

Tumorstammzellmarker beim Ovarial- und  
Mammakarzinom:  
Bedeutung der ALDH Aktivität und der CDCP1 Expression

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Kokorsch, Philipp

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. C. Lengerke

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Bitzer

Meinen Großeltern

**Inhaltsverzeichnis**

<b>A Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Die Krebsstammzellhypothese.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Die Aldehyddehydrogenase .....</b>	<b>4</b>
2.1 Funktionelle Bedeutung .....	4
2.2 Aldefluor-Assay zum funktionellen Nachweis der ALDH Aktivität .....	6
2.3 ALDH Aktivität als Stammzellmarker bei gesundem und malignem Brustgewebe, Bedeutung für die klinische Prognose .....	6
2.4 ALDH Aktivität als Stammzellmarker bei malignem Lungengewebe, Bedeutung für die klinische Prognose .....	7
2.5 ALDH Aktivität bei sonstigen malignen Tumoren .....	8
2.6 Bedeutung der ALDH Aktivität bei Resistenz gegenüber Chemotherapie und Metastasierung .....	9
<b>3. CUB-Domain-Containing Protein 1 (CDCP1) .....</b>	<b>10</b>
3.1 Aufbau und funktionelle Bedeutung .....	10
3.2 CDCP1 als Stammzellmarker von gesundem und malignem Gewebe .....	10
3.3 Klinische Bedeutung von CDCP1 .....	11
<b>4. Fragestellung.....</b>	<b>12</b>
<b>B Material und Methoden .....</b>	<b>14</b>
<b>1. Material .....</b>	<b>14</b>
1.1 Geräte .....	14
1.2 Verbrauchsmaterialien .....	15
1.3 Chemikalien, Reagenzien, Puffer, Kits, Medien mit Zusatz.....	15
1.4 Antikörper.....	16
1.5 Zelllinien .....	17
1.6. Zusammensetzung der Medien .....	18
<b>2. Methoden.....</b>	<b>18</b>
2.1 Zellkultur .....	18

2.1.1	Kultivierungsbedingungen .....	18
2.1.2	Passagieren.....	18
2.1.3	Zählen der Zellen.....	20
2.1.4	Sphären-Assay .....	20
2.1.5	Gewebeverdau .....	21
2.1.6	Einfrieren von Zellen.....	22
2.2	Durchflusszytometrie .....	22
2.2.1	Erläuterungen .....	22
2.2.2	Färbung .....	23
2.2.2.1	Aldefluor-Assay.....	23
2.2.2.2	Aldefluor- und CDCP1-Färbung kombiniert.....	26
2.3	Immunphänotypisierung und Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) .....	27
2.3.1	Erläuterung .....	27
2.3.2	Durchführung einer immunphänotypischen Analyse.....	28
2.4	Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) .....	30
2.5	Zellzyklusanalyse.....	33
<b>C Ergebnisse.....</b>		<b>34</b>
<b>1. Analyse der Expression der Tumorstammzellmarker .....</b>		<b>34</b>
1.1	ALDH Aktivität in den Zelllinien des Mammakarzinoms, des Ovarialkarzinoms und des Bronchialkarzinoms.....	34
1.2	CDCP1 Expression in den Zelllinien des Mammakarzinoms, des Ovarialkarzinoms und des Bronchialkarzinoms.....	36
<b>2. Funktionelle Untersuchungen zu CDCP1 und ALDH als Stammzellmarker</b>		<b>39</b>
2.1	Etablierung des Tumorsphären-Assays für Karzinomzellen.....	39
2.2	Untersuchung der Bedeutung der CDCP1 Expression als Stammzellmarker anhand der Mammakarzinomzelllinie SK-BR-3.....	40
2.3	Untersuchung der Bedeutung der Koexpression von CDCP1 und ALDH als Stammzellmarker anhand der Mammakarzinomzelllinie SK-BR-3.....	42
2.4	Untersuchung der Bedeutung der ALDH Aktivität als Stammzellmarker beim Ovarialkarzinom anhand der Tumorstammzelllinie OVCAR-3 .....	44

2.5	Untersuchung der Bedeutung der ALDH Aktivität als Stammzellmarker bei Primärgewebe des Ovarialkarzinoms .....	46
<b>3.</b>	<b>Zellzyklusanalyse in Abhängigkeit vom ALDH Status bei OVCAR-3.....</b>	<b>47</b>
<b>4.</b>	<b>Instabilität der ALDH Aktivität <i>in vitro</i> bei OVCAR-3 .....</b>	<b>48</b>
<b>D</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>50</b>
1.	Expression der ALDH .....	50
2.	Expression des CDCP1 Proteins.....	51
3.	Etablierung eines Tumorsphären-Assays für Ovarialkarzinomzellen .....	53
4.	Untersuchung des Stammzellpotentials CDCP1 positiver Zellen.....	54
5.	Co-Untersuchung von ALDH Aktivität und CDCP1 Expression.....	56
6.	Untersuchung des Tumorstammzellpotentials der ALDH positiven Subpopulation beim Ovarialkarzinom .....	58
7.	Erweiterte funktionelle und molekulare Analysen Aldefluor positiver versus negativer Ovarialkarzinomzellen .....	60
<b>E</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>62</b>
<b>F</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>65</b>
<b>G</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>69</b>
1.	Aldefluorfärbung .....	69
2.	Abbildungsverzeichnis .....	71
3.	Tabellenverzeichnis .....	72
4.	Abkürzungsverzeichnis .....	73
<b>H</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil .....</b>	<b>75</b>

## A Einleitung

### 1. Die Krebsstammzellhypothese

Stammzellen sind Zellen, die sich sowohl selbst erneuern als auch differenzieren können. Sie stellen daher in vielen Organen die Quelle für deren Regeneration dar. So kann beispielsweise eine murine hämatopoetische Stammzelle nach Transplantation die komplette Hämatopoese mit allen Blutzellreihen in einer adulten Maus wiederherstellen [1].

Vor einigen Jahren wurde die Stammzellhypothese ebenfalls innerhalb von Tumorerkrankungen überprüft.

Der Krebsstammzellhypothese zufolge existiert innerhalb eines Tumors eine Subpopulation von Zellen, sogenannte *Tumour Initiating Cells* (TIC) oder *Tumorstammzellen* (TSZ), welche in der Lage ist, Tumorstammzellen zu initiieren und aufrechtzuerhalten [2-12]. Demzufolge setzen sich Tumore aus einer zellulären Hierarchie zusammen, welche von den Tumorstammzellen ausgeht und welche ebenso Progenitorzellen und schließlich differenzierte Zellen beinhaltet. Die differenzierten Zellen stellen die Tumorzellmasse dar. Da sie aber weder in der Lage sind sich selbst zu erneuern, noch das Potential besitzen unbegrenzt zu proliferieren, werden diese, anders als die Tumorstammzellen, als nicht tumorigen angesehen.

Die Tumorstammzellhypothese konnte zum ersten Mal 1997 mit *in vivo* experimentellen Daten belegt werden. Pionierarbeiten von der Forschungsgruppe von John Dick in Toronto, Canada, zeigten, dass menschliche leukämische Blasten, die das Stammzellantigen CD34 exprimieren, nach Transplantation in immunpermissive Mäuse Leukämien induzieren konnten, während leukämische Zellen desselben Patienten, die

dieses Antigen nicht trugen, dazu nicht in der Lage waren [3]. Dieses Phänomen wurde später auf solide Tumoren übertragen, unter anderem auch auf das Mamma-, Ovarial-, und Lungenkarzinom [4, 13, 14].

So konnten Al-Hajj et al. eine Population mit Stammzelleigenschaften und den oberflächlichen Stammzellmarkern CD44+/CD24-/lin- im humanen Mammakarzinom identifizieren. Mit Hilfe der phänotypischen Expression von CD24 und CD44 wurde zum ersten Mal im Brustkrebs ein Kriterium gefunden, mit dem zwischen tumorigenen und nicht tumorigenen Krebszellen unterschieden werden kann. Lediglich der CD44+/CD24- Phänotyp war in der Lage, Tumore *in vivo* im Mausmodell zu erzeugen [4]. Mittlerweile haben sich zusätzliche Marker profiliert, um Populationen epithelialer Krebsstammzellen wie die des Mammakarzinoms zu isolieren. Dazu zählen die Oberflächenmarker CD133 [5], CD90 [15], CD61 [16] und als funktionelle Marker die verminderte Aktivität des 26S Proteasoms bei vermutlichen Tumorstammzellen [17] sowie die Fähigkeit Hoechst 33342 auszuschließen. Hoechst 33342 ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der mit der DNA interkaliert. Er wird von potentiellen Tumorstammzellen mittels erhöhter Expression von Verapamil-sensitivem BCRP1 (Breast Cancer Resistance Protein) aus der Zelle transportiert, so dass sich eine farblose tumorigene, sogenannte *Side Population*, abgrenzen lässt [7]. Neben Multipotenz und der Fähigkeit zur Selbsterneuerung zeichnen sich Tumorstammzellen auch durch ihre Resistenz gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung aus. Nach einer anfänglichen Sensibilität entwickelt sich beim Mammakarzinom letztendlich meist eine Resistenz gegenüber der Therapie. Die Tumorrezidive sind wahrscheinlich durch vermehrte Proliferation ursprünglich resistenter Tumorstammzellen zu erklären [18]. So kam es bei Chemotherapie, nachgewiesen durch Xiaoxian et al, zu einer prozentualen Erhöhung der CD44+/CD24-/lin- Population [19]. Ein durch verminderte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bedingter DNA-Schaden bei humanen und murinen Stammzellpopulationen konnte auch bei epithelialen Karzinomen bestätigt werden. Aufgrund diverser Schutzmechanismen entstehen intrazellulär weniger ROS, somit besteht bei Krebsstammzellen ebenfalls eine erhöhte Resistenz gegenüber Bestrahlung [20]. Es ergibt sich daher das klinische Problem, dass



die kleine tumorgenerierende Stammzellpopulation oft therapeutisch schwer zu erreichen ist und durch konventionelle Therapien gegebenenfalls nur die differenzierte Tumorzellmasse bekämpft wird. Somit ist bei Tumorpatienten ein Rezidiv häufig unvermeidbar und das Langzeitüberleben vermindert.

Eine weitere Eigenschaft der Tumorstammzellen ist das Wachstum als sphärische Kolonien unter nicht adhärennten Bedingungen. Die Fähigkeit der Stammzellen und Tumorstammzellen in Suspension in Anwesenheit von FGF und EGF zu proliferieren, wurde im Sphären-Assay zunächst bei neuralen Stammzellen beobachtet [21]. Folgeexperimente konnten zeigen, dass verschiedene Typen von humanen epithelialen Stammzellen (z.B. der Brust) ebenfalls diese Eigenschaft besitzen [22]. Die nicht adhärennten Sphären werden entsprechend als *Neurosphären*, für neurale Stammzellen, bzw. als *Mammosphären*, für Brustkrebszellen, oder generell als *Tumorsphären* bezeichnet. Eine Färbung von Mammosphären hat gezeigt, dass diese Kolonien nicht nur aus Zellen bestehen, sondern auch aus extrazellulärer Matrix. 20% der Sphären enthalten Laminin, bei allen Sphären wurden embryonale Komponenten der extrazellulären Matrix wie Decorin und Tenascin nachgewiesen [22]. Mittels dieses Kultivierungsverfahrens, auch als Sphären-Assay bezeichnet, ist ein Surrogat-Assay zum Nachweis und zur Anreicherung von potentiellen Tumorstammzellen mit tumorinitiierendem Potential möglich. Es ist nicht bekannt, ob die Fähigkeit zur Sphärenbildung auf alle epithelialen Gewebstammzellen und Tumorstammzellen übertragbar ist. Insbesondere im Ovarialkarzinom war diese Eigenschaft zu Beginn unserer Studie noch nicht bestätigt worden.

Eine weitere wichtige Frage ist, wie Tumorstammzellen entstehen. Es wurde gezeigt, dass sie durch Akquisition einer genetischen Mutation in normalen Stammzellen entstehen können, wie beispielsweise bei der chronischen myeloischen Leukämie [23, 24] oder aber auch durch genetische Veränderung von differenzierteren Progenitorzellen, die dann, wie bei bestimmten Formen der akuten myeloischen Leukämie beschrieben, Selbsterneuerungseigenschaften erhalten und dadurch Stammzellcharakter übertragen bekommen [25].

Ungleich der Situation im gesunden Gewebe, in dem Stammzellen sehr seltene Populationen darstellen, variiert die Frequenz der Tumorstammzellen stark in Abhängigkeit von Tumorart und -aggressivität sowie dem klinischen Stadium der Tumorerkrankung von beispielsweise  $<0,1$  bis  $>50\%$  der gesamten Tumorzellmasse [18].

## 2. Die Aldehyddehydrogenase

### 2.1 Funktionelle Bedeutung

Wie oben dargelegt, sind die Identifizierung und Isolation von Tumorstammzellen sehr wichtige wissenschaftliche Ziele. Neben den oben erwähnten Oberflächen- und funktionellen Markern sowie dem Sphären-Assay ist man in den letzten Jahren auf einen neuen funktionellen Marker aufmerksam geworden, welcher in Stammzellen in verschiedenen gesunden und malignen Geweben exprimiert wird. Es handelt sich um das Enzym Aldehyddehydrogenase (ALDH) und insbesondere um dessen Isoform ALDH1. Zellen mit einer erhöhten Aktivität dieses Enzyms weisen in bestimmten Geweben Stammzeleigenschaften auf. Die ALDH Enzymfamilie ist genauso wie die Cytochrom P450-Familie in Phase1-Reaktionen der Biotransformation involviert, spielt dabei aber eine wesentlich geringere Rolle. Nur wenige dieser Enzyme katalysieren xenobiotische Reaktionen, wobei sie auf ein enges Spektrum an Substraten ansprechen. ALDHs katalysieren oxidativ die von Pyridinnukleotiden abhängige Umwandlung der Aldehyde zu Säuren, Oxidationsmittel sind entweder  $\text{NAD}^+$  oder  $\text{NADP}^+$ . Aktuell rechnet man 17 Enzym-Isoformen zur ALDH-Superfamilie [26], deren Familien und Subfamilien in Abhängigkeit ihrer Aminosäuren eingeteilt werden. Es gibt zehn Familien und 13 Subfamilien [12]. Ihr Vorkommen verteilt sich bis auf wenige Ausnahmen auf das gesamte Gewebe. Die höchsten Konzentrationen werden in Leber und Nieren gemessen. ALDHs befinden sich intrazellulär entweder im Zytosol, in den Mitochondrien oder im endoplasmatischen Retikulum. ALDH1A1 konnte vor

allem im Zytosol nachgewiesen werden. ALDH1A1 katalysiert zusammen mit ALDH1A2, ALDH1A3 und ALDH8A1 die Oxidation von Retinal zur Retinolsäure, welche als Ligand bei der Transduktion des Retinolsäuresignalwegs die Genexpression reguliert [12]. Ferner wirkt es zusammen mit ALDH3A1 beim Metabolismus von Aldehyden mit, die während der Peroxidation von Lipiden entstehen. Dabei wird das Zwischenprodukt 4-Hydroxynonenal (4-HNE) verstoffwechselt, welches die Ursache für diverse Erkrankungen wie Retinopathie, Katarakt oder neurodegenerative Phänomene sein kann [12]. Beim Abbau des Ethanol wird die Oxidation des Acetaldehyds zu Acetacetat unter anderem von ALDH1A1 katalysiert, wobei hier jedoch hauptsächlich ALDH2 aufgrund ihrer niedrigeren Michaeliskonstante ( $K_m$ ) metabolisch aktiv ist. ALDH1A1 katalysiert auch eine weitere Reaktion zweier Zwischenprodukte des Cyclophosphamid und Ifosfamidmetabolismus. Die zwei Aldehyde Aldophosphamid und Aldoifosfamid werden entgiftet, wobei Carboxyphosphamid und Carboxyifosfamid entstehen [27]. Des Weiteren bindet ALDH1A1 das Zytostatikum Flavopiridol [28], es kommt daher konzentrationsabhängig zu einer verminderten Zytotoxizität. Somit hat ALDH1A1 einerseits große Bedeutung in der artgerechten Entwicklung des Individuums, andererseits schützt es den Organismus vor schädlichen Einflüssen, zum Beispiel in Form von zytotoxischen Agentien wie den in der Tumorthherapie eingesetzten Zytostatika, vor allem den Oxazaphosphorinen Cyclophosphamid und Ifosfamid. Es wurde gezeigt, dass Brustkrebs auf eine Chemotherapie mit Cyclophosphamid wesentlich schlechter anspricht, sobald überdurchschnittliche ALDH1A1 Aktivitäten gemessen wurden. Umgekehrt wurden bei erniedrigter ALDH1A1 Aktivität ein verbessertes klinisches Ansprechen gegenüber dieser Chemotherapie festgestellt [29]. Ähnlich entgiftende Wirkung auf Oxazaphosphorine entfalten ALDH3A1 und ALDH5A1 [26], sie sind jedoch auf Grund einer erhöhten  $K_m$  von geringerer Bedeutung, so dass sich das klinische Ansprechen auf Chemotherapie, z.B. gegen Brustkrebs, unabhängig vom ALDH3A1 Spiegel darstellt [29]. Es wird auch angenommen, dass ALDH1A2, ALDH1A3 und ALDH8A1 an der Entgiftung von Oxazaphosphorinen beteiligt sein können.

## **2.2 Aldefluor-Assay zum funktionellen Nachweis der ALDH Aktivität**

Die ALDH positiven Gewebs- oder Tumorstammzellen werden durch den Aldefluor-Assay angereichert, wobei eine hohe nachgewiesene Aktivität auf das Vorhandensein von potenziellen Stammzellen und Tumorstammzellen hinweist. Aldefluor dient als Substrat der ALDH1 und ALDH3 und fluoresziert nach der Interaktion mit dem Enzym intrazellulär.

Ursprünglich wurde der Aldefluor-Assay entwickelt um die ALDH Aktivität in hämatopoetischen Zellen zu untersuchen [30–32], mittlerweile wurde dieses Verfahren aber auch auf andere Gewebe wie mesenchymales [33], neurales [34] und Brust- [35] und Lungengewebe [36] übertragen.

## **2.3 ALDH Aktivität als Stammzellmarker bei gesundem und malignem**

### **Brustgewebe, Bedeutung für die klinische Prognose**

Aldefluor positive Zellen, welche aus menschlichem Brustgewebe isoliert wurden, weisen Bruststammzeleigenschaften auf. Ginestier et al. zeigten, dass die Aldefluor positive Population, allerdings nicht die Aldefluor negative Population, Mammosphären generieren kann. Ferner wurde beschrieben, dass Aldefluor positive Zellen dissoziierter Mammosphären in der Lage sind sich *in vitro* selbst zu erneuern sowie, dass sie *in vitro* über ein größeres Differenzierungspotential verfügen als Aldefluor negative Zellen [35]. Das Wachstum und die Differenzierung von Aldefluor positiven, negativen und gemischten Zellen wurde zusätzlich *in vivo* mit Hilfe eines Mäusemodells untersucht. Dabei konnte eine Tumorinduktion lediglich bei der Aldefluor positiven und der unsortierten Population nachgewiesen werden [35]. Letztendlich zeigte sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Fähigkeit zur Differenzierung und zu starkem Wachstum bei der Aldefluor positiven Population im Vergleich zur Aldefluor negativen Population. Diese Ergebnisse deuten sowohl auf den Stammzell- als auch auf den Tumorstammzellcharakter der Aldefluor positiven Population hin. Ginestier et al. verdeutlichten die Tumorstammzeleigenschaft Aldefluor positiver Zellen indem sie zeigten, dass diese Population in Kombination mit dem Phänotyp CD44+/CD24-/lin-, welchem

ebenfalls Tumorstammzellpotential nachgesagt wird [4], im Mäusemodell tumorigen wirkte. Dagegen erzeugte die Population CD44+/CD24-/lin-/ALDEFLUOR negativ keine Tumore.

Wendet man das Prinzip der ALDH Expression klinisch an, so zeigt sich bei Brustkrebs, dass das Overall Survival (OS) mit der ALDH1 Expression korreliert. Je höher die Expression von ALDH1 in Tumoren ist, desto schlechter ist die Prognose. So wurde ein verstärktes relatives Risiko von 1,76 ermittelt, an Brustkrebs zu sterben, sofern es sich um Patienten mit ALDH1 positivem Tumor handelt [35]. Viele weitere Studien identifizierten diverse Isotypen der ALDHs als ähnlich schlechte prognostische Faktoren bei Brustkrebs [37].

*In vitro* Untersuchungen von Zelllinien weiterer epithelialer Tumoren haben gezeigt, dass der ALDH positive Anteil der gesamten Zellen in Abhängigkeit seines Ursprungsgewebes variiert. Zum Beispiel ist die durchschnittliche Aldefluor positive Population der Kolonkarzinomzelllinien ( $15,5 \pm 11,5\%$ ) größer als die der Brustkrebszelllinien ( $3,5 \pm 4,8\%$ ) oder der Ovarialkarzinomzelllinien ( $6,2 \pm 13,5\%$ ) [38].

### **2.4 ALDH Aktivität als Stammzellmarker bei malignem Lungengewebe, Bedeutung für die klinische Prognose**

Untersuchungen an nicht kleinzelligen Lungenkrebszelllinien (NSCLC-Zelllinien), wie z.B. A548, liefern hinsichtlich des Tumorstammzellpotentials der ALDH1 exprimierenden Tumorzellen ähnliche Erkenntnisse wie Untersuchungen an Brustkrebszellen. Auch bei NSCLC ist das Isoenzym ALDH1 stark exprimiert. *In vitro* besitzen jene Zellen ein größeres Proliferations- und Differenzierungspotential als die Aldefluor negative Population. Ferner verhalten sich ALDH1 positive Zellen invasiver gegenüber ihrer Umgebung [39]. Dementsprechend kommt es bei ALDH1 Inhibition und Knockdown zu einer verminderten Wachstumsrate und Zellmotilität betroffener Zellen [40]. Ein weiterer Anhaltspunkt für das Tumorstammzellpotential Aldefluor positiver Lungenkrebszellen ist durch die auffällige expressive Überlappung dieser Zellen mit dem Stammzellmarker CD133 gegeben [39]. Entsprechend der

Tumorstammzellhypothese sind ALDH positive Lungenkrebszellen ebenfalls *in vitro* resistenter gegenüber chemotherapeutischen Agentien als ALDH negative Zellen [39]. Auch in *in vivo* Experimenten am Mausmodell hinsichtlich der Generierung von Tumoren und Differenzierung innerhalb von Tumoren zeigt die Aldefluor positive Population Tumorstammzellcharakter [39].

