

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Zelllinien

Bezeichnung	Tumorart	Besonderheiten	Quelle
Jurkat neo	humane akute lymphoide Leukämie		Dr. K. Tomaselli, USA
CEM neo	humane akute lymphoide Leukämie		Dr. M. Peter, USA
K562	humane chronisch myeloide Leukämie		ATCC: Nr. CCL-243
MCF-7	humanes Brustkarzinom	Caspase-3 defizient	Dr. M. Visva, Dixit, USA
MCF-7Bcl X <sub>L</sub>	humanes Brustkarzinom	Caspase-3 defizient Bcl-X <sub>L</sub> Expression	Dr. M. Visva, Dixit, USA
SK-BR-3	humanes Brustkarzinom		Charité/ Berlin
DU145	humanes Prostatakarzinom		Charité/ Berlin
PC 3	humanes Prostatakarzinom		Charité/ Berlin
A-673	humanes Rhabdomyosarkom		ATCC: Nr. CRL-1598
RD-ES	humanes Ewing Sarkom		ATCC: Nr. HTB 166
GLC 4 ADR	humanes Lungenkarzinom	Adriamycin resistent (Doxorubizin)	Dr. J. G.Zijlstra, NL
GLC 4	humanes Lungenkarzinom		Dr. J. G.Zijlstra, NL
HT29	humanes Kolonkarzinom		ATCC: Nr. HTB38

Die PBMC wurden aus Vollblut freiwilliger Spender und die Mausmilzsuspension aus RAG-1<sup>-/-</sup> Mäusen isoliert.

### 3.1.2 Anti-human Antikörper

Antikörper	Firma	Verdünnung für FACS-Färbung
Human HLA-ABC –FITC	Coulter Immunotech	1:100
Mouse IgG2a -FITC (Isotyp)	Coulter Immunotech	1:100

### 3.1.3 Chemikalien und Narkotika

Bezeichnung	Firma
BSA	Biomol
DMSO	Sigma
Kodan	Schülke&Mayr
Halothan	Sigma
Narketan ( Ketamin)	Chassot
Rompun (Xylazin, Sol 2 %)	CEVA
Trypanblau	Merck

### 3.1.4 Medien, Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Firma
BSA	Biomol
DMSO	Sigma
Kodan	Schülke&Mayr
Halothan	Sigma
Narketan ( Ketamin)	Chassot

Rompun (Xylazin, Sol 2 %)	CEVA
Trypanblau	Merck

Das Zellkulturmedium RPMI 1640 wurde von der Firma Invitrogen bezogen.

### **Kits**

Das Quick Cell Proliferation Assay Kit (WST) zur Vitalitäts-Überprüfung und das LDH-Kit für den Zytotoxizitäts-Test wurden von der Firma Roche bezogen.

### **3.1.5 Geräte und Verbrauchsmaterial**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>
Lichtmikroskop	Olympus
Zentrifuge	Heraeus
Pipetten	Gilson
Multipipetten	Integra
FACScan	Becton Dickinson
Cs-Bestrahlungsquelle (Biobeam 2000)	Steuerungstechnik & Strahlenschutz GmbH
Maxisorb-Platten	Nunc
ELISA-Reader	Molecular Devices
Zellzähler (Casy-1)	Schärfe System
Waage Roth-1 Compact Waage,	OHAUS Corp.
Rasierapparat	Wella
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific Co. Series 25

Verbrauchsmaterial für Zellkultur (sterile Pipetten, Flaschen, Röhrchen, etc) wurden von Nunc, Greiner, Falcon, Eppendorf und Schleicher & Schüll bezogen.

