

**Aus der Abteilung für
Molekulare Zellbiologie des
Instituts für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
(Komm. Leiter: Prof. Dr. Joachim Kruppa)
und
der Frauenklinik
(Direktor: Prof. Dr. Fritz Jaenicke)
des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf**

**Chromosomale Veränderungen bei FISH-Analysen
an EFE-184 Endometriumkarzinomzellen
während der in vitro Kultivation**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Jian Zheng
aus Beijing, VR China**

Hamburg, 2001

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 18. März 2002

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg.

Dekan: Prof. Dr. C. Wagener

Referent: Prof. Dr. F. Hölzel

Korreferent: Prof. Dr. F. Jänicke

Datum des letzten mündlichen Prüfung: 23. Mai 2002

奉献
给
我的亲人们

meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Humane Tumore.....	1
1.2. Chromosomen.....	3
1.2.1. Historische Entwicklung.....	3
1.2.2. Chromosomen-Aberrationen.....	3
1.3. Abnormer DNA-Gehalt bei Tumorzellen.....	7
1.4. Fragestellung.....	9
2. Material und Methoden.....	11
2.1. Zelllinien.....	11
2.2. Zellkultivierung.....	12
2.2.1. Zellkulturtechnik.....	12
2.2.2. Kryokonservierung.....	13
2.2.3. Zellklonierung.....	13
2.3. Chromosomen.....	14
2.3.1. Präparation.....	14
2.3.2. Giemsa - Bänderung.....	15
2.3.2.1. Lösungen für die G-Bänderung.....	17
2.3.2.2. Untersuchung zur G-Bänderung.....	17
2.3.3. In situ Hybridisierung.....	18
2.3.3.1. Hybridisierung mit FITC- oder Biotin-markierten Sonden.....	24
2.3.3.2. Hybridisierung mit Digoxigenin-Sonden.....	26

2.4. TUNEL-Assay zur Apoptose.....	31
2.4.1. Zellpräparate.....	31
2.4.2. Untersuchungen zur Apoptose.....	31
2.5. Isolierung von DNA.....	34
2.5.1. Aufbereitung der Zellkulturen und Präparation.....	34
2.5.2. Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	35
3. Ergebnisse.....	37
3.1. Klonierung von EFE-184 Endometriumkarzinomzellen.....	37
3.2. numerische Chromosomen-Aberrationen.....	44
3.3. strukturelle Chromosomen-Aberrationen.....	55
3.3.1. G – Bänderung.....	55
3.3.2. FISH - Analysen.....	59
3.3.2.1. EFE-184 Zellen.....	59
3.3.2.2. EFO-27 Ovarialkarzinomzellen.....	84
4. Diskussion.....	89
5. Zusammenfassung.....	99
6. Literaturverzeichnis.....	101
7. Danksagung.....	111
8. Lebenslauf.....	112
9. Erklärung.....	113

Liste der verwendeten Abkürzungen

AK	Antikörper
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinder Serum Albumin ("bovine serum albumin")
cDNA	komplementäre DNA
CGH	"comparative genomic hybridisation"
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
del	Deletion
der	Derivat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes "minimal essential medium"
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDTA-Na ₂	Ethylendiamintetraessigsäure, Di-Natriumsalz
FCS	fetales Kälberserum
FISH	"Fluorescence - in - situ - Hybridization"
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HBSS	"Hank's balanced salt solution"
kb	Kilobasen
MEM	minimales essentielles Medium
mRNA	Messenger-RNA (Boten-RNA)
MW	Molekulargewicht
OD	optische Dichte
PBD	"phosphate-buffered detergent"
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Salzlösung ("phosphate-buffered saline")
PCR	"polymerase chain reaktion" (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	"potentium hydrogenii" (-log [H ₃ O ⁺])

PI	Propidium-Iodid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SSC	“sodium chloride“ / “sodium citrate“ (Natriumchlorid / Natriumcitrat)
SSCP	“single-strand conformation polymorphism“ (Einzelstrang-Konformationspolymorphismus)
t	Translokation
tRNA	transfer RNA

1. Einleitung

1.1. *Humane Tumore*

In der Statistik der Todesursachen ist Krebs seit der Jahrhundertwende in den Industrieländern von der siebten auf die zweite Stelle vorgerückt. Überflügelt wird diese Erkrankung nur noch von Herz- und Kreislaufversagen. Im Laufe des Jahres 1996 sind allein in den USA schätzungsweise mehr als 550.000 Menschen an Krebs gestorben, in Europa mindestens 840.000 (**Willett** et al. 1997). In den Vereinigten Staaten werden jährlich etwa 600.000 neue Fälle diagnostiziert. Weniger als die Hälfte der Patienten, bei denen Krebs festgestellt wurde, überlebt einen Folgezeitraum von fünf Jahren (**Schirmacher**, 1987; **Trichopoulos** et al., 1997). In der VR China betrug im Laufe des Jahres 1999 die Mortalität bei Patienten mit malignen Tumoren ca. 140 pro 100.000 Einwohner, ungefähr zweifach soviel wie 1996 in Europa, darunter waren Lungenkarzinome mit 40/100.000 vertreten, Lebertumore mit 21/100.000, Magenkarzinome mit 19/100.000, aber Mammakarzinome bei Frauen nur mit 4/100.000 und Cervix-Karzinome mit 1/100.000 (**Statistik** der Städtischen Gesundheitsbehörden in der VR China, 1999). Im Vergleich dazu war in den Ländern der Europäischen Gemeinschaft die Mortalität für Patientinnen mit Mammakarzinom zwischen 17/100.000 im Jahr 1957 bis ca. 25/100.000 im Jahr 1994 angestiegen. Dagegen kam es im genannten Zeitraum zu einer deutlichen Abnahme der Sterberate von 13 auf ca. 6/100.000 bei Patientinnen mit Endometriumkarzinom in den europäischen Ländern (**Levi** et al., 1999).

Die Aufklärung der Ursache von Krebserkrankungen enthält sehr vielschichtige Aspekte, die von der molekularen über die zelluläre Ebene bis zur Gewebsdifferenzierung und schließlich zu regionalen und überregionalen Kontrollsystemen des Organismus reichen (**Schirmacher**, 1987; **Alberts** et al., 1990; **Bale & Li**, 1997). An vielen Stellen im Körper können Zellverbände mit anomalen Wachstumseigenschaften entstehen. Wenn diese Zellen nicht in das angrenzende Gewebe hinein wachsen, sondern örtlich begrenzt bleiben, bilden sie in der Regel gutartige Tumoren. Bösartige Tumore sind charakterisiert durch Zellen, die sich aus ihrem ursprünglichen Zellverband lösen und in die

Nachbarschaft oder über die Blutbahn oder das lymphatische System an andere Orte des Organismus gelangen können (**Riede**, 1989; **Erbar**, 1994). Während gutartige Tumoren bezüglich des Chromosomensatzes dem Ursprungsgewebe weitgehend entsprechen, zeigen bösartige mitunter ausgeprägte Abweichungen des Karyotyps. Dabei stehen im Vordergrund des Interesses numerische Chromosomenaberrationen und Strukturanomalien, die in Form sogenannter Marker-Chromosomen oftmals für bestimmte Tumoren typisch sind (**Hienz**, 1971).

Je nach Gewebetyp werden bei den Krebserkrankungen mehrere Gruppen unterschieden. Karzinome gehen aus Epithelzellen hervor, die die basale Schicht der Haut und der Darmmukosa bilden oder verschiedene Drüsen auskleiden. Die Adenokarzinome, die vom Epithelgewebe vor allem exokriner, seltener endokriner Drüsen, oder von zylinderzellhaltiger Schleimhaut ausgehen, gehören zur ersten Gruppe. Die viel selteneren Sarkome entstehen in Bindegewebe und Muskeln, z.B. Leiomyosarkome. Zu den Tumoren der dritten Gruppe werden die Leukämien und Lymphome gezählt, die sich aus den blutbildenden Zellen des Knochenmarks oder bei Zellen der Lymphknoten entwickeln (**Cairns**, 1987; **Erbar**, 1994).

Das Endometriumkarzinom ist heute trotz aller vorbeugenden klinischen Maßnahmen in vielen Ländern ein relativ häufiges Malignom des weiblichen Genitaltraktes; besonders häufig tritt dieser Tumor in den USA und den westlichen Industrieländern auf, 4-5fach mehr als in anderen Teilen der Welt (**Trichopoulos et al.**, 1997). Darüber hinaus ist in den meisten westlichen Ländern eine Zunahme der Erkrankungsrate zu beobachten. Das Endometriumkarzinom erscheint überwiegend bei postmenopausalen Frauen; nur 5% aller Fälle treten bei prämenopausalen Frauen auf, und bei jungen Frauen ist das Endometriumkarzinom noch wesentlich seltener. Es entwickelt sich aus der Schleimhaut des Corpus uteri, dem Endometrium. Etwa 85% der Endometriumkarzinome sind Adenokarzinome; in ungefähr 15% der Fälle finden sich bei den sogenannten adenosquamösen Karzinomen Plattenepithelkomponenten. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate, die weitgehend mit der Heilung identisch ist, schwankt naturgemäß in Abhängigkeit von dem jeweiligen Primärbefund und der Therapie (**Haagedoorn et al.**, 1996; **Greven & Corn**, 1997; **Trichopoulos et al.**, 1997). Offenbar bedingt durch verbesserte Vorsorge,

Früherkennung und Therapiemöglichkeiten zeigen die Mortalitätsraten für Patientinnen mit Endometriumkarzinom eine abnehmende Tendenz in Europa (**Levi et al.**, 1999) und in den USA (**Trichopoulos et al.**, 1997).

1.2. Chromosomen

1.2.1. Historische Entwicklung

Chromosomen wurden 1842 von **Nägeli** zuerst beschrieben. Die Rolle der Chromosomen in der Mitose wurde 1875 von **Strassburger** entdeckt, und 1888 hat **Waldeyer** die heutige Bezeichnung durchgesetzt. 1877 veröffentlichte **Flemming** eine Arbeit über das Thema „Zellsubstanz, Kern- und Zellteilung: Chromosomen in sich teilenden Tumorzellen“. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde erkannt, daß Chromosomen die Träger der Erbinformationen sind (**Sutton**, 1903; **Boveri**, 1907). Erstmals wurde durch **Boveri** (1914) den Chromosomen eine entscheidende Rolle bei der Tumorentstehung zugewiesen. Durch **Tjio & Levan** wurde 1956 die richtige Anzahl der menschlichen Chromosomen mit $2n = 46$ bestimmt. Kurz danach hat die Entdeckung von verschiedenen konstitutiven Chromosomen-Veränderungen bei Menschen mit hereditären Syndromen zu der Erkenntnis geführt, daß die Ursache von krankhaften Zuständen eine abnormale Chromosomen-Konstellation sein kann (nach **Hienz**, 1971), z.B. Trisomie 21 beim Down-Syndrom. Dieses Erkenntnis bildet die Grundlage für eine gezielte Suche nach dem Zusammenhang zwischen Chromosomen-Aberrationen und dem klinischen Erscheinungsbild, und hat somit das Verständnis von genetisch bedingten Erkrankungen wesentlich verbessert (**Hienz**, 1971; **Rubin & Farber**, 1988).

1.2.2. Chromosomen-Aberrationen

In der zytogenetischen Analyse gibt es zwei verschiedene Gruppen von Chromosomen-Aberrationen: primäre, konstitutionelle (angeborene) und sekundäre (erworbene) Chromosomen-Aberrationen. Bei den angeborenen Chromosomen-Aberrationen sind alle Zellen eines Organismus von der gleichen strukturellen oder numerischen Aberration betroffen. Weil die Aberration auch in

den Keimzellen vorliegt, kann sie an die Nachkommen weitergegeben werden und kann eine kausale Bedeutung für die Entstehung von Tumoren besitzen. Durch Repairdefekte der DNA hervorgerufene, sekundäre Chromosomen-Aberrationen treten in den Tumorzellen eines Individuums auf, und sind häufig mit somatischen Gen-Mutationen verbunden (**Le Beau**, 1997; **Schmutte & Fishel**, 1999). Das Philadelphia-Chromosom [t(9;22)(q34;q11)], das bei Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 entsteht, tritt nur in bestimmten Zellen des blutbildenden Organs auf und ist assoziiert mit der chronisch myeloischen Leukämie (**Khoury et al.**, 1997). Bei soliden Tumoren gilt im allgemeinen, je maligner der Tumor, desto mehr Aberrationen und desto größere Variabilität des jeweiligen Karyotyps werden beobachtet (**Bardi et al.**, 1995; **Wagener**, 1996; **Lengauer et al.**, 1998; **Bevilacqua et al.**, 1998; **de Vivie**, 1998).

Chromosomen-Aberrationen bei Tumoren dokumentieren sich einmal als numerische, indem die Zahl der Chromosomen von der des diploiden Chromosomensatzes abweicht, oder als strukturelle, indem zwar die Zahl der Chromosomen der Norm entspricht, einzelne Chromosomen aber morphologische Abweichungen von ihrer üblichen Größe und Gestalt aufweisen. Sehr häufig finden sich numerische und strukturelle Aberrationen gemeinsam in derselben Zelle (**Le Beau**, 1997).

Eine Abweichung von der normalen Chromosomenzahl bezeichnet man als Heteroploidie. Die Zahl der Chromosomen kann dabei vermindert oder vermehrt sein. Im einen Falle spricht man von hypodiploiden, im anderen Falle von hyperdiploiden Chromosomenzahlen. Abweichungen, die keine ganzzahlige Vervielfachung der Grund- oder Basiszahl, der haploiden (= mono-ploiden) Chromosomenzahl, aufweisen, werden als aneuploid bezeichnet bzw. unter dem Begriff Aneuploidie zusammengefaßt. Der Begriff Heteroploidie umfaßt alle euploiden und aneuploiden Chromosomenzahlen außer der diploiden (**Hienz**, 1971; **Buselmaier & Tariverdian**, 1999).

Abweichungen der Chromosomenzahl sind für zytogenetische Untersuchungen an Tumorzellen von Bedeutung, die sich durch eine exzessive Aneuploidie auszeichnen können. Weiterhin ist nicht selten aber auch eine sogenannte Pseudodiploidie nachweisbar, indem die Chromosomenzahl der Zellen diploide

Werte aufweist, einzelne Chromosomen in Wirklichkeit jedoch strukturell verändert sind. Dabei kann das Fehlen von einzelnen Chromosomen durch andere, in Überzahl vorhandene Chromosomen kompensiert sein, so daß rechnerisch ein euploider Chromosomensatz vorliegt (**Rubin & Farber, 1988; Buselmaier & Tariverdian, 1999**).

Strukturveränderungen von Chromosomen (strukturelle Chromosomen-Aberrationen) setzen voraus, daß sie in der Interphase vor der Mitose entstanden sind, in der das Chromatin des betreffenden Chromosoms noch eine Einheit darstellt und nicht in Chromatiden gespalten ist, während bei Chromatiden-Aberrationen zum Zeitpunkt der Mitose bereits eine Duplikation des Chromosoms in seine beiden Längsstrukturen erfolgt sein muß. Chromatiden-Aberrationen können sich unabhängig von anderen chromosomalen Aberrationen nur an einem Chromatid manifestieren. Im ersten Fall sind daher bei der Analyse von Metaphase-Chromosomen beide Chromatiden in gleicher Weise betroffen. Je nach Art der auftretenden Chromosomen-Aberration oder Rekombination unterscheidet man Deletionen, Duplikationen, Inversionen und Translokationen (**Cottier, 1980; Rubin & Farber, 1988; Dutrillaux, 1995; Buselmaier & Tariverdian, 1999**).

-- Bei der interstitiellen **Deletion** kommt es zum Verlust eines Chromosomen- oder Chromatidensegmentes nach zwei Brüchen und Wiedervereinigung der proximal und distal des Bruchstücks gelegenen Fragmente. Das deletierte Stück ohne Zentromer geht meist bei weiteren Teilungen verloren; aber es muß nicht immer eliminiert werden, sondern kann gelegentlich auch als Fragment noch nachweisbar bleiben.

-- Als **Duplikation** bezeichnet man die Verdoppelung eines Chromosomensegmentes, bei dem ein durch zwei Brüche entstandenes Bruchstück des einen Chromosoms in einen Bruch des anderen durch **Insertion** eingebaut und so eine Verdoppelung des betreffenden Segmentes im anderen Chromosom bewirkt wird. Nach Trennung der Tochterzellen kann dies ein Selektionsvorteil in der nachfolgenden Proliferationsphase sein, und es entsteht eine Population mit Zellen, die überwiegend die neue Aberration tragen. Die Duplikation stellt somit den Spezialfall einer Translokation zwischen zwei homologen Chromosomen dar. Ihr Ergebnis ist eine partielle Trisomie.

-
- Unter **Inversion** versteht man einen chromosomalen oder chromatidalen Strukturumbau, bei dem es nach einem Bruch terminal (selten) oder nach zwei Brüchen zur Bildung eines Bruchstückes (Segmentes) kommt, das sich nach einer Drehung um 180 Grad im Bereich der alten Bruchlinie(n) mit dem bzw. den benachbarten Segment(en) vereinigt. Je nachdem, ob dieses Bruchstück das Zentromer enthält oder nicht, unterscheidet man eine *perizentrische* oder symmetrische von einer *parazentrischen* oder asymmetrischen Inversion.
 - **Translokation** ist der Austausch zweier Segmente zwischen homologen oder nichthomologen Chromosomen oder eine Übertragung von einem Chromosom oder Chromosomensegment auf eine andere Stelle im gleichen Chromosom bzw. auf ein anderes Chromosom. Im ersten Falle spricht man von reziproker, im letzten Falle von einfacher Translokation.
 - Die Bildung eines **Ringchromosoms** stellt den Spezialfall einer interstitiellen Deletion dar, indem die beiden Bruchflächen des meist größeren Segmentes miteinander verschmelzen, und es so zur Bildung eines geschlossenen Ringes kommt, während die beiden terminalen Bruchstücke eliminiert werden, gelegentlich aber auch als Fragmente noch nachweisbar sind.
 - **Dizentrische Chromosomen** besitzen im Gegensatz zu den üblichen, als monozentrisch bezeichneten Chromosomen nicht nur ein Zentromer, sondern deren zwei. Sie entstehen in der Regel innerhalb eines Chromosoms nach einfachen Chromatidenbrüchen und Reunion der jeweils ein Zentromer tragenden Segmente der beiden Schwesterchromatiden, während die azentrischen Segmente oder Fragmente verlorengelangen. Dizentrische Chromosomen können bei entsprechender Wiedervereinigung der Bruchstücke, aber auch nach der sogenannten asymmetrischer Translokation entstehen, wenn ein zentromerhaltiges Segment transloziert wurde.
 - Die Bildung eines **Isochromosoms** ist meist Folge einer falschen Teilung des Zentromers, indem dieses nicht, der Regel entsprechend, in der Längsachse des Chromosoms, sondern quer zu dieser, im Bereich der inneren Zone des dreiteiligen Zentromerapparates erfolgt. Es entstehen so zunächst zwei telozentrische Chromosomen-Fragmente, die sich vereinigen z.B. zu Iso-p oder zu Iso-q, von denen jedes in eine Tochterzelle wandert. Nach Reduplikation des Armes besitzen die beiden nun mediozentrischen Chromosomen wieder ein vollständiges Zentromer. Ihre Schenkel sind homolog, d.h. genetisch identisch.

