



Klinik und Poliklinik für Gynäkologie
Gynäkologisches Forschungslabor
Prof. Dr. rer. nat. Leticia Oliveira-Ferrer



Abschlussbericht eines Promotionsstipendiums

Mechanismen der Adhäsion von Aszites-Tumorsphäroiden aus
Ovarialkarzinompatientinnen am Peritoneum

Stipendiatin

Clara Pellens
Sternstraße 25
39104 Magdeburg
Telefon: +49 1575 8793690
Mail: clara.pellens@web.de

Zentrum für Operative Medizin

Martinstraße 52
20246 Hamburg

Prof. Dr. Leticia Oliveira Ferrer

Laborleiterin
Gebäude N61, 3.OG, Raum 306
Telefon: +49 (0) 40 7410-52559
Fax: +49 (0) 40 74 10-54103
Mail: ferrer@uke.de

Einleitung

Ovarialkarzinome (Eierstockkrebs) werden meist sehr spät entdeckt, da in frühen Stadien keine Symptome auftreten: über zwei Drittel aller Patientinnen befinden sich bei Erstdiagnose bereits in einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium. Aufgrund ihrer späten Diagnose, aber auch der hohen Rezidivrate besitzen Ovarialkarzinome eine besonders hohe Mortalität. Man nimmt heute an, dass sich bei der sogenannten peritonealen Metastasierung, durch welche die frühe Ausbreitung begründet wird, Tumorzellen und/oder Tumorzellaggregate aus dem Primärtumor im Ovar oder dem Eileiter ablösen und mit der sich im Bauchraum befindlichen Flüssigkeit transportiert werden, bis sie sich letztendlich an die Wände der Bauchhöhle anlagern und die Organe befallen. In diesem Zusammenhang stellt die Hemmung der Tumorzellanhaftung an die Bauchwand ein attraktives therapeutisches Ziel dar, das in Kombination mit einer Standardchemotherapie verwendet werden könnte.

Ziel des Projektes

Das Ziel des unterstützten Projektes war es, den Prozess der Tumorzellanhaftung (Adhäsion) an die Bauchwand unter Laborbedingungen nachzuahmen, um die Subpopulation der bösartigen adhärennten Tumorzellen isolieren und anschließend näher charakterisieren zu können.

Experimentelles Vorgehen und Ergebnisse

Es wurden zunächst Tumorzellaggregate, welche aus Ovarialkarzinompatientinnen (n=9) während einer tumorreduktiven Operation gewonnen wurden, durch verschiedene Filtrierungs- und Reinigungsschritte isoliert. Für die anschließende Zellkultivierung wurden Kulturplatten mit Kollagen I (zentraler Bestandteil der Basalmembran) sowie Kollagen I + primären Mesothelzellen (LP3) beschichtet, um so möglichst wirklichkeitsgetreue Bedingungen zu schaffen. Nachdem die Tumorzellaggregate mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wurden, wurden sie gemeinsam mit den Mesothelzellen für verschiedene Inkubationszeiten kultiviert (Abbildungen 1 und 2).

In einem weiteren Versuchsansatz wurde der Einfluss der Aszites-Flüssigkeit der Patientinnen auf das Adhäsionsverhalten der Tumorzellen untersucht. Konkret wurde die Adhäsion der Tumorzellaggregate auf Kollagen I sowie auf Kollagen I + Mesothelzellen analysiert. In diesen Adhäsionsassays wurden die Proben vergleichend in Aszites-Flüssigkeit, welche während der chirurgischen Eingriffe der Patientinnen gewonnen wurde, beziehungsweise konventionellem Nährmedium kultiviert. Da die Tumorzellen auch in diesem Versuchsansatz mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes markiert wurden, konnte nach der Inkubation und mehreren sich anschließenden Waschschrinen die Menge der adhärennten Zellen mittels eines Fluoreszenz-Readers quantifiziert werden. Dabei wurde festgestellt, dass die Zellproben verschiedener Patientinnen durchaus unterschiedlich auf die Kultivierung mit Aszites-Flüssigkeit reagieren. Insbesondere in den Kulturen, in denen die Tumorzellaggregate nicht nur auf Kollagen I, sondern auf Kollagen I + Mesothelzellen kultiviert wurden, konnte eine stärkere Adhäsion unter dem Einfluss der Aszites-Flüssigkeit festgestellt werden (Abbildung 3).

