.

8.1 Diskussion der Materialien und Methoden

8.1.1 Verwendetes Epithel

Die von uns verwendeten Organkulturen stammen aus Resektionen, die an der Asklepios Fachklinik München, Gauting durchgeführt wurden. Indikation zur OP waren jeweils maligne Erkrankungen der Lunge. Diese Erkrankungen sind in aller Regel auch mit Veränderungen des Epithels, z. B. im Rahmen einer chronischen obstruktiven Lungenerkrankung, vergesellschaftet [25]. Dabei gibt es Dysplasien und Metaplasien des Epithels. Das mehrreihige Flimmerepithel wird zu einreihigem kubischen Epithel umgebaut und die Anzahl der Becherzellen nimmt zu. Teilweise ist dies auch an den Organpräparaten zu erkennen, die zum Teil trotz sorgfältiger Präparation und ausreichend langer Kultivierung nur einen geringen Anteil an Flimmerepithel besitzen. Die Gewinnung der Organkulturen durch Biopsie im

Rahmen einer Bronchoskopie ist hierbei der Präparation methodisch überlegen, da hier zumindest makroskopisch gesundes Epithel gewonnen werden kann.

Andererseits ist durch Biopsien alleine keine ausreichende Anzahl von Normalkulturen zu erreichen. Idealerweise sollten die Organkulturen das gleiche Alter und die gleiche Kultivierungsdauer haben. Für eine Versuchsreihe sind jedoch ca. 40 Kokulturen nötig. Man muss also auf Operationspräparate zurückgreifen, die ca. 20–30 Normalkulturen liefern.

8.1.2 Verwendete Tumorzelllinie

Die von uns verwendete Tumorzelllinie EPLC 32m1 ist eine Plattenepithel-Tumorzelllinie, die mit einem Green-Fluorescence-Plasmid transfiziert war. Nach der Transfizierung erfolgt eine einmalige Selektion der transfizierten Zellen über ein Selektivmedium (Antibiotika).

Problematisch dabei ist, dass der Anteil der Tumorzellen von Generation zu Generation, also mit andauernder Kulturzeit abnimmt. So produzierten in der von uns genutzten Generation 4 im Schnitt 89 % der Tumorzellen GFP, wohingegen in der Generation 15 nur noch 68 % der Tumorzellen eindeutig GFP-positiv waren. Dies hat dann Auswirkungen, wenn Tumorzellen unterschiedlicher Generationen verwandt werden. Es ist daher notwendig, bei jeder Versuchsreihe dieselbe Generation zu nutzen, oder die Anzahl zwischenzeitlich durch erneute Selektion wieder zu erhöhen. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Tumorzellen der Generation 4 verwendet.

8.1.3 Kokultursystem

Das von uns verwendete Kokultursystem besteht aus einer Organkultur von normalem humanen Bronchialepithel und einer Tumorzelllinie, in diesem Fall EPLC 32m1. In vorhergehenden Untersuchungen wurde dieses System ausführlich beschrieben und in unserer Gruppe wird es seit einiger Zeit genutzt {1, 6, 13, 14}. Die Herstellung dieser Organkulturen ist zwar verhältnismäßig einfach, aber dennoch wurden von uns Unterschiede hinsichtlich der Tumoradhäsion und –invasion in der COC gefunden, wenn diese von verschiedenen Mitarbeitern hergestellt wurden. Dies ist eventuell auf unterschiedliche Handhabung der Pipetten oder unterschiedlich aggressive Spülung der Kulturen nach Inkubation mit dem Tumor zurückzuführen. Es ist daher wichtig, die Versuchsreihen jeweils von der gleichen Person bearbeiten zu lassen.

Auch konnte ein gewisser Unterschied in der Tumoradhäsion und –invasion zwischen Organkulturen aus Biopsien und solchen aus OP-Präparaten gefunden werden. An den aus OP-Präparaten stammenden Kulturen blieb im Schnitt mehr Tumor haften als an den aus der Biopsie stammenden. Zum Teil ist dies darauf zurückzuführen, dass die Biopsien in der Regel etwas kleiner sind, als die OC aus OP-Präparaten. Diese werden dann mehrfach eingeschnitten und so mit Tumor kokultiviert. Das Epithel als natürliche Barriere ist so fast ganz erhalten, die Adhäsions- und Invasionsfläche für den Tumor also insgesamt geringer. Wichtig ist also, für eine Versuchsreihe jeweils nur eine Sorte von Organkulturen zu verwenden.

8.1.4 Herstellung der Einzelzellsuspension

Zur Herstellung der Einzelzellsuspension wurde von uns die Medimashine benutzt.

Dabei wird das Epithel durch EDTA, einen Chelat-Bildner, angelöst und dann mechanisch mittels einer Reibe separiert. Diese Methode ist sehr effektiv, aber für die Zellen sehr belastend. Dies schlägt sich nieder in einem geringen Anteil apoptotischer Zellen auch bei den Normalkulturen, da auch die Epithelzellen durch mechanische Belastung in Apoptose gehen {67}.

8.1.5 Messen der Zellen im FACS

Mit der Messung der Zellen im Durchflusszytometer steht uns eine effiziente und effektive Methode zur Untersuchung von Zellparametern wie Größe, Granularität oder GFP-Fluoreszenz zur Verfügung. Nachteilig ist der hohe finanzielle Aufwand zur Anschaffung eines FACS-Gerätes.

Im Umgang mit dem FACS ist ein standardisiertes Vorgehen wichtig. Unter anderem muss man in mehreren Vorversuchen, den oben beschriebenen Positiv- und Negativkontrollen, die Grundeinstellungen des Gerätes festlegen und alle weiteren Messungen mit diesen Werten vornehmen, da die erhobenen Daten sonst nicht vergleichbar sind. Regelmäßige Qualitätskontrollen und die Einhaltung international gültiger Standards sind ebenfalls essentiell {34, 36, 73, 77}.