Die Chromosomenzahl ändert sich also nicht, hingegen ist das Genom der beiden Tochterzellen verschieden, und die genomische Balance ist gestört (**Hienz, 1971; Le Beau, 1997**).

Tab.1. Einteilung von Chromosomen-Aberrationen (**Buselmaier & Tariverdian, 1999**)

numerische Veränderungen

- Hyperploidie (Beispiel: $2n + 1 =$ Trisomie)
- Hypoploidie (Beispiel: $2n - 1 =$ Monosomie)
- Polyploidie (Beispiel: $3n =$ Triploidie)

morphologisch sichtbare Veränderungen der Chromosomenstruktur

- Deletion (Verlust eines Chromosomensegments)
 - Duplikation (Verdoppelung eines Chromosomensegments)
 - Insertion (Inkorporation eines Chromosomensegments)
 - Inversion (Drehung eines Chromosomensegments um 180°)
 - Translokation (Rearrangement der Position eines oder mehrerer Chromosomensegmente)
 - Ringchromosom
 - Dizentrische Chromosomen
 - Isochromosom
-

1.3. Abnormer DNA-Gehalt bei Tumorzellen

Während die Chromosomen bei der Zellteilung in ihrer intaktiven Form in Erscheinung treten, bilden sie im Interphasekern das Chromatin, das ein Komplex aus DNA und Proteinen ist und ein mehr oder minder dichtes Fadenknäuel bildet. Das Chromatin des Interphasekerns ist entweder relativ locker (Euchromatin) oder an anderen Stellen fest gepackt (Heterochromatin) (**Ganten & Ruckpaul, 1997**). Im Chromatin des Interphasekerns ist die DNA der Chromosomen in bestimmten Arealen lokalisiert, so daß bei FISH-Analysen an normalen Zellen jeweils zwei Signale für die DNA der autosomalen Chromosomen sichtbar werden

(**Strachan & Read**, 1996). Innerhalb der abgrenzenden Kernmembran finden sich ein Nukleolus oder mehrere Nukleoli, in die DNA-Fäden mit den Gen-Clustern für die Synthese der ribosomalen RNA hineinragen (**Alberts** et al., 1990).

Zellkerne der malignen Tumoren und ihrer Vorstadien enthalten gewöhnlich von der Norm abweichenden DNA-Gehalt und erhöhte Chromosomenzahlen. Bei Karzinomen schwankt die Chromosomenzahl pro Zelle in weiten Grenzen (**Lengauer** et al., 1998). Dies spiegelt sich zum Teil in Größe und Anfärbbarkeit der Interphasekerne wider. Zwischen der Chromosomenzahl und dem DNA-Gehalt der Zellkerne besteht somit eine enge Korrelation, da jedes Chromosom einen durchgehenden DNA-Faden enthält (**Strachan & Read**, 1996). Aus den Ergebnissen zytophotometrischer DNA-Messungen an Interphasekernen lassen sich daher Rückschlüsse auf den Chromosomensatz der Zellkerne ziehen. Bei malignen Tumoren kann die Korrelation zwischen Chromosomenzahl und DNA-Menge bestätigt werden, indem neben der meist vermehrten Zahl von Chromosomen auch eine entsprechend erhöhte Menge an Zellkern-DNA zytophotometrisch bestimmt wird (**Dietel** et al., 1985; **Soost & Baur**, 1990).

Tumoren sind in der Regel klonalen Ursprungs, d.h., sie sind aus einer einzelnen Normalzelle entstanden. Fast immer sind Karzinom-Zellen hinsichtlich ihrer Chromosomenzahl aneuploid, d.h. die Zahl der Chromosomen stimmt nicht mit der eines diploiden Chromosomensatzes überein. Die Zellen haben mit zunehmendem Wachstum des Tumors eine Neigung zur Vermehrung der Chromosomenzahl. Ferner lassen sich bei eingehender Analyse vermehrt Strukturanomalien der Chromosomen, wie Deletionen und Translokationen, erkennen. Die Chromosomenkonstitution kann innerhalb einer neoplastischen Zellpopulation eine erhebliche Variabilität aufweisen, die oft mit der Weiterentwicklung im Verlauf des invasiven Wachstums zunimmt (**Bardi** et al., 1995; **Bevilacqua** et al., 1998). Offenbar besitzen Tumorzellen genetische Instabilität; darüber wird bereits seit den 70er Jahren berichtet (**Loeb** et al. 1974; **Nowell**, 1976; **Kunzmann & Hölzel**, 1987; **Hölzel** et al., 1990; **Sager**, 1997; **Duesberg** et al., 1998; **Lengauer** et al., 1998; **Cahill** et al., 1999; **Coleman & Tsongalis**, 1999; **Yamasaki & Mironov**, 2000). Daher finden sich bei fortgeschrittenen malignen Neoplasien mehr oder weniger ausgedehnte, vielfache

Veränderungen der chromosomalen Konstitution der Zellen. Es erhebt sich die Frage, ob der Prozeß der Instabilität auch in vitro fortschreitet, d.h. ändert sich die Chromosomenzahl pro Zelle während der langfristigen Kultivation unter artefiziellen Bedingungen und treten neue strukturelle Veränderungen der Chromosomen auf, oder bleibt das einmal entstandene Aberrationsmuster nach der Explantation aus dem Organismus bestehen. Dies kann durch Untersuchung der chromosomalen Veränderungen an Zellen aus Langzeitkulturen entschieden werden, und würde die Annahme eines autonom verlaufenden Prozesses der Zunahme an chromosomalen Veränderungen bestätigen. Weiterhin kann nach Klonierung einzelner Zellen und nachfolgender Karyotypisierung der klonierten Zellen auf das Ausmaß der inhärenten Instabilität des Genoms geschlossen werden.

1.4. Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die weitgehende Aufklärung der chromosomalen Veränderungen an Zellen der Linie EFE-184 eines humanen Endometriumkarzinoms während der in vitro Kultivation. Es ist anzunehmen, daß Tumorzellen mit bestimmten Chromosomenaberrationen Selektionsvorteile haben und schneller wachsen als Zellen ohne derartige Aberrationen. Tumorzellen mit einer bestimmten Aberration können sich während der Kultivation durchsetzen und die Kultur völlig überwuchern. Dementsprechend hatte sich in vorhergehenden Untersuchungen an EFE-184 Zellen ergeben (**Nollau**, 1991), daß sich der Amplifikationsgrad des c-myc Proto-Onkogens von 3-fach in frühen Kulturpassagen auf ca. 9-fach in späteren Kulturpassagen erhöht hatte. Dies war gekoppelt mit verstärkter Expression von myc-spezifischer RNA. In einem älteren Bericht der Arbeitsgruppe (**Kunzmann & Hölzel**, 1987) war gezeigt worden, daß in frühen Passagen der in vitro Kultivation von Ovarialkarzinom-Zellen der Linie EFO-27 mit nahezu-diploider Chromosomenzahl keine Metaphase mit allen für diese Linie typischen Marker-Chromosomen 1-6 aufzufinden war. In frühen Passagen gab es einzelne, nahezu-tetraploide Zellen mit jeweils ein oder zwei Marker-Chromosomen 1 und 2. In den späteren Passagen besaßen die meisten Zellen nahezu-tetraploide Chromosomenzahlen mit jeweils zwei Marker-Chromosomen 1-3, während Marker 4-6 nur nach der in vivo Passage der EFO-27

Zellen durch die nackte Maus aufzufinden waren. In nahezu allen EFO-27 Zellen war Marker-Chromosom 7 vorhanden. Somit war die Anzahl von Zellen mit den Marker-Chromosomen 1-3 mit steigender Zahl der Kulturpassagen vermehrt. Dies spricht eindeutig für einen Selektionsvorteil von Zellen mit den Marker-Chromosomen 1-3. In ähnlicher Weise wie bei EFO-27 Ovarialkarzinomzellen ist die Zelllinie EFE-184 bearbeitet worden, von der verschieden hohe Passagen der Kultivation für die eigenen Experimente zur Verfügung standen. Die in den früheren Untersuchungen dargestellten Aberrationen der Chromosomen-Struktur waren durch Giemsa/Trypsin-Bänderung identifiziert worden und sollten in den vorliegenden Arbeit durch FISH-Analysen bestätigt und ergänzt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Zelllinien

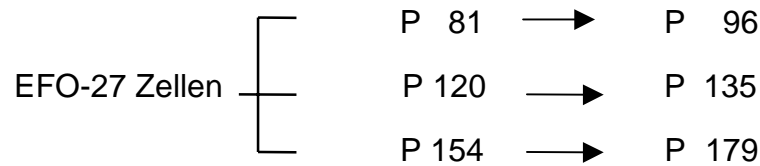
Die Zellen der Linie EFE-184 stammen aus dem Ascites einer 69-jährigen Patientin mit metastasiertem Endometriumkarzinom und wurden 1985 etabliert (**Nollau** et al., 1990). Drei Jahre vor der Zellentnahme war bei der Patientin eine Hysterektomie mit Entfernung beider Adnexe durchgeführt worden. Anschließend wurde die Patientin einer Strahlen-Therapie mit Telekobalt (^{60}Co)-Nachbestrahlung in der Gesamtdosis von 5000 rd unterzogen. Die histologische Untersuchung hatte ein teils mittelreifes, teils entdifferenziertes Adenokarzinom des Endometriums ergeben.

Für die vorliegende Studie wurden Zellen der Passage 57 aus den eingefrorenen Beständen aufgetaut und bis zur Passage 82 kultiviert. Inzwischen wurden EFE-184 Zellen in Passage 59 kloniert. Daraus sind EFE-184 / J-5 Zellen entstanden und bis zur Passage 136 (d.h. 77 Passagen nach der Klonierung) gezüchtet worden. Zusätzlich wurden Zellen, die von den oben genannten Kultivationen unabhängig waren, aus einer anderen, früheren EFE-184 Kultivation in Passage 121 aufgetaut und getrennt weiter bis zur Passage 168 gezüchtet; diese Zellen wurden zum Vergleich in die Untersuchungen mit einbezogen.

Die Zelllinie EFO-27 wurde aus der Metastase eines Ovarialkarzinoms im Omentum majus etabliert (**Simon** et al., 1983). 15 Monate vor der Explantation der Zellen war eine Ovariectomie durchgeführt worden. Die histologische Untersuchung des primären Tumors der 36-jährigen Patientin ergab 1979 ein mittelgradig differenziertes, seröses, papilläres Adenokarzinom des Ovars.

In dieser Arbeit wurden Zellen der Linie EFO-27 in Passage 120 aufgetaut und bis zur Passage 135 gezüchtet. Parallel wurden weitere Zellen aus zwei anderen, unabhängigen Subkulturen der Linie EFO-27 in Passagen 81 und 154

zum Vergleich eingebracht und getrennt davon bis jeweils zu Passage 96 und 179 kultiviert (s. Schema).



2.2. Zellkultivierung

2.2.1. Zellkulturtechnik

Die Kultivation der Tumorzellen als Monolayer-Kulturen erfolgte in Plastikflaschen (Nunc, Roskilde, Dänemark) mit ca. 20 ml Nährmedium. Die Zellen wurden bei 37°C in Brutschränken (Forma Scientific, Marietta, Ohio, USA & Labotect, Göttingen) mit 5% CO₂-Atmosphäre und Wasserdampf-gesättigter Luft gehalten. Die Zellkultur-Arbeiten wurden in einer sterilen Werkbank (CEAG, Dortmund) mit vertikalem Luftstrom durchgeführt. Als Kultur-Nährmedium (**Simon & Hölzel**, 1979) diente ein modifiziertes DMEM-Medium (My-Medium) auf der Grundlage von Earle's Salzen (86,4 g / pro 10 L, GIBCO/BRL) mit einer standardisierten Zusammensetzung aus 2x MEM Vitaminen (Biochrom, Berlin), 4x essentiellen Aminosäuren (Biochrom), 2x nichtessentiellen Aminosäuren (Biochrom), 10 mM Pyruvat (Merck, Darmstadt), 0,119 M Natrium-hydrogencarbonat (Merck) und 0,65 µg/ml Gentamycin-Sulfat (Biochrom). Das Medium wurde steril filtriert und mit ca. 10 ml 7,5% NaHCO₃ auf den pH-Wert von 7,5-7,8 eingestellt. Vor Gebrauch wurde mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) (Biochrom, Berlin) und 1% L-Glutamin (Serva, Boehringer, Heidelberg) angereichert. Das Medium wurde bei 4°C aufbewahrt und vor jeder Benutzung in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Alle drei bis fünf Tage erfolgte ein Wechsel des Mediums. Bei Konfluenz des Zellrasens wurde das Medium verworfen, und die Zellen wurden durch Zugabe einer bei 37°C vortemperierten Lösung von 0,05% Trypsin (Serva) / 5 mM EDTA-Na₂ (Merck, Darmstadt) in PBS (pH 7,4) vom Kulturflaschenboden abgelöst. Noch haftende Zellen wurden durch Klopfen oder leichtes Schlagen gegen die Kulturflaschenseite vom Flaschenboden abgelöst. Um die Trypsinswirkung zu

blockieren, wurden ca. 10 ml frisches Medium auf die vollständig abgelösten Zellen gegeben. Die Zellsuspension wurde zur Verbreiterung auf zwei oder drei Zellkulturflaschen verteilt und weiter kultiviert.

2.2.2. Kryokonservierung

Die Zellen einer Kultur-Flasche mit der Bodenfläche von 80 cm² (Nunc) wurden bis zur Subkonfluenz kultiviert, dann trypsinisiert. Der Trypsinierungsvorgang dauerte ca. 15 Min und wurde durch Zugabe von 10% FCS-haltigem frischen Medium gestoppt. Anschließend wurden die Zellsuspension in Plastik-Zentrifugenröhrchen (Bluecap, Nunc) überführt und die Zellen bei 1000-1500 rpm (IKS-Zentrifuge, Christ, Osterode) für 3-5 Min gesammelt. Die pelletierten Zellen wurden in 1 ml einer Mischung von 10% Glycerin (Merck) mit FCS-haltigem Medium vorsichtig resuspendiert und portionsweise (1 ml / Portion) in Kryo-Röhrchen (Nunc) bei -80°C eingefroren. Zur Wiederanzucht der eingefrorenen Zellen wurde der aufgetaute Kryo-Röhrchen-Inhalt in eine frische Kulturflasche mit neuem Nährmedium überführt. Nach 1-2 Tagen, wenn die Mehrzahl der Zellen schon am Flaschenboden angesetzt hatte, erfolgte eine Erneuerung des Mediums.

2.2.3. Zellklonierung

Eine Tumorzellpopulation besteht in der Regel aus einer Mischung mehrerer Subpopulationen. Für die Vergleich von einzelnen Tumorzellen wurden verschiedene Klone etabliert. Dazu wurde die Methode nach **Robb** (1970) angewendet. Aus subkonfluenten Kulturen der Linie EFE-184 in Passage 59 der Kultivation wurden durch Trypsinierung Zellen abgelöst; die Zellsuspension wurde derart verdünnt und in einer Konzentration von 1-6 Zellen pro Vertiefung einer Mikrotiterplatte (Nunc) ausgesät, so daß sich in einigen Löcher der Microtest-Platte mit Flachboden (Nunc) nur eine einzige Zelle befand. Am folgenden Tag wurden alle Löcher in einem Diavert-Umkehrmikroskop mit Phasenkontrast-Einrichtung (Leitz, Wetzlar) durchgemustert. Es wurden nur solche Kolonien weiter kultiviert, die aus Löchern stammten, die am zweiten

oder dritten Tag nach Aussaat eine einzige Zelle enthalten hatten. Nach 5 Tagen wurde das Medium gewechselt. Bei Konfluenz (ca. 19 Tage nach der Aussaat) wurden die Zellen durch Trypsinierung vom Boden abgelöst und in eine Plastik-Kulturflasche mit 75 cm² Grundfläche (Nunc) überführt und weiter kultiviert. Daraus wurden die Klone J-1 bis J-6 etabliert.

2.3. Chromosomen

Der Karyotyp wurde zum Zeitpunkt der relativ hohen Mitose-Aktivität bestimmt. Daher wurde die Chromosomenpräparation bei Semikonfluenz der Monolayer-Kulturen vorgenommen. Dazu wurden die Zellen am Tag vor der Präparation mit frischem Medium versorgt, um möglichst viele frische Metaphasen-Zellen zu bekommen.

2.3.1. Präparation

Die Chromosomenpräparation wurde durchgeführt, wenn mehr als 5-6 Metaphasen pro Gesichtsfeld im Phasenkontrast-Umkehrmikroskop sichtbar waren. Der Zellkultur-Überstand wurde in ein Plastik-Zentrifugenröhrchen (Bluecap, Nunc) vorsichtig abgegossen. Ein Teil des Zellrasens inklusive der abgerundeten Metaphase-Zellen wurde durch Behandlung mit 8-10 ml 0,05% Trypsin / 5 mM EDTA-Na₂ in PBS (40 g NaCl, 1 g KCl, 1 g KH₂PO₄, 7,2 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O auf 5 L Aqua bidest., pH 7,2) und nach Inkubation für 10-20 Min im Brutschrank (Forma Scientific, Marietta, Ohio, USA) bei 37°C vom Zellkulturflaschen-Boden abgelöst. Zur Trypsin-Inaktivierung wurde 5-10 ml frisches Medium hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde in dasselbe Bluecap-Röhrchen überführt und bei 1000-1500 rpm für 3-5 Min abzentrifugiert (IKS-Zentrifuge, Christ, Osterode). Der Überstand wurde dekantiert, und Mediumreste wurden durch Auswischen entfernt. Tropfenweise wurde ca. 2 ml 0,3% oder 0,4% KCl-Lösung zugegeben, die mit NaHCO₃ auf den pH-Wert von 7,0-7,3 eingestellt war und bei 37°C in einem Wasserbad vorgewärmt war; das Zellsediment wurde vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit ca. 8 ml KCl-Lösung vollständig in spitze Glas-

Zentrifugenröhrchen überführt. Zum Quellen wurden die Zellen für 10-20 Min bei 37°C im Brutschrank gehalten; danach wurden sie durch 3 Min Abzentrifugieren bei 1000-1500 rpm gesammelt, und der Überstand wurde bis auf ca. 0,5 ml abgehoben. Die Zellen wurden durch zunächst tropfenweise Zugabe der Carnoy-Fixierungslösung, die aus 3 Teilen Methanol (Merck) und 1 Teil Eisessigsäure (Merck) jeweils frisch zubereitet wurde, in einem Endvolumen von ca. 8 ml resuspendiert und für 25 Min bei 4°C im Kühlschrank fixiert. Danach wurde erneut abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde nochmals mit der Carnoy-Lösung für 5 Min bei 4°C nachfixiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand bis auf 0,3-0,5 ml mit einer Pasteur-Pipette abgehoben, und die Zellen wurden durch leichtes Schütteln vorsichtig resuspendiert. Mit einer neuen Pasteur-Pipette wurden die Zellen aus ca. 30-40 cm Höhe auf die mit Ethanol und Aceton gereinigten, bei minus 20°C vorgekühlten Objektträger aufgetropft (maximal 2 Tropfen pro Objektträger). Nach dem Trocknen der Objektträger bei Raumtemperatur für ca. 20 Min wurden die Chromosomen-Präparationen im Phasenkontrast-Mikroskop (Diavert, Leitz, Wetzlar) auf Anwesenheit von Metaphase-Zellen und gespreiteten Chromosomen überprüft. Anschließend wurden die Präparate mehrere Tage in Glas-Küvetten bei 4°C aufbewahrt.