### 3.1.6 Computerprogramme zur Datenerfassung und Auswertung

Software	
Windows NT, 2000	Betriebssystem
MS-Office 2000	Textverarbeitung, Tabellenkalkulation
Softmax Pro 3.0	Absorptionsmessungen (WST und LDH-Test
GraphPad Prism 3.0	Auswertung der Tumormodelle
FCS Express	Auswertung der FACS-Daten
Pubmed	Literaturrecherche
Reference Manager 10	Literaturverwaltung

### 3.1.7 Versuchstiere

#### RAG-1<sup>-/-</sup> defiziente Mäuse und Nude Mäuse

Die im Rahmen dieser Studie verwendeten immundefizienten Mäuse (RAG-1<sup>-/-</sup>/BL6; Nude/ BL6) wurden im Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (jetzt Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)) gezüchtet. Fütterung und Tränke erfolgten *ad libitum* mit hochkalorischen Pellets und destilliertem Wasser. Die Tiere wurden in Gruppen mit je 5 Tieren in Macrolonkäfigen, die mit Filterhauben versehen waren, auf staubfreier Einstreu gehalten. Wasser und Einstreu wurden einmal wöchentlich gewechselt. Die Temperatur betrug konstante 25°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70 %. Während der gesamten Versuchsdauer unterlagen die Mäuse einem Tag-Nacht-Rhythmus. (Genehmigungsnummer: G 0295/01)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

Alle Zellen wurden in RPMI-Medium/ 10 % FKS ohne Zusatz von Antibiotika unter Standardbrutbedingungen von 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Dreimal pro Woche wurde die Zellsuspension auf ein Inokulum von 1x10<sup>5</sup> Zellen pro ml verdünnt, um eine regelmäßige Proliferation zu gewährleisten. Für Experimente wurde aus dieser Kultur

ein Aliquot entnommen, die Zellen wurden abzentrifugiert und mit frischem RPMI auf die jeweilige Zelldichte eingestellt.

### **3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zellen aus anderen Instituten wurden erst auf Mykoplasmen untersucht, anschließend expandiert und eingefroren. Dazu wurden die Zellen pelletiert (5 min, 400 g, Raumtemperatur) und das resultierende Pellet mit einer Zelldichte von maximal  $1 \times 10^7$  Zellen pro ml in Einfriermedium aufgenommen. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in Einfrierröhrchen pipettiert, welche für die ersten 24 Stunden bei  $-70^\circ\text{C}$  inkubiert wurden und für die längere Aufbewahrung in einen Stickstofftank überführt wurden.

Zum Auftauen wurden die Einfrierröhrchen mit Zellen dem Stickstofftank entnommen und im  $37^\circ\text{C}$ -Wasserbad so schnell wie möglich aufgetaut. Der Inhalt des Röhrchens wurde zu 10 ml Auftaumedium gegeben und bei Raumtemperatur für 5 min bei 400 g zentrifugiert. Das Pellet wurde für die Zellzählung in Kulturmedium resuspendiert.

### **3.2.3 Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen**

Die Anzahl vitaler Zellen wurde vor jedem *in vitro* oder *in vivo* Versuch überprüft. Zuerst wurden  $10 \mu\text{l}$  der Zellsuspension mit  $10 \mu\text{l}$  Trypanblau vermischt. Eine Neubauerzählkammer ( $0,1 \text{ mm}$  Tiefe,  $0,0025 \text{ mm}^2$  Fläche) wurde mit dieser Mischung beschickt. Anschließend wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die vitalen, hellen und ungefärbten Zellen waren deutlich von den toten, blau gefärbten Zellen zu differenzieren.

### **3.2.4 Bestimmung der Zelldurchmesser**

Mit Hilfe des Zellanalysegerätes (Schärfe System) konnte der Durchmesser der einzelnen Zelllinien bestimmt werden. Die Messbereichsdynamik dieses Zellanalysegerätes beruht auf einer Kombination aus dem „Widerstandsmessprinzip“ und der „Pulsflächenanalyse“. Zur Messung werden die Zellen in einem schwachen Elektrolyten suspendiert und mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Kapillare definierter Geometrie gesaugt. Beim Durchtritt durch die Kapillare verdrängen die Zellen eine ihrem Volumen entsprechende Menge der Elektrolytlösung. Diese Widerstandsänderung ist ein Maß für das Volumen der Zellen. Aus den

Einzelmessungen wird dann das Integral des Messsignals (Pulsflächenanalyse) berechnet. Aus der volumenlinearen Originalverteilung wird eine durchmesserlineare Größenverteilung berechnet.