8.1.6 Erstellung der Wachstumskurve

Für die Wachstumskurve haben wir Kokulturen jeweils an den Tagen 2, 4, 8, 16 und 24 gemessen. Die Zunahme des Tumoranteils zum Tag 8 hat uns dazu veranlasst, am Tag 4 zu bestrahlen. So war sichergestellt, dass nur Tumorzellen mit hoher Zellteilungsrate und damit hoher Strahlungssensitivität der Strahlung ausgesetzt waren.

8.1.7 Bestrahlung

Für die Bestrahlung der COC wurde eine Gesamtdosis von 10 Gy bei einer Dosisleistung von 4 Gy/min. gewählt. Diese Dosis wurde in vorhergehenden Untersuchungen unserer Gruppe benutzt und daher wieder gewählt, um Vergleichbarkeit zu erreichen {1, 6, 13, 14}. Für Bestrahlung maligner Krankheiten im Gewebeverband ist diese Dosis sehr niedrig und wird als moderate Dosisleistung beispielsweise auf umliegendes gesundes Gewebe gewertet {27}, jedoch ist sie bei Einwirkung auf Monolayer und als Einzeldosis hoch.

8.1.8 DNA-Messung

Der DNA-Messung wohnt, wie jeder anderen Multiparameter-Messung im Durchflusszytometer, eine gewisse Anfälligkeit für Fehler inne. Die Grundlagen der Messung im Durchflusszytometer müssen daher Beachtung finden {3, 71}. Bei der Präparation kann es zur Verklumpung der Einzelzellen kommen, so dass der Anteil der Doubletten unverhältnismäßig ansteigt und im Endeffekt weniger Zellen für die DNA-Analyse zur Verfügung stehen. Dieses Verklumpen kann auch bei der Wartezeit bis zur Messung auftreten, daher ist es wichtig, die Zellen von Zeit zu Zeit sanft zu mischen. Die weiteren Fehlerquellen wie unspezifische Antikörperbindung und damit falsch positive Zellen, oder durch Verwendung mehrerer Farben komplizierte Abgrenzung der Fluoreszenzen {48} sind bei unserer Messung von geringer Bedeutung, da keine Antikörper verwendet werden und die benutzten Fluoreszenzen im Farbspektrum deutlich voneinander entfernt sind.

Der benutzte DNA-Farbstoff DRAQ 5 besitzt dieselben Farbe-Eigenschaften wie das weitverbreitete Propidiumiodid {55} und ist daher sehr gut geeignet, eine quantitative DNA-Analyse durchzuführen.

8.2 Diskussion der Ergebnisse

8.2.1 Verwendung der GFP-transfizierten Tumor-Zelllinie

Die Diskriminierung der beiden Zellpopulationen in der Kokultur wurde durch die Green-Fluorescence-Protein-transfizierten EPLC 32m1-Zelllinie möglich. Dadurch ergaben sich gewisse Einschränkungen.

Unsere Ergebnisse lassen nur Rückschlüsse auf die GFP-positiven Tumorzellen zu, da wir nur diese zweifelsfrei identifizieren können. In der FACS-Analyse GFP-positive Zellen bedeuten lebende, stoffwechselaktive Tumorzellen, GFP-negative Zellen können sowohl Normalzellen als auch stoffwechsellinaktive Tumorzellen, tote Zellen oder Abwehrzellen sein. Die Organkulturen sind jedoch gut untersucht und bestehen hauptsächlich aus differenziertem Epithel mit sekretorischen Becherzellen, zilienträgendem Flimmerepithel und Basalzellen {6}.

8.2.2 Wachstumskurve

Die Wachstumskurve hat eine Zunahme des relativen Tumoranteils bis zum Tag 8 gezeigt. Weiter konnte gezeigt werden, dass der Tumoranteil zum Tag 16 wieder abfällt, um dann bis zum Tag 24 konstant zu bleiben. Eine Erklärung hierfür wäre, dass die Versorgung mit Nährstoffen des Tumoranteils nach dem Tag 8 vermindert ist, da, wenn der Tumor eine bestimmte Masse überschreitet, die Grenze der Diffusion erreicht ist.

8.2.3 Bestrahlung

Nach einer Bestrahlung am Tag 4 mit 10 Gy nahm der Anteil der stoffwechselaktiven Tumorzellen noch am Tag der Bestrahlung, jedoch nicht signifikant, ab. Bisherige Untersuchungen finden einen direkten Bestrahlungseffekt auf die behandelten Kulturen erst 24 h nach Radiatio {4}. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass diese Untersuchungen indirekte Faktoren wie LDH-Bestimmung benutzt haben. Die Untersuchung des GFP-Anteils als Stoffwechselmarker ist wegen seiner kurzen Halbwertszeit von ca. 2 Stunden ein viel akuterer Parameter, der Aussagen über den Zustand der Tumorzellen zulässt. Unsere Hypothese, dass die Zellen durch die Bestrahlung in Apoptose gehen, untermauert die Änderung der Vorwärtsstreuung {78}.

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes an sich ist für die Beurteilung des Strahleneffekts nicht ausreichend. Der Anteil der Zellen in S-/ G2M-Phase ist höher beim malignen Anteil der Kokulturen als im Monolayer. Es sind jedoch auch mehr Zellen in der apoptotischen Phase zu finden. Dabei ist zu beachten, dass das genaue Wissen über die Abläufe des Zelltods noch zu ungenau sind. Möglicherweise befinden sich die Zellen in einem der Kontrollpunkte, die im Zellzyklus dazu dienen, schadhafte DNA zu finden und diese reparieren zu lassen. Man kennt für jede der Zellzyklusphasen einen solchen Checkpoint {26, 49, 72, 79}.

9 Zusammenfassung, Schlussfolgerung, Ausblick

9.1 Zusammenfassung

Zielsetzung der Arbeit war, eine Methodik zu entwickeln, die die Auswirkung ionisierender Strahlung auf Kokulturen mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysieren kann.