2.3.2. Giemsa-Bänderung

Die Darstellung der Chromosomen während der Mitose wird zur Karyotypisierung benutzt. Mit Hilfe der seit 1970 entwickelten cytologischen Methoden kann jedes individuelle Chromosom irrtumsfrei identifiziert werden (**Seabright**, 1971). Es gibt über 300 Banden (G-Banden), die sich mit Giemsa-Farbstoff anfärben lassen (**Yunis & Chandler**, 1977). Die chromosomale G-Bänderungsanalyse ermöglicht eine umfassende Untersuchung chromosomaler Aberrationen in Metaphasezellen (**Abb. 1**).

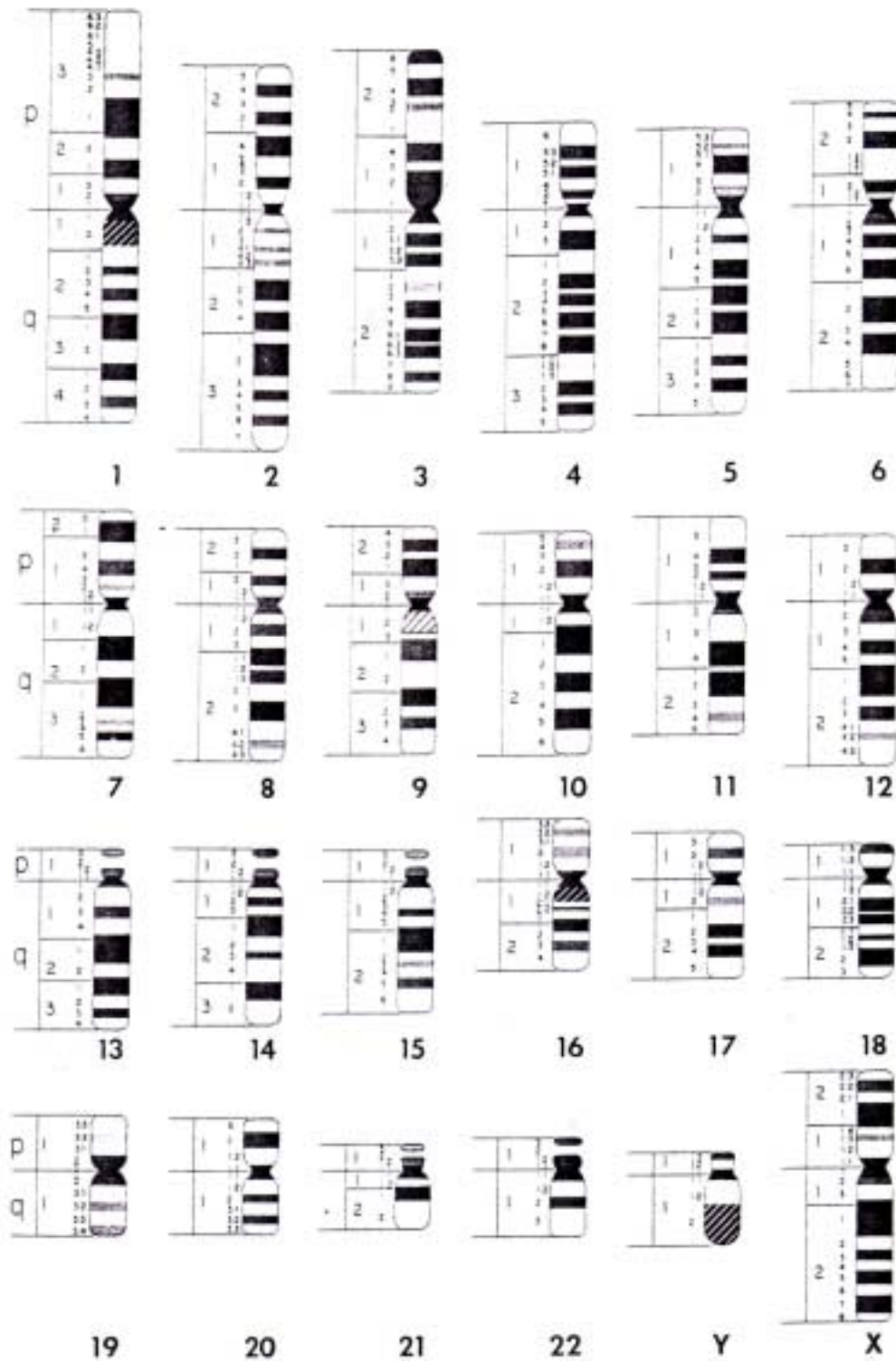


Abb. 1. Schema des menschlichen Karyotyps in der Giemsa-Bänderung (Yunis, 1981 und 1982)

2.3.2.1. Lösungen für die G-Bänderung

0.9% NaCl	9 g NaCl auf 1 L Aqua bidest.
Trypsin-Stammlösung	Trypsin 1:250 in HBSS, (Flow Laboratories, Meckenheim)
Soerensen-Phosphat-Puffer	pH 6,8-7,2; 38 ml Lösung A + 37 ml Lösung B
Lösung A	9,08 g KH_2PO_4 auf 1 L Aqua bidest.
Lösung B	11,88 g Na_2HPO_4 auf 1 L Aqua bidest.
Giemsa - Lösung	1 g Giemsa-Farbstoff (Merck) wurde in 54 ml Glycerin wasserfrei (Merck), mit Rührstab und Magnetprüher für mehrere Stunden gelöst, anschließend wurde 84 ml Methanol zugegeben und über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde die Lösung durch Faltenfilter (Selecta, Schleicher & Schüll, Dassel) filtriert.

2.3.2.2. Untersuchung zur G-Bänderung

Die differenzierte Anfärbung der sonst durch den basischen Giemsa-Farbstoff homogen gefärbten Chromosomen wird durch die Vorbehandlung in Form einer Alterung und einer Trypsinbehandlung hervorgerufen. Offenbar beruht die Quer-Bänderung auf einem partiellen Verlust von Struktur-Proteinen des Chromatins (Traut, 1991).

Zuerst wurden die Chromosomen-Präparate bei 65-70°C über Nacht auf einer Heizplatte (Präzitherm, Conrad und CO. Nfl., Hamburg) „gebacken“, um eine Alterung der Chromosomen zu erreichen. Dann wurde die 2,5% Trypsin-Stammlösung (Flow Laboratories, UK) beim Raumtemperatur aufgetaut und 1 :

20 in 0,9% NaCl in einer kleinen Hellendahl-Färbeküvette verdünnt (4 ml + 76 ml). Die Objektträger mit den fixierten Chromosomen wurden zuerst in einer großen Färbeküvette mit 0,9% NaCl kurz gespült, und danach in die kleine Hellendahl-Färbeküvette mit verdünnter Trypsin-Lösung für 2-3,5 Min gestellt und vorsichtig geschwenkt. Zweimal wurden die Objektträger mit 0,9% NaCl kurz gespült. Die Anfärbung erfolgte für 2,5-3,5 Min in einer Hellendahl-Färbeküvette mit der frisch filtrierten Giemsa-Lösung (= 3 ml ca. 0,73% Giemsa-Lösung + 75 ml Soerensen-Phosphat-Puffer, Endkonzentration 0,028% Giemsa). Dann wurden die Objektträger in zwei Küvetten mit Aqua bidest. gespült. Anschließend wurden sie auf Fließpapier schräg gestellt und bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet. Im Mikroskop (Zeiss Photomikroskop III) wurden die Chromosomen auf Spreizung und Bänderung geprüft. Geeignete, gut gebänderte Chromosomen je einer Metaphase wurden mit dem 63 x Objektiv photographiert (Agfa Ortho-25 Film). Aus den nachfolgend hergestellten Schwarzweiß-Vergrößerungen wurden die Chromosomen ausgeschnitten und nach der internationalen Nomenklatur eingeordnet (**Yunis**, 1981).

2.3.3. In situ Hybridisierung

Die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) ist eine inzwischen häufig angewandte Methode zur Erkennung spezifischer Genom-Sequenzen (**Lichter & Ward** 1990). Durch FISH können spezifische Nukleinsäuresequenzen in Präparationen mit Zellkernen und Metaphase-Chromosomen aufgefunden werden. Dabei werden DNA-Sonden benutzt, die nur an komplementäre Sequenzen der DNA der untersuchten Zellen binden können. Die DNA-Sonden werden durch chemische Modifikation markiert und nach der Hybridisierung mit einer Immunreaktion nachgewiesen. Zuerst wird die Sonden-DNA und die Ziel-DNA des Präparates durch Erhitzen (die Ziel-DNA in einer 70% Formamid-Lösung) denaturiert, d.h. einzelsträngig gemacht, und anschließend über Nacht hybridisiert. Der Nachweis der hybridisierten Sonden-DNA erfolgt über Farbstoffe, die Fluoreszenz-optisch dargestellt werden können (**Abb. 2**).

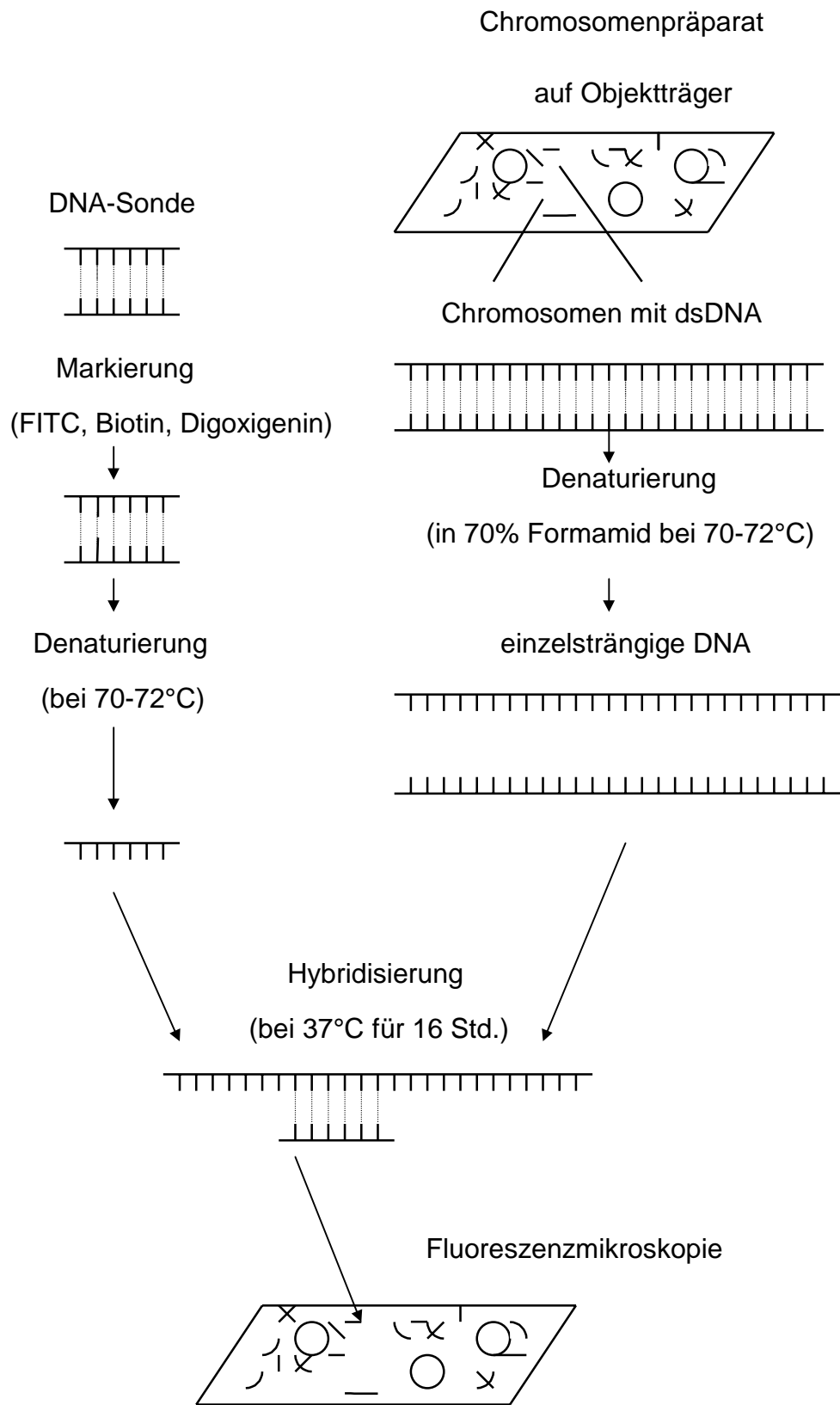


Abb. 2. Allgemeines Prinzip der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)
(nach **Bentz** et al., 1996)

Der Nachweis kann entweder "direkt" erfolgen, d. h. durch die Koppelung von Fluoreszenz-Farbstoffen an Nukleotide (z.B. FITC, **Abb. 3**), oder indirekt durch sogenannte "Reporter-Gruppen" (z.B. Biotin, Digoxigenin) erreicht werden. Bei der indirekten Nachweisreaktion ist zusätzlich ein Reporter-bindendes Molekül (z.B. Avidin oder Anti-Digoxigenin) erforderlich, an das ein Fluorochrom (z.B. TexasRed oder Rhodamin) gekoppelt ist (**Abb. 4** und **5**). In dieser Arbeit wurde sowohl der direkte als auch der indirekte Nachweis angewandt. Der indirekte Nachweis resultiert in einer höheren Signalintensität und einer höheren Sensitivität, da insgesamt mehr Fluorochrom-Moleküle detektiert werden. Die Sensitivität des Nachweises wird durch die Amplifikation der Fluoreszenz-Signale verstärkt; dabei werden Antikörper benutzt, die gegen die Reporter-bindenden Moleküle (z.B. für Avidin) oder das entsprechende Fluorochrom gerichtet sind (**Pinkel et al. 1986**). Die Hybridisierungssignale werden mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops analysiert und photographiert. Bei der mikroskopischen Auswertung können Filtersysteme benutzt werden, die hochselektiv für bestimmte Fluorochrome (d.h. bestimmte Wellenlängen) sind, und die eine gleichzeitige Darstellung mehrerer der im Experiment verwendeten Fluorochrome erlauben.

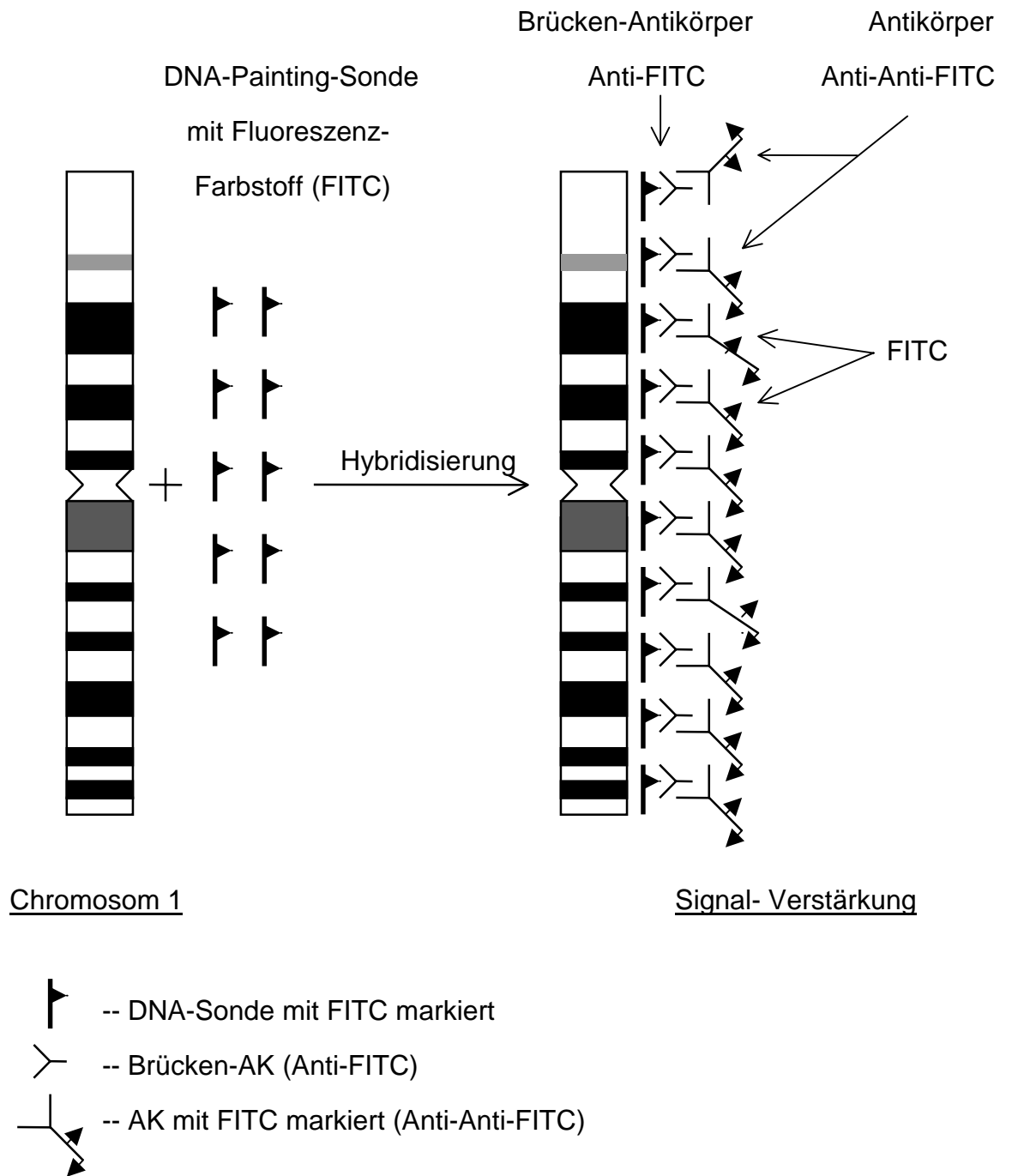


Abb. 3. Schema der Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH) mit einer Painting-Sonde für Chromosom 1: direkte Methode