### **3.2.5 Zellvorbereitung der zu injizierenden Tumorzellen**

Die *in vitro* gewachsenen Tumorzelllinien müssen für die Injektion in einem guten Zustand sein. Es dürfen nur wenig tote Zellen und keine Verkeimungen zu sehen sein. Adhärenten Zellen sollen zu 70-80 % konfluent vorliegen. Es werden pro Zelltyp insgesamt  $1,6 \times 10^8$  Zellen benötigt.

Bei den adhärennten Zelllinien wurde der Überstand abgenommen, die Zellen mit 15 ml PBS gewaschen und mit 3 ml Trypsin von ihrer Unterlage abgelöst, anschließend mit 7 ml RPMI/ 10 % FCS aufgefüllt und abzentrifugiert. Die Zellen wurden dann in PBS resuspendiert und anschließend mit Hilfe der Neubauerzählkammer gezählt. Dabei wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt um gleichzeitig ihre Vitalität zu überprüfen. Anschließend wurden die Zellen in drei Konzentrationen aliquotiert:

- 1)  $1 \times 10^6$  Zellen plus 50  $\mu$ l PBS pro Maus pro Seite, d.h. für fünf Mäuse à zwei Seiten:  $10 \times 10^6$  Zellen in 500  $\mu$ l PBS
- 2)  $5 \times 10^6$  Zellen plus 50  $\mu$ l PBS pro Maus pro Seite, d.h. für fünf Mäuse à zwei Seiten  $50 \times 10^6$  Zellen in 500  $\mu$ l PBS
- 3)  $1 \times 10^7$  Zellen plus 100  $\mu$ l PBS pro Maus pro Seite, d.h. für fünf Mäuse à zwei Seiten  $1 \times 10^7$  Zellen in 1 ml PBS

Bei den semiadhärennten Tumorzelllinien wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, die Flaschen anschließend mit 10 ml RPMI/ 10 % FCS aufgefüllt und die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber von dem Boden der Zellkulturflasche abgehoben. Die Zellen wurden ebenfalls zentrifugiert, in PBS resuspendiert, gezählt, mit Trypanblau kontrolliert und die Konzentration eingestellt.

Die Suspensionszellen wurden zentrifugiert, mit PBS resuspendiert, gezählt, ebenfalls mit Trypanblau kontrolliert und auf die Endkonzentration eingestellt.

Die Zellen wurden stets frisch aliquotiert und auf Eis zur Schleuse in den Tierstallbereich transportiert.

### 3.2.6 Tierversuche

#### 3.2.6.1 Mausvorbereitung zur Tumorzell-Injektion

Zwei Tage vor der Zellinjektion wurden die Tiere bestrahlt. Dazu wurde ein eigens für diesen Zweck erdachter Bestrahlungsbehälter in der hausinternen Werkstatt konstruiert. Der Bestrahlungsbehälter besteht aus vier Kammern, die jeweils in drei Unterkammern unterteilt sind. Der Behälter wurde unter der Sterilbank gereinigt und desinfiziert. Die Mäuse wurden in Gruppen, bestehend aus fünf Tieren, unter der Sterilbank aus ihrer Box in den Bestrahlungsbehälter in die Kammern B und C gesetzt. Diese Kammern befinden sich im mittleren Bereich des Bestrahlungsbehälters und sorgen somit für eine standardisierte Bestrahlungsintensität. Die Mäuse wurden in diesem Behälter aus dem Tierstallbereich durch die Materialschleuse ausgeschleust, mit dem Fahrstuhl in den Keller zum Bestrahlungsraum transportiert, dort in das Bestrahlungsgerät eingesetzt und bei 4 Gray (1 Gray = 100 rad) für 1,23 Minuten bestrahlt.

Eine Stunde vor der Injektion der Tumorzellen wurden die Mäuse auf 0,1 g genau gewogen und mit Hilfe eines Scores zur Abschätzung der Schwere von Schmerzen, Leiden und Schäden bei Versuchstieren (Morten und Griffiths 1985) untersucht:

#### 3.2.6.2 Körpergewicht

Beschreibung	Punkte
unbeeinflusst oder Anstieg	1
Änderung < 5 %	2
Futter/Wasseraufnahme vorhanden, aber beeinträchtigt, Gewichtsreduktion 10 bis 15 %	3
Futterverweigerung, Gewichtsreduktion 20 %	4