Bei Patienten mit NSCLC zeigt sich, dass die Höhe des Aldefluor positiven Anteils mit dem histologischen Grading und klinischen Staging signifikant korreliert [39]. Wie auch beim Brustkrebs hat das Ausmaß der ALDH1-Hochregulation signifikante prognostische Auswirkungen auf das Fünfjahresüberleben und die krebspezifische Überlebensrate [39].

### **2.5 ALDH Aktivität bei sonstigen malignen Tumoren**

Es wird von malignen Erkrankungen berichtet, bei denen sich zwar eine große ALDH positive Subpopulation nachweisen lässt, diese jedoch nicht spezifisch die Tumorstammzellen zu markieren scheint, da bei jenen Erkrankungen auch Aldefluor negative Zellen gleichwertiges Tumorstammzellpotential besitzen. Dies wurde beim malignen Melanom nachgewiesen. Hier ließ sich bei Aldefluor positiven und Aldefluor negativen Zellen sowohl hinsichtlich der Sphärenformation *in vitro* als auch der Tumorgeneration *in vivo* keine Abhängigkeit vom ALDH Phänotyp ableiten [41]. Es wurde postuliert, dass das maligne Melanom, im Gegensatz zum Brustkrebs oder zum NSCLC, nicht der Krebsstammzellhypothese folgt [41]. Ob dies der Fall ist, oder andere Besonderheiten im Falle dieser Tumorart und beispielsweise der Expression von Markern wie ALDH vorliegen, ist derzeit offen und wird in aktuellen Forschungsprojekten untersucht.

Beim Ovarialkarzinom sind die Daten zur ALDH1 Expression und zur klinischen Prognose derzeit widersprüchlich [42, 43]. Ein Zusammenhang zwischen ALDH-Expression und Tumorstammzellen im Ovarialkarzinom wurde bisher noch nicht eindeutig beschrieben und soll in diesem Projekt weiter untersucht werden.

ALDH Aktivität, bzw. ALDH1 Expression, sind daher nur in manchen Tumoren als Marker aggressiver Erkrankungen und von Tumorstammzellaktivität anzusehen.

## ***2.6 Bedeutung der ALDH Aktivität bei Resistenz gegenüber Chemotherapie und Metastasierung***

Bei ALDH positiven Tumorstammzellen wie den malignen Stammzellen der akuten und chronischen myeloischen Leukämie wird ein erhöhtes Maß an Resistenz gegenüber Chemotherapie beobachtet. Diese basiert auf den oben dargelegten Mechanismen (unter 2.1) sowie auf der erhöhten Expression von ATP-Binding-Cassette (ABC)-Transportern, welche die chemotherapeutischen Agenzien wieder aus der Zelle fördern [44]. Außerdem katalysieren ALDHs als potentielle Stammzellmarker bestimmte Reaktionen, die zusätzliche Resistenzmechanismen darstellen, wie z.B. die Oxidation von Aldophosphamid (siehe 2.1). So wurde unter neoadjuvanter Therapie besonders bei Patienten mit ALDH1 exprimierendem Brustkrebs ein niedrigeres klinisches Ansprechen als bei ALDH1 negativem Brustkrebs beschrieben. Zusätzlich erhöhte sich stellenweise der ALDH1 positive Anteil der Tumorzellmasse unter Chemotherapie [18]. Der relative Anstieg der ALDH positiven Population weist auf die vorhandene Resistenz hin. Es ist daher anzunehmen, dass der Grad der ALDH1 Expression Bedeutung als Marker für die Prognose des Erfolgs einer Chemotherapie bei Brustkrebs hat.

Neben der Funktion als potentieller Marker für Stammzellen, für das Gesamtüberleben sowie für Resistenz gegenüber Chemotherapie hat ALDH zusätzliche Bedeutung hinsichtlich der Beurteilung des metastatischen Potentials bei Brustkrebs. Experimente am Mäusemodell haben gezeigt, dass Metastasierungen vor allem auf Aldefluor positive Zellpopulationen zurückzuführen sind, injizierte Aldefluor negative Zellen entwickelten in Mäusen nur vereinzelt Metastasen [45]. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass ALDH positive TSZ oder TIC ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Metastasierung spielen.

### **3. CUB-Domain-Containing Protein 1 (CDCP1)**

#### **3.1 *Aufbau und funktionelle Bedeutung***

Ein weiteres Protein, das potentiell ein Stammzellmarker ist, ist das CUB-Domain-Containing Protein 1 (CDCP1). Hierbei handelt es sich um ein Transmembranprotein des Typ I, das drei CUB (Complement Protein Subcomponents C1/1r, Urchin Embryonic Growth Factor, and Bone Morphogenetic Protein 1)-Domänen besitzt. Diese Domänen weisen enge strukturelle Ähnlichkeit mit Immunglobulinen auf und wirken bei der Zelladhäsion und Interaktion mit anderen Zellen oder der Matrix mit. Zelladhäsion spielt eine besondere Rolle bei der Zellentwicklung hinsichtlich Überleben, Proliferation und Fortbewegung. Ähnliche Domänen lassen sich sowohl bei weiteren Proteinen nachweisen, die an der Interaktion mit der Umgebung beteiligt sind, als auch bei Wachstumsfaktoren. Intrazellulär gelegene Tyrosinreste dienen der Phosphorylierung [46]. Die Lokalisation des CDCP1 und dessen intrazelluläre Wechselwirkung mit phosphorylierenden Kinasen, unter anderem der Src-Familie [46], deuten eine funktionelle Beteiligung an der von extrazellulär nach intrazellulär verlaufenden Signaltransduktion an. CDCP1 positive Zellen können mit den monoklonalen Antikörpern CUB1–4 markiert werden [47].

#### **3.2 *CDCP1 als Stammzellmarker von gesundem und malignem Gewebe***

Erste Hinweise auf die Bedeutung des CDCP1 als Stammzellmarker ergaben sich durch die Erforschung hämatopoetischer Stammzellen. CDCP1 positive humane Knochenmarkzellen wurden in NOD/SCID Mäuse transplantiert. Das Resultat war ein differenziertes Wachstum jener Zellen über mehrere Generationen hinweg. Darüber hinaus besteht eine Koexpression von CDCP1 mit den humanen Stammzellmarkern CD34 [47, 48] und CD133 [47]. Beide werden auf der Oberfläche hämatopoetischer Stammzellen und früher Progenitorzellen exprimiert und ebenfalls in der Diagnose von Leukämien verwendet, um unreife leukämische Zellen zu markieren [47]. Weitere



Experimente deuten an, dass CDCP1 funktionelle Bedeutung in der frühen Erythropoese hat [47].

CDCP1 wird ebenfalls auf anderen Stammzellen exprimiert (zum Beispiel auf mesenchymalen und neuralen Stammzellen [47]).

Durch den Nachweis von CDCP1 exprimierenden malignen Zellen in Gewebsbiopsien des metastasierenden Brustkrebses, des Lungenkrebses sowie des kolorektalen Karzinoms [47, 49] wurde CDCP1 zum ersten Mal mit humanen Tumoren assoziiert. Hier zeigte sich klinisch bei Brustkrebs, dass das Level der CDCP1 Expression mit der proliferativen Aktivität des Tumors korreliert [50]. Hinsichtlich des Lungenadenokarzinoms ergab ein Knockdown des CDCP1-Gens bei der Zelllinie A549 *in vivo* ein vermindertes metastatisches Potential. *In vitro* verschwand die Fähigkeit Zellkolonien zu bilden [51].

### **3.3 Klinische Bedeutung von CDCP1**

Klinisch zeigt sich beim Adenokarzinom der Lunge eine signifikante Korrelation zwischen einer hohen CDCP1 Expression und Lymphknotenmetastasierung, schlechter Prognose sowie erhöhter Rückfallrate. Auch DFS (Disease-Free Survival) und OS (Overall Survival) hängen von der CDCP1 Expression ab, die in dieser Hinsicht einen unabhängigen prognostischen Faktor darstellt [52]. Auch bei gastrointestinalen Karzinomen untersuchte man den CDCP1 positiven Anteil. Hier korreliert das Maß der CDCP1 Expression ebenfalls mit dem metastatischen Potential sowie der Invasivität [53]. Weitere Hinweise auf das aggressive Tumorpotential von CDCP1 lieferten Untersuchungen von Deryugina et al. in denen Zellen der Zelllinie HeLa mit CDCP1 DNA transfiziert wurden und deren Entwicklung man mit Hilfe von Tiermodellen untersuchte. In der ursprünglich wenig aggressiven Zelllinie löste die CDCP1 Expression eine stärkere Metastasierung aus [54]. Zusätzlich zeigte sich bei *in vitro* Versuchen, dass CDCP1 positive Zellen weniger sensibel gegenüber Chemotherapie (z.B. Doxorubicin) reagierten, was an einer geringeren Apoptoserate zu erkennen war [54].

Die CDCP1-Expression wurde daher als Ansatz bei der Entwicklung von Krebstherapien genutzt. Durch Antikörperbehandlung des CDCP1 beim

Prostatakarzinom im Mäusemodell konnte erfolgreich die Metastasierung inhibiert werden. Der monoklonale Antikörper 25A11 war mit dem Zytotoxin Saporin gekoppelt [55]. Weitere Antikörper wie der monoklonale Antikörper 41-2 haben ähnliche Auswirkung auf die metastatische Kapazität bei Versuchen im Tiermodell. Bei CDCP1 positiven Zellen kommt es durch die Antikörper zu einer direkten Aktivierung der Caspasen [54] und damit zur Apoptose.

#### **4. Fragestellung**

Die bisherigen Erkenntnisse zeigen, dass sowohl ALDH Aktivität als auch CDCP1 Expression in der Tumorbilogie eine Rolle spielen und gegebenenfalls als Marker von Tumorstammzellen oder TIC und somit als verheißungsvoller Ansatz in der Prognose und Therapie von malignen Erkrankungen angesehen werden könnten. In der Tumorforschung setzt man große Hoffnung auf potentielle Stammzellmarker, die die Krebsstammzellen des jeweiligen Tumors identifizieren können.

In dieser Arbeit wurde daher die Expression von ALDH und CDCP1 in verschiedenen Tumortypen sowohl in Zelllinien als auch in Patientengewebe analysiert. Es sollte die Expression der Marker nachgewiesen werden. Anschließend wurde untersucht, ob diese Marker zur Charakterisierung von Tumorstammzellen geeignet sind. Zusätzlich wurden das Differenzierungs- und das Proliferationspotential in Abhängigkeit von der ALDH Aktivität untersucht.

Zunächst wurden Zelllinien des Mamma-, des Ovarial- und des Lungenkarzinoms hinsichtlich der ALDH Aktivität erstmalig analysiert. Dabei wurden die Mammakarzinomzelllinien MCF7, SK-BR-3, MDA-MB-468 und BT-549, die Ovarialkarzinomzelllinien OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-5, NCI/ADR-RES und die Lungenadenokarzinomzelllinie A549 untersucht. Bei den gleichen Zelllinien wurde anschließend eine Analyse der CDCP1 Expression vorgenommen. Als zweckmäßige Methode diente die Durchflusszytometrie.

Das Tumorstammzellpotential der CD44 positiven gegenüber der CD44 negativen Population wurde mittels Sphären-Assays in der SK-BR-3-Zelllinie überprüft. Dabei wurde untersucht, inwieweit es zur Bildung von Mammosphären kommt und ob die Größe der Sphären beeinflusst wird.

Es war ebenfalls von Interesse herauszufinden, ob durch eine Kombination der beiden Marker eine besonders potente Stammzell- bzw. TIC-Fraktion bei Mammakarzinomzelllinien isoliert werden kann.

Da bis dato noch nicht bekannt war, welche Rolle die ALDH Aktivität bei Ovarialkarzinomstammzellen spielt, wurde die Assoziation zwischen hoher ALDH Aktivität und Tumorstammzellpotential hier anhand der Zelllinie OVCAR-3 und in isolierten primären Ovarialkarzinomzellen im Sphären-Assay untersucht. Mögliche Unterschiede in der Differenzierungskapazität und im proliferativen Verhalten Aldefluor positiver und negativer Zellen wurden weiterhin in der Zelldurchflusszytometrie bzw. durch Zellzyklusanalysen in entsprechend aufgetrennten Ovarialkarzinomzelllinien überprüft.

## B Material und Methoden

### 1. Material

#### 1.1 Geräte

Durchflusszytometer	FACSCanto2
FACS	BD FACSAria™ II BD BIOSciences, Worldwide, Immuncytometrie Systems, Pharmingen
Inkubator	Sanyo Co <sub>2</sub> Inkubator, MCO-20 AIC, 215 Liter, UV-Sterilisation, MS- Laborgeräte GmbH
Inverses Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Axiovert 200
LS Column	MACS, Milteny Biotec, Lot.Nr.: 5081127010 Mat.Nr.: 120-000-475
MidiMACS Separator	MACS, Milteny Biotec, Mat.Nr.: 130- 042-302, Lot.Nr.: 5091216076, Serial Nr.: 00080
Mr. Frosty, Einfrierbehälter (-80°C)	Nalgene®, Sigma-Aldrich
Zählkammer Neubauer „Improved“	Hecht Assistent
Videokamera	Pieper GmbH, FK 6990-IQ-S
Thermostatisches Wasserbad	Neolab
Zentrifuge	Heraeus Multifuge 3 S-R, Thermo Scientific

Mikroskop	Nikon, Eclipse TS100
Sicherheitswerkbank	Thermo, Electron Corporation, HERAsafe KS
Midi MACS Separation Unit	Miltenyi Biotec
Akku betriebene Pippetierhilfe	Pipetus®, Hirschmann

Tab. 1: Benötigte Geräte

## 1.2 Verbrauchsmaterialien

Ammoniumchlorid	Stem Cell Systems
Cell Strainer	BD Falcon, BD Bioscience Discovery Labware, 70µm
Cryoröhrchen, Cryo.	Greiner Bio-One GmbH, Lot.Nr.: E090901G
Falcon, Polystyrol Röhrchen mit konischem Boden	Greiner Bio-One
Aspirations-Pipetten (5ml, 10ml, 25ml, 50ml)	Falcon®, BD Biosciences
Zellkulturflaschen, steril, 75cm <sup>2</sup>	Cellstar®, Greiner Bio One
Ultra Low Cluster Plate, 6 Well with Lid, Flat Bottom, Ultra Low Attachment, Sterile, Polystyrene	Costar, Corning Incorporated, Corning, NY 14831, Lot.No.:15610005
LD Columns	Miltenyi Biotec GmbH
Eppendorf Mikroliter Pipetten (0,5µl-10µl, 10µl-100µl, 20µl-200µl)	Neolab

Tab. 2: Verbrauchsmaterialien

## 1.3 Chemikalien, Reagenzien, Puffer, Kits, Medien mit Zusatz

Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Dulbecco's PBS ohne Ca & Mg	PAA, Cat.No.: H15-002, 500ml
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Applichem, Chemica Synthesis Service, Lot.Nr.: 9H009628, A3672,

	0100
<i>Fötales Kalbserum (FCS)</i>	Biochrom AG
<i>Fötales Rinderserum (FBS) Gold</i>	PAA, AUS, Cat.No.: A15-551, 500ml
<i>MACS Puffer</i>	PBS, 0,5% BSA, 2mM EDTA
<i>Kulturmedium: RPMI1640 mit L-Glutamin (und zusätzlich 10%FBS, 1% Penicillin/Streptomycin)</i>	PAA
<i>Penicillin/Streptomycin</i>	PAA, Cat.No.: P11-010, 100ml
<i>PI</i>	Sigma
<i>Trypsin/EDTA</i>	PAA, Cat.No.: L11-004, 100ml
<i>Trypanblau</i>	Trypan Blue Stain 0,4%, Invitrogen Corporation, GIBCO, Cat.No.: 15250-061, Lot.No.: 571771
<i>Aldefluor-Assay Puffer (ALDH-Puffer)</i>	<i>Stemcell Technologies, Cat.No.: 01702</i>
<i>Aldefluor Reagenz</i>	<i>Stemcell Technologies, Cat.No.: 01703</i>
<i>Aldefluor Dimethylsulphoxid (DMSO)</i>	<i>Stemcell Technologies, Cat.No.: 01706</i>
<i>DEAB Reagenz</i>	<i>Stemcell Technologies, Cat.No.: 01705</i>
<i>Mammary Epithelial Cell Basal Medium</i>	ATCC/LGC Standards

Tab. 3: Verwendete Chemikalien, Reagenzien, Puffer, Kits und Medien mit Zusatz

#### 1.4 Antikörper

<i>APC (Allophycocyanin) – conjugated AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Mouse IgG+IgM</i>	<i>Jackson Immuno Research Laboratories, Code Nr.: 115-136-068, Lot.Nr.: 81599</i>
<i>CUB2 (monoklonaler muriner IgG AK)</i>	<i>AG Buehring, Labor für Stammzellforschung,</i>

	<i>Universitätsklinikum Tübingen</i>
<i>Goat Anti-Mouse IgG Micro Beads</i>	<i>MACS, Miltenyi Biotec, Mat.Nr.:120-000-289, Lot.Nr.: 5091207040</i>

Tab. 4: Verwendete Antikörper

### 1.5 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden allesamt von dem *National Cancer Institute* (9609 Medical Center Drive, Bethesda, Maryland, USA) zur Verfügung gestellt.

Bei der Mammakarzinomzelllinie MCF7 (Michigan Cancer Foundation 7) handelt es sich um eine Zelllinie, die aus dem Pleuraerguss einer weißen kaukasischen Frau mit Mammakarzinom im Jahr 1970 abgeleitet wurde.

Die epitheliale Mammakarzinomzelllinie SK-BR-3 wurde ebenfalls 1970 isoliert. Die ursprünglichen Zellen stammen, wie bei MCF7, aus einem Pleuraerguss, welcher sich bei einem Brustadenokarzinom einer 43-jährigen kaukasischen Frau entwickelte.

Bei MDA-MB-468 handelt es sich um eine epitheliale Brustadenokarzinomzelllinie abgeleitet von einer 51-jährigen Frau.

BT-549 stammt von einem papillären, duktalem, invasiv wachsenden Adenokarzinom der Brust, das einer kaukasischen 72-jährigen Frau entnommen wurde. Diese Zelllinie wurde 1978 isoliert.

Die Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR-3 stammt aus dem ovarialen Gewebe einer 60-jährigen kaukasischen Frau. Es ist eine epitheliale Adenokarzinomzelllinie, deren Zellen 1982 bei einer Aszitespunktion gewonnen wurden.

OVCAR-4 ist eine epitheliale Adenokarzinomzelllinie. OVCAR-5 ist eine humane epitheliale Ovarialkarzinomzelllinie, deren Zellen ebenfalls in Aszitesflüssigkeit vorgefunden wurden. Bei NCI/ADR-RES handelt es sich ebenfalls um eine epitheliale Ovarialkarzinomzelllinie.

Die Lungenadenokarzinomzelllinie A549 entstammt von einem 58-jährigen kaukasischen Mann. Sie wurde 1972 entwickelt.

## 1.6. Zusammensetzung der Medien

	Grundmedium	Zusatz
Sphärenmedium	Mammary Epithlium Basal Medium, 25ml	B27, 500 $\mu$ l PS, 250 $\mu$ l EGF, 25 $\mu$ l HC, 25 $\mu$ l Insulin, 25 $\mu$ l Heparin, 25 $\mu$ l
Einfriermedium	Jeweiliges Kulturmedium	5% FCS 10% DMSO
MACS-Medium	PBS (pH:7,2)	0,5% BSA und 2mM EDTA

Tab. 5: Zusammensetzung der Medien

## 2. Methoden

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Kultivierungsbedingungen

Alle Zelllinien wurden adhärenent im Monolayer wie vom Hersteller empfohlen in RPMI1640 mit L-Glutamin, das zusätzlich mit 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt wurde, kultiviert. Es wurden T-75 Kulturflaschen verwendet.

#### 2.1.2 Passagieren

Die unterschiedlichen Zelllinien variierten in ihrer Teilungsrate, so dass die Flaschenkapazität dementsprechend verschieden schnell erschöpft war. Zellzyklusanalysen zufolge befanden sich Zellen, die dichter wuchsen, häufiger in der G1/G0 Phase, als Zellen, welche in einem lichterem Milieu proliferierten. Gerade diese Phase des Zellzyklus geht vermutlich mit verminderter



Proliferation einher. Um den dichten Zellverhältnissen in den T-75 Flaschen vorzukommen und zügige Proliferation zu gewährleisten, mussten die adhären kultivierten Zelllinien 2–3 Mal pro Woche gesplittet werden. Das bedeutet, dass ein Zell-Aliquot in eine neue Flasche mit frischem Zellmedium übertragen wurde. Die für diesen Vorgang verwendeten Agenzien wurden auf Raumtemperatur gebracht. Zunächst wurde das aufgebrauchte Zellmedium mit einer Pipette abgesaugt, die dicht und adhären gewachsenen Zellen blieben auf dem Flaschenboden zurück. Es folgte ein Waschschrift in dem PBS (10 ml) in die Flasche pipettiert und wieder entfernt wurde. Danach wurde Trypsin/EDTA (3 ml) hinzugefügt und inkubiert (1–2 Min., 37°C), dies bewirkte ein Ablösen der Zellen von der Kulturflasche. Zusätzliches Klopfen des Flaschenbodens erleichterte weiterhin das Lösen der Zellen. Die Endopeptidase Trypsin spaltet Aminosäureketten in der Regel C-terminal von Arginin, Cystein und Lysin. Es wirkt hauptsächlich über die Spaltung von Oberflächenproteinen welche verantwortlich sind für Zellmatrix- und Zellzelladhäsion. Unspezifisch zerstört es aber bei längerer Anwendung die gesamte Zellmembran. Deshalb wurde die Inkubationszeit auf 1–2 Minuten festgelegt.

Die Wirkung des Trypsin/EDTAs wurde anschließend durch 10 ml Zellmedium, welches mit FBS versetzt war, abgestoppt. Diese Zellsuspension wurde in einem Falcon-Röhrchen zentrifugiert (7 Min., 300xg, 1200 Umdrehungen/Min.). Das Pellet wurde in Kulturmedium gelöst und die Zellsuspension auf neue T-75 Flaschen verteilt. In einem Zeitraum von 24 Stunden waren erneut adhären Zellkulturen zu beobachten. Bei Assays, welche eine hohe Anzahl an Zellen erforderten, wie bei MACS und bei FACS, musste die verwendete Zelllinie länger kultiviert werden und mehrere Passagen durchlaufen. Die Assays wurden zu einem Zeitpunkt angesetzt, bei dem Zellen weder zu dicht, noch zu licht wuchsen und es wurde auf genaue Angleichung der Zellzahlen zwischen den Experimenten geachtet. So wurden für die Zelldurchflusszytometrie  $10^6$  Zellen benötigt, bei MACS waren es  $10^7$  Zellen.