Diese Organkulturen werden aus Operationspräparaten gewonnen und organisieren sich nach 5 -10 Tagen Kulturzeit als bindegewebiger Kern, der von respiratorischem Epithel umschlossen ist. Die Zellen haben dabei die Möglichkeit, Zell-Zell-Interaktionen auszubilden. Die Präparation des Epithels aus Operationspräparaten wurde optimiert. Durch die Verbesserung der Methodik mit Hilfe einer Lupe konnte die Ausbeute an Kulturen der Kategorie 1-3, die ringsum von Epithel umgeben waren, erhöht werden, Kulturen der Kategorie 5 und 6 und Infektionen kamen praktisch nie vor.

Die Organkulturen werden nach 5-10 Kulturtagen mit einer Bronchialepithel-Tumorzelllinie konfrontiert. Diese wächst in den bindegewebigen Kern der Kultur ein, so dass die Kokultur ein dreidimensionales, multizelluläres Modell des Bronchialkarzinoms darstellt.

Die Kulturen können mit einer kombinierten mechanisch-chemischen Methode separiert und als Einzelzellen in Suspension gebracht werden.

Diese Einzelzellsuspension kann im Durchflusszytometer analysiert werden. Durch die Verwendung der Green-Fluorescence-Protein-transfizierten Tumorzelllinie können Tumorzellen und Nicht-Tumorzellen getrennt und deren DNA-Gehalt dargestellt werden. Zum Vergleich wurden EPLC 32m1 und Beas-2B als Monolayer und Organkulturen ohne Tumoranteil analysiert.

Zusammenfassung

Zuerst konnte mit einer Wachstumskurve eine Zunahme des prozentualen Tumoranteils zwischen Tag 2 bis Tag 8 gezeigt werden. Zum Tag 16 nahm der Anteil der Tumorzellen wieder ab und blieb konstant bis zum Tag 24. Aus diesem Grund wurde der Zeitpunkt der Bestrahlung auf den Tag 4 gelegt, da hier ein Wachstum garantiert war. Nach einer Bestrahlung mit 10 Gy nahm der Anteil der Tumorzellen signifikant ab.

Der DNA-Gehalt der Zellen kann nach apoptotischen Zellen in SubG0, ruhenden Zellen in G0/1, synthetisierenden Zellen in der S- und mitotischen Zellen in G2/M-Phase getrennt werden.

Der Anteil der proliferierenden Zellen war dabei in absteigender Reihenfolge EPLC in COC > Beas-2B > OC = EPLC Monolayer > OC in COC. Der Anteil der apoptotischen Zellen war in absteigender Reihenfolge Beas-2B > EPLC in COC > OC > OC in COC > EPLC in Monolayer. Durch Bestimmung der absoluten Zellzahlen kann die Auswirkung dieser DNA-Verteilung beobachtet werden. Die absolute Anzahl der Zellen nach Bestrahlung nahm signifikant ab.

Die Ergebnisse legen nahe, dass Zell-Zell-Kontakte und die dreidimensionale Struktur der Kokulturen die Strahlenreaktion weitgehend modifizieren.

9.2 Schlußfolgerung

Die Ergebnisse lassen folgende Schlussfolgerungen zu:

Das Kokultursystem ist ein in-vivo nahes, dreidimensionales, multizelluläres Modell für das Bronchialkarzinom. Nach einer Bestrahlung nahm der Tumoranteil in den Kokulturen signifikant ab, die Kontrollgruppe blieb konstant. Bei Kultivierung der Tumorzelllinie EPLC 32m1 im Monolayer nahm die absolute Zellzahl ebenfalls signifikant ab. Mit der Durchflusszytometrie lässt sich die Wirkung der Strahlung auf den DNA-Gehalt der Zellen quantifizieren. Dabei nimmt nach Bestrahlung der Anteil der malignen Zellen in Apoptose signifikant zu. Interessanterweise ist eine Strahlensensitivierung der malignen Zellen in Kokultur zu beobachten. Der Anteil der proliferierenden Zellen nimmt nach Bestrahlung ebenfalls signifikant ab. Der DNA-Gehalt der Normalzellen aus Organkulturen ist unter Bestrahlung unverändert. Beas-2B, die Normalzellen in Monolayer, werden unter Bestrahlung genauso apoptotisch wie die Tumorzellen in Monolayer. Ihre Proliferation nimmt ebenfalls ab.

Der Vergleich der Ergebnisse der Kokulturen mit Tumor- und Normalzellen in Monolayern lässt diese althergebrachten Modelle in neuem Licht erscheinen. Monolayer-Kulturen spiegeln die in-vivo-Verhältnisse nur ungenügend wieder. Zellen in Monolayerkulturen verhalten sich signifikant unterschiedlich zum dreidimensionalen Zellverband. Tumorzellen sind in Kokultur strahlensensibler als im Monolayer. Beas-2B sind in ihrem Verhalten unter Bestrahlung den Tumorzelllinien ähnlicher, als den Normalzellen in Organ- und Kokultur. Normalzellen in Organ- oder Kokulturen verhalten sich unter Bestrahlung ähnlich.

Die Verwendung des Kokultursystems verspricht, die Tumorphysiologie besser zu verstehen und Antitumorthherapie durch in diesem Fall ionisierende Strahlung unter

in-vivo-nahen Verhältnissen zu analysieren. Deshalb könnten Organkulturen die Zahl von Tierversuchen reduzieren.

9.3 Ausblick

Ausblicke auf zukünftige Fragestellungen:

Die Durchflusszytometrie ist die Methode der Wahl zur Betrachtung einer großen Menge von Zellen nach einzelnen Kriterien. Vorteil ist die statistische Stabilität der Ergebnisse durch die Analyse einer großen Anzahl, Nachteil ist, dass die Zelle nach der Analyse verworfen wird. Mit der Laser Scanning Mikroskopie beispielsweise können die Zellen über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. Damit ist die genaue Betrachtung intrazellulärer Vorgänge möglich {42, 52, 57, 70,}.