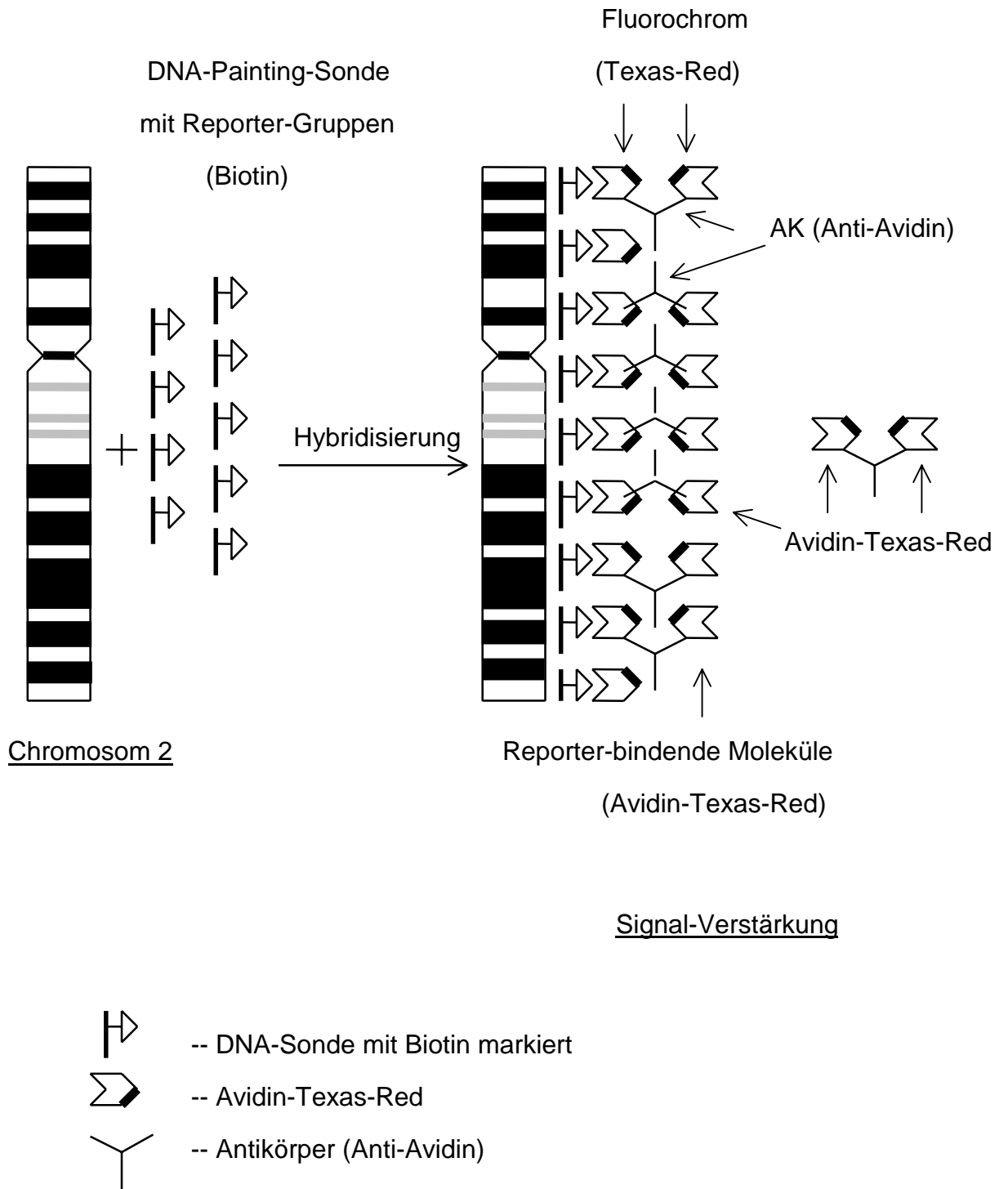


Abb. 4. Indirekte FISH-Methode mit Avidin-Texas-Red für Chromosom 2

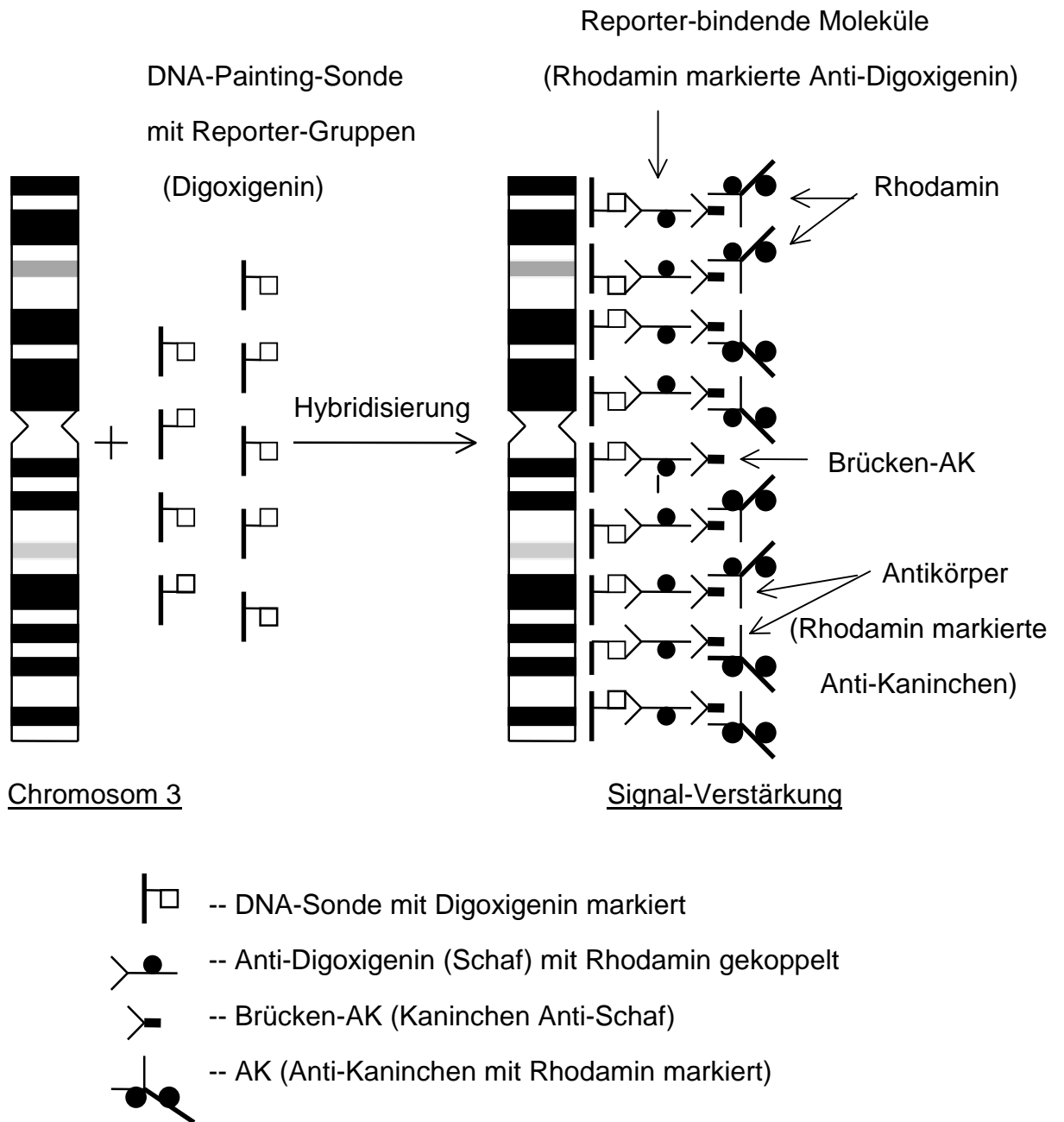


Abb. 5. Indirekte FISH-Methode mit Rhodamin-gekoppeltem Anti-Digoxigenin für Chromosom 3

2.3.3.1. Hybridisierung mit FITC- oder Biotin-markierten Sonden (vgl. Abb. 3 und 4)

- Vorbereitungen

Wasserbäder vortemperieren auf 70°C, 37°C und 45°C

Heizplatte (Präzitherm, Hamburg) auf 65°C erwärmen

- Lösungen

70%, 90% und 100% Äthanol (im Gefrierschrank)

20xSSC 0,3 M Na-Citrat und 3,0 M NaCl (pH 7,0 mit HCl)

4xSSC/Tween20 40 ml 20xSSC auf 200 ml Aq. bidest. + 1,4 ml
25% Tween20 (USB Corp., Cleveland)

4xSSC/Tween20 + 5% BSA (Waschlösung) 2 ml 4xSSC/Tween20 + 100 mg
BSA (Sigma, München)

2xSSC 50 ml 20xSSC auf 500 ml Aq. bidest.

70% Formamid / 0,6xSSC 70 ml 100% Formamid (Fluka, Buchs) + 30 ml
2xSSC (pH 7,0)

50% Formamid / 1xSSC 50 ml 100% Formamid + 50 ml 2xSSC (pH 7,0)

0,1xSSC 10 ml 2xSSC auf 200 ml Aq. bidest.

50% Formamid / 0,5xSSC 50 ml 100% Formamid + 2,5 ml 20xSSC auf
100 ml Aq. bidest.

DAPI-Lösung 1 µl DAPI (AGS, Heidelberg) + 2,5 ml 4xSSC/
Tween20

- DNA-Sonden: entweder mit Biotin oder mit FITC markierten Probe-DNA
(AGS)

- Detectionskit (AGS, Heidelberg)

F1 = Anti-FITC

F2 = Anti-F1 = Anti-Anti-F1

B3 = Avidin-TexasRed oder Avidin-FITC

B4 = Anti-Avidin-TexasRed

DAPI

Antifading-Lösung

- Durchführung

Die Objektträger mit den durch Methanol / Eisessigsäure fixierten Chromosomenpräparaten wurden mit Ethanol in aufsteigender Konzentrationen (70%, 90%, 100%) je 3 Min bei Raumtemperatur gewaschen und an der Luft getrocknet, danach wurden die Chromosomenpräparate auf einer Heizplatte bei 65°C über Nacht „gebacken“ (mindest 6 Stunden).

Die Biotin- oder FITC-markierten DNA-Sonden, die in Hybridisierungslösung gelöst und bei -20°C gelagert waren, wurden auf ca. 42°C in einem Wasserbad für 5 Min erwärmt und gut gemischt. Pro Objektträger wurde jeweils 10 µl gelöste DNA-Sonde in einem Eppendorfgefäß bei 70°C für 5 Min im Wasserbad denaturiert und dann ca. 30 Min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Chromosomen-DNA (Ziel-DNA) auf dem Objektträger wurde durch Einstellen in einer vortemperierten Küvette mit 70% Formamid / 0,6xSSC (pH 7,0) im Wasserbad bei 70°C für genau 2 Min denaturiert. Anschließend wurden die Chromosomenpräparate in der aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) bei -20°C im Gefrierschrank für je 3 Min entwässert und an der Luft getrocknet. Nachdem die denaturierte DNA-Sonde auf das Chromosomenpräparat pipettiert war, wurde je ein Deckglas (18 x 18 mm) luftblasenfrei aufgelegt, und die Präparate wurden anschließend mit „Fixogum“-Klebstoff luftdicht um den Deckglas-Rand verschlossen. Dann wurden die Präparate in einer mit Aluminiumfolie eingepackten (d.h. im Dunkeln), feuchten Kammer im Brutschrank bei 37°C über Nacht (ca. 16 Stunden) inkubiert.

Nach Entfernung des Deckglases wurden die hybridisierten Chromosomen-Präparate 3x für je 5 Min in 45°C vorgewärmter 50% Formamid / 1xSSC-Lösung (pH 7,0) gespült und noch 3x für je 5 Min unter leichtem Schütteln in 60°C vortemperierter 0,1xSSC-Lösung inkubiert und gewaschen. Die Präparate wurden danach in 4xSSC / Tween20 kurz gespült und zur Absättigung unspezifischer Bindungen mit 1 ml 4xSSC / Tween20 + 5% BSA für 25 Min bei 37°C in einer vorgewärmten feuchten Kammer inkubiert. Das BSA wurde durch Spülen mit 4xSSC / Tween20 entfernt. Je 40 µl mit 1:250 in 4xSSC / Tween20 verdünnte Lösung B3 (= Avidin-TexasRed) oder F1 (= Anti-FITC) wurde auf die Präparate gegeben und ein Deckglas (24 x 24 mm) wurde aufgelegt. Die

Inkubation erfolgt im Dunkeln, in einer feuchten Kammer bei 37°C im Brutschrank für 30 Min. Die überschüssige Lösung von B3 oder F1 wurde in 4xSSC / Tween20 unter Schütteln bei 45°C 3x für je 5 Min abgewaschen, und zur Verstärkung der Nachweisreaktion wurde ein Antikörper gegen Avidin (B4) oder ein mit FITC gekoppelter zweiter Antikörper gegen Antikörper F1 (F2) in der Verdünnung 1:250 auf die Präparate pipettiert (jeweils 40 µl). Die Präparate mit der Antikörper-Lösung wurden bei 37°C für 45 Min in Dunkeln, in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde der nicht gebundene Anteil der Antikörper in 4xSSC / Tween20 bei 45°C unter Schütteln 3x für je 5 Min abgespült. Die Präparate wurden erneut mit 40 µl der oben genannten Antikörper B3 oder F1 im Dunkeln in einer feuchten Kammer bei 37°C für 30 Min inkubiert. Nach dem Waschen in 4x SSC / Tween20 bei 45°C 3x für je 5 Min wurden die Chromosomenpräparate mit DAPI-Lösung (nach Herstellerangaben) gegengefärbt. Dazu wurde 1 µl DAPI-Lösung (Hybridisierungskit, AGS) mit 2,5 ml 4x SSC / Tween20 gemischt und je 0,2 ml dieser Lösung auf den Objektträger zugegeben. Die Anfärbung erfolgte im Dunkeln für 3 Min bei Raumtemperatur. Mit Leitungswasser wurden die Präparate gespült und dann an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Präparate mit 1 Tropfen "Antifading"-Lösung (Hybridisierungskit, AGS) versehen und ein Deckglas (24 x 60 mm, Alfred Behr, Hamburg) luftblasenfrei aufgelegt.

2.3.3.2. Hybridisierung mit Digoxigenin-Sonden (vgl. Abb. 5)

- Vorbereitung

Wasserbäder vortemperieren auf 37°C und 72°C

Wärmeschrank (Heraeus, Wesarg, Hamburg) bei 37°C

Gefrierschrank bei -20°C

- Lösungen

70%, 80%, 90% Ethanol

20xSSC	0,3 M Na-citrat & 3,0 M NaCl (pH 7,0 mit HCl)
2xSSC	30 ml 20xSSC auf 300 ml Aq. bidest. (pH 7,0)
1xSSC	10 ml 20xSSC auf 200 ml Aq. bidest. (pH 7,0)

0,5xSSC	5 ml 20xSSC auf 200 ml Aq. bidest. (pH 7,0)
70% Formamid / 2xSSC	8 ml 20xSSC + 16 ml Aq. bidest + 56 ml 100% Formamid (pH 7,0 mit HCl oder NaOH)
10x PBD	von Oncor
1x PBD	30 ml 10xPBD auf 300 ml Aq. bidest.
DAPI-Lösung	10 µg DAPI-Puffer (Sigma) auf 1ml Aq. bidest.

- DNA-Sonden (Oncor, Heidelberg): mit Digoxigenin markierten Probe-DNA
(COATASOME Total Chromosome Probe)

- Detectionskit (Oncor, Heidelberg)

Rhodamin-labeled Anti-Digoxigenin

Fluorescein-labeled Anti-Digoxigenin

Rabbit Anti-Sheep (Antikörper I)

Rhodamin-labeled Anti-Rabbit (Antikörper II)

DAPI /Antifade

Propidium Iodide (PI)

Antifade

- Chromosomenpräparate der Zelllinien EFE-184, Klon J-5 und EFO-27

- Durchführung

Die Hybridisierung erfolgte mit Digoxigenin-markierten "COATASOME Total Chromosome" Proben. Die Digoxigenin-markierten Chromosome Proben, die in Hybrisol VII (Oncor; 50% Formamid / 2xSSC) gelöst, gut gemischt und bei minus 20°C gelagert waren, wurden bei 36-39°C in einem Wasserbad für 5 Min erwärmt. Pro Objektträger wurde 10 µl gelöste Chromosome-DNA-Probe in einem Eppendorfgefaß bei 70-73°C für 10 Min im Wasserbad denaturiert und nach erneuter kurzer Mischung und Zentrifugation bei 37°C für ca. 45 Min inkubiert.

Die Objektträger mit den durch Methanol / Eisessig fixierten Chromosomen-Präparaten wurden mit 2xSSC (pH 7,0) bei 37°C in einem Wasserbad für 30 Min inkubiert, damit die untersuchten Chromosomen weniger Sensitivität für „Overdenaturation“ haben können. Dann wurden die Objektträger mit Ethanol in

aufsteigender Konzentrationen (70%, 80%, 95%) bei Raumtemperatur für je 2 Min entwässert und an der Luft getrocknet.

Nach dem Lufttrocknen wurden die Chromosomenpräparate in einer vorge-temperierten Küvette mit 70% Formamid / 2xSSC (pH 7,0) bei 71-73°C für genau 2 Min denaturiert und sofort in der Ethanolreihe (70%, 80%, 95%) bei -20°C für je 2 Min nochmals entwässert.

Die denaturierte Chromosome-Probe wurden nach kurzer Zentrifugation auf die denaturierten Chromosomen-Präparate pipettiert, je ein Deckglas (20 x 20 mm²) wurde luftblasenfrei aufgelegt, und die Präparate wurden anschließend mit Fixogum luftdicht um das Deckglas-Rand verschlossen. Danach wurden die Objektträger in einer mit Aluminiumfolie eingepackten feuchten Kammer (Nunc) im Brutschrank bei 37°C für ca.16 Stunden inkubiert und hybridisiert.

Nach der Entfernung des Deckglases wurden die hybridisierten Chromosomen-Präparate mit 1xPBD bei Raumtemperatur transportiert und in einer vorgewärmten Küvette mit 0,5xSSC (pH 7,0) bei 71-73°C für 5 Min ohne Schütteln inkubiert. Dann wurden die Präparate mit 1x PBD kurz gespült, jeweils 40 µl Rhodamin-gebundener Anti-Digoxigenin-Antikörper wurde auf die Präparate gegeben, und je ein Plastik Coverslip (24 x 60 mm²) wurde aufgelegt. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln, in einer feuchten Kammer (Nunc) bei 37°C im Wärmeschrank für 5 Min. Die überschüssige Lösung von Rhodamin-gekoppeltem Anti-Digoxigenin wurde in 1x PBD bei Raumtemperatur 3x für je 2 Min abgewaschen und zur Verstärkung der Nachweisreaktion wurde je 40 µl Rabbit Anti-Sheep (Kaninchen Anti-Schaf, Brücken-Antikörper) auf die Präparate pipettiert, und ein Plastik Coverslip aufgelegt. Nach 15 Min Inkubation in der vortemperierten feuchten Kammer bei 37°C wurden die Präparate in 1x PBD bei Raumtemperatur 3x für je 2 Min gewaschen und mit jeweils 40 µl Anti-Rabbit (Anti-Kaninchen, mit Rhodamin markiert) versehen, dann wurden die Präparate mit Plastik Coverslips eingedeckt und im Dunkeln bei 37°C in der feuchten Kammer für 15 Min inkubiert. Danach wurden die Objektträger erneut in 1x PBD bei Raumtemperatur 3x für je 2 Min abgespült. Zur Gegenfärbung wurde je 20-30 µl DAPI-Lösung (10 µg / 1 ml H₂O) auf die

Präparate gegeben, je ein Plastik Coverslip wurde aufgelegt, und für 3 Min wurden die Präparate im Dunkeln bei Raumtemperatur stehengelassen. Nachdem die Präparate mit entmineralisiertem Wasser abgespült und an der Luft abgetrocknet waren, wurden sie mit je 1 Tropfen (ca.10-20 μ l) Antifade eingedeckt, und ein Deckglas (24 x 60 mm²) wurde luftblasenfrei aufgelegt.