#### 3.2.6.3 Allgemeinzustand

Beschreibung	Punkte
Fell glatt, glänzend (Körperpflege), Körperöffnungen sauber, Augen klar, glänzend	1
Felldefekt (verminderte Körperpflege)	2
Fell stumpf, ungeordnet, verklebte Körperöffnungen, Augen trüb	3
schmutziges Fell, Körperöffnung ungepflegt, unnormale Haltung, Augen trüb	4

### 3.2.6.4 Klinische Befunde

Beschreibung	Punkte
Atmung und Herzfrequenz normal, Extremitäten warm, Schleimhäute gut durchblutet und gesund	1
schwache Abweichung des obigen Befundes	2
Atmung und Herzfrequenz + 30 %	3
Atmung und Herzfrequenz + oder - > 50 %	4

### 3.2.6.5 Spontanverhalten

Beschreibung	Punkte
normales motorisches und sonstiges Verhalten (Schlafen, Neugier, Sozialkontakt)	1
geringe Abweichungen	2
abnormales Verhalten, eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik, nicht ansprechbar, Tiere liegen isoliert, kein Tagesrhythmus	3
ungewöhnliche Laute, Expirationsgeräusch, Selbstamputation, abweichende Körperlage	4

### 3.2.6.6 Subkutane Injektion der Tumorzellen

Vor der subkutanen Zellinjektion wurden die Mäuse in der Narkosebox durch ein mit Halothan getränktes Tuch (ca.1 ml) narkotisiert und an den zu injizierenden Stellen (rechte und linke Schulter) rasiert und desinfiziert.

Die zu verabreichende Zellsuspension wurde gevortext bevor 200 µl mit einer 26G Kanüle in eine 1 ml Spritze aufgezogen wurden. Es wurde für jede Maus eine frische Kanüle und Spritze verwendet. Die Suspension wurde luftblasenfrei aufgezogen, um Konzentrationsschwankungen zu vermeiden. Die Kanüle wurde in Höhe der letzten Rippen in Richtung Schulterblatt eingestochen und die Zellsuspension abgesetzt.

Bei den ersten Versuchen (TV\_1) wurde eine Inhalationsnarkose verwendet, bei allen weiteren Versuchen (TV\_2-3) wurde mit einer Injektionsnarkose gearbeitet, um die Narkosezeit zu verlängern und somit die Injektion zu optimieren.

Für die Injektionsnarkose wurde eine Kombination aus sich ergänzenden Substanzen verwendet, indem ein Neuroleptikum, hier Ketavet ( Ketamin ), das entspannt und beruhigt, mit einem Analgetikum, hier Rompun (Xylazin), das insbesondere die

Schmerzempfindung unterdrückt, gemischt wurde. Diese Mischspritze wurde der Maus intraperitoneal appliziert. Der Wirkungseintritt war durch die intraperitoneale Applikation leicht verzögert und lag zwischen 30 Sekunden und einer Minute. Für ca. 30 Minuten befand sich die Maus im tiefen Narkosestadium die Narkoselänge und -tiefe ist variabel und hängt von der Dosis ab. Eine 1 ml Mischspritze besteht aus 800 µl PBS, 100 µl Xylazin und 100 µl Ketamin. Aus dieser Mischspritze wurden abhängig vom Mausgewicht zwischen 200 und 250 µl intraperitoneal injiziert. Dazu wurde die Maus wie folgt fixiert:

Die linke Hand fixiert das Nackenfell, dazu wurde die Maus vorher auf das Gitter gedrückt und dann mit dem Daumen und mit dem Zeigefinger festgehalten und zwischen dem Ringfinger und dem kleinen Finger wurde der Schwanzansatz fixiert. In das gut fixierte Tier wurde mit einer kurzen Kanüle im unteren Quadranten, ca. 1 cm von der Mittellinie, parallel zum Hinterbein in die Bauchhöhle eingestochen. Um versehentliche Punktionen von Organen zu vermeiden, war es hilfreich den Kopf nach unten zu halten und auf jeden Fall vor der Injektion zu aspirieren.