Diese Arbeit wurde unter Verwendung einer EPLC Tumorzelllinie, einer Plattenepithel-Zelllinie, erstellt. Neben diesem Plattenepithel-Karzinom gibt es auch noch weitere Bronchial-Karzinom-Histologien. Es ist vorstellbar, auch mit einer LCLC, SCLC oder Adenokarzinom-Zelllinie ähnliche Untersuchungen durchzuführen. Dazu wäre es nötig, diese Zelllinie ebenfalls mit einem Farbstoff zu transfizieren, der jedoch nicht notwendigerweise das GFP sein muss. Es existieren weitere Farbstoffe. Beispielsweise Cy5 (Zyan = blau), orange, gelb oder RubyRed (Rot). Dies würde Aufschluss über das Verhalten der anderen Tumorarten geben. Langfristig ist auch vorstellbar, nach Kultivierung von Patienten-Tumorzellen ein patientenspezifisches Tumorstadiums-Modell zu entwickeln und so die Antitumortherapie maximal zu optimieren.

Neben der Bestrahlung wäre es vorstellbar, andere Antitumortherapien ebenfalls zu überprüfen. Neben Taxanen und platinhaltigen Therapeutika könnten auch neuere Entwicklungen wie zum Beispiel Epidermal-Growth-Factor-Receptor- (EGFR)

Inhibitoren, wie beispielsweise Gefitinib, Erlotinib oder Cetuximab eingesetzt werden {18, 68, 69}. Ebenfalls könnte untersucht werden, inwieweit die Kombination unterschiedlicher Bestrahlungsschemata (Einzeit versus fraktioniert) das Bronchialepithel im Sinne einer Strahlenbronchitis schädigt, und das Reaktionsmuster der Tumorzellen verändert.

Die Bestimmung des DNA-Gehalts ist ein Schritt auf dem Weg zum Verständnis der strahlenbiologischen Auswirkungen ionisierender Strahlung. Der DNA-Gehalt ist besser als indirekte Parameter der Zellschädigung, wie beispielsweise LDH, dazu geeignet, diese darzustellen, aber dennoch nur das Ergebnis vieler Stoffwechsel-Kaskaden innerhalb der Zelle. Idealerweise wäre die Auswirkung der Strahlung durch Detektion einzelner Stoffwechseleränderungen in der Zelle zu erfassen.

Cytomics, die Untersuchung der Zellorganellen, Proteomics, die Analyse der Veränderungen auf Proteinebene, oder Genomics, die Darstellung von Änderungen im Genom sind dabei der Schlüssel zum Verständnis dieser Vorgänge. Es gibt Hinweise, dass der DNA-Gehalt, bzw. Abnormitäten des DNA-Gehalts wie beispielsweise die Methylierung der DNA, als kleinster Baustein bei der Kanzerogenese wirken {20, 21, 22}. Damit ist der Grundstein zur Bekämpfung von Krankheiten auf molekularer Ebene gelegt.

Ein weiterer Schritt ist die Anwendung der gewonnenen Erkenntnisse in der täglichen Klinik. Viele Arbeiten beschäftigen sich mit der Bedeutung der Veränderungen des DNA-Gehalts, sei es in der Diagnostik und Beurteilung der Dignität einer malignen Neubildung, oder bei der Beurteilung der Wirksamkeit therapeutischer Maßnahmen {7, 12}. Interessant ist die Betrachtung maligner Zellen im peripheren Blut von Tumorpatienten {76}. Dabei könnte nach Identifikation der Tumorzellen mit passenden Antikörpern eine Bestimmung des DNA-Status durchgeführt werden.

Zusammenfassung

Dieser kann dann im Verlauf der Therapie betrachtet werden. Dabei sind Antworten auf die Frage, warum manche Tumore gut auf antitumorale Therapie ansprechen, andere wiederum nicht, interessant. Eventuell kann aus den Veränderungen im DNA-Gehalt ein Rückschluss gewonnen werden. Eine Kombination mit einer Aufarbeitung von vorhandenen Zellen in einer Sputumanalyse, {44, 47} welche immer wieder als Screening Methode für Bronchial-Karzinome im Gespräch ist, bietet eine weitere Möglichkeit zum Verständnis dieser Gruppe von Erkrankungen.

10 Literaturverzeichnis

1. Al-Batran,S. E.; Astner,S.T.; Supthut,M.; Gamarra,F.; Brueckner,K.; Welsch,U.; Knuechel,R.; Huber,R.M.; Three-dimensional in vitro cocultivation of lung carcinoma cells with human bronchial organ culture as a model for bronchial carcinoma. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 21: 200-208, 1999.
2. Ormerod MG; Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry. *Journal of immunological Methods*, 265::73-80, 2002.
3. Ormerod M.G.; Analysis of DNA - general methods. In: *Flow Cytometry - a practical approach*, Edition 3 : 119-135, Oxford University Press, 2000.
4. Gamarra F; Wagner S; Al Batran S;Maier I; Castro M; Hautmann H; Bergner A; Baumgartner R; Huber RM; Kinetics of 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence in organ cultures of bronchial epithelium and tumor. *Respiration* 69: 445-450, 2002.
5. Huber RM; Schalhorn A; *Manual Tumorzentrum München*,6: 1-203, 1999.
6. Bals R; Gamarra F; Kaps A; Grundler S; Huber RM; Welsch U; Secretory cell types and cell proliferation of human bronchial epithelial cells in an organ-culture system. *Cell Tissue Res.*, 293: 573-577, 1998.
7. Anker P; Quantitative aspects of plasma/serum DNA in cancer patients. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 906: 5-7, 2000.
8. Huber RM; Fischer R; Hautmann H; Pollinger B; Wendt T; Muller-Wening D; Haussinger K; Palliative endobronchial brachytherapy for central lung tumors. A prospective, randomized comparison of two fractionation schedules. *Chest*, 107: 463-470, 1995.
9. Huber RM; Fischer R; Hautmann H; Pollinger B; Haussinger K; Wendt T; Does additional brachytherapy improve the effect of external irradiation? A prospective,