Die Signale von gut markierten Chromosomen-Präparaten wurden mit Standard-Epifluoreszenz-Filtern für FITC, Biotin bzw. Rhodamin, Fluoreszein, Propidium Iodide und auch für DAPI im Mikroskop (Photomikroskop III, Zeiss, Oberkochen) analysiert und photographiert (Kodak-Film, EPH P1600x). Dies ist ein Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskop, das mit Erregerfilter, Farbteiler, Sperrfilter und Anregungssystem ausgerüstet ist. Die Farbteiler reflektieren keine längerwellige Anregungsstrahlung und dadurch wird nur kurzwelliges Fluoreszenzlicht in die Präparate gelassen. Für die unterschiedlichen Signale aus der Anfärbung mit DAPI, FITC oder PI wurden verschiedene Filter für Anregung oder Emission benutzt (**Tab. 2**).

Tab. 2. Filtersysteme für die Fluoreszenzmarkierung bei den FISH-Analysen

Farbstoffe Lichtquelle	DAPI	FITC Fluorescein	Texas-Red, Rhodamin, Propidium Iodide
Anregungslicht	Ultraviolett	Blau	Rot
Erregerfilter	UV - durchlässiges Schwarzglas	Interferenz- Blaufilter	Interferenz- Grünfilter- Kombination
Farbteiler	FT395	FT510	FT580
Sperrfilter (Emission)	Farbloses UV- Sperrfilter LP420	Orangefilter LP520	Rotfilter LP590
Signal-Farbe	blau	grün-gelb	rot

2.4. TUNEL-Assay zur Apoptose

2.4.1. Zellpräparate

Vor der Verwendung wurden die Objektträger gründlich gereinigt: zuerst mit Aq. bidest. mechanisch gesäubert und gespült und in Hellendahl-Glas-Küvetten mit 95% Ethanol übernacht stehengelassen. Nach dem Abwischen wurden sie in Glas-Küvetten mit 1M HCl und 1M NaOH hintereinander für jeweils 3 Stunden stehenlassen, dann wurden sie in Aq. bidest. gespült bis der pH-Wert auf 7,0 gelangt war. Anschließend wurden die Objektträger in Küvetten mit Aceton für eine halbe Stunden gestellt und in der Luft getrocknet, danach wurden sie in Hellendahl-Glas-Küvetten bei 180°C über 4 Stunden sterilisiert.

Nach der Trypsinierung wurden Zellen der Linien EFO-27 und EFE-184 Klon J-5 vom Flaschenboden abgelöst und in Wachstumsmedium mit 10% Nativ-FCS auf die gereinigten Objektträger in Quadriperm-Schalen (Heraeus, Hanau) ausgesät. Es wurde eine Konzentration von 1×10^4 Zellen / ml in jeweils 7 ml Suspension pro Objektträger eingesetzt. Nach der Anwachs-Phase von 2 Tagen wurde das Medium gewechselt.

Wenn die Zellen auf den Objektträgern Subkonfluenz erreicht hatten, wurden die Präparate fixiert. Dazu wurden die Zellrasen mit Wachstums-Medium gespült und in einer Küvette mit 1% Paraformaldehyd (Merck) / PBS fixiert. Die Präparate wurden bei Raumtemperatur für 5 Min gehalten und anschließend in der Luft getrocknet.

2.4.2. Untersuchungen zur Apoptose

Für diese Untersuchung wurde der „In Situ Apoptosis Detection Kit,, (Appligene-Oncor, Heidelberg) eingesetzt. Der Kit besitzt folgende Reagenzien:

- Equilibration Buffer;
- Reaction Buffer;
- TdT / Enzyme;
- Stop / Wash Buffer;

-
- Blocking Solution;
 - Anti-Digoxigenin-Fluorescein.

 - Vorbereitungen:
 - 1% Paraformaldehyd: 10 g Paraformaldehyd (Merck) + 90 ml 10x PBS + 900 ml Aqua bidest. wurden auf einem beheizten Magnetrührer (Hotplate Magnetic Stirrer, Cenco Instrumenten MIJ.N.V.) bei 60°C für ca. 1 Stunde gerührt und gelöst.

 - Reagenz 1: 38 µl Reaction Buffer + 16 µl TdT / Enzyme / pro Präparat

 - Reagenz 2: 38 µl Reaction Buffer + 16 µl H₂O / pro Präparat
Die beiden Reagenzien wurden in je ein Eppendorfgefäß überführt, gemischt und in Eis gelagert.

 - Reagenz 3: Im Verhältnis von 1:34 wurden Stop / Wash Buffer und Aqua bidest. gut gemischt und in einer Glas-Küvette bei 37°C vortemperiert.

 - Reagenz 4: 56 µl Blocking Solution + 49 µl Anti-Digoxigenin-Fluorescein pro zwei Präparate wurden nach Durchmischung in einem Eppendorfgefäß mit Aluminiumfolie eingepackt und verdunkelt in Eis gelagert.

 - Reagenz 5: für "Counterstaining and Mounting"
1 Teil Propidium-Iodide und 4 Teile Antifade-Lösung wurden in einem Eppendorfgefäß gut gemischt, mit Aluminiumfolie eingepackt und im Dunkeln in Eis gelagert.

 - Feuchte Kammer: zur Verhinderung des Austrocknens der Präparate wurde eine feuchte Kammer benutzt, die bei 37°C im Brutschrank vorgewärmt war.

- Durchführung:

Die mit Paraformaldehyd fixierten Präparate wurden zweimal je 3 Min in einer Küvette mit 37°C vorgewärmten PBS gewaschen und danach schräg aufgestellt, um Tropfen ablaufen zu lassen. Die Präparate sollten nie ganz trocken werden. Auf jedes Präparat wurden jeweils 75 µl des 1x Equilibration Buffer pipettiert, und je ein Plastik Coverslip wurde aufgelegt. Anschließend wurden die Präparate in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 5 Min inkubiert. Nach Entfernung des Coverslips wurden die Objektträger kurz schräg aufgestellt und die überschüssige Flüssigkeit wurde abtropfen lassen. Dann wurden je 54 µl Reagenz 1 (mit TdT / Enzym) auf jedes Präparat pipettiert. Zum Vergleich wurden auch 54 µl Reagenz 2 (ohne TdT / Enzym stattdessen mit H₂O) auf ein Präparat gegeben, und danach wurden alle Präparate mit jeweils einem Plastik Coverslip bedeckt. Die Inkubation erfolgte in der vorgewärmten feuchten Kammer bei 37°C für 60 Min. Anschließend wurden die Objektträger in der Glas-Küvette mit Reagenz 3 (Stop/Wash Buffer) bei Raumtemperatur für 10 Min gehalten und in PBS 3x je 3 Min gewaschen. Die Präparate wurden dann mit jeweils 52 µl Reagenz 4 (Blockierungsloesung mit Anti-Digoxigenin-Fluorescein) versetzt, je ein Coverslip wurde aufgelegt, und es wurde in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 30 Min im Dunkeln inkubiert. Nach der Entfernung des Plastik Coverslips wurden die Objektträger 3x je 5 Min in Küvetten mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Zuletzt wurden die Präparate gegengefärbt. Dazu wurden jeweils 40 µl Reagenz 5 (PI / Antifade) pipettiert, je ein Deckglas (24 x 60 mm²) wurde aufgelegt. Die Präparate wurden im Dunkeln bei Raumtemperatur für 10 Min inkubiert und anschließend bei -20°C gelagert. 1-3 Tage später wurden die Präparate im Mikroskop analysiert.

Die Signale der untersuchten Präparate wurden mit Epifluoreszenz-Filtern für Fluorescein und Propidium-Iodide (vgl. Tab. 2 auf S. 29) im Mikroskop (Photomikroskop III, Zeiss, Oberkochen) eingestellt und photographiert. Dasselbe Sehfeld wurde auch im Phasenkontrast photographiert. Dies ermöglicht eine Kontrolle der Bild-Fokussierung und erlaubt Aussagen zur Intaktheit der Zellen.

2.5. Isolierung von DNA

Die angewandte schonende Art der Präparation von DNA wurde von **Marmur** et al. (1961) entwickelt und von **Davis** et al. (1986) modifiziert. Die Zellen wurden durch Inkubation mit dem Detergens Natrium-Dodecylsulfat (1,5% SDS in TNE-Puffer) und durch Zusatz von 0,1% Proteinase K lysiert; dabei bleibt die hochmolekulare Struktur der DNA weitgehend erhalten und freigesetzte Nukleasen werden schnell inaktiviert (**Sambrook** et al., 1989).

2.5.1. Aufbereitung der Zellkulturen und Präparation

Zunächst wurden die auf Petri-Schalen (14 cm Durchmesser, Nunc) ausgesäten Zellen der Linien EFE-184, EFO-27 und von Klon J-5 bis zur Konfluenz kultiviert. Dann wurde das Nährmedium abgegossen, und die Monolayer-Zellrasen wurden dreimal mit PBS gespült. Bezogen auf die Zellkulturfläche von 175 cm² wurden 5 ml TNE-Puffer, 400 µl 20% SDS-Lösung (Serva) und 100 µl 2% Proteinase-K Lösung (Boehringer, Mannheim) zugesetzt. Damit wurden die Zellen für ca. 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA aus den Zellysaten isoliert.

Die Extraktion der DNA mit Phenol und Chloroform (Merck) erlaubt die Abtrennung der Proteine in der organischen Phase und in der Zwischenphase, während die Nukleinsäuren in der wässrigen Phase verbleiben. Zur schonenden Isolierung der DNA aus Zellysaten wurde das für die Extraktion verwendete Phenol (Appligene Oncor, Heidelberg) vor Gebrauch äquilibriert. Hierzu wurde kristallines Phenol in 2M Tris-HCl (pH 7,5) gelöst und die wässrige Phase durch Schütteln solange gegen frischen 2M Tris-Puffer ausgetauscht, bis die wässrige Phase einen neutralen pH-Wert erreicht hatte.

Zur Entfernung der Proteine wurden die Zellysate von jeweils zwei Schalen in ein 50 ml Bluecap-Röhrchen (Nunc) umgefüllt und im Volumenverhältnis von 1:1 mit einer Mischung aus Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, ca. 5 Min vorsichtig gemischt und bei Raumtemperatur in einer

Hettich-Rotosilenta / K-Zentrifuge für 10 Min bei 2000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde mit einer an der Spitze gekürzten 10 ml Plastik-Pipette in ein neues Bluecap-Röhrchen überführt und ein zweites Mal wie oben beschrieben extrahiert. Zur Entfernung der Phenolreste wurden zwei weitere Extraktionen der wässrigen Phase im Volumenverhältnis von 1:1 mit einer Mischung aus Chloroform-Isoamylalkohol (Merck) (24:1) angeschlossen.

Um Verunreinigung der DNA durch RNA zu beseitigen, wurde ein Verdau mit je 30 µl RNase A (Sigma, Endkonzentration 10 µg / ml) für 45-60 Min bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurde die RNase durch einen erneuten Extraktionsschritt mit einer Mischung aus Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) entfernt, und die wässrige Phase wurde 2mal durch einen erneuten Extraktionsschritt mit einer Mischung aus Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) von Phenolresten befreit.

Die Salzkonzentration der wässrigen DNA-Lösung wurde mit 3 M Natriumacetat (pH 5,2) auf 0,3 M erhöht und mit dem doppelten Volumenteil absoluten, bei minus 80°C gelagerten Ethanol gefällt. An der Grenzschicht zwischen Ethanol und der wässriger Phase bildeten sich nach kurzer Zeit Faden-Präzipitate. Die DNA-Fäden wurden mit einer Pasteur-Pipette, deren Spitze zuvor in der Gas-Flamme geschmolzen und zu einem Häkchen gebogen worden war, vorsichtig herausgewickelt, nach kurzem Trocknen dreimal in 70% Ethanol gewaschen und wieder an der Luft getrocknet. Zuletzt wurden die DNA-Fäden in Kryoröhrchen (Nunc) mit 200 µl TE-Puffer (pH 7,4) gelöst (Davis et al. 1986).

2.5.2. Photometrische Bestimmung der DNA- Konzentration

Die DNA-haltigen Lösungen aus verschiedenen Zellkulturen wurden im Verhältnis 1:50 in Aqua bidest. verdünnt (= 20 µl DNA-Lösung + 980 µl H₂O). Zur Quantifizierung wurde die optische Dichte (OD) der DNA-haltigen Lösungen mit einem Spektralphotometer (PMQ II, Zeiss, Oberkochen) bei den Wellenlängen 260 nm, 280 nm und 245 nm bestimmt. Es wird bei der Berechnung der isolierten DNA-Konzentrationen zugrunde gelegt, daß der Wert einer Einheit der optische Dichte $_{260\text{ nm}}$ (OD₂₆₀) einer Konzentration von 50 µg

DNA / ml entspricht. Um die Reinheit der Präparationen zu überprüfen, wurde der Quotient der $OD_{260\text{ nm}}$ und $OD_{280\text{ nm}}$ gebildet. Wenn dieser Wert mehr als 1,7 ergab, so konnte die DNA für nachfolgende Untersuchungen, u.a. für CGH-Analysen, benutzt werden; ansonsten wurde wegen vermuteter Protein-Verunreinigungen die Phenol-Chloroformextraktion der Nukleinsäure-Lösungen wiederholt (**Sambrook** et al., 1989).

Zur Klärung der Frage, ob hohe Salzkonzentrationen die gemessene OD_{260} beeinflussten, wurde die DNA-Lösung bei einer Wellenlänge von 245 nm vermessen. Wenn der Wert für die OD_{245} deutlich weniger als der entsprechenden Wert bei 260 nm lag, so konnte davon ausgegangen werden, daß die Meßwerte nicht durch Salze verfälscht waren.

3. Ergebnisse

3.1. Klonierung von EFE-184 Endometriumkarzinomzellen

Die Morphologie von Zellen aus soliden Tumoren ist in Kultur sehr unterschiedlich und variabel. Die Tumorzellen können im Verlauf der Kultivierung verschiedene Grundformen annehmen, wie z.B. rundlich, polygonal oder länglich. Mit der Zeit verändert sich die Morphologie derselben Zelle, ohne daß ihr Zelltyp sich ändert. Der Zelltyp, der dem ursprünglichen Gewebe entspricht, bleibt erhalten. Die Zellen der in dieser Arbeit untersuchten Linien EFE-184 (Endometriumkarzinom) und EFO-27 (Ovarialkarzinom) sind vom epitheloiden Typ. Trotz Veränderungen ihrer Morphologie und trotz der völligen Umwandlung in abgerundete Zellen durch den Trypsinierungsvorgang behalten die Zellen während der Langzeit-Kultivierung weiter ihren epitheloiden Zelltyp. Die gezeigten Fotos (**Abb. 6A** und **6B**) sind Momentaufnahmen der Zellkulturen. Auf beiden Fotos sind einige größere Zellen mit mehreren Zellkernen und in der Mehrzahl kleinere, polygonale mononukleäre Zellen zu sehen. Die kleineren Zellen besitzen klare Konturen mit scharfen Zellrand und deutlichen Nucleoli. Nach einigen Tagen kann die Morphologie desselben mikroskopischen Ausschnitts verändert sein.

Die Morphologie der Tumorzellen ist vom Stadium des Zellzyklus abhängig, d.h. Zellen in Teilung sind in asynchron und rasch wachsenden Kulturen häufig zu sehen, und die Zellen werden rundlich bei der Zellteilung (**Abb. 6A**). Variationen der Zell-Morphologie sind auch in Kulturen von klonierten Zelllinien sichtbar. Die Zellen von Klon J-5 besitzen unterschiedliche Zellformen (**Abb. 6B**), in ähnlicher Weise wie unklonierte Zellen der Linie EFE-184. Bei der Aufzucht eines Zellklons geht die Morphologie der ursprünglichen Einzel-Zelle verloren. Der Vergleich der beiden Phasenkontrast-Fotos ergab jedoch keine grundsätzlichen Unterschiede zwischen den unklonierten Zellen und Zellen von Klon J-5.

Nach Verdünnung und Aussäen von Zellen der Linie EFE-184 in Passage 59 auf einer Mikrotiterplatte (Nunc) ergab sich in einigen Löchern der Platte mit Flachboden nur jeweils eine einzige Zelle, die sich zur Kolonie weiter

entwickelte. Auf diese Weise wurden die sechs Klone J-1 bis J-6 gewonnen (Abb. 7).