### 2.1.3 Zählen der Zellen

Gezählt wurde mit einer Neubauer Zählkammer. Zunächst wurde ein 25 µl Aliquot der Zellsuspension mit Trypanblau (1:2) gemischt und tropfenweise auf eine Neubauer Zählkammer aufgetragen. Die Suspension verteilte sich zwischen Deckplättchen und Zählkammer, wobei die Kammertiefe 0,1 mm betrug. Die Zählkammer war netzartig in viermal vier große Quadrate von je 1 mm<sup>2</sup> Fläche aufgeteilt. Somit entsprach ein Großquadrat dem Volumen von 0,1 µl. Bei der Auszählung der Eckquadrate musste beachtet werden, dass Zellen, die auf der Grenzlinie lagen, nicht auf jeder der vier Quadratseiten gezählt wurden, sondern immer auf zwei zuvor festgelegten Seiten. Die Ereignisse auf den zwei übrigen Grenzlinien wurden bei der Zählung nicht berücksichtigt.

Nach dem Zählen musste bei der abschließenden Hochrechnung zur Bestimmung der Zellzahl beachtet werden, dass einerseits vier Quadranten gezählt wurden und dass andererseits das Aliquot 1:2 verdünnt wurde. Auch das Volumen der Zellsuspension musste in die Hochrechnung einbezogen werden.

### 2.1.4 Sphären-Assay

Die Versuchsanordnung des Sphären-Assays sah vor, dass Zellen unter nicht adhärennten Bedingungen in Sphärenmedium wachsen. Hierfür wurden die Zellen in Ultra Low Attachment 6 Well Plates transferiert und in Sphärenmedium (siehe oben unter 1.6) über mehrere Tage kultiviert.

Während des Zell-Sortings (siehe 2.3) wurden die Zellen bereits in sterile mit Mammosphärenmedium gefüllte Röhrchen sortiert. Die Aufteilung der Zellen auf die verschiedenen Röhrchen erfolgte entsprechend der Expression des CDCP1 Antigens, bzw. entsprechend der ALDH Aktivität der jeweiligen Zelle.

Nach dem Sort-Vorgang befanden sich noch einzelne Flüssigkeitströpfchen an der Gefäßwand. Um diese nicht zu verlieren wurden die Gefäße mit Medium gespült. Nach einer weiteren Zentrifugation und dem Abnehmen des Überstands wurden die Pellets in Sphärenmedium gelöst. Dieses Medium war mit Ergänzungsmitteln (B27, PS, HC, Heparin) und Wachstumsfaktoren (EGF, Insulin) angereichert. Die Zellen wurden wie oben dargelegt gezählt. Für das

Zählen unter dem Mikroskop wurde Trypanblau (1:2) eingesetzt. Eine festgelegte Zellanzahl wurde in Ultra Low Attachment Cluster Plates in sechs Wellformat ausgesät und FGF zum Medium hinzugefügt (0,75 µl/ml). Von nun an wurden die Zellen im Abstand von 24 Stunden sowohl mit FGF als auch mit EGF (1 µl/ml) versorgt, um die Zellen vital zu halten und ihr Wachstum zu fördern. Die Sphärenentwicklung wurde in den einzelnen Wells zu verschiedenen Zeitpunkten ausgewertet. Beobachtungskriterien waren Anzahl sowie Größe der Sphären.

### *2.1.5 Gewebeverdau*

Neben den Zelllinien wurde Patientengewebe für die Untersuchung verwendet. Dieses stammte aus operativen Eingriffen, die an Patienten mit Mamma- oder Ovarialkarzinom vorgenommen wurden.

Zunächst wurde das betreffende Gewebe mittels Skalpell und Pinzette mechanisch in einer Petrischale zerkleinert und Fettbestandteile aussortiert. Dieser Arbeitsschritt fand im flüssigen Kulturmedium RPMI 1640 statt. Im Anschluss erfolgte die enzymatische Verdauung durch Kollagenase, die mit Zellmedium verdünnt war (3:7), in einem Falcon-Röhrchen. Mammakarzinome wurden der Kollagenaseaktivität im Inkubator zwölf Stunden ausgesetzt, bei Ovarialkarzinomen wurde die Verdauung nach drei Stunden gestoppt.

Im weiteren Verlauf wurde das verdaute Gewebe durch Auf- und Abpipettieren durchmischt, aufgelockert und zerkleinert. Das Lysat wurde dann in ein neues Falcon-Röhrchen übertragen und gefiltert (Porengröße: 70 µm). Um die Auswirkungen der Kollagenaseaktivität zu reduzieren, wurde diese durch einen Waschschrift mit PBS verdünnt. Nach anschließendem Zentrifugieren wurde die kollagenasehaltige Flüssigkeit endgültig abgenommen. In manchen Fällen enthielt das Pellet neben Gewebezellen Erythrozyten, welche mit Ammoniumchlorid lysiert werden mussten. Das Ammoniumchlorid wurde dabei 9:1 mit PBS verdünnt. Zur Lyse musste die Zelllösung sieben Minuten schüttelnd auf Eis inkubieren. Anschließend wurde sie mit PBS aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Das Pellet enthielt dann aufgereinigte Zellen aus Tumor- bzw. aus normalem Gewebe.

### 2.1.6 Einfrieren von Zellen

Zellen, welche zu einem späteren Zeitpunkt Verwendung finden sollten, wurden eingefroren. Das Einfrieren erfolgte in Cryo-Röhrchen nach Resuspension in Cryo-Medium in einem Mr. Frosty bei  $-80^{\circ}\text{C}$  über Nacht. Am Folgetag wurden die eingefrorenen Zellen dann in einen Gefrierschrank mit Temperaturen von  $-150^{\circ}\text{C}$  zur Lagerung überführt.

## 2.2 Durchflusszytometrie

### 2.2.1 Erläuterungen

Die Durchflusszytometrie wurde an einem Gerät des Typs FACS Cantoll durchgeführt. Hinsichtlich der Zellgröße betrug der Messbereich  $0,5\text{--}50\ \mu\text{m}$ . Die Zellen wurden einzeln in eine Kapillare aufgenommen und passierten dabei Laserstrahlen. Das benutzte Gerät verfügte über zwei Laser mit den Wellenlängen  $488\ \text{nm}$  (blau) und  $633\ \text{nm}$  (rot). Die Laserstrahlen trafen auf die Zellen und wurden abhängig von der Zellbeschaffenheit unterschiedlich stark in ihrem Verlauf beeinflusst, was wiederum von Detektoren notiert wurde. Die Brechung des Seitwärtsstreulichts (SSC = Sidewards Scatter) war abhängig von der Granularität der Zellen. Sie variierte aufgrund der Anzahl der Vesikel in der Zelle und der Größe des Zellkerns. Die Beugung des Vorwärtsstreulichts (FSC = Forward Scatter) war abhängig vom Volumen der Zelle. Neben Sideward Scatter (SSC), das Granularität anzeigte, und Forward Scatter (FCS), das die Zellgröße anzeigte, konnten die untersuchten Zellen und Zellpopulationen auch über die Fluoreszenzmessung charakterisiert werden, bei der zusätzlich Fluoreszenzfarben (Fluorochrome) gemessen wurden. Wenige Zellen zeigten eine Eigenfluoreszenz, so dass eine sogenannte Isotyp-Kontrolle durchgeführt werden musste. Verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe und fluoreszierende Antikörper wurden für diese Studie verwendet (Aldefluor, APC (Allophycocyanin), PI (Propidium Iodid)). Diese banden entweder direkt an bestimmte Bestandteile der Zelle (PI interkalierte mit der DNA) oder sie markierten indirekt über spezifische Antikörper. Da das FACS Cantoll über

mehrere Laser verfügt, konnten dementsprechend mehrere Farbstoffe zur Charakterisierung der Proben verwendet werden.

### 2.2.2 Färbung

#### 2.2.2.1 Aldefluor-Assay

Aldefluor wurde dazu verwendet Zellen mit starker Aldehyddehydrogenase (ALDH) Aktivität zu isolieren. Aldefluor gelang über freie Diffusion in die Zellen und wurde von der ALDH verstoffwechselt. Die Menge an Reaktionsprodukt, die bei dieser Reaktion entstand und intrazellulär akkumulierte, korrelierte mit der ALDH Aktivität dieser Zelle. Es handelte sich hierbei um BODIPY-Aminoazetat (BAA), welches fluoreszierte. Dieses war negativ geladen und konnte somit nicht aus der Zelle diffundieren. Allein aktiver Transport via ATP-Binding-Cassette (APC)-Transporter aus den Zellen heraus war möglich. Um dem aktiven Efflux des BAA entgegenzuwirken, wurde ein spezieller Aldefluor-Assay-Puffer verwendet. Fluoreszierendes BAA befand sich also in Zellen mit intakter Membran und ALDH Aktivität, wohingegen tote, fixierte und permeabilisierte Zellen und Zellen ohne ALDH Aktivität Aldefluor negativ erschienen und nicht fluoreszierten.

Über Zelldurchflusszytometrie und Fluoreszenznachweis konnten auf diese Weise vitale Zellen mit ALDH Aktivität nachgewiesen werden, allerdings nur durch Abgleich mit einer Negativkontrolle. Diese enthielt den spezifischen ALDH Inhibitor Diethylaminobenzaldehyd (DEAB).

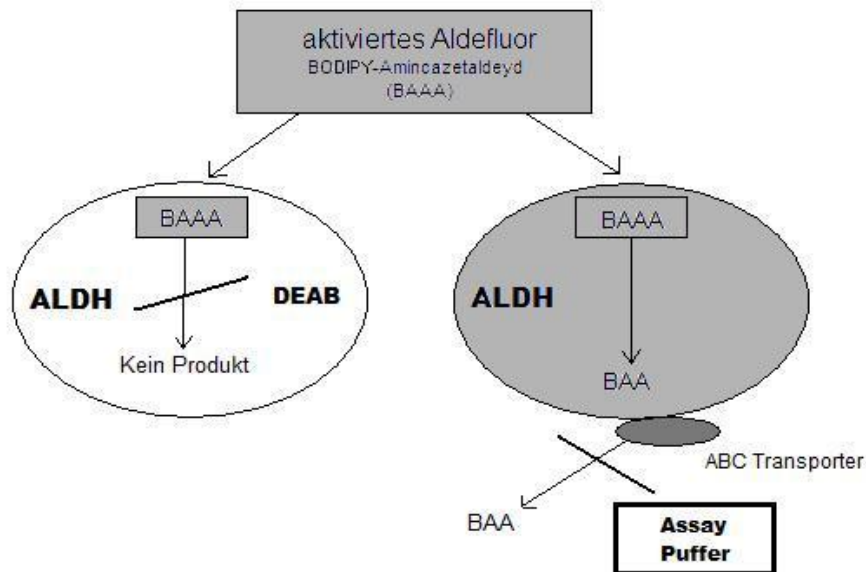


Abb. 1: Aldefluor-Assay schematisch

*Durchführung.* Die Zellen wurden adhären in T-75 Flaschen kultiviert. Die Auflösung der Zell-Zell- und Zell-Matrixadhäsionen erfolgte durch Trypsin/EDTA. Nach zwei Minuten wurden die dissoziierten gelösten Zellen mit FBS behandelt und die Reaktion des Trypsin/EDTA abgestoppt. Die Zellen wurden dann in PBS gewaschen, ausgezählt und in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml in Aldefluor-Assay-Puffer gelöst. Die Pufferlösung wurde für die Aldefluorfärbung mit BODIPY-Aminoacetaldehyd (BAAA) (1:200) versetzt. Für die Negativkontrolle wurden 100µl dieser Probe mit DEAB (1:100) inkubiert, DEAB interagiert mit der ALDH und inhibiert diese. Beide Gefäße wurden in einem Wasserbad inkubiert (37°C, 30 Min.). Im weiteren Verlauf wurden beide Proben zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Pellets erneut in Aldefluor-Assay-Puffer gelöst. Die positive Probe sowie Zellen, die nicht mit Aldefluor behandelt worden waren, wurden mit PI gefärbt (1:100). Des Weiteren wurden ungefärbte Zellen zum Einstellen des Geräts verwendet. So ergaben sich für die Durchflusszytometrie letztendlich vier Proben:

- Probe 1: Aldefluor +/-PI
- Probe 2: DEAB (Negativkontrolle)
- Probe 3: PI
- Probe 4: ungefärbt

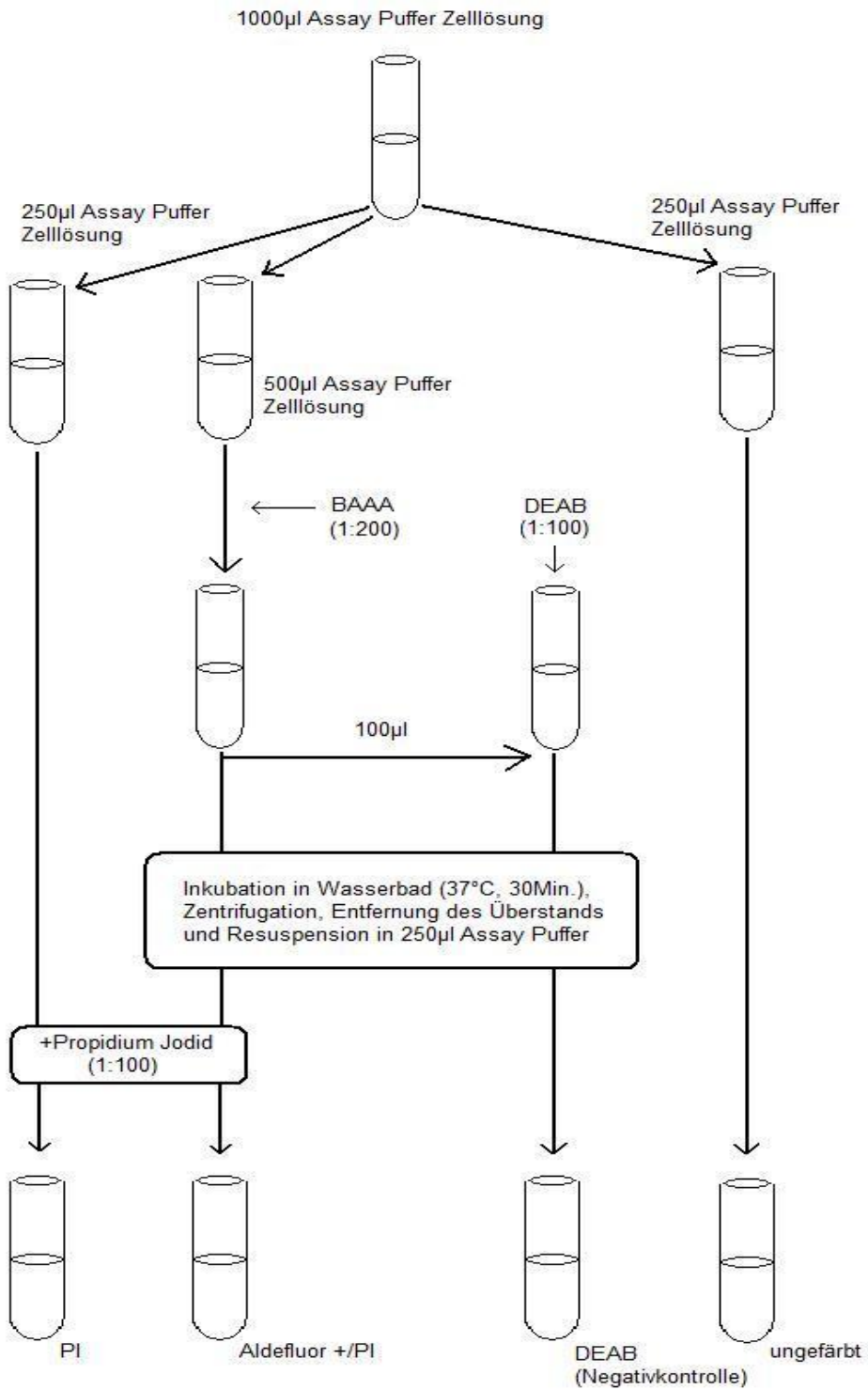


Abb. 2: Durchführung des Aldefluor-Assays

### 2.2.2.2 Aldefluor- und CDCP1-Färbung kombiniert

Die jeweiligen Zelllinien lagen in kultivierter Form adhärent in T-75 Flaschen vor. Zunächst wurden die Zellen mittels Trypsin/EDTA vom Boden der Flasche gelöst. Um Zelltod zu vermeiden, musste die Trypsinaktivität mit FBS abgestoppt werden. Dazu wurde das FCS-haltige Kulturmedium eingesetzt. Für die Durchflusszytometrie wurden  $5 \times 10^6$  Zellen pro 1ml ALDH-Puffer in Lösung gebracht. Die Zellsuspension wurde mit Aldefluor, genauer BAAA, versetzt (1:200), welches durch die intrazelluläre ALDH in Bodipyaminoacetat (BAA) umgewandelt wurde. Für die Negativkontrolle wurden 100µl der Zellsuspension mit dem ALDH-Inhibitor DEAB (1:100) behandelt. Durch DEAB wurde BAAA nicht umgesetzt, dementsprechend war bei der Negativkontrolle keine Fluoreszenz zu erwarten. Sowohl die Aldefluor positive Zellsuspension als auch die Negativkontrolle wurden in einem Wasserbad inkubiert (37°C, 30 Min.).

Für die anschließende indirekte Antikörperbehandlung wurden die Zellsuspensionen, eine Fraktion Aldefluor positiver Zellen sowie ungefärbte Zellen zunächst mit dem primären CDCP1 Antikörper CUB2 1:3 für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Als Negativkontrolle wurden ungefärbte Zellen verwendet. Nach der Inkubation wurden die Proben zentrifugiert (300xg, 10 Min.) und der Überstand abgenommen. Um den primären Antikörper darzustellen, mussten die drei Proben einschließlich der CUB2 Negativkontrolle anschließend mit dem sekundären Antikörper APC Goat Anti-Mouse IgG (1:20) behandelt werden. Es folgte wiederum eine Inkubation auf Eis (15 Min.). Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Pellets der vier Proben in Aldefluor-Assay-Puffer gelöst, um zu vermeiden, dass die Fluoreszenz des Aldefluorfarbstoffs an Intensität verliert.

Eine Fraktion der Aldefluor positiven/CDCP1 positiven Probe wurde dann mit PI behandelt (1:100), eine weitere Probe ungefärbter Zellen wurde ebenfalls bei gleicher Konzentration mit PI versehen.

So ergaben sich für die Zytometrie letztendlich acht Proben:

- Probe 1: Aldefluor+/CDCP1+/PI
- Probe 2: Aldefluor+/CDCP1+
- Probe 3: Aldefluor+



- Probe 4: DEAB (Negativkontrolle)
- Probe 5: CDCP1+
- Probe 6: CDCP1- (Negativkontrolle)
- Probe 7: PI
- Probe 8: ungefärbt

### **2.3 Immunphänotypisierung und Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)**

#### *2.3.1 Erläuterung*

Mittels Immunphänotypisierung wurden Zellen detektiert und hinsichtlich Oberflächenmarker analysiert. Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) bedeutet die Auftrennung der Zellen nach diesen Kriterien (z.B. Zellgröße, ermittelt im FSC, Zellgranularität, ermittelt im SSC, und Expression von Oberflächenproteinen, ermittelt durch Bindung an fluorochromgekoppelte Antikörper).

Es wurde ein Zell-Sorter des Typs BD FACSAria™ II verwendet. Die zu untersuchende Zellsuspension wurde über eine Kapillare in das Zytometer aufgenommen und in einem feinen Flüssigkeitsstrahl mitgerissen. Durch den geringen Durchmesser des Strahls kam es bereits hier zu einer Auftrennung der Zellen, bei denen anschließend FSC, SSC und Fluoreszenzsignal zytometrisch bestimmt wurden. Die erhaltenen Signale wurden analysiert und der Strahl durch Vibration in einzelne Tropfen aufgetrennt, so dass pro Tropfen eine Zelle vorlag. Unmittelbar nach dem Bruch des Strahls wurden die Tropfen elektrisch aufgeladen und einem elektrischen Feld ausgesetzt. Die Ladung der jeweiligen Tropfen basierte auf den Daten, die kurz zuvor aus der Zytometrie gewonnen wurden, so dass Zellen unterschiedlicher Struktur und Emission unterschiedlich aufgeladen und im elektrischen Feld verschieden stark abgelenkt wurden. Abhängig von der Ladung wurden die einzelnen Zelltropfen auf diese Weise auf entsprechende Reagenzgläser verteilt. Zellen, die aufgrund ihrer zytometrisch

ermittelten Signale nicht von wissenschaftlicher Relevanz waren, wurden nicht geladen und in einem Sammelbehälter verworfen.

Im Unterschied zur Zelldurchflusszytometrie wurden die Zellen nach der Analyse der Fluorochrome nicht verworfen sondern sortiert. Anders als bei Magnetic Activated Cell Sorting (MACS), welches auf Interaktion paramagnetischer Partikel mit einem magnetischen Feld beruht, wurden die analysierten Zellen bei FACS einzeln analysiert. Sie wurden entsprechend der Anwesenheit oder des Fehlens von ALDH Aktivität und CD133 unterschiedlich geladen, in einem magnetischen Feld ausgelenkt und in Röhrcchen gesammelt. Aus dem Ablauf des Trennverfahrens ist ersichtlich, dass die analysierten Zellen einem hohen Stress ausgesetzt waren und Zelluntergang aufgrund der mechanischen Belastung in Kauf genommen werden musste. Um nach der Sortierung noch stets ausreichend vitale Zellen zur Verfügung zu haben, mussten eingangs viele Zellen bereitgestellt werden. Es wurden ca.  $6 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Inwieweit der Stress Auswirkungen auf die sortierten vitalen Zellen und damit auf die folgenden Untersuchungen hatte ist unklar. So hätte insbesondere die Sphärenbildung, welche im Sphären-Assay untersucht wurde, beeinflusst werden können.

Der große Vorteil des FACS lag darin, dass anders als bei MACS mehr als zwei Populationen isoliert werden konnten. Diese Voraussetzung war insofern wichtig, als das das Sphärenbildungspotential der Aldefluor positiven/CD133 positiven Population, der Aldefluor positiven/CD133 negativen Population, der Aldefluor negativen/CD133 negativen Population und der Aldefluor negativen/CD133 positiven Population im Sphären-Assay überprüft werden sollte. Hier wurden vier unterschiedliche Populationen separiert, was mit MACS nicht möglich gewesen wäre.