In einem weiteren Schritt wurden die adhärenz- und die nicht-adhärenz-fähige Zellpopulation der Zellaggregate voneinander getrennt, um diese dann mittels Durchflusszytometrie vergleichend zu analysieren. Als Zielmarker für die zytometrische Analyse wurden verschiedene Moleküle der Zelloberfläche ausgewählt und so ein passendes Marker-panel zusammengestellt (Tabelle 1). Dieses enthielt einerseits Antikörper gegen Moleküle, die eine Zelltyp-Charakterisierung ermöglichen, um lebende Tumorzellen identifizieren zu können, andererseits auch Moleküle, die bekanntermaßen eine wichtige Rolle in verschiedenen Zelladhäsionen spielen. Ein besonderer Fokus lag dabei auf unterschiedlichen Integrin-Untereinheiten. Nachdem durch Durchflusszytometrie die Daten verschiedener Patientinnen unter den verschiedenen beschriebenen Versuchsansätzen gewonnen werden konnten, zeigen sich auch in diesen Analysen deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Patientinnen, die auf eine große Heterogenität von Ovarialkarzinomen hinweisen. Insbesondere die unterschiedliche Expression der Oberflächenmoleküle CD90 und CD44 scheinen hierbei das Adhäsionsverhalten der Zellaggregationen in unterschiedlich starkem Maße zu beeinflussen. An einer tiefgehenderen Analyse sowie der Untersuchung einer Korrelation zwischen dem Ausmaß der Adhäsion und der Expression der untersuchten Oberflächenmoleküle wird weiterführend gearbeitet (Abbildung 4).

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Timo Gemoll an der Universität Lübeck wurde zudem eine vergleichende Massenspektrometrie von Tumorzellaggregaten durchgeführt, die einerseits in konventionellem und andererseits für verschiedene Inkubationszeiten ($t_1 = 2\text{h}$; $t_2 = 48\text{h}$) in Aszites-Flüssigkeit kultiviert wurden. Die Quantifizierung der vorkommenden Proteine wird nicht nur in die derzeit laufenden Analysen der gewonnenen Daten einbezogen, sondern es wird insgesamt nach neuen möglichen Faktoren, die eine Zelladhäsion in Aszites-Flüssigkeit begünstigen, gesucht.

An einer zusammenführenden Publikation der Ergebnisse aller Versuchsansätze, die sich vorrangig auf Faktoren konzentriert, welche ein so heterogenes Adhäsionsverhalten innerhalb ein und derselben Tumorentität erklären können, wird momentan gearbeitet.

Anhang:

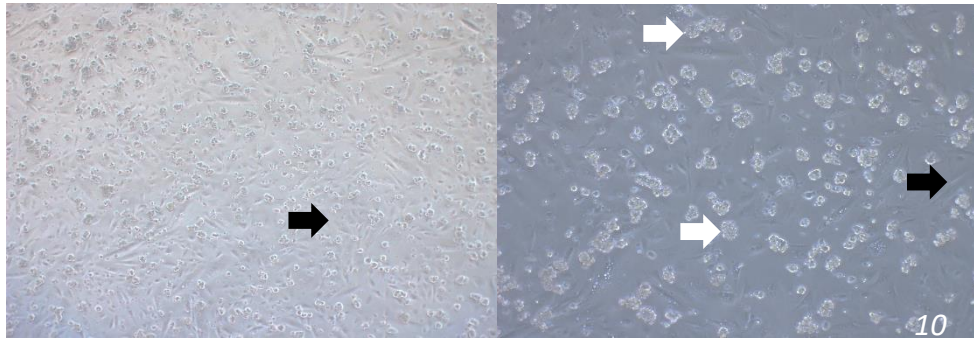


Abbildung 1: Kultivierung von Ovarialkarzinom-Tumorzellaggregaten (weiße Pfeile) auf primären Mesothelzellen (schwarze Pfeile)

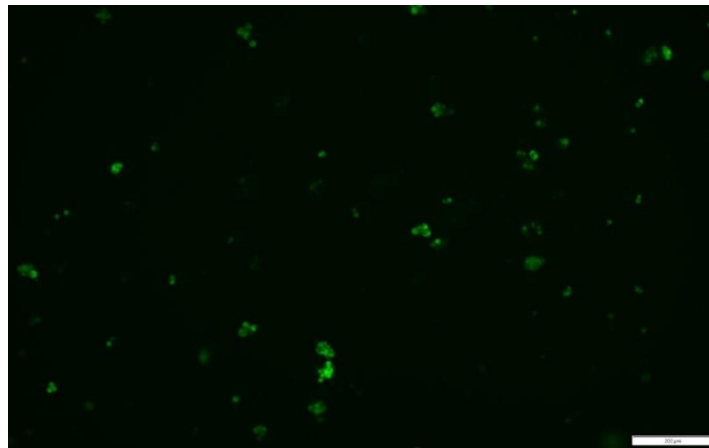


Abbildung 2: Fluoreszenz-markierte Tumorzellaggregate bei Kultivierung auf primären Mesothelzellen