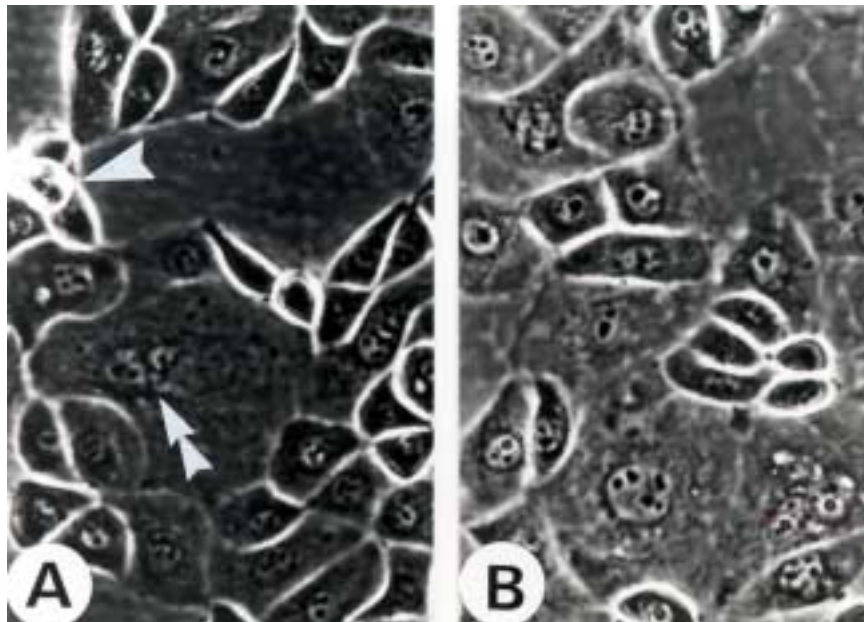
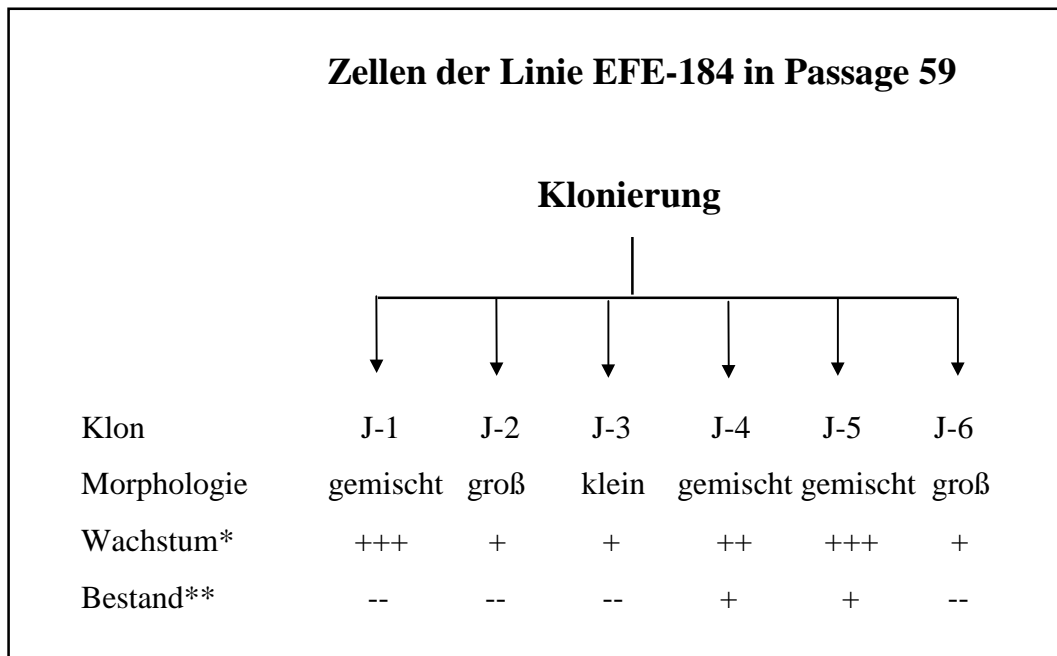


Abb. 6. Polygonale epitheloide Zellen der Linie EFE-184 (250 x),
A) in Passage 121 (unkloniert); Zelle in Teilung (Pfeil), große
Zelle mit mehreren Kernen (Doppel-Pfeil),
B) bei Klon J-5 in Passage 81.



Wachstum*: + gering, Konfluenz erst nach mehr als 14 Tagen;
 ++ Konfluenz nach 9 bis 12 Tagen;
 +++ relativ schnell, Konfluenz nach 6 bis 8 Tagen.

Bestand**: -- Zellen durch Kontamination verloren,
 + Zellen eingefroren und nach Auftauen weiter kultiviert.

Abb. 7. Eigenschaften von EFE-184 Zellen nach der Klonierung
 in Passage 59 der Kultur

Die Zellen von Klon J-1 besaßen unterschiedliche Größe und wuchsen relativ schnell. Die Kulturen von Klon J-2 und J-6 hatten fast nur extrem große Zellen und kaum kleine Zellen; demgegenüber bestand Klon J-3 nur aus kleinen Zellen. Das Wachstum von Zellen der Klone J-2, J-3 und J-6 war langsam; es gab nur wenige Metaphase-Zellen. Durch Kontaminationen sind die Klone J-1, J-2, J-3 und J-6 verlorengegangen. Die Zellen der Klone J-4 und J-5 hatten gemischte Größen. Die Zellen von Klon J-4 wuchsen etwas langsam und blieben nur in einer weiteren Passage (P2) erhalten. Die Zellen des Klons J-5 sind stabil etabliert und wachsen schnell. Sie wurden in der Zwischenzeit häufig verbreitert und bis zur Passage 77 nach der Klonierung kultiviert.

Während der Kultivation von EFE-184 Zellen kamen somit vereinzelt größere Zellen vor, die langsam wuchsen. Dabei war nicht klar, ob die größeren Zellen zu bestimmten Wachstumsphasen gehören oder eine Vorstufe für den Zelluntergang sind. Zur Klärung dieser Frage und zur genauen Lokalisation wurden 2 Tage nach dem Anwachsen von trypsinierten Zellen mit einer sterilen Punktionsnadel Strichmarkierungen in der Fläche des Zellrasens angebracht. Im Mikroskop mit Phasenkontrast-Einrichtung wurden Zellen desselben Bildausschnitts täglich beobachtet und photographiert (**Abb. 8A-E**). Mitte links von der Strichmarkierung ist eine große Zelle mit mehreren Zellkernen zu sehen (**Abb. 8A**). Diese Zelle machte keine Zellteilung durch und ging 4 Tage nach der Aussaat (zwischen Tag 5 und 7) verloren. Eine kleine Zelle im unteren linken Bildteil war nach 1 Tag groß und flach geworden (**Abb. 8B**); der linke obere Rand dieser Zelle ist hoch gewölbt und zeigt den bevorstehenden Zelluntergang an. Am darauffolgenden Tag war die Zelle nicht mehr detektierbar (**Abb. 8C**).

In der gezeigten Kolonie rechts von der Strichmarkierung waren zunächst nur kleine Zellen sichtbar (**Abb. 8A-C**). Am 7. Tag fand sich in der Kolonie eine einzige große Zelle (**Abb. 8D**). An derselben Stelle waren am 8. Tag zwei große Zellen zu sehen; zusätzlich fanden sich weiter rechts davon weitere große Zellen (**Abb. 8E**). Wie diese Beobachtungen zeigen, entstehen die großen Zellen aus kleinen Zellen und sind offenbar nur begrenzt teilungs- und lebensfähig; sie sind zum Untergang bestimmt.

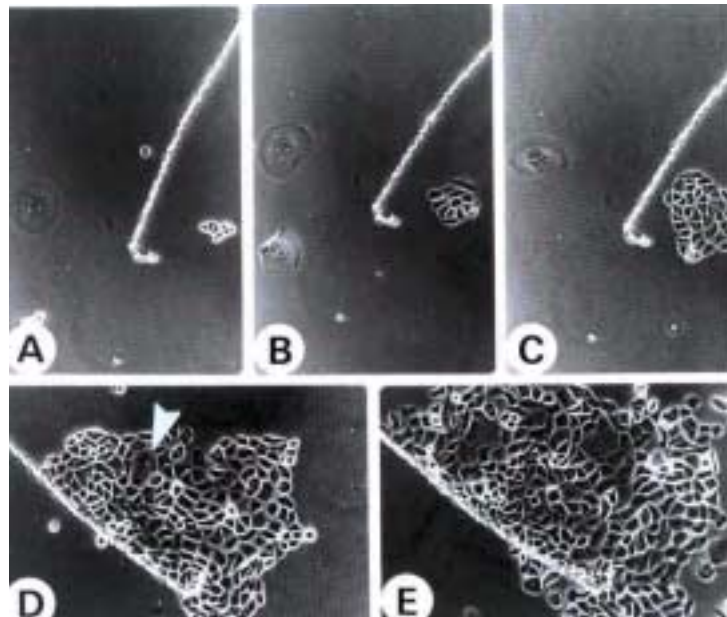


Abb. 8. Zellen der Linie EFE-184, Klon J-5 in Passage 70 zu verschiedenen Zeiten nach der Aussaat (125 x).

A) 2.Tag nach der Aussaat. Links eine große flache Zelle mit mehreren Zellkernen; rechts neben der Strichmarkierung eine Gruppe von kleinen Zellen.

B) 3.Tag. Links zwei große Zellen, die obere mit mehreren Kernen ist dieselbe große Zelle wie in (A); der Rand der unteren großen Zelle wölbt sich nach oben. Rechts von der Strichmarkierung: Die Gruppe von kleinen Zellen ist vergrößert.

C) 4.Tag. Links: Die Rand-Wölbung der oberen großen Zelle ist deutlicher als in (B); die untere, zweite große Zelle ist verlorengegangen. Rechts: Die kleinen Zellen haben sich vermehrt.

D) 7.Tag. Links: Die großen Zellen mit Umschlag des Randes sind verlorengegangen. Rechts: In der Gruppe von kleinen Zellen ist nicht nur die Zellzahl vermehrt, sondern zusätzlich ist eine große Zelle mit mehreren Kernen (Pfeil) entstanden.

E) 8.Tag. Die kleinen Zellen haben sich sehr vermehrt und sind um die Strichmarkierung herum gewachsen; einige weitere große Zellen mit mehreren Zellkernen sind innerhalb der Gruppe der kleinen Zellen zu beobachten.

Aus diesem Befund ergab sich die Frage, ob die großen Zellen durch Apoptose oder durch Nekrose zugrunde gehen. Zur Klärung wurde ein „In Situ Apoptosis Detection Kit“ eingesetzt („TUNEL-Assay“). Der Antikörper entdeckt die apoptotischen Zellen anhand einer Fluoreszenz-Immunoreaktion (**Abb. 9**). Jeweils links im Bild sind große Zellen der Linien EFE-184 J-5 und EFO-27 mit mehreren Zellkernen sichtbar, die keine Anfärbung mit dem Apoptose-spezifischen Antikörper zeigen (**Abb. 9**, oben). Die Zellmembran ist bis auf geringe Reste aufgelöst; der Membran-Rest ist nur am unteren Zellrand bei der mehrkernigen EFO-27 Zelle im Phasenkontrast zu erkennen (**Abb. 9**, unten rechts). Aufgrund der Nekrose-typischen morphologischen Veränderungen und der negativen Reaktion im TUNEL-Assay befinden sich die großen mehrkernigen Zellen offenbar im Zustand der Nekrose. Zusätzlich ist rechts in jedem Bild jeweils eine kleine Zelle in Apoptose zu beobachten. Die Anfärbung des apoptotischen Zellkerns durch den spezifischen Antikörper ist deutlich sichtbar. Die Membran der apoptotischen Zellen ist erhalten geblieben. Damit ist gezeigt, daß die großen flachen Zellen mit mehren Kernen sich im Zustand der Nekrose befinden, und daß die Apoptose offenbar in kleinen Zellen stattfindet. Sowohl im TUNEL-Assay als auch im Phasenkontrast sieht man bei den kleinen Zellen deutlich den Zellkern und die scharf konturierte Zellmembran. Das Ergebnis des Versuches demonstriert das gleichzeitige und benachbarte Vorkommen von Nekrose und Apoptose in derselben Zellkultur.

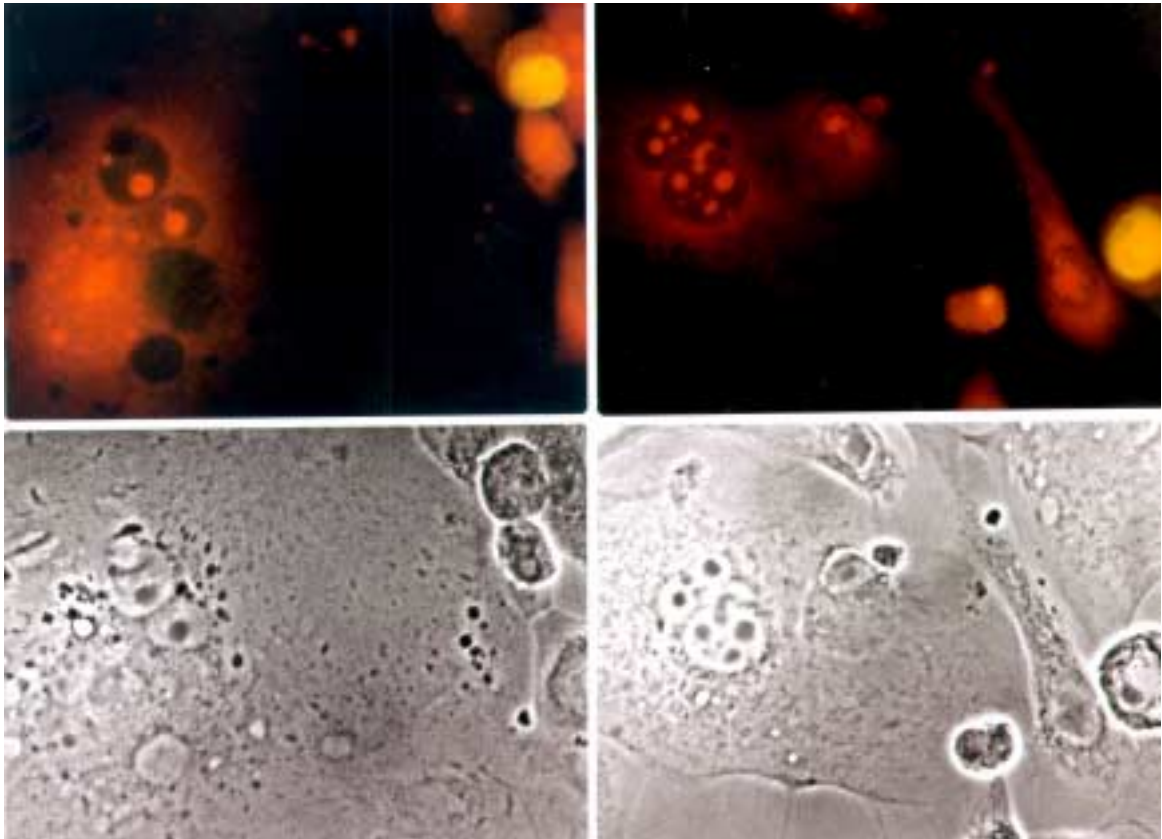


Abb. 9. Kultivierte Zellen der Linie EFE-184 Klon J-5 (links) und der Linie EFO-27 (rechts) nach immuncytochemischer Anfärbung im TUNEL-Assay und nach Gegenfärbung mit Propidium-Iodid (oben). Einerseits ist eine große Zelle in Nekrose mit Auflösung der Zellmembran jeweils links im Bild zu sehen. Andererseits ist rechts im Bild jeweils eine kleine Zelle in Apoptose mit Gelbfärbung des Zellkerns sichtbar. Zusätzlich sind Zellen im normalen Zustand erkennbar. Zum Vergleich ist jeweils dasselbe Gesichtsfeld im Phasenkontrast gezeigt (unten). (300 x).

3.2. Numerische Chromosomen-Aberrationen

Wie vorhergehend dargestellt, besitzen Zellen der Linie EFE-184 weitgehende Heterogenität der Morphologie. Daraus ergeben sich folgende Fragen:

- Ist der Chromosomen-Gehalt einzelner Zellen ebenfalls unterschiedlich, d.h. weist die Zahl der Chromosomen pro Zelle starke Variationen auf?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen morphologischen Veränderungen und numerischen chromosomalen Aberrationen?

Für die Untersuchung dieser Fragen wurden Zellen der Linie EFE-184 in verschiedenen Passagen der Kultivierung sowie von Klon J-5 in Passage 70-88 analysiert (**Abb. 10**). Zum Vergleich wurden drei Subkulturen in Passage 58 abgezweigt und individuell weiter gezüchtet.

Eine Kultur mit unklonierten Zellen der nachfolgenden Passage 59 wurde subkultiviert in zwei Flaschen der Passage 60, die getrennt zu den Kulturen A und B sowie zu den Kulturen C und D weiter gezüchtet wurden. Von einer weiteren Subkultur der Passage 59 wurden zwei Kulturen abgetrennt zu Passage 60, die zu den Subkulturen E und F führten. Eine von den drei Subkulturen aus P58 wurde in Passage 59 zur Zellklonierung verwendet, und es wurden die Klone J-1 bis J-6 erhalten (vgl. Abb. 7). Eine der aus Klon J-5 entstandenen Subkulturen wurde mit „G“ bezeichnet. Unabhängig davon wurden Zellen aus einer anderen, früheren EFE-184 Kultivierung in Passage 121 aufgetaut und getrennt weiter gezüchtet bis zur Kultur H und zur Chromosomen-Analyse in Passage 139.

Nach Präparation und G-Bänderung oder FISH-Analyse wurden aus je 50 oder 100 Metaphasezellen der genannten Kultur-Passagen die Chromosomenzahlen bestimmt (**Abb. 11A - D und E - H**). Die Zahl der Chromosomen pro Zelle war größer als 46 in fast allen untersuchten Metaphase-Zellen. Keine einzige Zelle hatte eine diploide Chromosomenzahl ($2n = 46$); fast alle Zellen besaßen hyperdiploide Chromosomenzahlen mit mehr als $2n$ und weniger als $8n$ ($8n = 184$, $n = 23$). Die unklonierten, parallel gezüchteten Zellen in Passage 71 der Kultivierung (Subkultur A) und in Passage P65 (Subkultur B) enthielten in der Mehrheit 60 bis 85 Chromosomen pro Zelle.

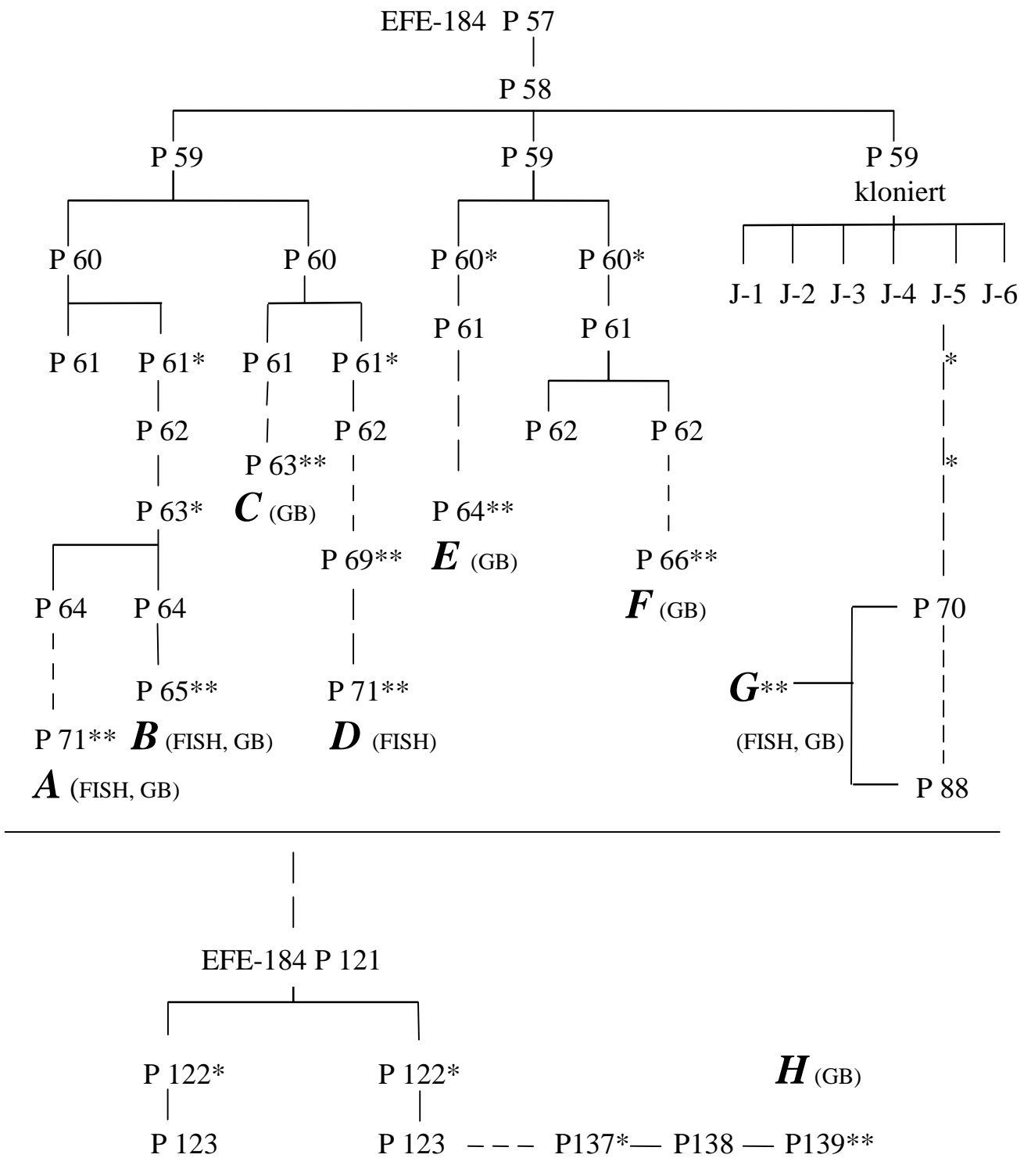


Abb. 10. Kulturen aus verschiedenen Passagen der Kultivierung von EFE - 184 Zellen. A bis F: Ableitung von Subkulturen in der Passage 58; G: Zellklonierung in Passage 59. Sublinie H wurde aus einer Kultur von eingefrorenen Zellen in höherer Passage (P 121) gewonnen, die zu einem früheren Zeitpunkt und unabhängig von den Zellkulturen A-G etabliert war. Von den Kulturen A bis H wurden Chromosomen-Aberrationen durch FISH oder G-Bänderung (GB) bestimmt.
 * Zellen dieser Passagen waren eingefroren und wieder aufgetaut worden;
 ** Chromosomen-Präparation.