### *2.3.2 Durchführung einer immunphänotypischen Analyse*

Beim FACS-Assay wurden folgende fünf Proben zusammengestellt:

- Probe mit Aldefluor-Färbung
- Probe mit Aldefluor-Färbung und DEAB-Zusatz als Negativkontrolle

- Probe mit CUB2, dem primären IgG Antikörper (Maus) gegen CDCP1 und sekundärer Färbung mit APC Goat Anti-Mouse IgG
- Probe mit APC Goat Anti-Mouse IgG-Färbung allein als Negativkontrolle
- Probe mit Aldefluor-Färbung kombiniert mit CDCP1-Färbung (primärer CUB2 Antikörper und sekundärer APC Antikörper)

Ebenso wie bei der Durchflusszytometrie- und der MACS-Färbung wurden Zelllinien untersucht, welche adhärent wuchsen und zunächst mittels Anwendung von PBS, Trypsin/EDTA und Kulturmedium (RPMI 1640) gelöst werden mussten. Anschließend erfolgte das Zählen der Zellen. Die ausgezählten Zellen wurden in ALDH Puffer inkubiert ( $5 \times 10^6$  Zellen pro 1 ml Puffer) und bis auf einen geringen Anteil mit Aldefluor gefärbt (1:200). Aus der Aldefluor gefärbten Zellsolution wurde die Negativkontrolle entnommen und mit DEAB (1:100) versetzt. Sowohl die Aldefluor gefärbte Zellsolution, als auch die Negativkontrolle wurden in ein warmes Wasserbad gebracht (30 Min., 37°C). Nach Zentrifugation und Abnehmen des Überstands wurden beide Pellets erneut in ALDH Puffer aufgenommen. Die Negativkontrolle wurde auf Eis gestellt, und es wurde in den folgenden Schritten mit den Aldefluor positiven Zellen weitergearbeitet. Diese wurden zu einem Großteil mit dem gegen das CDCP1 Antigen gerichteten primären CUB2 Antikörper behandelt und ebenfalls gekühlt inkubiert. Es wurde eine geringe Anzahl von Zellen mit einer Aldefluor-Einzelfärbung zum Einstellen des FACS benötigt.

Um die CDCP1 Einzelfärbung zu erhalten, wurde die Hälfte der übrig gebliebenen noch ungefärbten Zellen primär mit dem CUB2 IgG Antikörper (Maus) und die andere Hälfte der Zellsolution als Negativkontrolle nicht behandelt.

Die zwei mit CUB2 IgG Antikörpern behandelten Proben sowie die CDCP1 Negativkontrolle wurden wieder 15 Minuten auf Eis inkubiert, zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Im weiteren Verlauf wurde der primäre CUB2 IgG Antikörper (Maus) sekundär durch APC Goat Anti-Mouse IgG markiert (1:20). Auch die CDCP1 Negativkontrolle wurde mit diesem Antikörper behandelt. Nach erneuter 15-minütiger Inkubation auf Eis, Zentrifugation und dem

Absaugen des Überstandes standen alle Proben bereit. Vor dem Sortieren wurden die Zellpellets in ALDH-Puffer aufgenommen.

Sortiert wurde die Zellsuspension, auf die die Aldefluor-Färbung kombiniert mit der CDCP1-Färbung angewandt worden war. Es wurde nach Aldefluor und CDCP1 positiven bzw. negativen Zellen sortiert.

Die Aldefluor positive Zellprobe und die entsprechende DEAB Negativkontrollprobe sowie die CDCP1 positive Zellfraktion und deren Negativkontrolle dienten lediglich der Konfiguration des Zell-Sorters.

#### **2.4 Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)**

Auch MACS setzte voraus, dass die zu untersuchenden adhärent kultivierten Zellen zunächst gelöst wurden (siehe FACS), bevor mit dem Experiment begonnen werden konnte. Mittels Magnetic Activated Cell Sorting konnten bestimmte Antigene von Zellen magnetisch markiert und Zellpopulationen isoliert werden. Zur Trennung der Zellen wurden einerseits MACS Micro Beads benötigt. Hierbei handelte es sich um kleine paramagnetische Partikel, welche im Experiment bereits mit Goat Anti-Mouse IgG assoziiert waren. Andererseits musste ein magnetisches Feld angelegt werden, um die paramagnetische Zellpopulation von den übrigen Zellen abzuspalten, wozu ein MACS Separator, ein Permanentmagnet, verwendet wurde. An diesem war eine LS Säule angebracht. In dieser Säule wurden die markierten Zellen, während sie durch deren hydrophile Matrix sickerten, von dem generierten, stark magnetischen Feld zurückgehalten. Nicht markierte Zellen durchliefen die LS Säule dementsprechend ungehemmt oder wurden im darauffolgenden Schritt mit Puffer aus der Säule gewaschen. Um die positive Zellfraktion zu gewinnen, wurde die Säule aus dem magnetischen Feld entfernt und die positive Zellpopulation unter Druck aus der Matrix gespült und gesammelt.

Die Zellen wurden während der gesamten Prozedur eiskalt gehalten. Das setzte gekühlte Lösungen und schnelles Vorgehen voraus. Auf diese Weise konnte das Risiko der unspezifischen Markierung mit Antikörpern vermindert werden. Die verwendete Pufferlösung hatte einen pH-Wert von 7,2 und setzte sich aus PBS, 0,5% BSA und 2 mM EDTA zusammen.

Nach der Zählung der gelösten Zellen wurden diese im Puffer resuspendiert und mit CUB2, dem primären IgG Antikörper (Maus), der gegen das CDCP1 Antigen gerichtet ist, markiert. Die Inkubation auf gekühltem Eis erfolgte für 15 Minuten. Längere Inkubationszeiten hätten die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Bindungen der Antikörper erhöht. Anschließend wurden die Zellen gewaschen (1–2 ml Puffer/ $10^7$  Zellen), zentrifugiert (300xg, 10 Min.) und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet war jetzt spezifisch mit dem primären Mausantikörper markiert. Das Pellet wurde wieder im Puffer gelöst (80  $\mu$ l Puffer/ $10^7$  Zellen) und mit 20  $\mu$ l des Sekundärantikörpers Goat Anti-Mouse IgG Micro Beads/ $10^7$  Zellen für 15 Minuten erneut auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurde eine zusätzliche sekundäre Färbung mit APC Goat Anti-Mouse IgG unternommen, um die Reinheit der magnetisch sortierten Zellen hinsichtlich der CDCP1 positiven und CDCP1 negativen Population mittels FACS zu überprüfen. Nach der Inkubation (15 Min., 4–8°C) wurde erneut gewaschen (1–2 ml Puffer/ $10^7$  Zellen), zentrifugiert (300xg, 10 Min.) und der Überstand abgenommen. Die Zellen waren nun sowohl mit den Micro Beads als auch mit APC markiert und wurden wieder in Puffer (500  $\mu$ l Puffer/ $10^8$  Zellen) aufgenommen.

Für die magnetische Separation wurde die Zellsuspension auf die Säulen gegeben. Aufgrund der Anzahl der markierten Zellen und der gesamten Zellanzahl wurden LS Säulen (max. Anzahl markierter Zellen:  $10^8$ , max. Anzahl der gesamten Zellen:  $2 \times 10^9$ ) verwendet. Diese wurden in das magnetische Feld eines Midi Max Separators platziert. Zellen, die die Matrix der Säule durchliefen, waren dem magnetischen Feld ausgesetzt und wurden, falls mit Micro Beads markiert, zurückgehalten. Zunächst musste die Matrix mit einer geeigneten Menge an Puffer durchspült werden (LS: 3 ml Puffer), anschließend wurde die Zellsuspension der Säule zugeführt. Die unmarkierten Zellen durchliefen die Matrix und konnten in Falcon-Röhrchen gesammelt werden. Durch eine weitere Auswaschung der Matrix (LS: 3x3 ml Puffer) wurden zurückgebliebene unmarkierte Zellen aus der Matrix entfernt und ebenfalls als unmarkierte Fraktion gesammelt. Um schließlich die positive Fraktion zu erhalten, wurde die Säule dem magnetischen Feld des Separators entzogen und in ein Falcon-

Röhrchen platziert. Zusätzlicher Puffer wurde eingesetzt (LS: 5 ml) und mittels Saugglocke zügig durch die Matrix getrieben. Die positive Zellpopulation wurde herausgespült und separat gesammelt.

Da das Prinzip Zellen mit dem Oberflächenprotein CDCP1 magnetisch zu isolieren zu diesem Zeitpunkt noch nicht erprobt war, wurde der Grad der Reinheit der CDCP1 positiven und CDCP1 negativen Population anschließend durch Zelldurchflusszytometrie geprüft, indem man bei beiden Populationen den gebundenen APC-Anteil maß. Der APC Antikörper ist, wie der mit der Micro Beads gekoppelte sekundäre Antikörper auch, ein Goat IgG Antikörper, der sich gegen den primären Mausantikörper CUB2 richtet. Wichtig wäre gewesen, dass es bei der nachträglichen Färbung und Inkubation mit APC nicht zu kompetitiven Verdrängungseffekten zwischen den beiden sekundären Antikörpern am primären CUB2 Antikörper kommt. In dem Fall, dass APC verdrängend gewirkt hätte, wäre die CDCP1 exprimierende Population APC positiv, aber magnetisch nicht mehr markiert gewesen. Hätte APC aufgrund mangelnder Möglichkeit vermindert gebunden, so wären Anteile der CDCP1 exprimierenden Population APC negativ gewesen. Im optimalen Fall hätte sich eine maximale Effektivität der MACS Isolation durch eine komplett APC negative, CDCP1 negative und eine komplett APC positive, CDCP1 positive Population dargestellt.

Die Überprüfung durch die Zelldurchflusszytometrie zeigte, dass bei durchschnittlich 2,65 % der als CDCP1 positiv magnetisch isolierten Zellen durch den sekundär CUB2 bindenden APC Antikörper der CDCP1 positive Status nicht nachgewiesen werden konnte. In der Population ohne magnetische Markierung, welche also als CDCP1 negativ angesehen wurde, äußerte die APC Färbung einen CDCP1 positiven Zellanteil von durchschnittlich 1,28%. Somit konnte gezeigt werden, dass die Trennung in eine CDCP1 positive und negative Population durch MACS funktioniert hat, was eine verlässliche Grundlage für den nachfolgenden Sphären-Assay lieferte.

## **2.5 Zellzyklusanalyse**

Mittels Zellzyklusanalysen wurden die Zellzyklusphasen bestimmt, in welchen sich Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt befanden. Der Zellzyklus ist Grundlage der Proliferation und lässt sich einerseits in die Mitose und andererseits in die Interphase unterteilen. Die Interphase ist weiterhin in die Phasen G1, S und G2 gegliedert. Von diesen Phasen unterscheidet sich die G0 Phase, eine spezielle Form der G1 Phase. In der G0 Phase befinden sich Zellen, die sich nicht teilen, weil sie ausdifferenziert bzw. nicht mehr teilungsfähig sind oder weil sie einen ruhenden stammzelltypischen Charakter aufweisen. Bestimmte Zelltypen können nach längerem Verbleib in dieser Phase in die G1 Phase zurücktreten und den Zellzyklus von neuem durchlaufen.

Mit Hilfe der Zellzyklusanalyse am Durchflusszytometer kann man zwischen der G0/G1 Phase und den übrigen proliferativen Phasen unterscheiden. Das Prinzip des Assays ist, dass PI mit doppelsträngiger DNA stöchiometrisch interkaliert und entsprechende fluoreszierende Signale sendet, welche in der Zelldurchflusszytometrie ermittelt und aufgezeichnet werden. Über die detektierten Fluoreszenzsignale können die Zellen anschließend den einzelnen Zellzyklusphasen zugeordnet werden.

Die zu untersuchenden Zellen wurden mit -20°C kaltem, 70%igem Ethanol für zehn Minuten fixiert und anschließend gewaschen (1 ml FACS-Puffer, Zentrifugation: 7 Min./460xg). Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 100–200 µl FACS-Puffer aufgenommen. In einem Verhältnis von 1:100 wurde dann neben PI auch RNase hinzugefügt. RNase baut doppelsträngige RNA ab und verhinderte somit eventuelle Messfehler, da PI auch doppelsträngige RNA binden kann. Während der anschließenden Durchflusszytometrie wurden nur einzelne Zellen gemessen (PI-A, PI-W).

## C Ergebnisse

### 1. Analyse der Expression der Tumorstammzellmarker

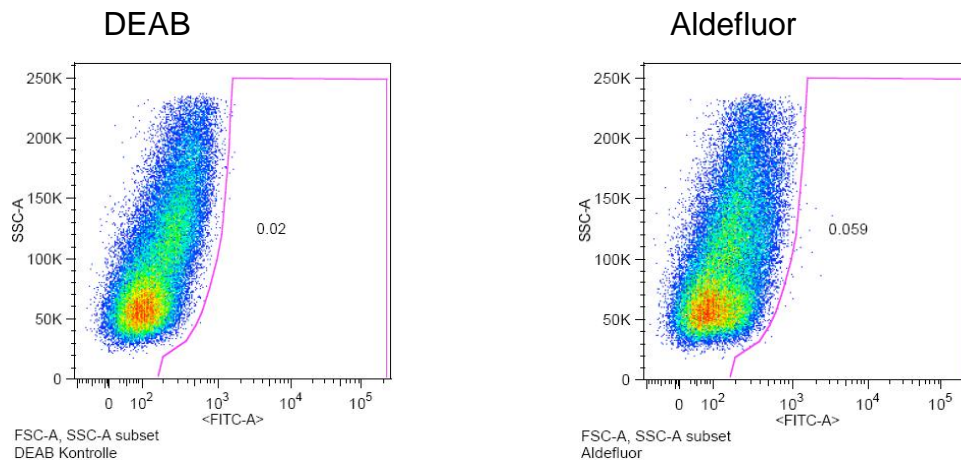
#### *1.1 ALDH Aktivität in den Zelllinien des Mammakarzinoms, des Ovarialkarzinoms und des Bronchialkarzinoms*

Bei Zellen sämtlicher Mammakarzinomzelllinien (MCF7, SK-BR-3, MDA-MB-468, BT-549), Ovarialkarzinomzelllinien (OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-5, NCI/ADR-RES) und der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 wurde indirekt die ALDH Aktivität nachgewiesen.

Die humanen Brustadenokarzinomzelllinien variierten in der gemessenen ALDH Aktivität. So waren bei der Zelllinie MCF7 keine Aldefluor positiven Zellen nachzuweisen. Bei der Zelllinie BT-549 war Fluoreszenz geringfügig existent (ca. 1%). Bei der Messung von SK-BR-3 und MDA-MB-468 zeichneten sich größere Aldefluor positive Populationen ab. Im Fall von SK-BR-3 ließen sich  $13,11 \pm 8,85$  %, bei MDA-MB-468  $14,97 \pm 7,94$  % an positiven Zellen beobachten.



**A**



**B**

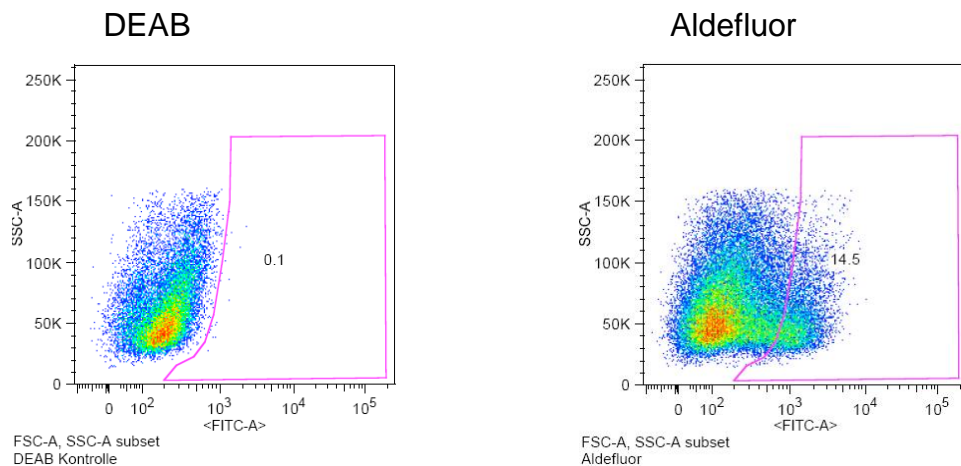
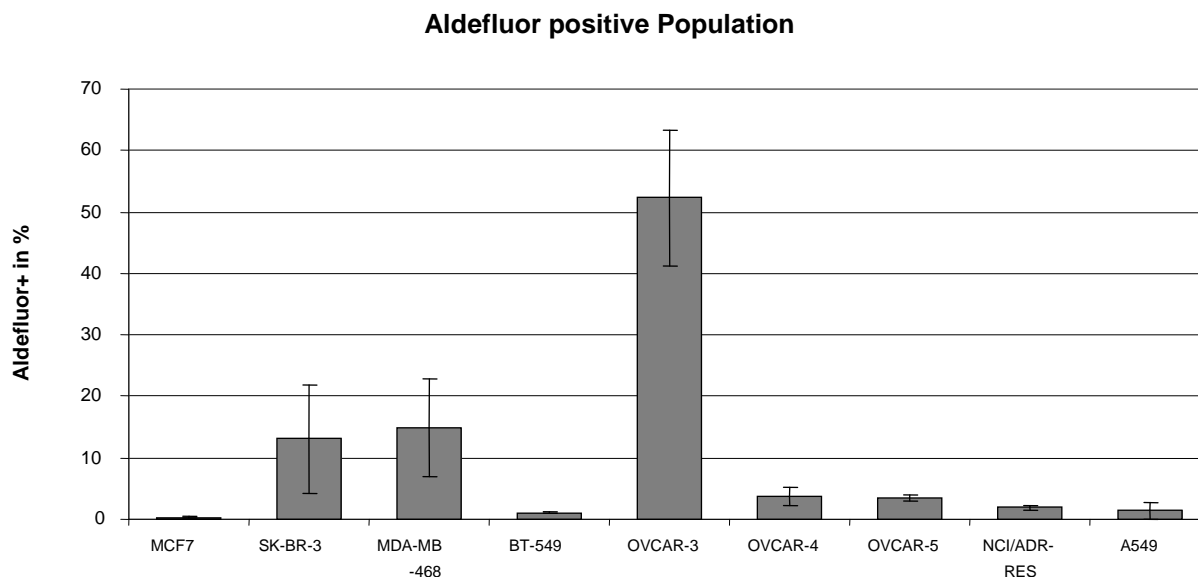


Abb. 3: Durchflusszytometrie nach Aldefluorfärbung bei MCF7 und SK-BR-3  
 Ergebnisse bei MCF7 (A) und SK-BR-3 (B). Die Gates wurden in Abhängigkeit von der jeweiligen DEAB Kontrollprobe gesetzt. Anders als bei MCF7 ließ sich bei SK-BR-3 eine Aldefluor positive Population nachweisen (13,11±8,85 %).

Auch bei den humanen Ovarialkarzinomzelllinien waren die messbaren fluoreszierenden Populationen unterschiedlich groß. So war die ALDH Aktivität bei OVCAR-3 am stärksten, die Aldefluor positive Population dieser Tumorzelllinie lag bei 52,3±11,1 %. Kleinere Aldefluor positive Populationen wurden auch in den übrigen untersuchten Ovarialkarzinomzelllinien beobachtet. Bei OVCAR-4 konnten 3,7±1,5 %, bei OVCAR-5 3,46±0,59 % und bei NCI/ADR-RES 1,89±0,32 % nachgewiesen werden.

Bei der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 nahm die Aldefluor positive Population einen Anteil von  $1,42 \pm 1,4$  % ein.



*Abb. 4: Anteil der Aldefluor positiven Populationen im Vergleich Anteil der Aldefluor positiven Populationen gemessen an Zellen der humanen Brustadenokarzinomzelllinien (MCF7, SK-BR-3, MDA-MB-468, BT-549), der humanen Ovarialkarzinomzelllinien (OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-5, NCI/ADR-RES) und der humanen Lungenadenokarzinomzelllinie A549. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung, berechnet aus drei oder mehr unabhängig durchgeführten Messungen.*

## **1.2 CDCP1 Expression in den Zelllinien des Mammakarzinoms, des Ovarialkarzinoms und des Bronchialkarzinoms**

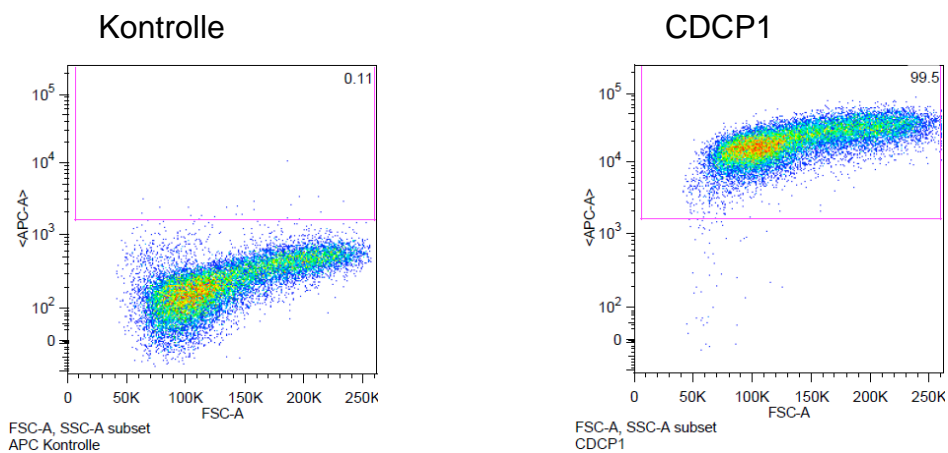
Bei den gleichen Zelllinien (Mammakarzinomzelllinien: MCF7, SK-BR-3, MDA-MB-468, BT-549; Ovarialkarzinomzelllinien: OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-5, NCI/ADR-RES; Lungenadenokarzinomzelllinie: A549) wurde der Anteil der CDCP1 positiven Population an der Gesamtpopulation ermittelt.

Das Oberflächenmolekül CDCP1 war bei den Zellen der vier Brustkrebszelllinien verschieden stark ausgeprägt. Bei MCF7 konnte keine CDCP1 positive Population ermittelt werden. Die Zellen der Zelllinie SK-BR-3 exprimierten diesen Marker zu einem Anteil von  $67,65 \pm 9,55$ %. Hinsichtlich

MDA-MB-468 und BT-549 war bei nahezu allen Zellen dieser Zelllinien CDCP1 nachzuweisen ( $99,95 \pm 0,06\%$  bzw.  $98,07 \pm 0,45\%$ ).

In Ovarialkarzinomzelllinien war die CDCP1 Expression ebenfalls heterogen: OVCAR-3, OVCAR-4 und OVCAR-5 zeigten eine CDCP1 Expression in nahezu allen Zellen ( $99,57 \pm 0,2$ ,  $99,8 \pm 0,1$  und  $99,7 \pm 0,2$ ) während NCI/ADR-RES keine relevante Expression zeigte.