### 3.2.6.7 Untersuchung der Mäuse

Die Mäuse wurden über 1-2 Monate dreimal wöchentlich gewogen und auf ihren Gesundheitszustand nach dem Protokoll von Morten und Griffiths (siehe 3.2.2.1.) untersucht. Durch die Messung des Körpergewichtes der Einzeltiere war eine quantitative Größe zur Überwachung des Allgemeinzustandes der Tiere gegeben. Wenn eines der Tiere in den oben genannten Beurteilungskriterien (Score von Morten und Griffiths) 4 Punkte erreicht hatte, wurde der Versuch bei diesem abgebrochen und das Tier euthanasiert. Bezogen auf das Gewicht bedeutete dies ein Abbruch bei einem Gewichtsverlust von über 20 % gegenüber dem Eingangsgewicht. Um die Kriterien an physiologischen unbehandelten Mäusen vergleichen zu können, liefen zu jedem Versuch 1-3 Kontrollmäuse gleichen Alters und Geschlechts mit. Eine Tumorgroße von über 1,5 cm im Durchmesser oder ein ulzerierender Tumor galten ebenfalls als Abbruchkriterium.

### 3.2.6.8 Kontrolle des Wachstumsverlauf der Tumore

Der Längs- und Breitendurchmesser der Tumore wurde dreimal pro Woche mit Hilfe einer Schieblehre gemessen. Die rasierten Stellen erleichterten die Genauigkeit der

Messungen, die auf +/- 0,1 mm genau bestimmt werden konnten. Als untere zuverlässige Messgrenze wurden Tumordurchmesser von 2 mm und einem entsprechendem Tumolvolumen von 4 mm<sup>3</sup> angegeben. Das Tumolvolumen berechnete sich gemäß der Formel  $0,5 \times \text{Länge} \times \text{Breite}^2$ .

### **3.2.7 Tumormodell**

Die Kriterien für ein erfolgreich etabliertes Tumormodell wurden in dem für diese Arbeit zugrunde liegenden Tierversuchsantrag folgendermaßen definiert:

Die humanen Krebszelllinien gelten als erfolgreich etabliert, wenn innerhalb der ersten vier Wochen nach der Injektion ein Volumen von 100 mm<sup>3</sup> erreicht wurde und es sich innerhalb der darauf folgenden vier Wochen mindestens verdoppelt hat. Ein weiteres Kriterium für die erfolgreiche Etablierung der Xenotransplantatmodelle ist, dass innerhalb einer Gruppe mit fünf Tieren mit maximal 10 möglichen Tumoren, mindestens fünf Tumore diese Kriterien erfüllen und die Tag-0-Streuung zwischen diesen fünf Tumoren 12 Tage oder weniger beträgt. Diese Kriterien haben die beiden Lungenkarzinome, die Leukämiezelllinie und der Knochenkrebs mit einer Angehtrate von mindestens 80 % erfüllt.

### **3.2.8 Sektion**

Die Tiere wurden nach Ablauf des Beobachtungszeitraums oder, falls die Abbruchkriterien es erforderten, schon früher mittels Inhalationsnarkose betäubt und anschließend durch Genickbruch getötet. Während der anschließenden Sektion wurden alle Tiere auf makroskopische Veränderungen untersucht und die Parameter stichprobenartig in einem Protokoll festgehalten. Einige Organe und alle Tumore wurden entweder als Frischpräparat in PBS (zur anschließenden FACS Analyse) oder tiefgefroren im Stickstofftank bei -178 °C aufbewahrt. Der größte Teil der Präparate wurde in 4 % Formaldehydlösung konserviert.

### **3.2.9 Zellbiologische Untersuchungen**

#### **3.2.9.1 WST-Proliferationstest**

Als Maß für die Vitalität wird die metabolische Aktivität der Zellen nach Inkubation mit APIT gemessen. Das chromogene Tetrazoliumsalz WST-1 wird durch mitochondriale

Succinatdehydrogenasen lebender Zellen reduktiv aufgespalten, es entsteht ein wasserlösliches Formazansalz. Der WST-Proliferationstest wurde in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte in 3-fach Bestimmung durchgeführt. Dafür wurden am Vortag der Messung pro Loch eine definierte Zellzahl der zu untersuchenden Zellen in einem Volumen von 50 µl ausgesät. Anschließend wurde APIT in absteigenden Konzentrationen ebenfalls in 50 µl RPMI dazugegeben. Am nächsten Tag wurden 25 µl des 1:1,5 im RPMI-Medium verdünnten Tetrazolium-Salz WST-1 zu jedem Ansatz pipettiert. Es folgte eine drei- bis vierstündige Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>, bevor die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 650 nm) in einem Spektrometer (ELISA-Reader) gemessen wurde.