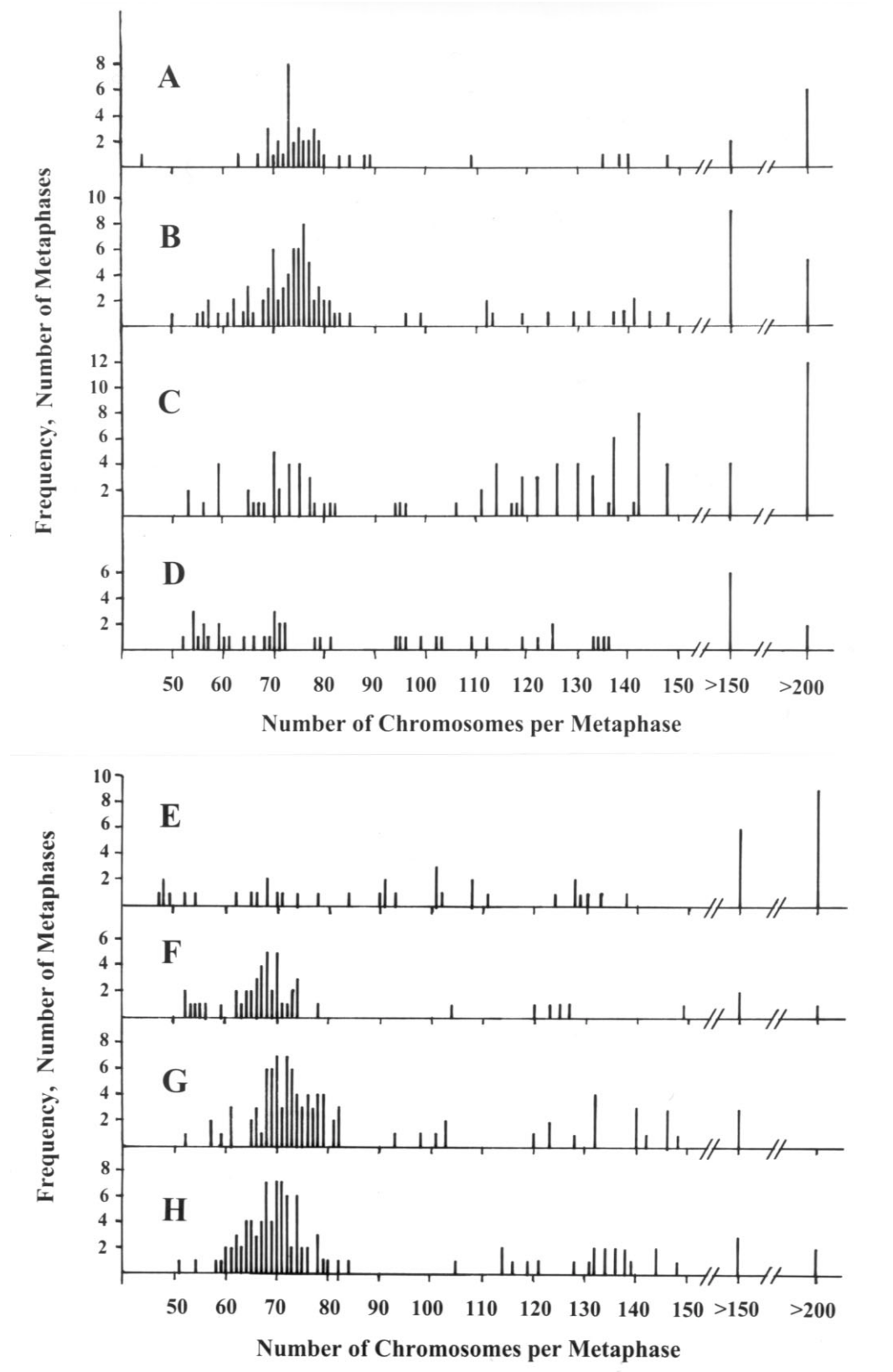


Abb. 11. Verteilung der Chromosomenzahlen pro Metaphase der Linie EFE-184 in den parallel gezüchteten Subkulturen A - D sowie E - H (vgl. Schema in Abb. 10). In B, C, G und H wurden die Chromosomenzahlen aus jeweils 100 Metaphasen ausgewertet; in A, D, E und F lagen die Zahlen von jeweils 50 Metaphasen zugrunde.

In Kultur A besaßen 68% der Metaphasezellen Chromosomenzahlen zwischen 60 und 85 pro Zelle, in B waren es 65% und in der aus geklonten J-5 Zellen bestehenden Subkultur G hatten 72% der Zellen Chromosomenzahlen im genannten Bereich (**Tab. 3**). Somit ist die Verteilung der Chromosomenzahlen pro Metaphasezelle bei den Subkulturen A, B und G weitgehend ähnlich. Die Chromosomenzahlen pro Metaphase sind in der klonierten Zellkultur G fast genau die gleichen wie in den beiden unklonierten Zellkulturen A und B. Die Modal-Chromosomenzahlen der drei genannten Kulturen (d.h. die jeweils höchsten vorkommenden Chromosomenzahlen pro Metaphase) wurden bei A mit 73, bei B mit 76 und bei G mit 70/72 bestimmt. Für die Bestimmung der Modalzahlen wurden Metaphasen mit mehr als 150 Chromosomen nicht herangezogen, da diese möglicherweise aus mehrkernigen Zellen stammen. In diesen untersuchten Subkulturen zeigte sich eine relativ hohe Homogenität der numerischen Aberrationen, obwohl sie aus völlig verschiedenen Kultivationsansätzen stammten (vgl. Abb. 10). Ein ähnliches Aberrationsmuster der Chromosomenverteilung ergab sich auch bei Kultur F sowie bei der Kultur H, die aus völlig unabhängig gezüchteten EFE-184 Zellen hergeleitet war.

Tab. 3. Chromosomenzahlen in Subkulturen von EFE-184 Zellen (vgl. Abb. 10 und 11)

Sub- kultur	Chromosomen / pro Metaphase		Metaphasen mit je 60-85 Chromosomen bei den ausgewerteten Zellen pro Kultur	Modalzahl für Metaphasen mit < 150 Chromosomen
	Mittelwert			
	bei Zellen mit 46-150 Chr./ Metaphase	bei allen Metaphasen		
A	3371 / 42 = 80,3	98,3	34 / 50 68 %	73
B	6995 / 86 = 81,3	93,5	65 / 100 65 %	76
C	8789 / 84 = 104,6	120,7	27 / 100 27 % *	142
D	3517 / 42 = 83,7	96,3	16 / 50 32 % *	54 / 70
E	3092 / 35 = 88,3	115,8	10 / 50 20 % *	101
F	3457 / 47 = 73,6	79,1	34 / 50 68 %	68 / 70
G	8110 / 97 = 83,6	86,3	72 / 100 72 % **	70 / 72
H	7773 / 95 = 81,8	86,2	71 / 100 71 %	68 / 71

*weitgehend heterogene Chromosomen-Verteilung; ** G entspricht Klon J-5

Im Gegensatz dazu ergab sich bei den Subkulturen C, D und E vermehrte Heterogenität der Chromosomenzahl pro Zelle (**Abb. 11C, D und E**). Die drei Kulturen C, D und E, die in Passage 59 abgezweigt, aber ebenso wie die Kulturen A, B und F unkloniert waren, hatten einen breit gestreuten Bereich der Chromosomenzahlen von 50 bis 150 pro Metaphase, manchmal über 200 hinausgehend. Es gab keine Mehrheit von Zellen mit 60 bis 85 Chromosomen pro Metaphase, in Kultur C hatten nur 27% der Zellen 60 bis 85 Chromosomen pro Metaphase, bei Kultur D waren es 32% und in E nur 20% (**Tab. 3**). Die Modalzahlen der Kulturen C, D und E mit sehr heterogener Chromosomenverteilung waren dementsprechend stark unterschiedlich; bei Kultur C war die Modalzahl 142, bei D 54/70 und bei E 101 (**Abb. 11C, D und E**). Dies war überraschend im Hinblick auf die parallele Züchtung der Subkulturen A und B mit weitgehender Homogenität der Chromosomenzahlen pro Zelle im Vergleich mit den Kulturen C und D, die fast zu gleicher Zeit gezüchtet wurden und aus der gemeinsamen parentalen Kultur in Passage 59 stammten. In ähnlicher Weise wurde ein Unterschied in der Chromosomenzahl pro Zelle beim Vergleich der Subkulturen E und F sichtbar, die von der gemeinsamen parentalen Kultur in Passage 59 abgeleitet waren. Trotzdem hatte Kultur F eine weitgehend ähnliche Chromosomenzahl-Verteilung wie die Subkulturen A, B, G und H. Die Zellen der Kultur F enthielten in der Mehrheit 60 bis 85 Chromosomen (68% der Zellen), und ihre Modalzahl war 68/70.

Besonders überraschend sind die Ergebnisse bei EFE-184 Zellen der Subkultur H (**Abb. 11H**), die völlig unabhängig von den übrigen genannten Kulturen gezüchtet wurde (vgl. Abb. 10, Subkultur H). Dabei zeigte sich die gleiche Verteilung mit überwiegend hyperdiploiden Zellen im Bereich vom 60 bis 85 Chromosomen pro Metaphase wie in den unklonierten Zellen der Kulturen A, B und F sowie in G (Klon J-5). 71% der Zellen von Kultur H besaßen Chromosomenzahlen zwischen 60 und 85, und die Modalzahl war 68/71 (**Tab. 3**). Das Ergebnis aus Subkultur H entspräche somit einer weitgehenden Stabilität der numerischen Aberrationen bei unabhängig voneinander durchgeführten Kultivationen.

Aus den dargestellten Analysen (**Abb. 11**) ergibt sich somit, daß der Chromosomen-Gehalt einzelner Zellen sehr unterschiedlich sein kann. Dies wird besonders klar bei Kultur H, die völlig unabhängig von den Kulturen A bis G hoch-gezüchtet war, jedoch deutlich eine andere Chromosomen-Verteilung aufwies als die Kulturen C, D oder E. Die Chromosomen-Verteilung bei Zellen der Kultur H ist weitgehend vergleichbar mit den Chromosomenzahlen pro Zelle bei den Kulturen A, B, F und G, nicht aber mit der Chromosomen-Verteilung bei Zellen der Kulturen C, D und E. Die Instabilität der Chromosomenzahlen pro Zelle ist deutlich erkennbar bei Kultur G, die aus Klon J-5 gezüchtet wurde. Bei stabilen Chromosomenzahlen pro Zelle wäre nach der Klonierung aus einer einzigen Zelle jeweils dieselbe Chromosomenzahl pro Metaphase bei Kultur G zu erwarten; dies war jedoch nicht der Fall, sondern 72% der Zellen enthielten 60 bis 85 Chromosomen (**Tab. 3**). Offenbar geht die Instabilität nicht soweit, daß eine völlig heterogene Verteilung der Chromosomenzahlen pro Zelle wie z.B. in den Kulturen C, D und E entstanden ist. Ein Zusammenhang mit dem vorherigen Einfrieren und Auftauen der Zellen konnte nicht hergestellt werden. Zellen der Subkultur C waren im Untersuchungszeitraum nicht eingefroren gewesen (vgl. Abb. 10) und zeigten ebenso weitgehende Heterogenität der Chromosomen-Verteilung wie Zellen der Kulturen D und E, die zwischenzeitlich eingefroren waren. Es könnte vermutet werden, daß nach dem Auftauen und beim Wiederaanwachsen der Zellen Selektionsprozesse stattfinden, die zur Entstehung von Zellpopulationen mit bestimmten Eigenschaften führen. Dafür gaben die Ergebnisse der Bestimmung der Chromosomenzahl pro Metaphase und der später beschriebenen Karyotypisierung jedoch keinen Hinweis.

Vereinzelt wurden Zellen mit Chromosomenzahlen von mehr als $8n$ gefunden (**Abb. 11A-F und H**); in extremen Fällen waren es mehr als 200 Chromosomen pro Zelle. Für die extrem hohen Chromosomenzahlen können zwei Erklärungen gegeben werden. Einerseits werden möglicherweise bei der Chromosomen-Präparation mehrere Metaphasenzellen (z.B. 2-4 Zellen) gleichzeitig auf- oder nebeneinander gespreitet; damit könnten die Chromosomen mehrerer Metaphasen überlappend fallen. Andererseits kann eine Zelle mehrere Zellkerne enthalten (vgl. Abb. 8), die sich synchron teilen und gleichzeitig in die Metaphase gelangen könnten. Es gab keine Anhaltspunkte dafür, daß hohe

Chromosomenzahlen aus mehreren Zellen entstanden waren, denn in der mikroskopischen Beobachtung ließen sich nahe beieinander liegende Metaphasen unterscheiden. Bei der gleichzeitigen Lyse von zwei oder mehreren Metaphase-Zellen ist es wenig wahrscheinlich, daß die Chromosomen sich in exakt denselben Stadien der Mitose befinden. Chromosomen aus zwei oder mehreren Zellen, die zufällig nebeneinander gespreitet wurden, können in der Regel eindeutig anhand der Chromosomen-Struktur und der Anfärbung als aus verschiedenen Zellen stammende Chromosomen diskriminiert werden. In Zweifelsfällen wurden derartige Konstellationen nicht ausgewertet. Daher ist die Wahrscheinlichkeit größer, daß sehr hohe Chromosomenzahlen aus Zellen mit mehreren Zellkernen stammen können. In den Kulturen der Zelllinie EFE-184 und des Klons J-5 wurden jeweils große Zellen mit mehreren Zellkernen beobachtet (vgl. Abb. 6). Bei einer großen Zelle mit gleichzeitiger Mitose von mehreren Zellkernen könnten somit durchaus Zellen mit polyploiden Chromosomenzahlen erfasst werden. Es kann nicht mit Sicherheit unterschieden werden, ob in diesen Fällen die Chromosomen aus mononukleären Zellen mit hyperdiploider Chromosomenzahl oder aus Zellen mit mehreren Zellkernen stammen.

Die Variation der numerischen chromosomalen Aberrationen könnte im Zusammenhang mit morphologischen Zellveränderungen vermutet werden. Einerseits sind bei einer großen Zelle mit mehreren Kernen höhere Chromosomenzahlen zu erwarten. Andererseits ist offenbar bei einem Teil der Kulturen die Chromosomenzahl pro Zelle innerhalb eines gewissen Rahmens von 60 - 85 Chromosomen pro Metaphase variabel (vgl. Tab. 3; Kulturen A, B, F, G und H) oder außerhalb dieses Rahmens weitgehend heterogen (Kulturen C, D und E). Da jedoch kein Unterschied in der Anzahl der Zellkerne bei den genannten Kulturen beobachtet wurde, und da die Mehrheit der Zellen nur einen Kern enthielt, ist offenbar die Variation der Chromosomenzahl pro Metaphase aus unbekanntem Gründen recht groß. Eine Ursache dafür könnte in der Präparation der Chromosomen zu finden sein.

Zu dieser Frage wurden Experimente über die Verteilung der Chromosomenzahl pro Metaphase unter verschiedenen Bedingungen der Präparation durchgeführt

(**Abb. 12**). Bei Variation der Quellzeit der Zellen in 0,4% KCl ergab sich ein Unterschied in der Verteilung des Chromosomengehalts der untersuchten J-5 Zellen. Nach 8 Min Quellzeit wurden Zellen erhalten, die in der Mehrzahl 60 bis 85 Chromosomen pro Metaphase enthielten (**Abb. 12A**) und deren Modalzahl 74 war (**A** in **Tab. 4**). Die Zellen für diese Experimente wurden in Passage 67 der Kultivierung benutzt und entsprachen einer parallelen Kultur zur Subkultur A (vgl. **Abb. 10**), bei der in der Mehrheit der Zellen 60 bis 85 Chromosomen aufgefunden wurden (vgl. **Abb. 11A**; **Tab. 3**). In einem weiteren Ansatz derselben Zellsuspension in Passage 67 der Kultivierung (**Abb. 12B**) war nach 16 Min Quellzeit die Verteilung der Zellen mit mehrheitlich 60 bis 85 Chromosomen pro Metaphase zu Zellen mit geringerer Chromosomenzahl verschoben, und die Modalzahl war 67; nur 46% der Zellen enthielten 60 bis 85 Chromosomen pro Metaphase (**B** in **Tab. 4**). Einige Zellen besaßen nur 41 bis 55 Chromosomen pro Metaphase, und zusätzlich wurden drei Zellen mit weniger als 40 Chromosomen pro Metaphase beobachtet.