- randomized study in central lung tumors. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, 38: 533-540, 1997.
10. Ballarini F; Biaggi M; Ottolenghi A; Sapora O; Cellular communication and bystander effects: a critical review for modelling low-dose radiation action. *Mutat.Res.*, 501: 1-12, 2002.
 11. Djordjevic B; Bystander effects: a concept in need of clarification. *Bioessays*, 22: 286-290, 2000.
 12. Xavier Morin, Richard Daneman, Michael Zavortink, and William Chia A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in *Drosophila*, *PNAS*, 98: 15550- 15555, 2001.
 13. Edelmann M, Bergner A,Winklhofer A, Baumgartner R, Passlick B, Huber RM, Gamarra F.; Quantifizierung der Effekte von ionisierenden Strahlen im Kokultursystem von humanem Bronchialepithel und einer Bronchialkarzinom-Tumorzelllinie mittels Durchflusszytometrie. *Pneumologie*,5: 73, 2002.
 14. Bergner A.,Stief J.,Holdenrieder S.,Stieber P.,Haimerl W.,Passlick B.,Waldschmidt A.,Kummermehr J.,Gamarra F.,Huber R.M. Effects of single dose irradiation on bronchial epithelium comparing Beas- 2B monolayer, human organ cultures and Goettinger minipigs, *Radiation Research* 160: 647-654, 2003.
 15. Huber RM; Schalhorn, A.; Tumorzentrum München. Tumoren der Lunge und des Mediastinums, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. *Tumormanual*, 2003.
 16. Reis-Filho JS; Simpson PT; Martins A; Preto A; Gartner F; Schmitt FC.; Distribution of p63, cytokeratins 5/6 and cytokeratin 14 in 51 normal and 400 neoplastic human tissue samples using TARP-4 multi-tumor tissue microarray. *Virchows Arch.*, 2003.

Literaturverzeichnis

17. Nakayama H; Enzan H; Yamamoto M; Miyazaki E; Hidaka C; Okumichi T; Okumichi A; Kajihara H; CD34-positive stromal cells in primary lung carcinomas. *Oncol Rep.*10: 1306- 1313, 2003.
18. Fjellbirkeland L; Cambier S; Broaddus VC; Hill A; Brunetta P; Dolganov G; Jablons D; Nishimura SL; Integrin $\alpha v \beta 8$ -Mediated Activation of Transforming Growth Factor- β Inhibits Human Airway Epithelial Proliferation in Intact Bronchial Tissue. *Am Journal of Pathology*, 163: 533-542, 2003.
19. Deshpande CG; Shah RN; Yeldandi A; Papreddy K; Badve S; Expression of Das-1 in Primary Lung Adenocarcinomas Represents Reactivation of an Oncofetal Pulmonary Antigen. *Pathobiology*, 70: 343-347, 2002.
20. Piyathilake CJ; Henao O; Frost AR; Macaluso M; Bell WC; Johanning GL; Heimbürger DC; Niveleau A; Grizzle WE; Race- and age-dependent alterations in global methylation of DNA in squamous cell carcinoma of the lung in the United States. *Cancer Causes Control*, 2003.
21. Santos Romeo M; Sokolova IA; Morrison LE; Zeng C; Baron AE; Hirsch FR; Miller YE; Franklin WA; Varella-Garcia M; Chromosomal Abnormalities in Non-Small Cell Lung Carcinomas and in Bronchial Epithelia of High-Risk Smokers Detected by Multi-Target Interphase Fluorescence in Situ Hybridization. *Journal of Molecular Diagnostics*, 5: 103-112, 2003.
22. Kleeberger W; Versmold A; Rothamel T; Glockner S; Bredt M; Haverich A; Lehmann U; Kreipe H; Increased Chimerism of Bronchial and Alveolar Epithelium in Human Lung Allografts Undergoing Chronic Injury. *Am Journal of Pathology*, 162: 1487-1494, 2003.

Literaturverzeichnis

23. Mollerup S;Jorgensen K;Berge G;Haugen A; Expression of estrogen receptors [alpha] and [beta] in human lung tissue and cell lines. *Lung Cancer*, 37: 153-159, 2002.
24. Park MT, Lee SJ. Cell cycle and cancer. *J Biochem Mol Biol*, 3: 160-165, 2003.
25. Sun XR, Zheng Y, MacAulay C, Lam S, Doudkine A, Palcic B.; In vitro model for studying malignancy associated changes. *Anal Cell Pathol.*, 25: 95-102, 2003.
26. G.J. Phillips; Green fluorescent protein –a bright idea for the study of bacterial protein localization. *FEMS Microbiology Letters* 204: 2001.
27. Coleman CN; Blakely WF; Fike JR; MacVittie TJ; Metting NF; Mitchell JB; Moulder JE; Preston RJ; Seed TM; Stone HB; Tofilon PJ; Wong RSL; Molecular and Cellular Biology of Moderate-Dose (1- 10 Gy.) Radiation and Potential Mechanisms of Radiation Protection: Report of a Workshop at Bethesda, Maryland, December 17-18, 2001. *Radiation Research*, 159: 812-834, 2003.
28. Pulatova MK, Sharygin VL, Shliakova TG; Reactions of deoxyribonucleotide synthesis system to irradiation and their modification by radioprotectors. *Radiats Biol Radioecol.*, 43: 29- 43, 2003.
29. Adelstein SJ; Feinendegen LE; Pollycove M; Biologic Responses to Low Doses of Ionizing Radiation: Adaptive Response Versus Bystander Effect. *The Journal of Nuclear Medicine*, 44: 125-126, 2003.
30. Lehmann AR; Replication of damaged DNA in mammalian cells: new solutions to an old problem. *Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 509: 23-34, 2002.
31. Hall EJ.; The bystander effect. *Health Phys.*, 85: 31- 35, 2003.