**A**



**B**

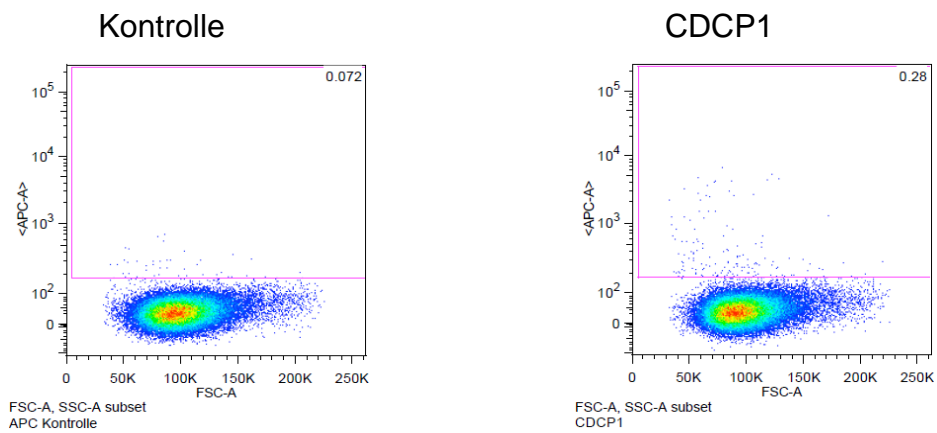


Abb. 5: CDCP1 Expression bei OVCAR-3 und NCI/ADR-RES  $99,57 \pm 0,2\%$  der Zellen von OVCAR-3 exprimierten CDCP1 (A), wohingegen bei NCI/ADR-RES keine positive Population nachzuweisen war (B).

Die Lungenkarzinomzelllinie A549 besaß eine CDCP1 positive Population zu einem Anteil von  $88,37 \pm 4,16\%$ .

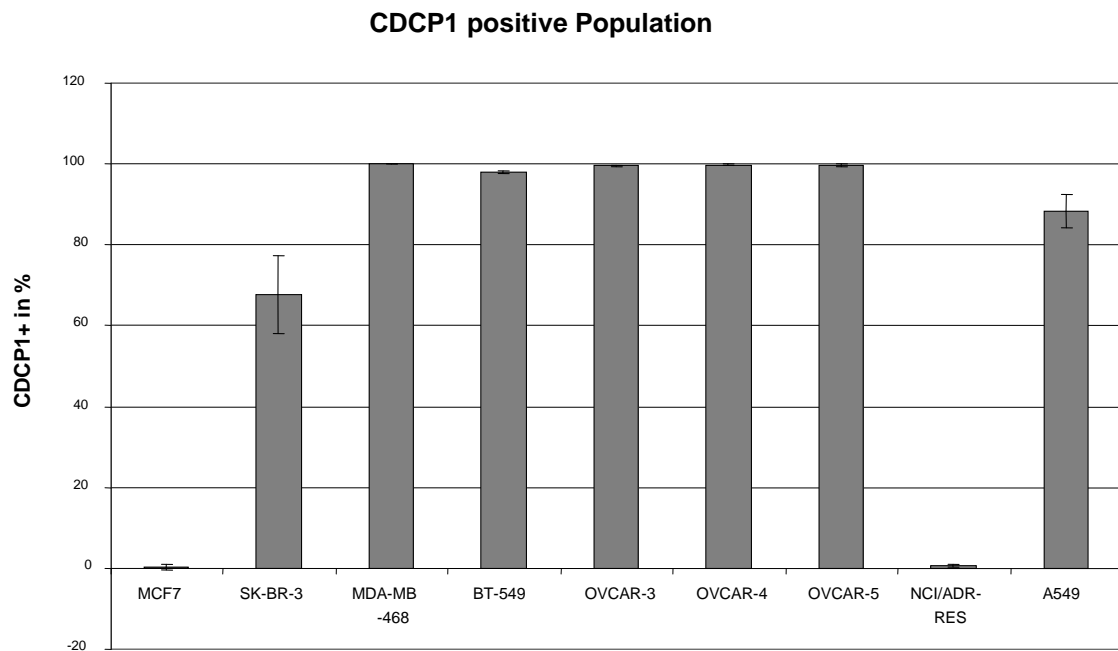


Abb. 6: Anteil der CDCP1 positiven Populationen im Vergleich Anteil der CDCP1 positiven Population an der Gesamtpopulation der Mammakarzinomzelllinien (MCF7, SK-BR-3, MDA-MB-468, BT-549), der Ovarialkarzinomzelllinien (OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-5, NCI/ADR-RES) und der Lungenkarzinomzelllinie A549. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung, berechnet aus drei oder mehr unabhängig durchgeführten Messungen.

Zusammenfassend ließen sich hinsichtlich der ALDH Aktivität und der CDCP1 Expression bei den untersuchten Tumorzelllinien folgende Prozentsätze an positiven Zellen in der Gesamtzellpopulation ermitteln:

Zelllinie	Aldefluor pos. in %	CDCP1 pos. in %
<i>Mammakarzinomzelllinien</i>		
SK-BR-3	13,11±8,85	67,65±9,55
MCF7	0,34±0,18	0,04±0,63
MDA-MB-468	14,97±7,94	99,9±0,06
BT-549	1,06±0,16	98,03±0,45

Zelllinie	Aldefluor pos. in %	CDCP1 pos. in %
<i>Ovarialkarzinomzelllinien</i>		
OVCAR-3	52,3±11,1	99,57±0,21
OVCAR-4	3,7±1,5	99,8±0,1
OVCAR-5	3,46±0,59	99,7±0,2
NCI/ADR-RES	1,9±0,32	0,59±0,34
<i>Lungenkarzinomzelllinien</i>		
A549	1,42±1,4	88.37±4,16

Tab. 6: ALDH Aktivität und CDCP1 Expression der untersuchten Mammakarzinom-, Ovarialkarzinom-, und Lungenkarzinomzelllinien

## 2. Funktionelle Untersuchungen zu CDCP1 und ALDH als Stammzellmarker

### 2.1 Etablierung des Tumorsphären-Assays für Karzinomzellen

Zunächst musste ein fester Zeitpunkt ausgewählt werden, an dem die Auswertung des jeweiligen Sphären-Assay stattfinden sollte. Erste Sphären-Assay an den Zelllinien OVCAR-3 und SK-BR-3 wurden täglich ausgewertet. Von Tag zwei bis Tag zehn wurde die Anzahl und Größe der Sphären unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Ab Tag fünf war stets eine quantitative Regression zu verzeichnen, so dass es sinnvoll erschien die Datenermittlung auf diesen Tag zu beschränken. Alle weiteren Sphären-Assays mit den Zelllinien SK-BR-3, OVCAR-3 und auch mit Patientengewebe bezogen sich in ihrer Auswertung also auf Tag fünf.

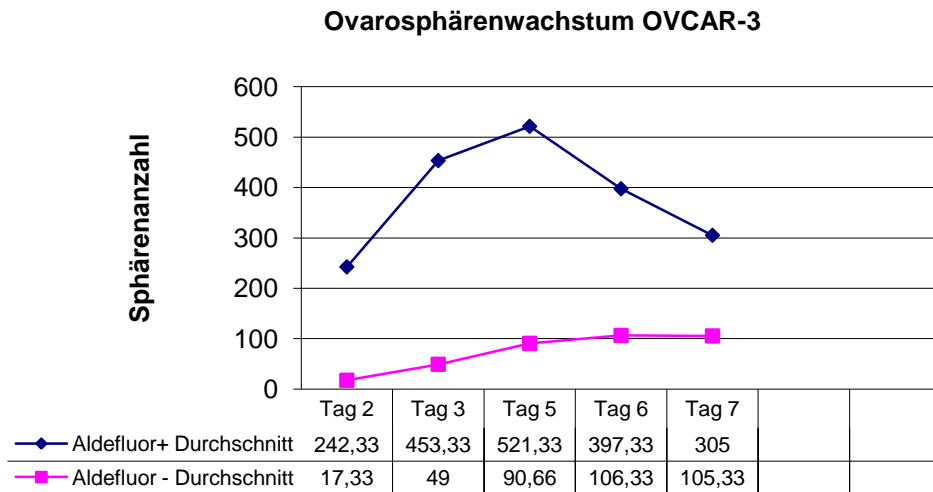


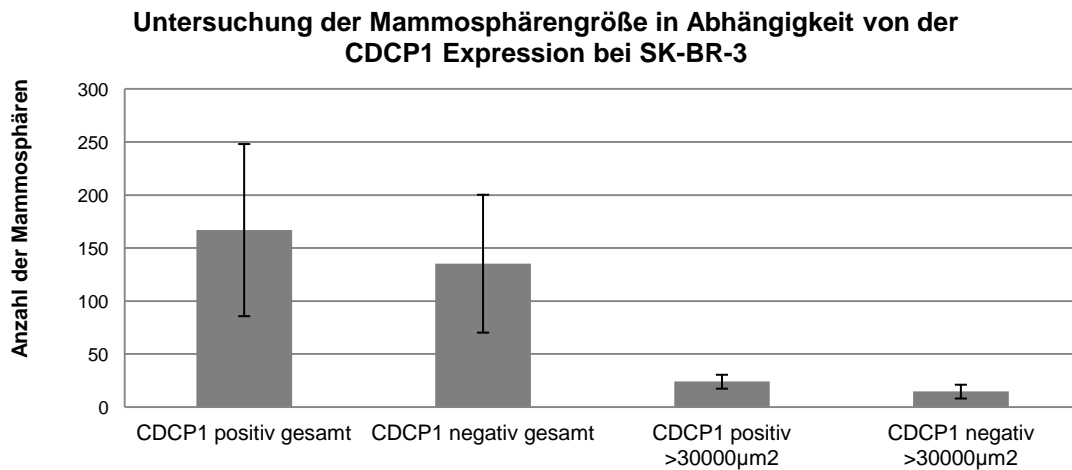
Abb. 7: Untersuchung des zeitlichen Verlaufs des Ovarosphärenwachstums  
Die Zelllinie OVCAR-3 wurde durch FACS in eine Aldefluor positive und eine Aldefluor negative Population aufgeteilt und dem Sphären-Assay unterzogen. An Tag fünf war stets das quantitative Maximum des Sphärenwachstums erreicht. Der gesamte Assay wurde dreimal wiederholt.

## 2.2 Untersuchung der Bedeutung der CDCP1 Expression als Stammzellmarker anhand der Mammakarzinomzelllinie SK-BR-3

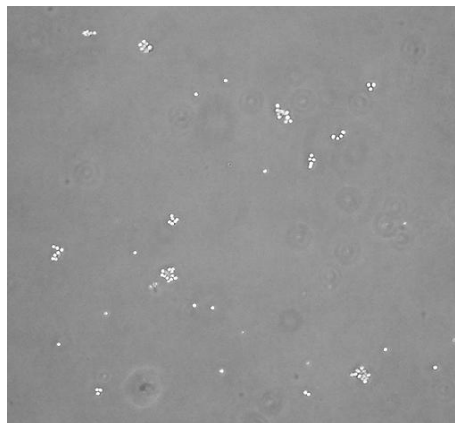
Beim Sphären-Assay sollten die Entstehung und das Wachstum von Mammosphären und damit das Stammzellpotential CDCP1 positiver SK-BR-3 Zellen geprüft und mit der Mammosphärenentwicklung der CDCP1 negativen Population der SK-BR-3 Tumorzelllinie verglichen werden. Die positive und negative Population wurden durch MACS voneinander getrennt und anschließend in 6-Well Platten in Sphärenmedium überführt. Bei der Auswertung am fünften Tag wurde auf Anzahl und Größe der Mammosphären geachtet, wobei zwischen Sphären größer und kleiner als  $30000\mu\text{m}^2$  unterschieden wurde. Der Sphären-Assay wurde dreimal wiederholt. Es hat sich gezeigt, dass Mammosphären sowohl aus CDCP1 positiven als auch aus CDCP1 negativen Zellen der Zelllinie SK-BR-3 entstehen. Dabei war ein nicht signifikanter Unterschied in der Anzahl der gebildeten Sphären zu beobachten ( $167\pm 81,18$ , bzw.  $135,33\pm 65,04$ ).

Hinsichtlich der Größe der gebildeten Mammosphären äußerten Zellen mit CDCP1 Expression ein minimal stärkeres Potential größere Sphären zu bilden. So bildeten  $24 \pm 6,56$  CDCP1 positive Zellen gegenüber  $14,66 \pm 6,5$  CDCP1 negativen Zellen der Linie SK-BR-3 Sphären mit einer Fläche  $>30000 \mu\text{m}^2$ .

**A**



**B**



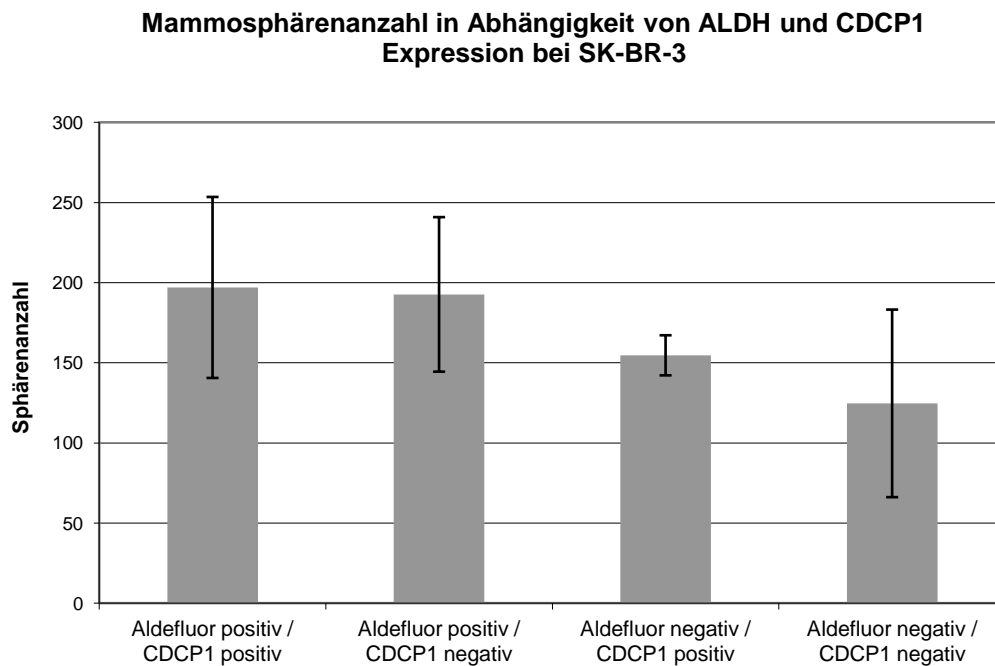
*Abb. 8: Sphärenbildung in Abhängigkeit der CDCP1 Expression bei SK-BR-3*  
 Zellen der Mammakarzinomzelllinie SK-BR-3 wurden durch MACS in eine CDCP1 positive und CDCP1 negative Population aufgetrennt und einem fünftägigen Sphären-Assay unterzogen. Beide Populationen bildeten Mammosphären, wobei bei Mammosphären  $>1000 \mu\text{m}^2$  die CDCP1 positiven Sphären überwogen ( $167 \pm 81,18$  gegenüber  $135,33 \pm 65,04$ ). Kleinere Sphären wurden nicht mitgezählt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung, berechnet aus drei oder mehr unabhängig voneinander durchgeführten Messungen (A). Mammosphären, gebildet aus Tumorstammzellen der Zelllinie SK-BR-3, zehnfache Vergrößerung (B).

### **2.3 Untersuchung der Bedeutung der Koexpression von CDCP1 und ALDH als Stammzellmarker anhand der Mammakarzinomzelllinie SK-BR-3**

Um die Bedeutung der CDCP1 und ALDH Expression als Stammzellmarker in Kombination zu untersuchen, wurde die Zelllinie SK-BR-3 ausgewählt, die eine heterogene Expression von CDCP1 und ebenfalls ALDH Aktivität zeigt, was in bisher publizierten Studien mit Stammzellaktivität in Verbindung gebracht wurde. Die SK-BR-3 Zellen wurden abhängig von ihrer CDCP1 Expression, bzw. ALDH Aktivität durch FACS in vier Populationen sortiert und dann unter nicht adhärennten Bedingungen in Sphärenmedium kultiviert. Die Auswertung der Sphärenentwicklung erfolgte am fünften Tag, der Sphären-Assay wurde dreimal wiederholt. Bei den ausgewerteten Zellpopulationen handelte es sich um eine ALDH positive/CDCP1 positive Population, eine ALDH negative/CDCP1 negative Population sowie eine rein Aldefluor positive und eine rein CDCP1 positive Population.

Die meisten Mammosphären entstanden aus der Aldefluor und CDCP1 doppelt positiven Population mit  $197 \pm 56,47$  Ereignissen sowie aus der allein Aldefluor positiven Population ( $192,66 \pm 48,22$ ), wohingegen  $154,66 \pm 12,5$  Ereignisse bei der rein CDCP1 positiven Population zu messen waren.  $124,66 \pm 58,53$  Sphären gingen aus Zellen hervor, welche weder ALDH Aktivität noch CDCP1 besaßen.





*Abb. 9: Mammosphärenbildung in Abhängigkeit der ALDH und CDCP1 Koexpression bei SK-BR-3*

*Die Aldefluor positive und CDCP1 positive Population bildete zusammen mit der rein Aldefluor positiven Population die meisten Mammosphären (197±56,47, bzw. 192,66±48,22). Aus Zellen für CDCP1 positiv/Aldefluor negativ gingen 154,66±12,5 Sphären hervor. Bei der doppelt negativen Population wurden 124,66±58,53 Ereignisse gezählt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung, berechnet aus drei oder mehr unabhängig durchgeführten Messungen.*

Betrachtete man isoliert die Aldefluor positive, negative und die CDCP1 positive und CDCP1 negative Population, so zeigte sich bei der Population mit der meisten ALDH Aktivität das größte Sphärenbildungspotential, es waren durchschnittlich 389,66±73,66 Sphären gegenüber der Aldefluor negativen Population mit 279,33±46,52 Mammosphären. Die CDCP1 positive Population bildete 351,66±67,28 und die CDCP1 negative Population 317,33±99,93 Mammosphären.

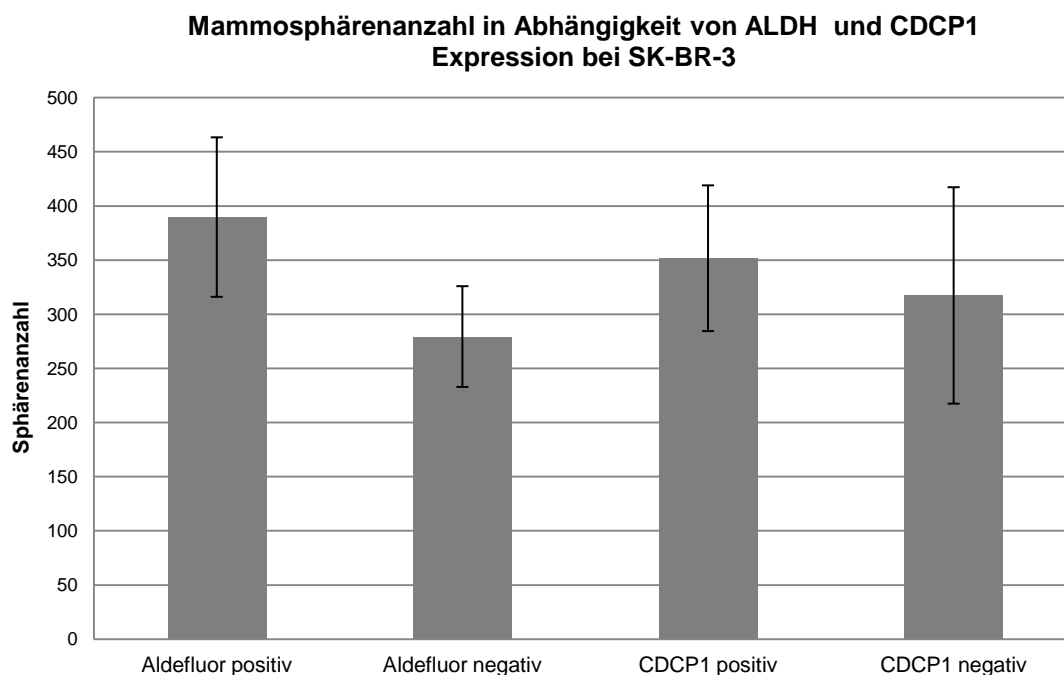


Abb. 10: Mammosphärenbildung bei isolierter Expression von CDCP1 und ALDH bei SK-BR-3  
 Das Mammosphärenwachstum der Zelllinie SK-BR-3 wurde beobachtet und nach fünf Tagen ausgewertet. Die Aldefluor positive Population bildete  $389,66 \pm 73,66$  Sphären, die Aldefluor negative Population  $279,33 \pm 46,52$  Sphären. Die CDCP1 positive bzw. negative Population bildete  $351,66 \pm 67,28$  bzw.  $317,33 \pm 99,93$  Mammosphären. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung, berechnet aus drei oder mehr unabhängig durchgeführten Messungen.

#### **2.4 Untersuchung der Bedeutung der ALDH Aktivität als Stammzellmarker beim Ovarialkarzinom anhand der Tumorstammzelllinie OVCAR-3**

Anders als im vorausgegangenen Assay wurden dieses Mal Zellen der humanen epithelialen Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR-3 eingesetzt. Das Ziel war, gezielt den Einfluss der Expression des funktionellen Markers ALDH auf die Bildung von Sphären und damit auf das Stammzellpotential zu ermitteln. Im Gegensatz zu Mammakarzinomen ist die Bedeutung der ALDH Aktivität beim Ovarialkarzinom weniger gut geklärt. Ebenfalls war zum Zeitpunkt der Untersuchung der Tumorsphären-Assay mit humanen Ovarialkarzinomzellen noch nicht etabliert. In den folgenden Experimenten wurden daher

Ovarialkarzinomzellen unter gleichen Kulturbedingungen wie Mammakarzinomzellen untersucht und die Bildung von sogenannten *Ovarosphären* ausgewertet. Zur Auftrennung von Aldefluor positiven und Aldefluor negativen Populationen wurden Einzelzellsuspensionen aus Ovarialkarzinomzellen wie oben beschrieben behandelt und gemessen. Die CDCEP1 Expression dieser Zelllinie lag, ermittelt durch das vorausgegangene Screening, bei nahezu 100%. Neben der Anzahl der Sphären sollte auch zwischen der Größe der gebildeten Sphären bei der jeweiligen Population unterschieden werden.

Die Auswertung nach fünf Tagen zeigte, dass auch Zellen einer Ovarialkarzinomzelllinie, hier OVCAR-3, in der Lage sind, Sphären zu generieren. Aus der Aldefluor positiven Population ( $256 \pm 53,69$ ) gingen im Vergleich zur Aldefluor negativen Population ( $78,83 \pm 32,23$ ) signifikant ( $P < 0,0001$ ) mehr Sphären hervor.