### 3.2.9.2 LDH-Test

Dieser Test basiert auf der Bestimmung der Zelllyse der durch APIT behandelten Zellen anhand der Lactatdehydrogenasemenge im Überstand. Im Überstand vorliegende Lactatdehydrogenase ist in einer gesunden, normal proliferierenden Zellkultur nur in sehr geringem Maße vorhanden, da dieses Enzym im Zytoplasma vorliegt. Durch Membranschädigung wird das Enzym in den Überstand freigesetzt. Zugegebenes NAD<sup>+</sup> wird zu NADH + H<sup>+</sup> reduziert und Laktat wird zu Pyruvat oxidiert. Im zweiten enzymatischen Schritt werden zwei H<sup>+</sup> von NADH + H<sup>+</sup> zum zugegebenen gelben Tetrazoliumsalz transferiert und es entsteht rotes Formazan. Die Formazanmenge korreliert mit der Anzahl an toten Zellen. Die Menge an Lactatdehydrogenase wird enzymatisch durch Umsetzung von gelbem Tetrazoliumsalz in Formazan bestimmt. Dieser rote Farbumschlag wird bei einer Wellenlänge von 490 (Referenzwert von 600 nm) photometrisch bestimmt.

In einer 96-Loch-Mikrotiterplatte werden drei Zelllinien als Triplikate in 50 µl Medium vorgelegt. APIT wird in absteigenden Konzentrationen ebenfalls in RPMI dazugegeben. Die 96-Loch-Mikrotiterplatte wird im Brutschrank über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend werden je 10 µl LDH-Kit in 15 µl RPMI pro Loch zugegeben und die Platte erneut drei bis vier Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 3.2.9.3 Isolierung und Aufbereitung der Zellen aus den Tumoren

Das Xenotransplantatgewebe sowie die Milz der Maus wurden frisch extrahiert und in PBS in 15 ml Tubes transportiert. Sowohl die Milz als auch das Gewebe wurden mit

einem Skalpell in ca. 3 mm<sup>3</sup> große Stücke zerkleinert. Anschließend wurden die zerkleinerten Gewebeteile mit dem Stempel einer 10 ml Spritze durch einen Zellfilter gedrückt. Die Zellfragmente wurden in 10 ml PBS aufgenommen, resuspendiert und bei 1000 rpm 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml PBS aufgenommen. Für die Auftrennung wurde die 10 ml Suspension auf einen Ficoll-Isopaque-Gradienten (5 ml, Dichte: 1,077 g/cm<sup>3</sup>) in einem 50 ml Falcon-Röhrchen aufgetragen. Nach Zentrifugation für 20 min bei 600 g (ohne Bremse) und Raumtemperatur, waren die Zellen als scharfe, milchig-trübe Bande zwischen Ficoll und Gewebeplasma zu erkennen, während die größeren Gewebereste sedimentierten. Mononukleäre Zellen wurden aus dem Blut von gesunden Spendern isoliert. Es wurde Vollblut direkt nach der Blutabnahme verwendet. Für die Aufreinigung der PBMCs wurde das Vollblut mit 2 µl Heparin pro ml Vollblut als Antikoagulanzen versetzt und 1:1 mit PBS verdünnt. 15 ml Ficoll wurden mit 30 ml des PBS-Vollblut-Gemischs überschichtet und bei 600 x g ohne Bremse für 20 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die PBMCs waren als scharfe Bande zwischen Ficoll und Plasma zu erkennen, während Granulozyten und Erythrozyten sedimentierten. Die Zellen wurden abgenommen und 2 x mit PBS gewaschen, d.h. für 5 min bei 400 x g und 4°C zentrifugiert.