Literaturverzeichnis

32. Huang X, Lin T, Gu J, Zhang L, Roth JA, Liu J, Fang B. Cell to cell contact required for bystander effect of the TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) gene. *Int J Oncol.*, 22: 1241- 1245, 2003.
33. S.A.Lorimore A, E.G.Wright; Radiation-induced genomic instability and bystander effects: related inflammatory-type responses to radiation-induced stress and injury? A review. *Int J Rad Biol.*, 1: 15-25, 2003.
34. Bergers E, Montironi R, van Diest PJ, Prete E, Baak JP.; Interlaboratory reproducibility of semiautomated cell cycle analysis of flow cytometry DNA-histograms obtained from fresh material of 1,295 breast cancer cases. *Hum Pathol.*, 27: 553-560, 1996.
35. Bergers E, van Diest PJ, Baak JP.; Cell cycle analysis of 932 flow cytometric DNA histograms of fresh frozen breast carcinoma material. Correlations between flow cytometric, clinical, and pathologic variables. MMMCP Collaborative Group. Multicenter Morphometric Mammary Carcinoma Project Co. *Cancer*, 77: 2258-2266, 1996.
36. Bergers E, van Diest PJ, Baak JP. Tumour heterogeneity of DNA cell cycle variables in breast cancer measured by flow cytometry. *J Clin Pathol.*, 49: 931- 937, 1996.
37. Torres FX, Mackowiak PG, Brown RD, Linden MD, Zarbo RJ.; Comparison of two methods of mechanical disaggregation of scirrhous breast adenocarcinomas for DNA flow cytometric analysis of whole cells. *Am J Clin Pathol*, 103: 8-13, 1995.
38. Am. Cancer Society; cancer facts., 2003.
39. Jeffrey A. Vos , Jerry H. Simurdak ,Brad J.Davis ,Jerome B.Myers ,Mark D.Brissette ; Vortex disaggregation for flow cytometry allows direct histologic correlation: A novel approach for small biopsies and inaspirable bone marrows. *Cytometry*, Vol. 52 B Issue 1: 20-31, 2002.

40. Karsten E.Dreinhöfer, Bo Baldetorp ,Måns Åkerman , Mårten Fernö , Anders Rydholm , Pelle Gustafson; DNA ploidy in soft tissue sarcoma: Comparison of flow and image cytometry with clinical follow-up in 93 patients. *Cytometry*, Vol. 50 B, Issue 1: 2001.
41. Carol T.Schnizlein-Bick, Francis F.Mandy , Maurice R.G.O'Gorman , Helene Paxton , Janet K.A.Nicholson , Lance E.Hultin , Rebecca S.Gelman , Cynthia L.Wilkening , Daniella Livnat; Use of CD45 gating in three and four-color flow cytometric immunophenotyping: Guideline from the national institute of allergy and infectious diseases, division of AIDS. *Cytometry*, Vol. 50 B, Issue 2, 2001.
42. Attila Tárnok, Andreas O.H.Gerstner; Clinical applications of laser scanning cytometry. *Cytometry*, Vol. 50 B, Issue 3, 2002.
43. B.Y.Kularatne; P.Lorigan, S.Browne, S.K.Suvarna, M.O.Smith , J.Lawry Monitoring tumour cells in the peripheral blood of small cell lung cancer patients. *Cytometry*, Vol. 50 B, Issue 3 :2002.
44. Branko Palcic, David M.Garner , Jack Beveridge , Xiao Rong Sun , Alexei Doudkine , Calum MacAulay , Stephen Lam , Peter W.Payne ; Increase of sensitivity of sputum cytology using high-resolution image cytometry: Field study results. *Cytometry*, Vol. 50 B, Issue 3, 2002.
45. Alberto Alvarez-Larran, Lluís Jover,Pedro Marin,Jordi Petriz ; A multicolor, no-lyse no-wash assay for the absolute counting of CD34+ cells by flow cytometry. *Cytometry*, Vol. 50 B, Issue 5, 2002.
46. Fu-sheng Wang; Fumio Kubota A novel apoptosis research method with imaging-combined flow cytometer and HITC or IR-125 staining. *Cytometry*, Vol. 50 B, Issue 5, 2002.

Literaturverzeichnis

47. Simon M.Barry; ,Aida Condez ,Margaret A.Johnson , George Janossy Determination of bronchoalveolar lavage leukocyte populations by flow cytometry in patients investigated for respiratory disease. *Cytometry*, Vol. 50 B, Issue 6, 2002.
48. M. Plander ,G. Brockhoff , S. Barlage , S. Schwarz , G. Rothe , R. Knuechel; Optimization of three- and four-color multiparameter DNA analysis in lymphoma. *Cytometry* Vol. 54 A, Issue 1, 66-74, 2003.
49. Gloria Juan; Hernando, Carlos Cordon-Cardo Separation of live cells in different phases of the cell cycle for gene expression analysis. *Cytometry*, Vol. 49 B, Issue 4, 170-175, 2002.
50. Ingrid Schmid; Mirabelle D. Dagarag , Mary Ann Hausner , Jose L.Matud , Tom Just , Rita B.Effros , Beth D.Jamieson ,David Geffen Simultaneous flow cytometric analysis of two cell surface markers, telomere length, and DNA content. *Cytometry*, Vol. 49, Issue 3, 96-105, 2002.
51. Jerzy Grabarek Barbara Ardelt ,Jan Kunicki ,Zbigniew Darzynkiewicz ; Detection of in situ activation of transglutaminase during apoptosis: Correlation with the cell cycle phase by multiparameter flow and laser scanning cytometry. *Cytometry*, Vol. 49, Issue 2, 83- 89, 2001.
52. Zsolt Bacso; James F.Eliason Measurement of DNA damage associated with apoptosis by laser scanning cytometry. *Cytometry*, Vol. 49, Issue 3, 180-186, 2002.
53. Andrea Rasola Massimo Geuna; A flow cytometry assay simultaneously detects independent apoptotic parameters. *Cytometry*, Vol. 45, Issue 2, 151-157, 2001.
54. Smith PJ; Wiltshire M; Davies S; Patterson LH; Hoy T; A novel cell permeant and far red-fluorescing DNA probe, DRAQ5, for blood cell discrimination by flow cytometry. *J Imm Methods*, Vol. 229: 131-139, 1999.