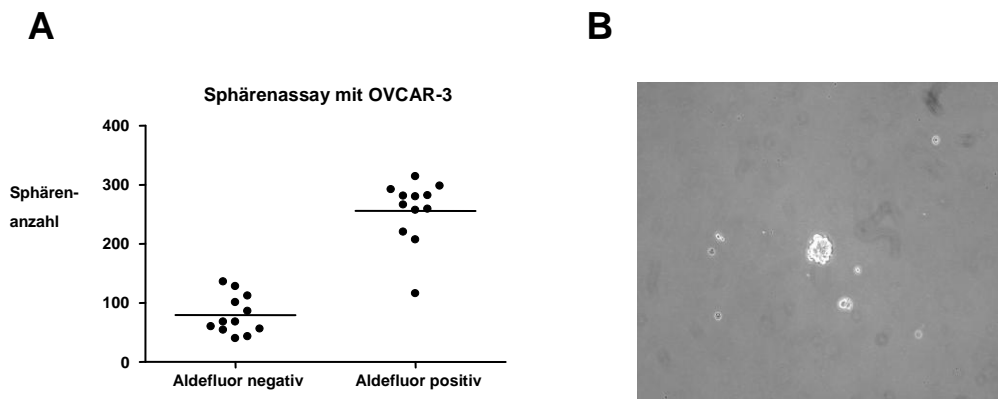


Abb. 11: Anzahl der Ovarosphären in Abhängigkeit der ALDH Expression bei OVCAR-3  
Mittels FACS wurden bei OVCAR-3 jeweils drei Aldefluor positive und drei Aldefluor negative Populationen isoliert und ein Sphären-Assay vorgenommen, dieser Vorgang wurde viermal wiederholt. Aus der positiven Population gingen  $256 \pm 53,69$  Ovarosphären hervor, die negative Population entwickelte  $78,83 \pm 32,23$  Sphären. Dargestellt sind vier unabhängig voneinander durchgeführte Messungen sowie der Mittelwert (A). Ovarosphären, gebildet aus der Aldefluor positiven Population, bei zehnfacher Vergrößerung (B).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass allein die Aldefluor positive Population von OVCAR-3 in der Lage war, große Ovarosphären zu generieren, welche  $\geq 5000 \mu\text{m}^2$  waren. In diesen Größenbereich fielen  $21 \pm 9,77$  Sphären. Aldefluor negative Zellen produzierten nur kleinere Sphären.

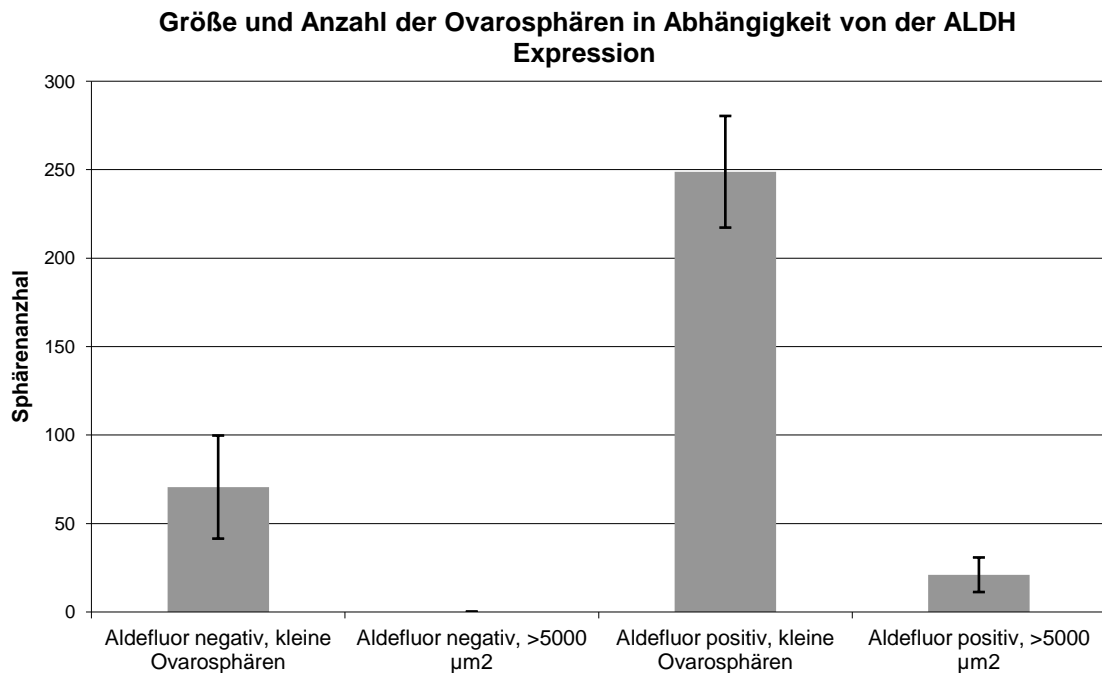
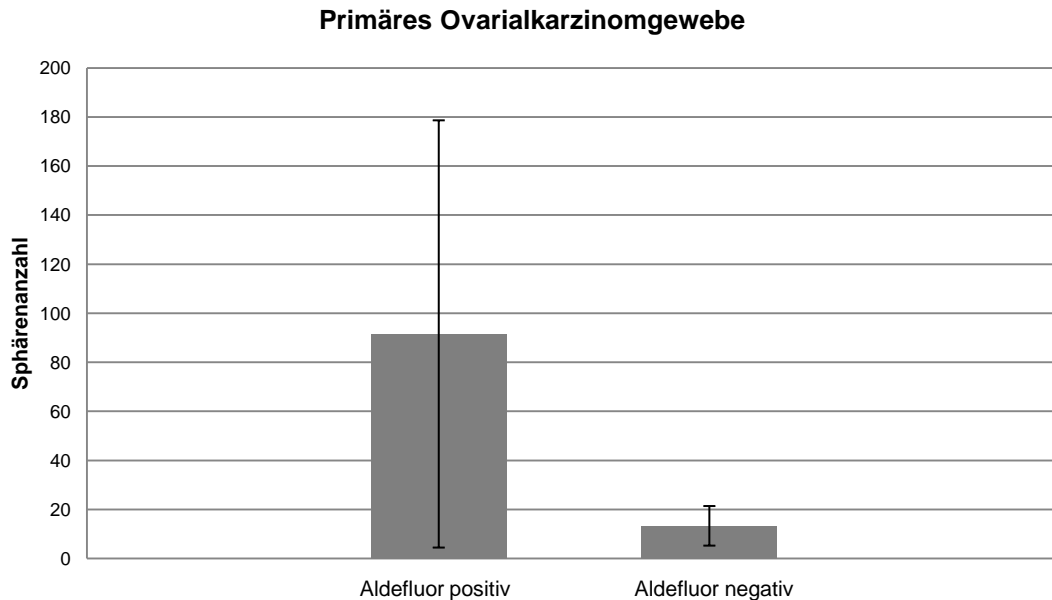


Abb. 12: Größe der Ovarosphären in Abhängigkeit der ALDH Expression bei OVCAR-3 FACS und Ovarosphären-Assay von OVCAR-3. Aldefluor negative OVCAR-3 Zellen bildeten  $70,56 \pm 29,2$  Sphären  $\leq 5000 \mu\text{m}^2$ , größere Sphären wurden nicht beobachtet. Bei der Aldefluor positiven Population wurden  $248,78 \pm 31,55$  Ereignisse  $\leq 5000 \mu\text{m}^2$  gezählt. Allein diese Population war in der Lage größere Ovarosphären zu bilden, welche  $>5000 \mu\text{m}^2$  maßen ( $21 \pm 9,77$ ).

## 2.5 Untersuchung der Bedeutung der ALDH Aktivität als Stammzellmarker bei Primärgewebe des Ovarialkarzinoms

Primäres Ovarialkarzinomgewebe wurde gesortet und das Stammzellpotential der Aldefluor positiven und der Aldefluor negativen Fraktion überprüft. Insgesamt wurden je drei Tumorgewebeproben von drei unterschiedlichen Patienten untersucht. Wie in den zuvor untersuchten Proben von Ovarialkarzinomzelllinien konnte auch hier ein Sphärenwachstum unter den gleichen Bedingungen nachgewiesen werden. Die ALDH positiven Zellen zeigten auch in diesen Proben eine stärkere Tendenz zur Sphärenbildung als ALDH negative Zellen. Bei der fluoreszierenden Population bildeten sich  $91,5 \pm 87,08$  Ovarosphären, bei den Aldefluor negativen Zellen bildeten sich  $13,28 \pm 8,07$  Ovarosphären. Aufgrund der großen Variabilität zwischen den

Proben waren die Ergebnisse in dieser kleinen Stichprobe mit Primärgewebe statistisch nicht signifikant.



*Abb. 13: Ovarosphären-Assay bei primärem Patientengewebe  
Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von insgesamt drei Messungen die an drei verschiedenen Patientenproben durchgeführt wurden.*

### **3. Zellzyklusanalyse in Abhängigkeit vom ALDH Status bei OVCAR-3**

Um zu überprüfen, ob das höhere Wachstum in Sphärenkulturen gegebenenfalls Ausdruck einer vermehrten Proliferation ALDH positiver Zellen ist, wurden Ovarialkarzinomzellen nach ALDH Aktivität aufgetrennt und bezüglich des Zellzyklus untersucht. Zellen der Zelllinie OVCAR-3 wurden gesortet, so dass sich eine Aldefluor positive und eine Aldefluor negative Population ergab. Im anschließenden Zellzyklus-Assay wurden beide Fraktionen mit PI und RNase behandelt, bevor sie mittels Durchflusszytometrie auf das PI Fluoreszenzsignal hin analysiert wurden und sich die verschiedenen

Zellzyklusphasen darstellten. Der Assay wurde dreimal wiederholt. Bei der Population ohne ALDH Aktivität befanden sich zum Zeitpunkt der Analyse  $22,57\% \pm 3,37\%$  der Zellen in der S-/G2-/M-Phase. Damit ergab sich zur Aldefluor positiven Population mit  $34,57 \pm 3,4\%$  ein hoch signifikanter Unterschied.

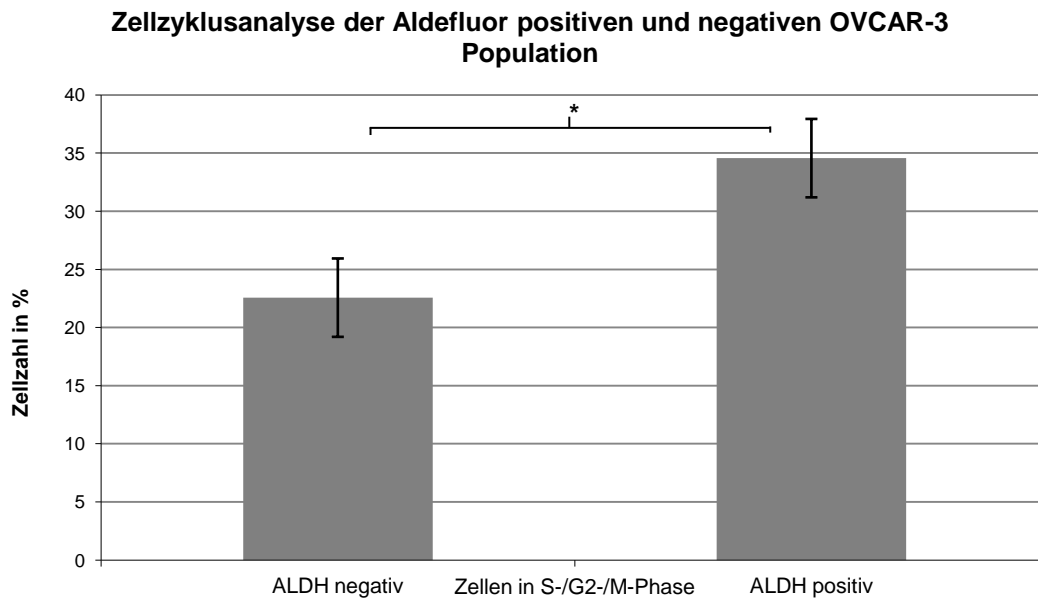


Abb. 14: Zellzyklusanalyse von Zellen der Tumorstammzelllinie OVCAR-3

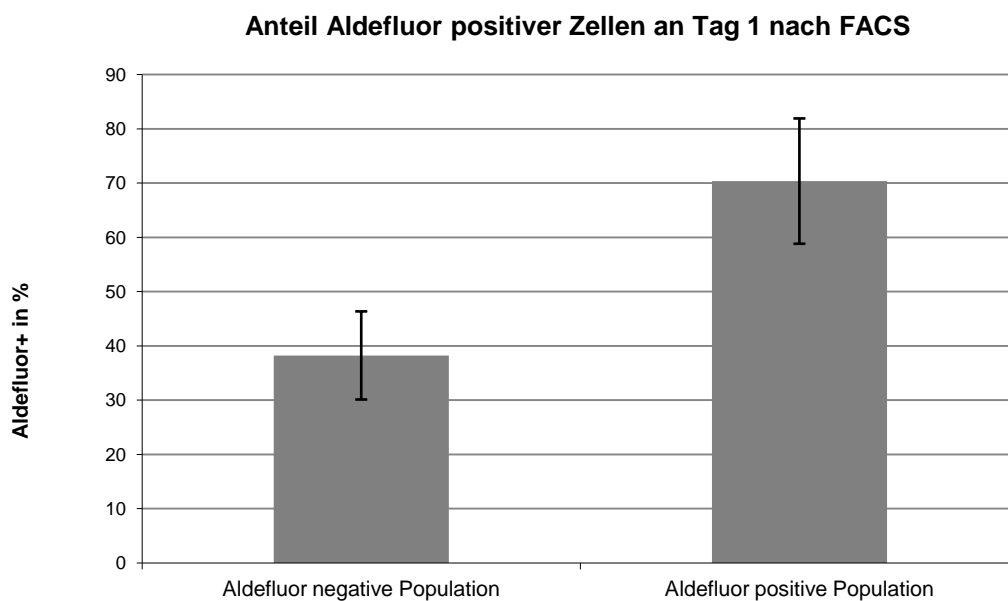
Zellen der Tumorstammzelllinie OVCAR-3 wurden zuvor mittels Aldefluor-Assay in ALDH positive und negative Zellen aufgetrennt. Mit  $34,57 \pm 3,4\%$  befanden sich in der ALDH positiven Population hoch signifikant mehr Zellen in der S-/G2-/M-Phase als in der ALDH negativen Population ( $22,57\% \pm 3,37\%$ ). Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von insgesamt drei durchgeführten Messungen.

#### 4. Instabilität der ALDH Aktivität *in vitro* bei OVCAR-3

Aus Zellen der Zelllinie OVCAR-3 wurden basierend auf dem Aldefluor-Assay eine Aldefluor positive (100 % ALDH Aktivität) und eine Aldefluor negative (0 % ALDH Aktivität) Fraktion sortiert. Die zwei Populationen wurden anschließend adhärenz in T-75 Flaschen separat voneinander für 24 Stunden in Nährmedium kultiviert. Danach wurde die Adhärenz durch Trypsin/EDTA gelöst und die

ALDH Aktivität der einzelnen Zellen durch Zelldurchflusszytometrie ermittelt. Dieser Assay wurde dreimal wiederholt. Das Differenzierungspotential der Aldefluor positiven hin zu einer Aldefluor negativen Population und vice versa sollte ermittelt werden.

Es wurde beobachtet, dass die ursprünglich als Aldefluor negativ isolierte Population nun zu  $38,2 \% \pm 8,1 \%$  ALDH Aktivität zeigte. Die positive Population war nach 24 Stunden noch zu  $70,33 \% \pm 11,55 \%$  positiv. Das Phänomen der nach 24 Stunden veränderten auftretenden ALDH Aktivität, welches sich sowohl bei der komplett Aldefluor negativen, als auch bei der allein Aldefluor positiven Population darstellte, lässt auf eine Instabilität (und möglicherweise Zellzyklusphasenabhängigkeit) der ALDH Aktivität in diesem Gewebe schließen.



*Abb. 15: Darstellung der ALDH Instabilität anhand der Zelllinie OVCAR-3  
Durch FACS erzeugte rein Aldefluor positive und Aldefluor negative Zellpopulationen vollzogen innerhalb von 24 Stunden einen Wandel in ihrer ALDH Aktivität. Die ursprünglich negative Population war nun zu  $38,2\% \pm 8,1\%$  positiv, bei der positiven Population verminderte sich die Aktivität auf  $70,33\% \pm 11,55\%$ . Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von insgesamt drei durchgeführten Messungen.*

## D Diskussion

### 1. Expression der ALDH

In vorausgegangenen Studien wurde bereits ALDH1 Expression in verschiedenen Tumoren, einschließlich in Mamma-, Ovarial- und Lungenkarzinomen, nachgewiesen [38]. Darüber hinaus wurde vor allem in Mammakarzinomen von einem Zusammenhang zwischen ALDH Expression und Stamm- und Tumorstammzellpotential berichtet [35, 45]. Diese Beziehung zu untersuchen war ein wesentliches Ziel dieser Arbeit. Voraussetzung dafür war, dass die Aldefluor Färbemethode auch in unserem Labor und auf die von uns ausgewählten Zelllinien reproduzierbar angewendet werden konnte, d.h., dass indirekt die intrazelluläre Aktivität der ALDH nachgewiesen werden konnte. Die Anwendbarkeit des Protokolls konnte bestätigt werden, intrazelluläre Fluoreszenz war vorhanden und der ALDH positive Anteil stellte sich quantitativ unterschiedlich gegenüber der Negativkontrolle dar. Insgesamt zeigte sich im Bereich aller Tumorentitäten eine große Heterogenität bezüglich des Gehalts an Zellen mit nachweisbarer ALDH Aktivität. In zwei der Mammakarzinomzelllinien (MCF7, BT-549) waren keine ALDH positiven Populationen mit dieser Methode nachweisbar, während zwei andere Zelllinien (SK-BR-3 und MDA-MB-468) Aldefluor positive Populationen zeigten, die in Abhängigkeit von Zelldichte und Färbemethode unterschiedlich stark ausgeprägt waren. Bei den Ovarialkarzinomzelllinien äußerten sämtliche Zelllinien nur minimale ALDH Aktivität, bis auf die Zelllinie OVCAR-3, in der ca. 50 % der Zellen Aldefluor positiv waren. Die ermittelten Daten hinsichtlich des relativen Anteils der Aldefluor positiven Populationen sind im Einklang mit bereits bestehenden Daten [35, 38, 45].



Aufgrund der robusten Aldefluor positiven Zellpopulation wurden die Zelllinien SK-BR-3 (14,97±7,94 %) und OVCAR-3 (52,3±11,1 %) ausgewählt, um beide Populationen (Aldefluor positiv und Aldefluor negativ) zu isolieren und anschließend weiter zu untersuchen.

Bei den ermittelten Daten fiel auf, dass bei wiederholten Messungen große ALDH Aktivitätsabweichungen innerhalb der Aldefluor positiven Population der jeweiligen Zelllinie zu verzeichnen waren. Eine Erklärungsmöglichkeit bietet der unten diskutierte Aldefluor-Shift (siehe Anhang: 1. Aldefluorfärbung). Des Weiteren ist zu diskutieren, inwiefern eine bestimmte Zellzyklusphase mit der Aktivität der ALDH zusammenhängt. Unterschiedliche Zyklusphasen könnten mit einer unterschiedlichen Expression dieses Enzyms einhergehen, so dass dementsprechend auch die Wechselwirkungen dieses Enzyms mit dem Substrat BODIPY-Aminoazetaldehyd (BAAA) unterschiedlich stark nachgewiesen werden würden. So könnte beispielsweise eine geringere ALDH Expression während des Ruhezustands, also der G0 Phase, einer Zelle auftreten. Diese Phase war besonders bei dichtem adhärentem Wachstum der Zelllinien in der Kulturflasche nachzuweisen. Dadurch gewinnt der Zeitpunkt zu dem die einzelne Zelle aus der Kultur entnommen wird, bzw. die Zelldichte innerhalb der Kultur, an Bedeutung für das Ergebnis der folgenden Durchflusszytometrie.

## 2. Expression des CDCP1 Proteins

Beim CUB-Domain-Containing Protein (CDCP1) handelt es sich um ein neu entdecktes Transmembranprotein, welches initial als in hämatopoetischen Stammzellen exprimiert und als diagnostischer Marker bei Leukämien beschrieben wurde [47, 48]. Seine Überexpression wurde unter anderem in Brust-, Lungen- und Kolonkarzinomen nachgewiesen [47, 49]. CDCP1 positive Zellen zeichneten sich Publikationen zufolge *in vivo* durch erhöhte Proliferation, Metastasierung, Invasivität, Aggressivität [53, 54] und durch eine

verschlechterte Prognose aus [52]. Dieselben Tumorzelllinien des Mammakarzinoms, des Ovarialkarzinoms und des Bronchialkarzinoms wurden auf ihre CDCP1 Expression hin untersucht. Es war von Interesse herauszufinden, ob CDCP1 auch in den von uns studierten Tumorentitäten einen Stammzellmarker darstellt. Das benachbarte Labor für Stammzellforschung, geleitet von Dr. Hans-Jörg Bühring, verfügte über einen selbstentwickelten CDCP1 Antikörper, der für diese Untersuchungen zur Verfügung gestellt wurde [47]. Wir untersuchten daher die Oberflächenexpression von CDCP1 in den oben genannten Brust-, Ovarial- und Lungenkarzinomzelllinien. Bei der Brustkarzinomzelllinie SK-BR-3 zeigte die Durchflusszytometrie eine positive Population von  $67,65 \pm 9,55$  %. Die Zelllinie MCF7 zeigte hingegen gegenüber der Negativkontrolle keine CDCP1 positive Population, MDA-MB-468 und BT-549 exprimierten CDCP1 währenddessen in nahezu 100 % der Zellen. Ähnliche Ergebnisse offenbarten sich auch bei der Messung der Ovarialkarzinomzelllinien, hier waren alle Zellen der Reihe OVCAR zu 100 % markiert, wohingegen NCI/ADR-RES gegenüber der Negativkontrolle kein CDCP1 exprimierte. Die maligne pulmonale Tumorzelllinie A549 war zu  $88,37 \pm 4,16$  % positiv.

Wie auch bei der Fluoreszenzmessung des Aldefluor stellten sich innerhalb der Tumorzelllinien desselben Gewebetyps bei der CDCP1 Messung abweichende Messergebnisse hinsichtlich der positiven Fraktion dar. Auffällig war, dass es unter den Zelllinien eine Tendenz gab, CDCP1 entweder komplett oder gar nicht zu exprimieren. Ausnahmen bildeten SK-BR-3 und A549. Das vollständige Vorhandensein, bzw. das vollständige Fehlen dieses transmembranen Markers lassen es fraglich erscheinen, inwiefern CDCP1 bei den betreffenden Zelllinien oder generell geeignet ist, eine Tumorstammzellpopulation abhängig von deren Expression zu charakterisieren, da eine umschriebene Population mittels dieses Markers nicht isoliert werden konnte. Genauere vergleichende Assays und Untersuchungen der CDCP1 positiven Population gegenüber der CDCP1 negativen Population waren daher auch nur bei den Zelllinien SK-BR-3 und A549 möglich.