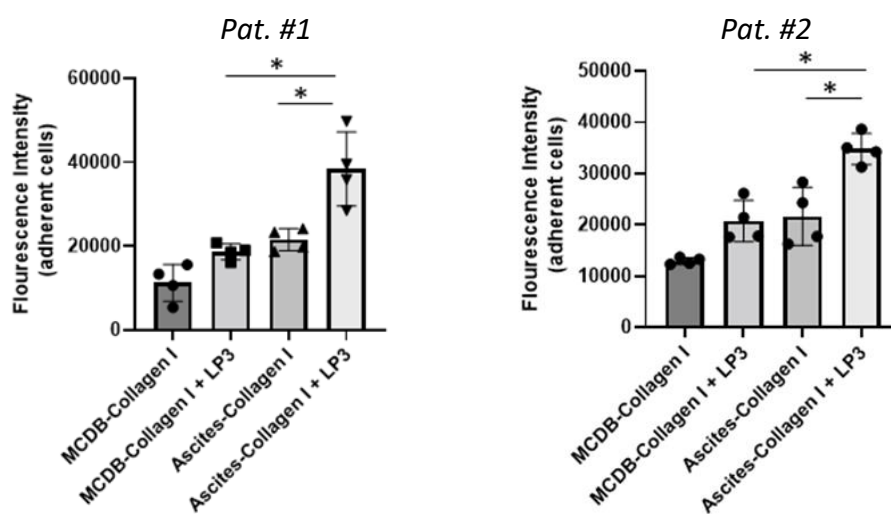


Abbildung 3: Quantifizierung der Adhäsion von Tumorzellaggregaten aus 2 Ovarialkarzinom Patientinnen auf Kollagen I oder Kollagen I + Mesothelzellen (LP3) unter dem Einfluss von Aszites-Flüssigkeit bzw. Nährmedium (MCDB).

Patientin #3

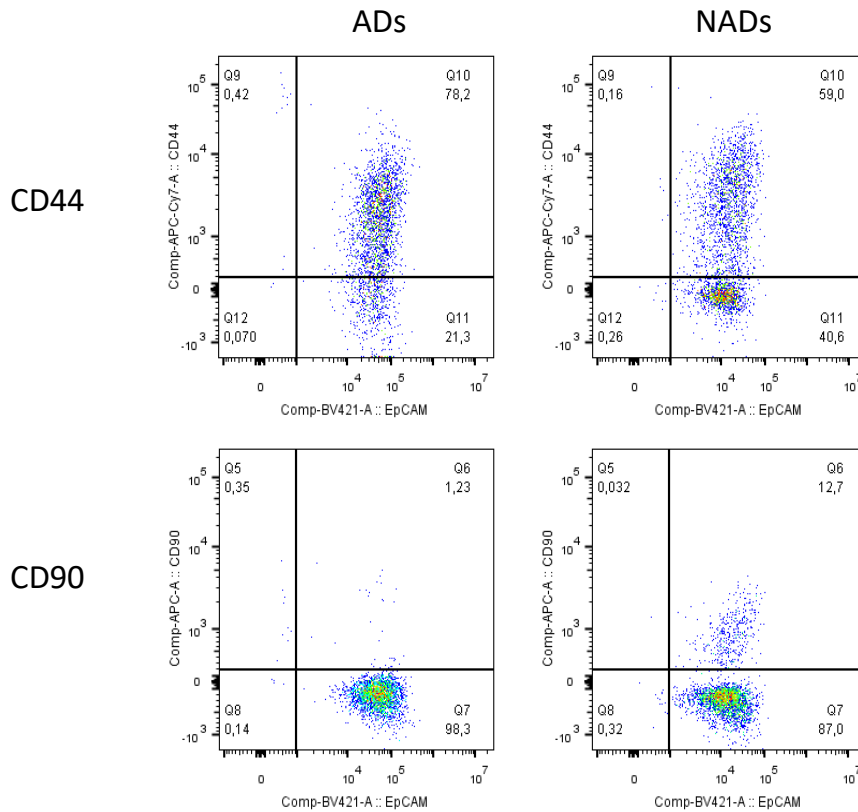


Abbildung 4: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenproteine CD44 und CD 90 bei adhärennten (ADs) sowie nicht-adhärennten (NADs) Tumorzellagregaten

Tabelle 1: Verwendetes Marker-panel bei zytometrischer Analyse nicht-adhärennter und adhärennter Zellpopulationen

Laser	Marker	Fluorochrom	Verwendungszweck
Laser 355	ITGβ4 (CD104)	BUV395	Ädhäsionsprotein
Laser 405	EpCAM	BV421	Markerprotein für Tumorzellen
	Tote Zellen	Pacific orange	Differenzierung zwischen toten und lebenden Zellen
	E-Cadherin	BV711	Adhäsionsprotein
Laser 488	Lebende Zellen (CMFDA)	FITC	Differenzierung zwischen Mesothelzellen und Tumorzellagregaten
	ITGβ1 (CD29)	PercP-Cy5.5	Adhäsionsprotein
Laser 561	ITGα5 (CD49e)	PE	Adhäsionsprotein
	ITGαV (CD51)	PE-Cy7	Adhäsionsprotein
Laser 633	Thy-1-Membran-Glykoprotein (CD90)	APC	fragliches Adhäsionsprotein
	Hyaluronsäure-Rezeptor (CD44)	APC-Cy7	fragliches Adhäsionsprotein