55. Marie Wiltshire; Laurence H.Patterson, Paul J.Smith 1 A novel deep red/low infrared fluorescent flow cytometric probe, DRAQ5NO, for the discrimination of intact nucleated cells in apoptotic cell populations. *Cytometry*, Vol. 39, Issue 3, 217- 223, 2000.
56. Paul J. Smith, Nicola Blunt, Marie Wiltshire, Terence Hoy, Paul Teesdale-Spittle, Michael R.Craven, James V.Watson, W.Brad Amos, Rachel J.Errington, Laurence H.Patterson; Characteristics of a novel deep red/infrared fluorescent cell-permeant DNA probe, DRAQ5, in intact human cells analyzed by flow cytometry, confocal and multiphoton microscopy. *Cytometry*, Vol. 40, Issue 4, 280-291, 2000.
57. Zhang T, Cao EH, Li JF. A laser scanning confocal microscopy method. Simultaneous detection of intracellular Ca²⁺ and apoptosis using Fluo-3 and Hoechst 33342. *Anal Quant Cytol Histol.*, 22: 93- 97, 2000.
58. Liegler; Hyun W, Yen TS, Stites DP. Detection and quantification of live, apoptotic, and necrotic human peripheral lymphocytes by single-laser flow cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol.*, 2: 369- 376, 1995.
59. M.Thomas; U.Gatzemeier, R.Goerg,W.Matthiessen, H.Morr, N.Schoenfeld, D.Ukena, G.Stamatis. Empfehlungen zur Diagnostik des Bronchialkarzinoms. *Pneumologie*, 54: 361- 371, 2002.
60. J. Rieger; U. Linsenmaier, H. Hautmann, A. Fedorowski, R.M. Huber, K.J. Pfeifer Interdisciplinary interventional therapy for tracheobronchial stenosis with modern metal net stents. *Rofo Fortschr Geb Rontgenstr.*, 7: 1009-1014, 2001.
61. Hautmann H; Huber RM., Laser resistance of expandable metal stents in interventional bronchoscopy: an experimental evaluation. *Lasers Surg Med.*, 29: 70- 72, 2001.

Literaturverzeichnis

62. M. Thomas, M. Baumann, M. Deppermann, L. Freitag, U. Gatzemeier, R. Huber, B. Passlick, M. Serke, D.Ukena: Empfehlungen zur Therapie des Bronchialkarzinoms. *Pneumologie*, 56: 113- 133, 2002.
63. Paul Hermanek; Leslie H.Sobin; Christian Wittekind; How to improve the present TNM staging system. *Cancer*, Vol. 86, Issue 11, 2189- 2191, 1999.
64. Novelli M; Savoia P; Cambieri I; Ponti R; Comessatti A; Lisa F;Bernengo MG; Collagenase digestion and mechanical disaggregation as a method to extract and immunophenotype tumour lymphocytes in cutaneous T-cell lymphomas. *Clinical and Experimental Dermatology*, 25: 423- 431, 2000.
65. Ottesen G., Christensen IJ, Larsen JK, Hansen B, Andersen JA.; Tissue disaggregation for flow cytometric DNA analysis: comparison of fine-needle aspiration and an automated mechanical procedure. *Cytometry*, 26, Issue 1, 65- 68, 1996.
66. Mandy FF, Nicholson JK, McDougal JS Guidelines for performing single-platform absolute CD4+ T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep*. 52: 1- 13, 2003.
67. Hammerschmidt S; Kuhn H; Grasenack T; Gessner C; Wirtz H; Apoptosis and Necrosis induced by cyclic mechanical stretching in alveolar type II cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2003.
68. Li Y; Sun X; LaMont JT; Pardee A; Li CJ; Selective killing of cancer cells by beta-lapachone: Direct checkpoint activation as a strategy against cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 5:2674-2678 2003 Mar 4.

69. Li CJ;Li YZ; Pinto AV; Pardee AB; Potent inhibition of tumor survival in vivo by beta-lapachone plus taxol: Combining drugs imposes different artificial checkpoints. PNAS Vol. 96, Issue 23, 13369-13374, 1999.
70. Darzynkiewicz Z; Bedner E; Li X; Gorczyca W; Melamed MR; Laser-Scanning Cytometry: A New Instrumentation with Many Applications. Experimental Cell Research, 249: 1-12, 1999.
71. Shapiro Howard M.; Practical flow cytometry, 5th Edition, Wiley- Liss, 2003.
72. Dekker PBD; Kuipers-Dijkshoorn N; Hogendoorn PCW; Van Der Mey AGL; Cornelisse CJ; G2M arrest, blocked apoptosis, and low growth fraction may explain indolent behavior of head and neck paragangliomas. Hum Pathol., 34: 690- 698, 2003.
73. Gordon KM; Duckett L; Daul B; Petrie HT; A simple method for detecting up to five immunofluorescent parameters together with DNA staining for cell cycle or viability on a benchtop flow cytometer. J Imm Meth., 275: 113- 121, 2003.
74. C.M.Schlotter ,U.Vogt, U.Bosse, K.Waßmann; Impact of DNA Image Cytometry (ICM) Parameter and Established Prognostic Factors on Disease Free Survival (DFS) and Overall Survival (OS) of Node-Negative Breast Cancer (NNBC) Patients. Zentralbl Gynakol., 125: 368- 374, 2003.
75. Fournie GJ; Courtin JP; Laval F;Chale JJ; Pourrat JP; Pujazon MC; Lauque D; Carles P; Plasma DNA as a marker of cancerous cell death. Investigations in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing human tumours. Cancer Let 2 : 221- 227, 1995.
76. Dekker P; Kuipers-Dijkshoorn N; Hogendoorn P; Van Der Mey A; Cornelisse C; G(2) M arrest, blocked apoptosis, and low growth fraction may explain indolent behavior of head and neck paragangliomas. Hum Pathol.,34: 690- 698, 2003.