Es ist nicht geklärt, warum CDCEP1 bei manchen Zelllinien in jede Zellmembran eingebaut wird, bei anderen Zelllinien auf der Zelloberfläche hingegen gar nicht vertreten ist. Bei allen untersuchten Zelllinien handelte es sich um epitheliale Zelllinien, so dass das ursprüngliche Gewebe nicht der ausschlaggebende Faktor sein konnte.

### **3. Etablierung eines Tumorsphären-Assays für Ovarialkarzinomzellen**

Die jetzigen Ergebnisse legen nahe, dass es innerhalb von Ovarialkarzinomzelllinien und primärem Patientengewebe eine Zellpopulation gibt, die Tumorstammzellpotential besitzt. Die funktionellen Eigenschaften von Stammzellen (Selbsterneuerung und Differenzierung) können am besten nach Transplantation *in vivo* untersucht werden. Der Sphären-Assay ist ein *in vitro* Surrogat-Assay zur Bestimmung klonogener Eigenschaften, die Tumorstammzellen charakterisieren. Nachweislich wurden auf diesem Wege Zellen identifiziert, die Stammzeleigenschaften besitzen. Zum einen wegen des nicht adhärenen Wachstums in flüssigem Medium, zum anderen wegen der Fähigkeit der anschließenden multipotenten Differenzierung. Derartige Erkenntnisse beruhten anfangs auf Forschung an neuronalem Gewebe [21], später auch auf Daten, welche aus Untersuchungen von Brustgewebe, einschließlich Tumorpatientengewebe, gewonnen wurden [22, 56]. Für Ovarialkarzinomzellen war der Sphären-Assay zu Beginn unseres Projekts nicht etabliert. Unsere Untersuchungen konnten zeigen [57], dass unter Verwendung gleicher Bedingungen wie beim Mammosphären-Assay Ovarialkarzinomzellen sich ähnlich verhalten und innerhalb weniger Tage Sphären bilden können. Die Kapazität der Sphärenbildung *in vitro* konnte für Zellen aus Zelllinien sowie Primärgewebe gezeigt werden, und wurde in den Folgeversuchen als Surrogat-Assay für Ovarialkarzinomzellen mit Stammzeleigenschaften genutzt.

#### **4. Untersuchung des Stammzellpotentials CDCP1 positiver Zellen**

Die Durchflusszytometrie oder MACS Methode sowie der Aldefluor-Assay wurden verwendet, um Populationen mit CDCP1 Expression und/oder ALDH Aktivität zu isolieren. Um diese Faktoren hinsichtlich ihrer Qualität als Stammzellmarker zu überprüfen, wurden die isolierten Zellfraktionen bezüglich ihres Potentials *in vitro* Sphären zu initiieren untersucht. Dabei zeigte sich beispielsweise in der SK-BR-3 Zelllinie, dass Mammosphärenbildung unabhängig von der Expression von CDCP1 geschieht. Sowohl bei der positiven als auch bei der negativen Population wurde eine ähnliche Anzahl von Sphären beobachtet. Sowohl nach MACS als auch nach Durchflusszytometrie war im Sphären-Assay kein signifikanter Unterschied im Sphärenbildungspotential der CDCP1 positiven und negativen Population zu beobachten. Diese Ergebnisse indizieren, dass CDCP1 nicht geeignet ist, eine Tumorstammzellpopulation zu identifizieren, wie von früheren Studien suggeriert. Einige dieser Erkenntnisse bezogen sich allerdings auf Daten von Studien, welche zum einen *in vivo* gewonnen wurden und sich zum anderen auf unterschiedliches Gewebe beziehen. Bei SK-BR-3 handelt es sich um eine humane epitheliale Zelllinie eines Mammakarzinoms, bei dem die Expression von CDCP1 eine andere Rolle spielen könnte als bei humanen Knochenmarkzellen. Hier kam es bei Transplantation derartiger CDCP1 positiver Zellen in NOD/SCID Mäuse zu Proliferation mit Differenzierung über mehrere Generationen hinweg, was auf das Stammzellpotential von CDCP1 hindeutete. Zusätzlich wurde hier eine Koexpression mit dem hämatopoetischen Stammzellmarker CD34 beschrieben [48]. Ebenfalls *in vivo* wurden CDCP1 exprimierende leukämische Blastenzellen beschrieben, unter anderem in Koexpression mit den vorbeschriebenen Tumorstammzellmarkern CD34 und CD133 [47].

Zwar wurde CDCP1 auch schon bei humanen Tumoren wie dem Bronchialkarzinom, dem kolorektalen Karzinom, dem Prostatakarzinom und auch dem Brustkrebs nachgewiesen, jedoch wurde der Marker hier mit einem

erhöhten metastatischen Potential assoziiert, nicht mit Stammzeleigenschaften [47, 54]. Selbiges gilt für Zelllinien wie die des Lungenadenokarzinoms [51] und des Zervixkarzinoms [54], bei denen die Metastasierung der CDCP1 positiven Population im Tiermodell beobachtet wurde. Nachgewiesenermaßen begünstigt hohe Expression Metastasierung, hohe Proliferationsraten und invasives Wachstum [53]. Darüber hinaus reagieren CDCP1 positive Zellen *in vitro* resistenter gegenüber Chemotherapie [54]. Basierend auf diesen Erkenntnissen ist es nicht verwunderlich, dass CDCP1 als prognostischer Marker anzusehen ist, welcher mit schlechter Prognose, hoher Rückfallrate und verkürztem Disease-Free Survival und Overall Survival einhergeht. Die oben beschriebenen Eigenschaften CDCP1 positiver Zellen werden durch die Struktur des transmembranen Proteins wiedergespiegelt, welche für die Adhäsion und Interaktion mit Zellen oder Matrix verantwortlich ist, die Grundlagen für Überleben, Proliferation und Fortbewegung. Es ist durchaus möglich, dass es dieser adhäsiven Eigenschaft geschuldet ist, dass CDCP1 positive Zellen größere Sphären bildeten als CDCP1 negative Zellen. Diese Beobachtung war jedoch nicht signifikant. Studien zeigen ebenfalls, dass das Level der CDCP1 Expression mit der proliferativen Aktivität eines Tumors zusammenhängt [50], jedoch lässt dieser Zusammenhang nicht direkt auf CDCP1 als einen Tumorstammzellmarker rückschließen.

Insgesamt unterstützen unsere Untersuchungen die Hypothese, dass CDCP1 in manchen Tumoren exprimiert wird und wichtige tumorbiologische Rollen übernimmt, deuten jedoch darauf hin, dass diese Funktionen nicht auf bestimmte Zellsubpopulationen beschränkt sind und dass letztendlich CDCP1 Oberflächenexpression nicht als Stammzellmarker bei den von uns untersuchten Mamma-, Ovarial- und Lungenkarzinomzelllinien benutzt werden kann.

Trotzdem hat CDCP1 bei humanen Tumoren Bedeutung als Marker von besonders aggressiver Tumorentwicklung, auch hinsichtlich Metastasierung und von Resistenz, sodass CDCP1 klinisch, vor allem therapeutisch, von großem Nutzen sein kann. Die CDCP1 Expression könnte beispielsweise als Indikator für bestimmte Antikörpertherapien dienen, um Metastasierung zu

lindern oder sogar zu verhindern. Charakterisierung der genauen Bedeutung dieses Transmembranproteins sollte daher das Ziel weiterer Forschung sein.

## **5. Co-Untersuchung von ALDH Aktivität und CDCP1 Expression**

In weiteren Assays wurde das Sphärenbildungspotential von CDCP1 und ALDH doppelt positiven Zellen untersucht, um zu analysieren, ob CDCP1 beispielsweise innerhalb der ALDH positiven Brustkrebszellen, eine Subpopulation identifiziert, die erhöhte Klonogenität besitzt. Abermals wurde die humane epitheliale Tumorstammzelllinie SK-BR-3 untersucht. Eine Aldefluor+/CDCP1+ Population, eine Aldefluor+/CDCP1- Population, eine Aldefluor-/CDCP1+ Population und eine Aldefluor-/CDCP1- Population wurden durch FACS sortiert. Erneut wurde in jeder Population die Sphärenbildungskapazität evaluiert. Wie bereits publiziert [35] konnte gezeigt werden, dass die Aldefluor positiven Populationen mehr Sphären bildeten als die ALDH negativen. Interessanterweise war dies jedoch unabhängig davon, ob CDCP1 ebenfalls exprimiert war oder nicht, was gegen CDCP1 als Stammzellmarker in dieser Tumorzelllinie spricht. Somit bestätigen unsere Ergebnisse, dass das Stammzellpotential im Wesentlichen von Zellen mit ALDH Aktivität ausgeht, und der *in vitro* Tumorsphären-Assay diese Eigenschaften nachweisen kann. Andererseits wurde das Ergebnis des vorausgegangenen Sphären-Assays, welcher sich auf die CDCP1 Expression konzentrierte, bestätigt. Es zeigte sich, dass der CDCP1 Expression als Marker zur Identifikation von Tumorstammzellen mit Sphärenbildungskapazität keine tragende Rolle zukommt. Somit war auch klar, dass die Verwendung der beiden potenziellen Tumorstammzellmarker ALDH Aktivität und CDCP1 Expression sich nicht eignet, um mittels dieser Markerkombination eine besonders potente Stammzellpopulation zu isolieren oder Tumorstammzellen genauer zu

charakterisieren. Die ALDH Aktivität hingegen stellte sich als robuster Marker zum Nachweis von Zellen mit sphäreninitiiierender Kapazität dar.

Ähnlich wie bei CDCP1 zeigte sich die Bedeutung der ALDH Aktivität anfänglich beim hämatopoetischem Gewebe [30–32]. Auch bei Aldefluor zeigten positive Knochenmarkzellen die Fähigkeit über mehrere Generationen hinweg zu proliferieren, ebenso kam es zu Koexpression mit den hämatopoetischen Stammzellmarkern CD133 und CD34. Anders als bei CDCP1 wurde allerdings auch bei humanen Tumoren wie neuronalen Tumoren [34], Lungentumoren [36] und auch bei Brustgewebe [35] der Aldefluor-Assay erfolgreich verwendet, um potentielle Tumorstammzellen zu markieren. Ginestier et al. konnten 2008 im Sphären-Assay zeigen, dass Aldefluor positive Zellen aus humanem Brustgewebe in der Lage sind, Mammosphären zu generieren und damit Stammzellcharakter nachweisen. Diese Erkenntnisse wurden sowohl anhand von Patientengewebe als auch anhand von Zelllinien gewonnen [45].

Die Ergebnisse des Sphären-Assays mit der Brustkarzinomzelllinie SK-BR-3 konnten bestehende Erkenntnisse hinsichtlich der Bedeutung von ALDH Aktivität als Stammzellmarker nur andeutungsweise, nicht aber signifikant bestätigen.

Beim Vergleich der beiden Aldefluor negativen Populationen fiel auf, dass diejenige mit CDCP1 Expression mehr Mammosphären gebildet hat. Eine Erklärungsmöglichkeit könnte darin bestehen, dass es sich anstelle von Sphären um Zellaggregate handelte, deren Bildung durch CDCP1 begünstigte Adhäsion zustande kam.

Die vorhergegangenen Assays indizierten, dass ALDH Aktivität größeren Einfluss auf Sphärenbildung hatte als die Expression von CDCP1. Dieser Marker fand keine weitere Beachtung bei Sphären-Assays der humanen epithelialen Adenokarzinomzelllinie OVCAR-3.

## 6. Untersuchung des Tumorstammzellpotentials der ALDH positiven Subpopulation beim Ovarialkarzinom

Allein die Sphärenbildung einer Aldefluor positiven und einer Aldefluor negativen Population wurden verfolgt. Es wurde eine Ovarialkarzinomzelllinie verwendet, da nun eine andere Tumorzellspezies auf ihr Sphärenbildungspotential in Abhängigkeit von ihrer ALDH Aktivität überprüft werden sollte. Bei Aldefluor positiven Zellen von Zelllinien des Mammakarzinoms konnten Sphärenbildung und damit Stammzellcharakter gegenüber der Aldefluor negativen Population bestätigt werden [35]. Mit der Entscheidung, nun eine Ovarialkarzinomzelllinie für den Assay zu verwenden, fiel die Wahl auf eine Spezies von Zelllinien über die anhand von Publikationen noch nicht von Sphärenbildung berichtet und der Zusammenhang zwischen erhöhter ALDH Aktivität und Tumorstammzellpotential noch nicht genauer dargestellt worden war. Bei den vier auf die ALDH Aktivität geprüften Ovarialkarzinomzelllinien erwies sich die Zelllinie OVCAR-3 aufgrund ihrer heterogener Expression mit einem robusten Anteil an ALDH positiven Zellen für den vorgesehenen Assay am geeignetsten. Diese Zelllinie wies in der Zelldurchflusszytometrie eine CDCP1 Expression in nahezu 100 % der Zellen auf, so dass das Ergebnis der Sphärenbildung innerhalb der Aldefluor positiven und negativen Population vom Vorhandensein jenes Markers unabhängig war. Es konnte gezeigt werden, dass auch Zellen aus primärem Ovarialkarzinomgewebe in der Lage sind, Sphären unter nicht adhärenen Bedingungen zu generieren. Die beobachteten Sphären, in Analogie zu den Mammosphären als *Ovarosphären* bezeichnet, schienen in ihrer Bildung ähnlich wie die aus Zelllinien abgeleiteten Ovarialkarzinomzellen von der Höhe der ALDH Aktivität abzuhängen. So bildeten Aldefluor positive Zellen aus primärem Ovarialkarzinomgewebe ähnlich wie Aldefluor positive Zellen der Tumorzelllinie OVCAR-3 mehr und größere Ovarosphären als die korrespondierenden Aldefluor negativen Zellen. Die Ergebnisse der Patientenproben zeigten aufgrund der Heterogenität zwischen den einzelnen Proben keine statistische Signifikanz. Mehr Probanden hätten gewählt werden



müssen, um potenzielle signifikante Unterschiede zu ermitteln. Insgesamt bestätigen jedoch diese im Ovarialkarzinom gewonnenen Daten die in Mammakarzinomzellen beobachteten Ergebnisse.

Die Expression des Oberflächenmarkers CD133, welcher bei der Zelllinie OVCAR-3 in der Aldefluor negativen und der Aldefluor positiven Population auf jeder Zelle exprimiert wurde, konnte auch in dieser Tumorentität keine Population mit bedeutend gesteigerter Sphärenbildungskapazität isolieren.

Um weitere Erkenntnisse über die Anwendbarkeit von ALDH als funktionellen Tumorstammzellmarker zu gewinnen wurden die proliferativen Eigenschaften Aldefluor positiver und negativer Zellen der Zelllinie OVCAR-3 untersucht. Bei der Zellzyklusanalyse der Zelllinie OVCAR-3 zeigte sich, dass sich Aldefluor positive und negative Zellen signifikant in ihrem proliferativen Charakter unterscheiden. Aldefluor positive Zellen proliferierten stärker, wohingegen sich Zellen der negativen Population vermutlich häufiger in der G<sub>0</sub>-Phase befanden. Die große Wachstumskapazität, die von Aldefluor positiven im Vergleich zu negativen Zellen der Zelllinie OVCAR-3 ausging, könnte auch für den Unterschied im Sphärenwachstum ursächlich verantwortlich sein. Daher müssen weitere zukünftige Studien untersuchen, ob ALDH tatsächlich ein Stammzellmarker in dieser Tumorentität ist oder ein Marker, der mit erhöhter Zellproliferation einhergeht oder sogar in Abhängigkeit von bestimmten Zellzyklusphasen hochreguliert wird. Für letzteres würde auch die Tatsache sprechen, dass ALDH negative Zellen sich *in vitro* nach kurzen Kultivierungszeiten unter Standardbedingungen bereits in ALDH positive Zellen umwandeln können und vice versa. Ein Zusammenhang zwischen ALDH Aktivität und Proliferation wurde auch bereits in Mammakarzinom(stamm)zellen diskutiert [35].

Die Stammzellhypothese besagt, dass eine Stammzelle multipotent differenzieren kann. Sie verfügt über ein uneingeschränktes Teilungspotential, wobei in den Folgegenerationen zunächst Progenitorzellen entstehen, bis es letztendlich zur Entdifferenzierung kommt. Sollte es sich bei der ALDH beim Ovarialkarzinom um einen Tumorstammzellmarker handeln, so würde die Aldefluor positive Population aufgrund der Multipotenz in den Folgepopulation

sowohl Zellen mit ALDH Aktivität als auch Zellen ohne ALDH Aktivität produzieren. Aldefluor negative Zellen würden sich dagegen weiterhin stabil Aldefluor negativ ausdifferenzieren. Vorausgesetzt die ALDH Aktivität kommt als funktioneller Tumorstammzellmarker beim Ovarialkarzinom in Frage, wäre die Generierung Aldefluor positiver Zellen in der Folgegeneration aus Aldefluor negativen Zellen im Rahmen der Krebsstammzellhypothese nicht möglich gewesen. Es zeigte sich jedoch, dass auch die Aldefluor negative zu einer Aldefluor positiven Population ausdifferenzieren konnte.

Es steht zur Diskussion, ob erhöhte ALDH Aktivität beim Ovarialkarzinom als Tumorstammzellmarker anzusehen ist oder ob mittels dieses funktionellen Markers allein Zellen markiert werden, welche sich stark proliferativ verhalten. Zwar berichten jüngere Publikationen von erhöhter ALDH Expression als Tumorstammzellmarker, jedoch bezogen sich diese Erkenntnisse vor allem auf das Mammakarzinom [35, 45] und auf das Lungenkarzinom [39]. Um diese Aspekte genauer zu erforschen, werden weitere Studien benötigt, vor allem auch unter Einbeziehung von *in vivo* Verhältnissen.

### **7. Erweiterte funktionelle und molekulare Analysen Aldefluor positiver versus negativer Ovarialkarzinomzellen**

Dass es sich bei der Aldefluor positiven Population beim Ovarialkarzinom nicht um Krebsstammzellen handelt wurde auch durch Bareis et al. („Aldehyde Dehydrogenase expression indicates proliferative activity in human ovarian carcinoma cells“, unpubliziert) gezeigt. So ergaben *in vivo* Assays mit der Zelllinie OVCAR-3 und primärem Gewebe seröser Ovarialkarzinome, dass jeweils die xenotransplantierte Aldefluor negative Population in nahezu gleicher Regelmäßigkeit in Mäusen Tumore generierte wie die Aldefluor positive Population. Molekulargenetisch ergab sich darüber hinaus keine positive Korrelation zwischen erhöhter ALDH Aktivität und der Expression von Transkriptionsfaktoren wie SOX2, Oct4 und Lin28, welche in

Tumorstammzellen des Ovarialkarzinoms angereichert sind. Auch eine Koexpression mit oberflächlichen ovariellen Tumorstammzellmarkern wie CD133, CD24 und CD44/CD117 konnte durch diese Arbeiten widerlegt werden. Letztendlich bestätigte die chemotherapeutische Behandlung der Zelllinie OVCAR-3 mit diversen Agentien, dass die ALDH positive Population keine erhöhte Resistenz aufweist, was ebenfalls gegen ihr Stammzellpotential spricht. Andererseits konnte in derselben Arbeit erhöhte proliferative Kapazität mit erhöhter ALDH Aktivität assoziiert werden. So unterschied sich *in vivo* beispielsweise die qualitative Tumorbildung, denn die Aldefluor positive Population bildete Tumore schneller und größer aus. Erhöhte Proliferationsraten innerhalb der ALDH aktiven Population konnte ebenfalls durch eine erhöhte Bromodeoxyuridin(BrdU)-Aufnahme nachgewiesen werden, des Weiteren zeigte die adhärenzte Kultivierung beider Populationen ein stärkeres Wachstum in der positiven Population an. Zu guter Letzt konnte bei malignem Patientengewebe innerhalb der ALDH aktiven Population durch immunhistochemische Analyse eine erhöhte Expression des proliferativen Markers Ki67 nachgewiesen werden, diese unterschied sich signifikant gegenüber der Ki67 Expression der Aldefluor negativen Population.

## E Zusammenfassung

Die Krebsstammzellhypothese besagt, dass die Entwicklung der malignen Tumormasse von Tumorstammzellen ausgeht [2–12]. Diese können multipotent ausdifferenzieren und sich dabei stets selbst erneuern [58–64]. CDCP1 und ALDH sind Proteine, deren Expression mit Stammzell- und Tumorstammzellpotential in Verbindung gebracht werden. Bei CDCP1 handelt es sich um ein neu entdecktes oberflächlich lokalisiertes Transmembranprotein. [46]. Aldehyddehydrogenasen stellen eine Gruppe von intrazellulär lokalisierten Enzymen dar. Sie nehmen Einfluss auf die artgerechte Entwicklung [12] und schützen vor toxischen Agentien [27, 28].

Beiden Markern ist eine Assoziation mit erhöhtem Differenzierungs-, Proliferations- [50] und Metastasierungspotential [45, 51, 53, 54] sowie mit invasivem Wachstum und Resistenz gegenüber Chemotherapie [54] gemein. Eine verschlechterte Prognose hinsichtlich Disease-Free Survival und Overall Survival [35, 52] wird ebenfalls beschrieben. Die Tumorstammzellassoziation ergab sich für beide Marker bei Leukämie [30–32, 47, 48] und für die ALDH auch bei weiteren soliden humanen Tumoren, wie dem Mammakarzinom [35] und dem NSCLC [39, 40]. Jedoch ist die funktionelle Rolle der ALDH nicht für jedes Gewebe gleichbedeutend oder sie ist noch unklar; aktuelle Daten zum Ovarialkarzinom sind widersprüchlich [42, 43].

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der Expression beider Marker für Tumorzelllinien des Mammakarzinoms (SK-BR-3, MCF7, MDA-MB-468, BT-549), des Lungenadenokarzinoms (A549), des Ovarialkarzinoms (OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-5, NCI/ADR-RES) sowie für primäres ovariales Tumorgeewebe untersucht. Die Marker wurden durch den Aldefluor-Assay bzw. durch Verwendung des primären Antikörpers CUB2 dargestellt. Anschließend wurde die Bedeutung der ALDH Aktivität und der CDCP1 Expression als

Stammzellmarker anhand des Sphären-Assays untersucht. Dieser Assay wurde beim Ovarialkarzinom neu etabliert. Hier wurden sowohl primäres Patientengewebe als auch die Tumorzelllinie OVCAR-3 auf den Zusammenhang zwischen ALDH Aktivität und Tumorstammzeleigenschaft untersucht. Das proliferative Verhalten von Zellen mit hoher ALDH Aktivität wurde mit Zellen mit niedriger ALDH Aktivität durch Zellzyklusanalysen verglichen. Zusätzlich wurde die Differenzierungskapazität untersucht.