Anschließend wurden sowohl die Gewebe- und Mausmilzzellen als auch die mononukleären Zellen abgenommen, in ein neues Röhrchen überführt und zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, indem die Zellen resuspendiert und für 5 min bei 400 g und 20°C zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 6 ml FACS-Puffer aufgenommen und auf drei FACS-Röhrchen verteilt. Das erste Röhrchen blieb unverdünnt, ins zweite Röhrchen wurde der Isotyp in einer 1:100 Verdünnung hinzugegeben. In das dritte Röhrchen kam der Antikörper ebenfalls in einer 1:100 Verdünnung (20 µl). Die Proben wurden für 20 min dunkel und kühl gelagert. Anschließend wurden die Röhrchen mit FACS Puffer aufgefüllt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl FACS Puffer aufgenommen. Anschließend wurden die Proben im FACS Gerät gemessen und mit Hilfe des FCS Express Programms ausgewertet.

#### 3.2.9.4 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie ermöglicht die Erfassung von bis zu zehn verschiedenen Parametern auf Einzelzellebene für eine fast beliebig hohe Anzahl von Zellen. Mit

Standardgeräten, wie dem hier verwendeten FACScan der Firma Becton Dickinson können die morphologischen Eigenschaften, wie Größe und Granularität, nach spezifischer Immunfärbung mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gemessen werden. Das Durchflußzytometer besteht aus einem Flüssigkeits- und einem optischen System. Das Flüssigkeitssystem im Gerät steht unter Druck, der dafür sorgt, dass die Zellen vereinzelt und mit konstanter Geschwindigkeit am Laserstrahl vorbeigeführt werden. Das auftreffende Laserlicht wird in zwei Richtungen gestreut: das nach vorne gestreute Licht (Forwardscatter, FCS) macht den Hauptanteil des gestreuten Lichtes aus und ist ein Maß für die Größe der Zelle. Ein kleinerer Anteil des Lichts wird zur Seite (Sidewardscatter, SSC) gestreut und gibt Auskunft über die Granularität der Zellen. Das Laserlicht regt darüber hinaus die Fluorochrome, mit denen bestimmte Strukturen der Zellen angefärbt wurden, zur Emission von Lichtquanten an, die wie das abgelenkte Laserlicht, auf Sensoren treffen und in elektrische Impulse umgewandelt werden. Die Parameter der gemessenen Ereignisse können entweder im Histogramm (Auftragung der Anzahl der Ereignisse gegen die Intensität) oder gegeneinander im sogenannten Dot Blot (Auftragung der Intensität des Parameters 1 gegen die Intensität des Parameters 2) dargestellt werden. Die Auswertung der Daten erfolgt am PC mit dem Programm FCS Express.

Um die Xenotransplantate auf ihren humanen Ursprung zu überprüfen, wurden die Zellen der solide gewachsenen Tumore mittels Durchflußzytometrie untersucht. Mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen die humanen MHC Klasse I Moleküle, die auf der Zellmembran aller kernhaltigen Zellen des menschlichen Körpers existieren, lässt sich das humane Tumorgewebe vom Mausgewebe abgrenzen. Dazu wird der Tumor von der euthanisierten Maus präpariert, mit einem Zellsieb und einem Stempel einer 1 ml Spritze zerkleinert, um eine Einzelsuspension, zu gewinnen. Die Zellen werden dann mit dem mit FITC-markierten Antikörper für 20 min bei 4°C inkubiert, dreimal mit FACS Puffer gewaschen und im FACS analysiert. Um eine unspezifische Antikörperbindung auszuschließen, wird eine Kontrollfärbung mit einem FITC-markiertem Antikörper gleichen Isotyps durchgeführt (Isotypkontrolle). Als Positivkontrolle werden humane PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) und als Negativkontrolle murine Milzzellen verwendet. Um tote Zellen und Zellaggregate von der Analyse auszuschließen, wird die zu analysierende Population als Region definiert. Die Histogramme zeigen die mit dem FITC gekoppelten anti-MHC-Klasse I (ausgefüllt) und die mit der Isotypkontrolle gefärbten Zellen.

### **3.3 Statistik**

#### **3.3.1 Auswertung der *in vitro* Versuche**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte Computer gestützt mit Hilfe der oben genannten Programme durchgeführt. Aufgrund des geringen Umfangs erfolgte eine rein deskriptive Auswertung der Daten.