77. Omerod MG., Consensus report of the task force on standardisation of DNA flow cytometry in clinical pathology. DNA Flow Cytometry Task Force of the European Society for Analytical Cellular Pathology, *Anal Cell Pathol.*, 17: 103- 110, 1998
78. Álvaro L Bertho, Marta A Santiago, Sérgio G Coutinho Flow Cytometry in the Study of Cell Death; *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 95 (3): 429- 433, 2000.
79. Luis Marín; Alfredo Minguela, Alberto Torío, María R.Moya-Quiles, Manuel Muro , Olga Montes-Ares, Antonio Parrado, D.María Rocío Álvarez-López , Ana M.García-Alonso Flow cytometric quantification of apoptosis and proliferation in mixed lymphocyte culture. *Cytometry*, Vol. 51 A, Issue 2, 107- 118, 2003.

11 Danksagung

Ein sehr herzlicher Dank gilt meiner Frau Tina, meiner Mutter, meiner Großmutter und meinen Schwiegereltern, die alle durch ihre Unterstützung mein Studium ermöglicht und zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn OA Prof. Dr. med. R.M. Huber, Leiter der Pneumologie der Medizinischen Klinik -Innenstadt der LMU, für die Aufnahme als Doktorand in die Abteilung, die interessante Aufgabenstellung mit allen Möglichkeiten zur Entfaltung und die vielfältige Unterstützung.

Herrn Dr. med. Albrecht Bergner sei für die Unterstützung meiner Arbeit als Betreuer herzlich gedankt. Er war von der Planung bis zur Durchführung der Versuche und bei der Auswertung der Ergebnisse stets helfend präsent. Auch die Schriftform dieser Arbeit verdankt ihm viel.

Herrn Dr. med. Fernando Gamarra sei ebenfalls für seine Unterstützung als Betreuer gedankt. Er führte mich in die Grundlagen der statistischen Auswertung ein und ermöglichte mir so die Präsentation dieser Arbeit in mehreren Seminaren und als Abstract und Vortrag auf dem Jahrestag der Deutschen Pneumologischen Gesellschaft in Bochum im Jahr 2002, den er, da ich durch das 2. Staatsexamen verhindert war, für mich vortrug.

Ich bin froh sagen zu können, dass mich mit beiden ein freundschaftliches Verhältnis verbindet.

Herrn OA. Prof. Dr. med. Thetter und Herrn OA Prof. Dr. med. B. Passlick, Asklepios-Fachkliniken Gauting bei München, danke ich für die freundliche Unterstützung meiner Arbeit durch die Bereitstellen der Operationspräparate.

Danksagung

Frau M. Castro und Herrn Dr. rer. nat. B. Baumgärtner, Laserforschungszentrum der Urologie, Klinikum der LMU, Großhadern und Mitarbeitern danke ich für die Überlassung der GFP-transfizierten Bronchialepithel-Karzinom-Zelllinie.

Der Klinik für Strahlentherapie des Klinikums Innenstadt der LMU und Herrn. Dipl. phys. B. Winklhofer Danke ich für die Unterstützung durch die Bestrahlung der Kulturen.

Den Mitarbeitern der Abteilung klinische Pharmakologie und ihrem Leiter, Herrn Prof. Dr. med. S. Endres, sei für die Unterstützung der Arbeit durch Benutzung des FACS-Gerätes und die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft bei der Planung besonders gedankt.

Bei meinen Mitdoktoranden D. Kraijciová, P. Lingk, E. Stauß, J. Stief, möchte ich mich für die nette und gute Zusammenarbeit bedanken. Ebenso bei allen anderen Mitarbeitern der Pneumologie: Stellvertretend seien Herr PD Dr. med. H. Hautmann, Frau Dr. med. K. Brückner, Frau Dr. med. S. Astner, Frau Dr. med. D. Stratakis, Herr M. Kreidenweis und Frau A. Kemp da Silva genannt.

Allen Personen, die an der Ausbildung meiner medizinischen und menschlichen Kompetenzen beteiligt waren, bin ich zu tiefem Dank verpflichtet.

12 Lebenslauf

Persönliche Daten: Name: Edelmann
Vorname: Martin
Geburtsdatum/- ort 21.05.1974 in Ellwangen/ Jagst
seit 09/97 verheiratet mit Tina Edelmann
Tochter Clara, geb. 2002
Tochter Luzia, geb. 2004

Schulbildung: 08/1983- 06/1994 Kopernikus-Gymnasium Wasseralfingen
11.06.1994 Abitur (Deutsch, Biologie, Philosophie),
Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst: von 08/1994 bis 12/1995 bei Malteser Hilfsdienst,
Kreisgeschäftsstelle Aalen, als Rettungssanitäter und Ausbilder

Studium: 05/1996 Studium der Humanmedizin an der LMU München
08/1998 Ärztliche Vorprüfung
08/1999 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2002 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2003 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Doktorarbeit: seit April 1999 bei OA Prof. Dr. med. R.M. Huber, Pneumologie,
Med. Klinik-Innenstadt, Klinikum der LMU.

Lebenslauf

<u>Praktisches Jahr:</u>	<p>1. Tertial Innere Medizin (medizinische Klinik-Innenstadt, Klinikum der LMU München, Ziemssenstr.1), in der Abteilung für Pneumologie,</p> <p>2. Tertial Chirurgie (Chirurgische Klinik, Klinikum Großhadern) in der Abteilung für Gefäßchirurgie und Allgemeinchirurgie.</p> <p>3. Tertial Anästhesie (Klinik für Anästhesiologie, Innenstadt, Klinikum der LMU München, und auf der Herzchir. Intensiv am Augustinum)</p>
<u>Studienabschluss</u>	20.05.2003
<u>Berufliche Tätigkeit</u>	<p>seit 01.10.2003 Arzt im Praktikum an der Medizinischen Klinik-Innenstadt, Klinikum der LMU München.</p> <p>Seit 1.10.2004 Assistenzarzt an der Medizinischen Klinik-Innenstadt, Klinikum der LMU München.</p> <p>Ab 01.02.2005 Post-Doc an der University of Massachusetts, USA, Dpt. of Physiology.</p>