Im Screening konnte über die Expression von CDCP1 bei den betreffenden Tumorzelllinien des Mamma-, des Ovarial- und des Lungenkarzinoms keine umschriebene Population identifiziert werden. Im Mammosphären-Assay wurde gezeigt, dass CDCP1 Überexpression bei der Mammakarzinomzelllinie SK-BR-3 nicht mit erhöhter Sphärenbildung assoziiert ist.

Selbige Zelllinien stellten sich in der Zelldurchflusszytometrie durch eine heterogene ALDH Aktivität dar. Besonders robuste Aldefluor positive Populationen zeigten sich bei den Mammakarzinomzelllinien SK-BR-3 und MDA-MB-468 sowie bei der Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR-3. Im Sphären-Assay wurde die ALDH Aktivität bei Mammakarzinomzellen der Zelllinie SK-BR-3 als funktioneller Marker zum Nachweis von Zellen mit sphäreninitiierender Kapazität bestätigt. Eine Kombination mit dem Marker CDCP1 war nicht geeignet, eine potente Stammzellpopulation zu isolieren. Erstmals konnte anhand von primärem Ovarialkarzinomgewebe und der Zelllinie OVCAR-3 gezeigt werden, dass auch beim Ovarialkarzinom Sphärenbildung möglich ist und dass die Fähigkeit zur Generation von Ovarosphären in Zusammenhang mit der ALDH Aktivität steht. Es wurden mehr und größere Ovarosphären gebildet. Anhand der Zelllinie OVCAR-3 wurde gezeigt, dass sich das Proliferationspotential der Aldefluor positiven Population signifikant von dem der Aldefluor negativen Population unterscheidet. Allerdings ergab die Beobachtung der Differenzierung der Aldefluor positiven und Aldefluor negativen Population der Zelllinie OVCAR-3, dass ebenfalls aus Aldefluor negativen Zellen Aldefluor positive Zellen hervorgehen.

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass CDCP1 nicht als Tumorstammzellmarker benutzt werden kann. Anders verhält es sich bei der Aldehyddehydrogenase,

deren erhöhte Aktivität bei verschiedenen humanen Tumoren mit Stammzellpotential assoziiert ist. Dies gilt für das Lungenkarzinom und auch für das Mammakarzinom, was durch diese Arbeit belegt wurde. Auch die Aldefluor positive Tumorzellpopulation des Ovarialkarzinoms zeigte im Sphären-Assay Stammzellpotential. Untersuchungen der Differenzierungskapazität widersprechen jedoch dem Tumorstammzellcharakter der ALDH positiven Population beim Ovarialkarzinom hinsichtlich der Krebsstammzellhypothese, welche besagt, dass Tumorstammzellen nur aus bereits bestehenden Tumorstammzellen hervorgehen können. In diesem Zusammenhang scheint die ALDH für das Ovarialkarzinom *in vitro* kein Marker zur Charakterisierung von Tumorstammzellen zu sein, sondern vielmehr Zellen mit erhöhter proliferativer Kapazität zu markieren.

Weitere Studien – insbesondere unter *in vivo* Verhältnissen – sind nötig, um diese Erkenntnisse gründlicher zu erforschen.

## F Literatur

1. Cao, Y.A., et al., *Shifting foci of hematopoiesis during reconstitution from single stem cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(1): p. 221-6.
2. Lapidot, T., et al., *A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice*. Nature, 1994. **367**(6464): p. 645-8.
3. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nature medicine, 1997. **3**(7): p. 730-7.
4. Al-Hajj, M., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(7): p. 3983-8.
5. Singh, S.K., et al., *Identification of human brain tumour initiating cells*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 396-401.
6. Fang, D., et al., *A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas*. Cancer research, 2005. **65**(20): p. 9328-37.
7. Szotek, P.P., et al., *Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(30): p. 11154-9.
8. Dalerba, P., et al., *Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(24): p. 10158-63.
9. O'Brien, C.A., et al., *A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice*. Nature, 2007. **445**(7123): p. 106-10.
10. Ricci-Vitiani, L., et al., *Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells*. Nature, 2007. **445**(7123): p. 111-5.
11. Szotek, P.P., et al., *Normal ovarian surface epithelial label-retaining cells exhibit stem/progenitor cell characteristics*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(34): p. 12469-73.
12. Vasiliou, V., A. Pappa, and T. Estey, *Role of human aldehyde dehydrogenases in endobiotic and xenobiotic metabolism*. Drug metabolism reviews, 2004. **36**(2): p. 279-99.
13. Ponnusamy, M.P. and S.K. Batra, *Ovarian cancer: emerging concept on cancer stem cells*. Journal of ovarian research, 2008. **1**(1): p. 4.
14. Sullivan, J.P., J.D. Minna, and J.W. Shay, *Evidence for self-renewing lung cancer stem cells and their implications in tumor initiation, progression, and targeted therapy*. Cancer metastasis reviews, 2010. **29**(1): p. 61-72.
15. Yang, Z.F., et al., *Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer*. Cancer cell, 2008. **13**(2): p. 153-66.
16. Vaillant, F., et al., *The mammary progenitor marker CD61/beta3 integrin identifies cancer stem cells in mouse models of mammary tumorigenesis*. Cancer research, 2008. **68**(19): p. 7711-7.

17. Vlashi, E., et al., *In vivo imaging, tracking, and targeting of cancer stem cells*. Journal of the National Cancer Institute, 2009. **101**(5): p. 350-9.
18. Tanei, T., et al., *Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2009. **15**(12): p. 4234-41.
19. Li, X., et al., *Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy*. Journal of the National Cancer Institute, 2008. **100**(9): p. 672-9.
20. Diehn, M., et al., *Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells*. Nature, 2009. **458**(7239): p. 780-3.
21. Reynolds, B.A. and S. Weiss, *Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell*. Developmental biology, 1996. **175**(1): p. 1-13.
22. Dontu, G., et al., *In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells*. Genes & development, 2003. **17**(10): p. 1253-70.
23. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 105-11.
24. Gonon-Demoulian, R., J.M. Goldman, and F.E. Nicolini, *[History of chronic myeloid leukemia: a paradigm in the treatment of cancer]*. Bulletin du cancer, 2014. **101**(1): p. 56-67.
25. Krivtsov, A.V., et al., *Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9*. Nature, 2006. **442**(7104): p. 818-22.
26. Vasiliou, V., et al., *Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping*. Pharmacogenetics, 1999. **9**(4): p. 421-34.
27. Sladek, N.E., *Aldehyde dehydrogenase-mediated cellular relative insensitivity to the oxazaphosphorines*. Current pharmaceutical design, 1999. **5**(8): p. 607-25.
28. Schnier, J.B., et al., *Identification of cytosolic aldehyde dehydrogenase 1 from non-small cell lung carcinomas as a flavopiridol-binding protein*. FEBS letters, 1999. **454**(1-2): p. 100-4.
29. Sladek, N.E., et al., *Cellular levels of aldehyde dehydrogenases (ALDH1A1 and ALDH3A1) as predictors of therapeutic responses to cyclophosphamide-based chemotherapy of breast cancer: a retrospective study*. Rational individualization of oxazaphosphorine-based cancer chemotherapeutic regimens. Cancer chemotherapy and pharmacology, 2002. **49**(4): p. 309-21.
30. Storms, R.W., et al., *Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(16): p. 9118-23.
31. Hess, D.A., et al., *Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity*. Blood, 2004. **104**(6): p. 1648-55.
32. Armstrong, L., et al., *Phenotypic characterization of murine primitive hematopoietic progenitor cells isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity*. Stem cells, 2004. **22**(7): p. 1142-51.
33. Gentry, T., et al., *Simultaneous isolation of human BM hematopoietic, endothelial and mesenchymal progenitor cells by flow sorting based on aldehyde dehydrogenase activity: implications for cell therapy*. Cytotherapy, 2007. **9**(3): p. 259-74.
34. Corti, S., et al., *Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity*. Stem cells, 2006. **24**(4): p. 975-85.
35. Ginestier, C., et al., *ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome*. Cell stem cell, 2007. **1**(5): p. 555-67.



36. Sreerama, L. and N.E. Sladek, *Class 1 and class 3 aldehyde dehydrogenase levels in the human tumor cell lines currently used by the National Cancer Institute to screen for potentially useful antitumor agents*. Advances in experimental medicine and biology, 1997. **414**: p. 81-94.
37. Alexe, G., et al., *Breast cancer prognosis by combinatorial analysis of gene expression data*. Breast cancer research : BCR, 2006. **8**(4): p. R41.
38. Deng, S., et al., *Distinct expression levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1), in human epithelial cancers*. PLoS ONE, 2010. **5**(4): p. e10277.
39. Jiang, F., et al., *Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer*. Molecular cancer research : MCR, 2009. **7**(3): p. 330-8.
40. Moreb, J.S., et al., *ALDH isozymes downregulation affects cell growth, cell motility and gene expression in lung cancer cells*. Molecular cancer, 2008. **7**: p. 87.
41. Prasmickaite, L., et al., *Aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity does not select for cells with enhanced aggressive properties in malignant melanoma*. PLoS ONE, 2010. **5**(5): p. e10731.
42. Chang, B., et al., *ALDH1 expression correlates with favorable prognosis in ovarian cancers*. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc, 2009. **22**(6): p. 817-23.
43. Liu, S., et al., *Prognostic value of cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase in ovarian cancer: a meta-analysis*. PloS one, 2013. **8**(11): p. e81050.
44. Raaijmakers, M.H., *ATP-binding-cassette transporters in hematopoietic stem cells and their utility as therapeutical targets in acute and chronic myeloid leukemia*. Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K, 2007. **21**(10): p. 2094-102.
45. Charafe-Jauffret, E., et al., *Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature*. Cancer research, 2009. **69**(4): p. 1302-13.
46. Hooper, J.D., et al., *Subtractive immunization using highly metastatic human tumor cells identifies SIMA135/CDCP1, a 135 kDa cell surface phosphorylated glycoprotein antigen*. Oncogene, 2003. **22**(12): p. 1783-94.
47. Buhring, H.J., et al., *CDCP1 identifies a broad spectrum of normal and malignant stem/progenitor cell subsets of hematopoietic and nonhematopoietic origin*. Stem cells, 2004. **22**(3): p. 334-43.
48. Conze, T., et al., *CDCP1 is a novel marker for hematopoietic stem cells*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2003. **996**: p. 222-6.
49. Scherl-Mostageer, M., et al., *Identification of a novel gene, CDCP1, overexpressed in human colorectal cancer*. Oncogene, 2001. **20**(32): p. 4402-8.
50. Ikeda, J.I., et al., *Epigenetic regulation of the expression of the novel stem cell marker CDCP1 in cancer cells*. The Journal of pathology, 2006. **210**(1): p. 75-84.
51. Uekita, T., et al., *CUB domain-containing protein 1 is a novel regulator of anoikis resistance in lung adenocarcinoma*. Molecular and cellular biology, 2007. **27**(21): p. 7649-60.
52. Ikeda, J., et al., *Expression of CUB domain containing protein (CDCP1) is correlated with prognosis and survival of patients with adenocarcinoma of lung*. Cancer science, 2009. **100**(3): p. 429-33.
53. Uekita, T., et al., *CUB-domain-containing protein 1 regulates peritoneal dissemination of gastric scirrhous carcinoma*. The American journal of pathology, 2008. **172**(6): p. 1729-39.
54. Deryugina, E.I., et al., *Functional role of cell surface CUB domain-containing protein 1 in tumor cell dissemination*. Molecular cancer research : MCR, 2009. **7**(8): p. 1197-211.

55. Siva, A.C., et al., *Targeting CUB domain-containing protein 1 with a monoclonal antibody inhibits metastasis in a prostate cancer model*. *Cancer research*, 2008. **68**(10): p. 3759-66.
56. Dontu, G., et al., *Stem cells in normal breast development and breast cancer*. *Cell proliferation*, 2003. **36 Suppl 1**: p. 59-72.
57. Bareiss, P.M., et al., *SOX2 expression associates with stem cell state in human ovarian carcinoma*. *Cancer research*, 2013. **73**(17): p. 5544-55.
58. Smalley, M. and A. Ashworth, *Stem cells and breast cancer: A field in transit*. *Nature reviews. Cancer*, 2003. **3**(11): p. 832-44.
59. Jordan, C.T., M.L. Guzman, and M. Noble, *Cancer stem cells*. *The New England journal of medicine*, 2006. **355**(12): p. 1253-61.
60. Lobo, N.A., et al., *The biology of cancer stem cells*. *Annual review of cell and developmental biology*, 2007. **23**: p. 675-99.
61. Stingl, J. and C. Caldas, *Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis*. *Nature reviews. Cancer*, 2007. **7**(10): p. 791-9.
62. Ward, R.J. and P.B. Dirks, *Cancer stem cells: at the headwaters of tumor development*. *Annual review of pathology*, 2007. **2**: p. 175-89.
63. Visvader, J.E. and G.J. Lindeman, *Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions*. *Nature reviews. Cancer*, 2008. **8**(10): p. 755-68.
64. Lee, J.T. and M. Herlyn, *Old disease, new culprit: tumor stem cells in cancer*. *Journal of cellular physiology*, 2007. **213**(3): p. 603-9.

## G Anhang

### 1. Aldefluorfärbung

Aldefluor wurde in Form von BODIPY-Aminoazetaldehyd (BAAA) als Substrat der ALDH verwendet, um quantitativ die Aktivität dieses Enzyms bei den untersuchten Tumorstammzelllinien nachzuweisen. Bei Inkubation diffundierte das ungeladene BAAA frei durch die Zellmembran und wurde intrazellulär durch ALDH zu fluoreszierendem BODIPY-Aminoazetat (BAA) oxidiert. Als geladenes Molekül blieb BAA tendenziell eher intrazellulär und konnte nicht mehr frei über die Membran nach extrazellulär diffundieren. Zusätzlicher Efflux über aktiven Transport wurde durch den Aldefluor-Assay-Puffer inhibiert.

Die im Assay zu verwendende Konzentration von Aldefluor musste im Vorfeld ermittelt werden. Informationen diesbezüglich existierten bereits in vorhanden technischen Berichten. Aus Kostengründen war es wichtig, die ALDH Aktivität maximal nachzuweisen und zwar bei minimal verwendeten Aldefluorkonzentrationen. Zu diesem Zweck wurde der Aldefluor-Assay mit mehreren Testproben an der Zelllinie SK-BR-3 durchgeführt und allein die angewandte Aldefluorkonzentration modifiziert. Mit einem Applikationsverhältnis von 1:200 war die minimale Konzentration erreicht, bei welcher die ALDH Aktivität noch optimal nachgewiesen werden konnte.

Nach Applikation des Aldefluors musste die Probe in einem 37°C warmen Wasserbad inkubieren, um die Wechselwirkungen zwischen ALDH und BAAA und die Umwandlung zu BAA und damit die intrazelluläre Fluoreszenz zu fördern. Die Inkubationszeit durfte 60 Minuten nicht überschreiten, da es sonst zu einem Verlust an Fluoreszenz gekommen wäre. Technische Berichte gaben einen Zeitraum zwischen 30 und 45 Minuten vor. Letztere Zeitspanne wurde

zunächst im Versuchsprotokoll verwendet, später aber eine kürzere Inkubationszeit von 30-minütiger Dauer gewährt. Die Färbedauer wurde letztendlich verkürzt, um die Messung so schnell wie möglich bei stetig schwindender Fluoreszenz abzuschließen.

Die Notwendigkeit, die Färbezeit so gering und konstant wie möglich zu halten, bestand darin, dass es bei dreimaliger Wiederholung eines Aldefluor-Assays bei gleicher Zelllinie zu stark abweichenden Messergebnissen hinsichtlich der ALDH Aktivität kam.

Es war stets eine Aldefluor positive Population gegenüber der Negativkontrolle nachzuweisen, jedoch variierte in allen untersuchten Zelltypen das Aktivitätsausmaß beträchtlich. Dieses Phänomen (*Aldefluor-Shift*) war vor allem bei der Zelllinie SK-BR-3 zu beobachten.

Möglichst kurze und konstante Färbedauer verminderte das Ausmaß dieser Verschiebung. Dass sich die Aldefluor positive Probe in gleichen Assays mit unterschiedlicher Aldefluor Aktivität darstellte, könnte auf verschiedene zelluläre Vorgänge zurückzuführen sein. Eine Ursache könnte eine instabile Zellmembran gewesen sein, welche einen Efflux des BAA und damit verminderte intrazelluläre Fluoreszenz begünstigte. Trypsinierung könnte in diesem Zusammenhang eine Rolle gespielt haben, ebenso wie mechanisch bedingter Zellstress während des Assays. Eine insuffiziente Hemmung der aktiven, ABC-Transporter gesteuerten Aldefluor-Exklusion durch den ALDH-Puffer könnte auch bei intakten Membranverhältnissen zu einer verminderten intrazellulären Speicherung des Farbstoffs geführt haben. Eine dritte Möglichkeit bestünde in einer von Beginn an veränderten ALDH Aktivität. Dies setzt voraus, dass das Enzym selbst beeinflusst wurde und damit BAAA als Substrat unterschiedlich stark zu BAA umgesetzt worden ist. Abgesehen von der Veränderung der Aktivität der ALDH selbst könnte es auch zu quantitativen Veränderungen der Expression des Enzyms gekommen sein, welche sich möglicherweise in den verschiedenen Zellzyklusphasen unterschiedlich darstellt.

## 2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aldefluor-Assay schematisch .....	24
Abb. 2: Durchführung des Aldefluor-Assays.....	25
Abb. 3: Durchflusszytometrie nach Aldefluorfärbung bei MCF7 und SK-BR-3 .	35
Abb. 4: Anteil der Aldefluor positiven Populationen im Vergleich .....	36
Abb. 5: CDCP1 Expression bei OVCAR-3 und NCI/ADR-RES .....	37
Abb. 6: Anteil der CDCP1 positiven Populationen im Vergleich .....	38
Abb. 7: Untersuchung des zeitlichen Verlaufs des Ovarosphärenwachstums..	40
Abb. 8: Sphärenbildung in Abhängigkeit der CDCP1 Expression bei SK-BR-3	41
Abb. 9: Mammosphärenbildung in Abhängigkeit der ALDH und CDCP1 Koexpression bei SK-BR-3 .....	43
Abb. 10: Mammosphärenbildung bei isolierter Expression von CDCP1 und ALDH bei SK-BR-3 .....	44
Abb. 11: Anzahl der Ovarosphären in Abhängigkeit der ALDH Expression bei OVCAR-3.....	45
Abb. 12: Größe der Ovarosphären in Abhängigkeit der ALDH Expression bei OVCAR-3.....	46
Abb. 13: Ovarosphären-Assay bei primärem Patientengewebe .....	47
Abb. 14: Zellzyklusanalyse von Zellen der Tumorstammzelllinie OVCAR-3.....	48
Abb. 15: Darstellung der ALDH Instabilität anhand der Zelllinie OVCAR-3 .....	49

### 3. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Benötigte Geräte .....	15
Tab. 2: Verbrauchsmaterialien .....	15
Tab. 3: Verwendete Chemikalien, Reagenzien, Puffer, Kits und Medien mit Zusatz.....	16
Tab. 4: Verwendete Antikörper.....	17
Tab. 5: Zusammensetzung der Medien.....	18
Tab. 6: ALDH Aktivität und CDCP1 Expression der untersuchten Mammakarzinom-, Ovarialkarzinom-, und Lungenkarzinomzelllinien .....	39

## 4. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC-Transporter	ATP-Binding-Cassette-Transporter
AK	Antikörper
ALDH	Aldehyddehydrogenase
APC	Allophycocyanin
BAA	BODIPY-Aminoazetat
BAAA	BODIPY-Aminoazetaldehyd
BCRP1	Breast Cancer Resistance Protein 1
BSA	Bovine Serum Albumin
Ca	Calcium
CD	Cluster of Differentiation
CDCP1	CUB Domain-Containing Protein 1
CUB-Domänen	Complement Protein Subcomponents C1/1r, Urchin Embryonic Growth Factor, and Bone Morphogenetic Protein 1-Domänen
DEAB	Diethylaminobenzaldehyd
DFS	Disease-Free Survival
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FSC	Forward Scatter
g	Erdanziehung: 9,81 m/s
G-Phase	Gap-Phase
HeLa	Henrietta Lacks
IgG	Immunglobulin G

IgM	Immunglobulin M
4-HNE	4-Hydroxynonenal
$K_m$	Michaeliskonstante
Lin	Lineage
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MCF7	Michigan Cancer Foundation 7
Mg	Magnesium
Min.	Minuten
NAD+	Nikotinamidadenindinukleotid
NADP+	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer
OS	Overall Survival
OVCAR	Human Ovarian Carcinoma Cell Line
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI	Propidium Iodid
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI1640	Rosswell Park Memorial Institute 1640
S-Phase	Synthese-Phase
Src	Sarcoma
SSC	Sidewards Scatter
TIC	Tumour Initiating Cell
TSZ	Tumorstammzelle



## H Erklärung zum Eigenanteil

Die Kozeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit *Frau Prof. Dr. Claudia Lengerke (Arbeitsgruppenleiterin des Labors für Entwicklungsbiologie)* und *Frau Dr. rer. nat. Petra Bareiss*.

Die Versuche in den Abbildungen 3-15 sowie in der Tabelle 6 wurden nach Einarbeitung durch *Frau Dr. rer. nat. Petra Bareiss* von mir eigenständig durchgeführt.

In Zusammenarbeit mit *Frau Dr. rer. nat. Petra Bareiss* wurde der in Abbildung 11 dargestellte Versuch durchgeführt.

Ich versichere das Manuskript selbständig, nach Anleitung durch *Frau Prof. Dr. Claudia Lengerke* sowie *Frau Dr. rer. nat. Petra Bareiss*, verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Mannheim, des 02.03.215

Philipp Kokorsch

# Danksagung

## **Ich bedanke mich herzlich bei**

**Frau Prof. Dr. Claudia Lengerke** für die Annahme als Doktorand, die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes sowie für die persönliche und nette Betreuung. Danke dafür, dass diese Zusammenarbeit auch trotz der letztendlich entstandenen Distanz und dem damit verbundenen größeren Aufwand weiterhin möglich war.

**Frau Dr. rer. nat. Petra Bareiss**, ohne deren Hilfe und Ratschläge diese Arbeit nicht hätte entstehen können. Danke für die geduldige Einarbeitung in die Färbe- und Messmethoden, die anschließende fachliche Betreuung und die Zusammenarbeit im Labor.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitgliedern der **AG Lengerke** für deren Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern, **Katrin und Dr. Friedrich Kokorsch**, die mir ein sorgenfreies Studium ermöglicht haben und auf deren Unterstützung ich mich immer verlassen kann.