Die Darstellung der Daten von den untersuchten Tumorzelllinien hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber APIT erfolgte sowohl in tabellarischer als auch graphischer Form. Die Empfindlichkeit der Zelllinien wurde im Diagramm mit interpolierten Linien und den entsprechenden Datenpunkten gezeigt. Die metrisch skalierten Merkmale werden zum einen aus den Verdünnungsstufen von APIT und zum andern aus den Zelllinien, die durch das arithmetische Mittel und den Standardabweichungen charakterisiert wurden gebildet. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei Replikaten der Rohdaten in Excel 2000<sup>®</sup> berechnet. Die Rohdaten der WST-Tests wurden mit Hilfe des Absorptionsmessgerätes (Spectramax) ermittelt, wobei die Werte die optische Dichte der einzelnen Löcher (der 96-Loch-Mikrotiterplatte) erfassen. Die optische Dichte (OD) korreliert direkt mit der Vitalität der Zellen. Im Diagramm wurde die OD der unbehandelten Zellen gleich 100% vital gewertet. Die Mittelwerte wurden so aufgetragen, dass sie den Vitalitätsverlust einer Zelllinie bei einer bestimmten Konzentration (120; 60; 30; 15; 7,5; 3,75 ng/ ml) an APIT angeben. Der IC<sub>50</sub>-Wert der Zelllinien beschreibt die APIT Konzentration, die benötigt wird, um eine Abnahme der Vitalität der Zellen um 50 % zu erreichen. Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden anhand der aufgestellten Diagramme abgelesen.

Die im Zellanalysegerät (Casy1<sup>®</sup>) ermittelten Durchmesser der Zellen (Jurkat neo; A673, CEM neo und GLC 4) wurden rein explorativ analysiert und in Excel 2000<sup>®</sup> ausgewertet. Es wurde der arithmetische Mittelwert, samt Standardabweichungen gebildet. Die Größe der einzelnen Zellen wurde zum Vergleich in einem Säulendiagramm dargestellt, ebenso die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte. Diese Ergebnisse beziehen sich ausschließlich auf die vier untersuchten Zelllinien und können nur bedingt auf alle Krebszelllinien übertragen werden.

#### **3.3.2 Auswertung der *in vivo* Versuche**

Die Tumorgröße wurde mit Hilfe einer Schieblehre gemessen. Dabei wurde zweidimensional verfahren. Der größte Durchmesser entspricht der Länge, im rechten

Winkel dazu gemessen ergibt sich die Breite des Tumors. Die Tumore wurden alle zwei Tage gemessen.

Für die Berechnung wurden folgende Parameter verwendet:

Als Maß für die Tumorgöße wurde das Tumolvolumen verwendet.

**Tumolvolumen:**  $TV = 0,5 \times \text{Länge} \times \text{Breite}^2$

Die Tumorverdopplungszeit stellt ein wichtiges Kriterium bei der Etablierung der Xenotransplantate dar.

**Tumorverdopplungszeit:** TD = Zeit in Tagen, die erforderlich ist, um ein relatives Tumolvolumen von 200 % zu erreichen

Das Tumolvolumen (TV) wurde anhand der oben angegebenen Formel in Excel 2000<sup>®</sup> berechnet und in einem Punktdiagramm mit interpolierten Linien dargestellt. Die angegebenen Datenpunkte setzten sich aus der Zeit (in Tagen) und den berechneten Tumorumina dar. In der abschließenden Tabelle (Tabelle 3 unter Pkt. 3.13) wurde das Tumolvolumen samt Tumorverdopplungszeit (TD) angegeben. Die TD wurde in GraphPad Prism 3.0 berechnet. Anschließend wurde der arithmetische Mittelwert der einzelnen Tumore gebildet. Da in dieser Arbeit keine Therapieversuche berücksichtigt wurden und keine Ausreißer unter den Tumorumina bestanden, wurde der arithmetische Mittelwert dem Median vorgezogen.

Das Mausegewicht wurde ebenfalls im arithmetischen Mittel angegeben und gegen die Zeit in einem Punktdiagramm mit interpolierten Linien aufgetragen.