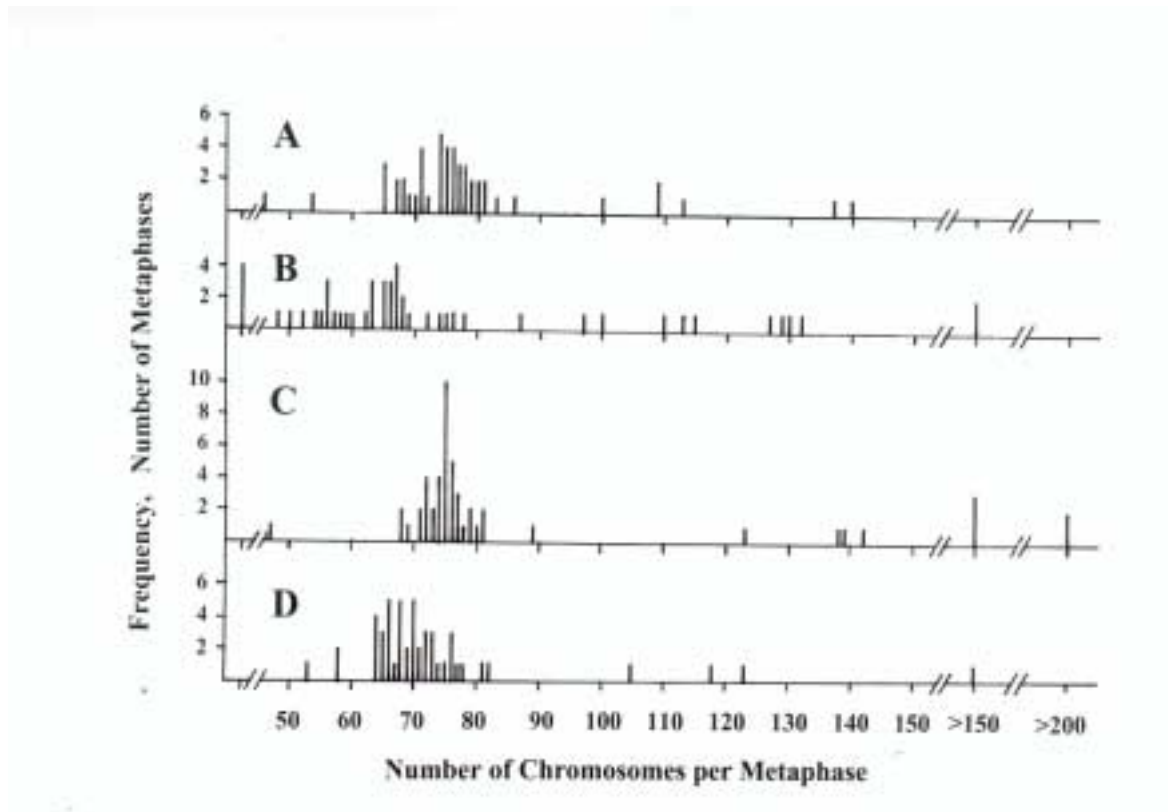


Abb. 12. Einfluß der Präparationsbedingungen auf die Chromosomenzahl pro Metaphase.

- A)** und **B)** Variation der Quellzeit. Eine Suspension von Metaphase-Zellen aus derselben Flasche von unklonierten EFE-184 Zellen in Passage 67 (Vorläufer-Kultur von Kultur A in Abb. 10) wurde nach der Trypsinierung geteilt und mit unterschiedlichen Quellzeiten von 8 Min (A) bzw. 16 Min (B) im hypotonischen Milieu behandelt.
- C)** und **D)** Unterschiedlich lange Einwirkung von Trypsin. Metaphase-Zellen aus derselben Flasche von Klon J-5 in Passage 86 nach einmaliger Trypsinierung für 10 Min (C) bzw. nach wiederholter Trypsinierung für weitere 10 Min (D).

Tab. 4. Chromosomenzahl von EFE-184 Zellen bei verschiedenen Präparationsweisen (vgl. Abb. 12).

A und B: Unklonierte Zellen aus der Flasche einer Parallel-Kultur von "A" (vgl. Abb. 10), nach Quellzeiten von 8 Min (A) bzw. 16 Min (B).

C und D: Zellen des Klons J-5 einer Vorläufer-Kultur von "G" (vgl. Abb. 10) nach einmaliger Trypsinierung für 10 Min (C) bzw. nach wiederholter Trypsinierung für weitere 10 Min (D).

Ver- Suchs- kultur	Chromosomen / pro Metaphase		Metaphasen mit je 60-85		Modalzahl für Metaphasen mit < 150 Chromosomen
	Mittelwert		Chromosomen		
	bei Zellen mit 46-150 Chr./ Metaphase	bei allen Metaphasen	bei 50 ausgewerteten Zellen pro Kultur		
A	3858 / 49 = 78,7	80,2	40 / 50	80 %	74
B	3293 / 44 = 74,8	74,6	23 / 50	46 %	67
C	3594 / 45 = 79,9	88,9	39 / 50	78 %	75
D	3558 / 49 = 72,6	74,2	42 / 50	84 %	66 / 68 / 70

Zur Erklärung des Auftretens von Metaphasen mit Chromosomenzahlen von überwiegend zwischen 60 und 85 bei kürzerer Quellzeit von 8 Min sind zwei Möglichkeiten offen: Einerseits könnten Zellen mit höherer Chromosomenzahl längere Zeit brauchen zum Quellen, bzw. die Zellen mit 60-85 Chromosomen quellen leichter und schneller unter denselben Bedingungen, und werden somit eher beim Spreitungsvorgang erfaßt. In diesem Fall sollten bei kürzerer Quellzeit mehr Metaphasen mit 60-85 Chromosomen erfaßt werden als bei längerer Quellzeit, und es sollten zusätzlich intakte Metaphase-Zellen zu sehen sein, deren Chromosomen noch nicht gespreitet sind. Dies wurde in einzelnen Fällen bei 8 Min Quellzeit beobachtet (Präparate nicht im Foto gezeigt). Andererseits könnten bei der längeren Quellzeit von 2 x 8 Min fragile Zellen mit jeweils mehr als 60-85 Chromosomen bereits vor der Spreitung zerplatzt sein, und mehr Metaphasen mit weniger Chromosomen wären zu beobachten und wurden tatsächlich auch bestimmt. Weiterhin war bei längerer Quellzeit die Modal-Chromosomenzahl von 74 auf 67 reduziert, d.h., es wurden mehr Metaphasen

mit Chromosomenzahlen im niedrigen Bereich gefunden als bei 8 Min Quellzeit (Tab. 4). Dies kann erklärt werden durch einen Verlust von Chromosomen beim Spreitungsvorgang infolge einer erhöhten Fragilität der Zellmembran. Dafür spricht auch, daß vereinzelte Metaphasen mit weniger als 46 Chromosomen gefunden wurden (**Abb. 12B**).

Eine andere Erklärung für die Beobachtung von Metaphasen mit unterschiedlichen Anzahlen von Chromosomen ist möglicherweise durch den Ablösungsvorgang der Zellen vom Boden der Kulturgefäße beim Trypsinieren der Monolayer-Kulturen gegeben. Dazu wurde eine Kultur von klonierten J-5 Zellen in Passage 86 (vgl. Abb. 10G) zweimal hintereinander auf die gleiche Weise für jeweils 10 Min mit Trypsin/EDTA behandelt, unmittelbar gefolgt von der Hemmung der Trypsinwirkung bei den abgelösten Zellen durch Zugabe von Medium mit 10% FCS. Bei der ersten Trypsinierung wurden überwiegend Trypsin-sensitive Zellen erfaßt; bei der wiederholten Trypsinierung kamen Zellen zur Analyse, die weitergehende Resistenz gegen die Trypsinierungsvorgang zeigten. Nach paralleler Aufarbeitung ergab sich bei einmaliger Trypsinierung eine Verteilung von Zellen mit überwiegend 60-85 Chromosomen pro Metaphase (**Abb. 12C**) und 75 als Modalzahl (**C in Tab. 4**). Die Aufarbeitung der Präparate bei nochmaliger Trypsinierung führte zu Metaphasen mit mehrheitlich 58 bis 76 Chromosomen (**Abb. 12D**), und die Modalzahl war 66/68/70 (**D in Tab. 4**). D.h., Zellen mit 60-85 Chromosomen wurden bereits durch einmalige Trypsinierung vom Zellrasen abgelöst. Bei wiederholter Trypsinierung wurden mehr Metaphasen mit leicht reduzierter Anzahl von Chromosomen gefunden. Dieser Befund spricht für eine erhöhte Fragilität der Zellmembran bei insgesamt längerer Einwirkungszeit des Trypsin/EDTA - Gemischs und für einen anschließenden Verlust von einzelnen Chromosomen beim Spreitungsvorgang. Offenbar spielt die Stabilität der Zellmembran eine entscheidende Rolle bei der Bestimmung der exakten Chromosomenzahl pro Zelle. Die Ergebnisse der Experimente mit Veränderungen von Quellzeit oder Dauer der Trypsin-Einwirkung zeigten, daß eindeutige Unterschiede in der Anzahl der Chromosomen bei einzelnen Zellen der jeweiligen Populationen bestehen, die möglicherweise auf die Präparation zurückzuführen sind. Dabei ist offenbar die Dauer der Quellzeit von größerer Bedeutung als die Trypsinierungszeit. Die

Bestimmung der Chromosomenzahlen pro Zelle ist demnach nicht immer ganz zuverlässig zur Charakterisierung von Tumorzell-Populationen, und ist offenbar im wesentlichen abhängig von der Quellzeit vor dem Spreitungsvorgang.

3.3. Strukturelle Aberrationen

3.3.1. G-Bänderung

Wie oben beschrieben (vgl. Abb. 11 und 12; Tab. 3 und 4) war die Zahl der Chromosomen in fast allen untersuchten Metaphasen-Zellen größer als 46. Kaum eine Zelle hatte eine diploide Chromosomenzahl ($2n = 46$), fast alle Zellen besaßen hyperdiploide Chromosomenzahlen mit mehr als $2n$ und weniger als $8n$ ($8n = 184$). Daraus ergeben sich mehrere Fragen:

- Welche Chromosomen sind vermehrt?
- Sind jeweils dieselben Chromosomen in verschiedenen Metaphasen vermehrt?
- Ist jeweils dasselbe Chromosom in den untersuchten Kulturpassagen der Zelllinien EFE-184 oder Klon J-5 vermehrt?
- Gibt es spezifische strukturelle Chromosomen-Veränderungen in den untersuchten Zelllinien EFE-184 und EFO-27, die häufig auftreten?

Zur Klärung dieser Fragen wurden frühere Karyotyp-Analysen von EFO-27 Ovarialkarzinomzellen und von EFE-184 Zellen einbezogen (**Abb. 13A** und **13B**). Aus den älteren Untersuchungen (**Kunzmann & Hölzel, 1987; Kunzmann et al., unveröffentlicht; Nollau, 1991; Nollau et al., in Vorbereitung**) ist bekannt, daß einzelne Chromosomen mit regulärer Struktur vermehrt sein können, und daß eine Polysomie jedoch nicht bei allen untersuchten Metaphasen dasselbe Chromosom betreffen muß, andererseits sehr häufig in verschiedenen Metaphasen und zu unterschiedlichen Zeiten der Kultivation einer Tumorzelllinie beobachtet wird. Bei der Analyse der strukturellen Aberrationen hatte sich gezeigt, daß individual-spezifische, strukturelle Chromosomen-Veränderungen existieren, die offenbar charakteristisch für die Tumorzellpopulation einzelner Patienten sind und in ihrer Gesamtheit bestimmte Muster ergeben. Strukturelle Aberrationen, die bei mehr als 50% der analysierten Metaphasen gefunden

wurden, sind in diesen Untersuchungen als Marker-Chromosomen bezeichnet worden. Weiterhin hat sich herausgestellt, daß die chromosomalen Aberrationsmuster nicht stabil sind, sondern im Verlauf der in vitro Kultivation weitere Veränderungen erfahren können. Dies ist besonders deutlich geworden bei Karyotyp-Analysen an EFO-27 Zellen (**Kunzmann & Hölzel, 1987**). Offenbar sind derartige "Shifts" der Chromosomen-Aberrationsmuster auch in vivo möglich, wie sich bei Karyotyp-Untersuchungen an Mehrfach-Explantaten von Zellen eines metastasierten Mammakarzinoms gezeigt hat (**Kunzmann & Hölzel, unveröffentlicht**).

In Zellen der Linie EFE-184 kommen mehrere Marker-Chromosomen vor. Diese wurden anhand der G-Bänderung analysiert (**Abb. 13 und 14**) und folgendermaßen benannt:

M1 = t (1; 5) (p13; q21)

M2 = der (2p3p)

M3 = der (2q3q)

M4 = del (3) (p14)

M5 = del (4) (q31.2)

M6 = del (13) (q31)

M7 = unidentifiziert

M8 = del (2) (q31)

M9 = t (7q17q)

M10 = t (X; 4) (p22.3; q24)

M11 = t (5; ?) (p13; ?)

M12 = t (6; ?) (q16; ?)

M13 = del (9) (q21)

M14 = del (4) (q24)

M15 = t (5; ?) (p12; ?)

M5* = del (M5)

M6* = t (2; M6) (q31; M6)

M7* = del (M7)

Iso (9q)

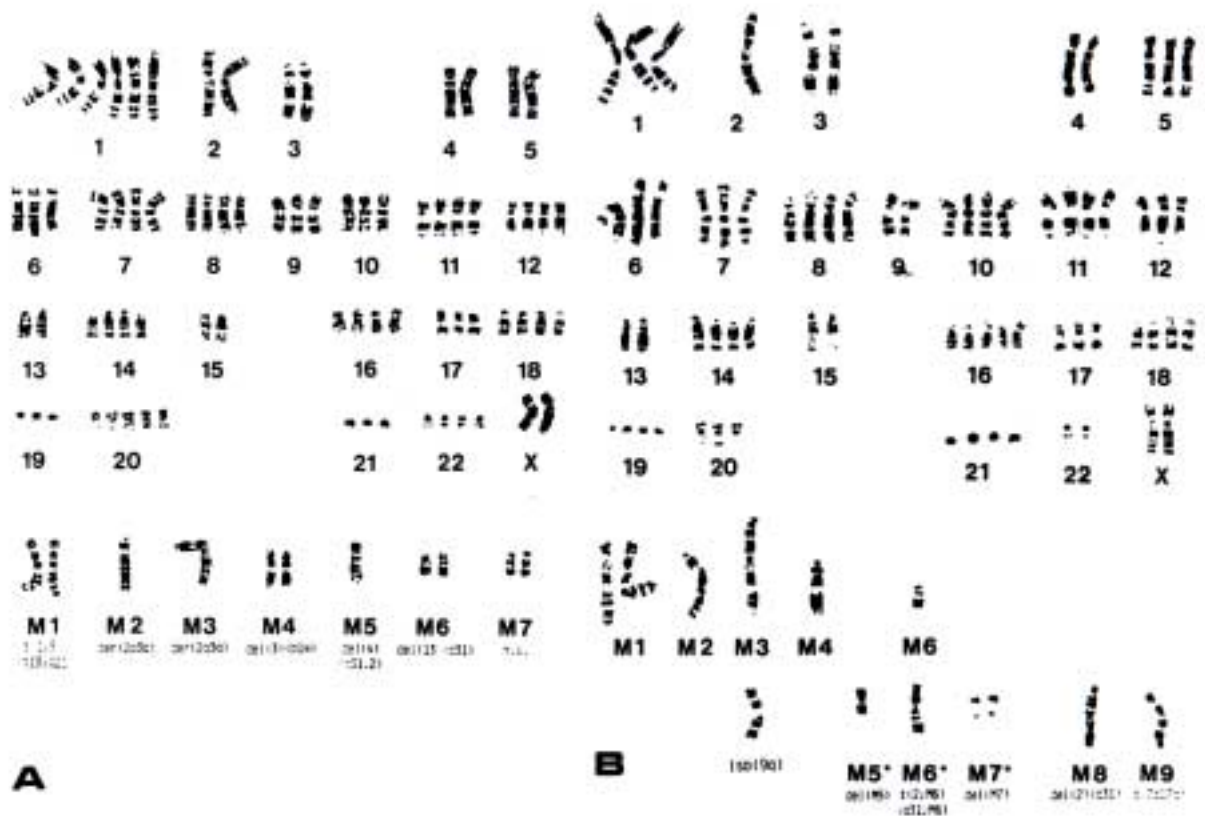
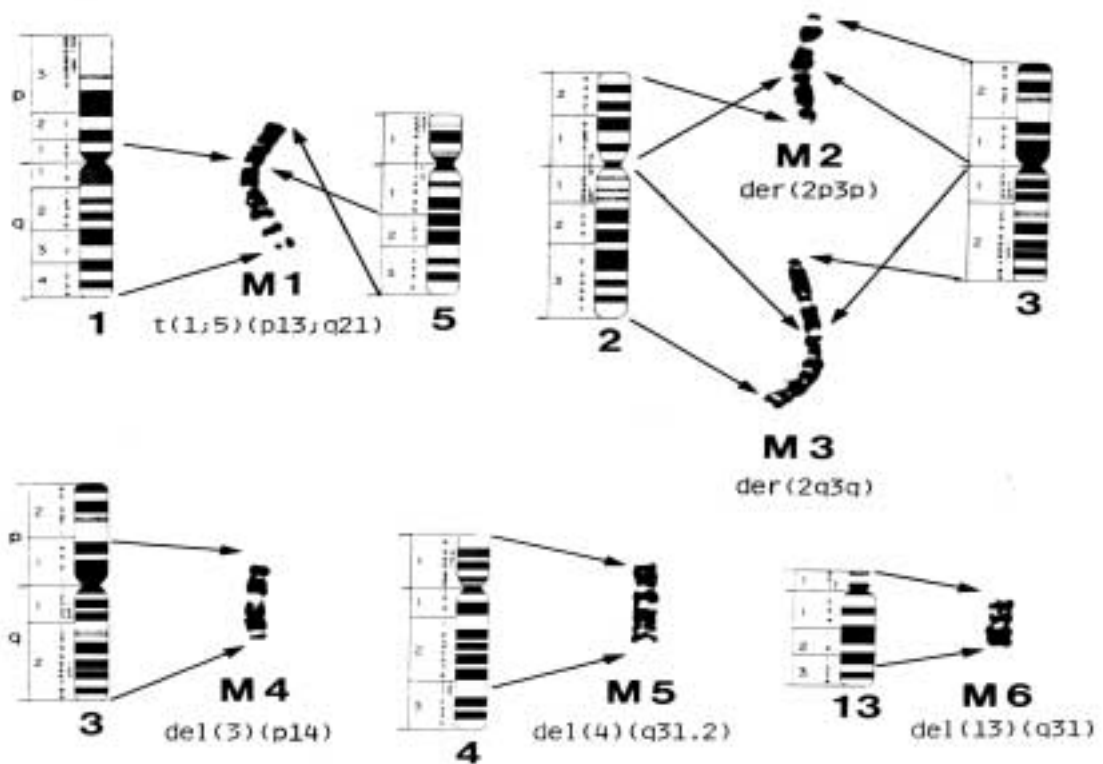


Abb. 13. Karyotyp von EFE-184 Zellen analysiert durch Trypsin-Giemsa-Bänderung (A) in Passage 24 (86; XX), (B) in Passage 69 (82; XX). Die Marker-Chromosomen sind mit M1-M9 bezeichnet. Die abgeleiteten Marker sind durch * angezeigt (nach **Kunzmann & Hölzel**, unveröffentlicht).

A



B

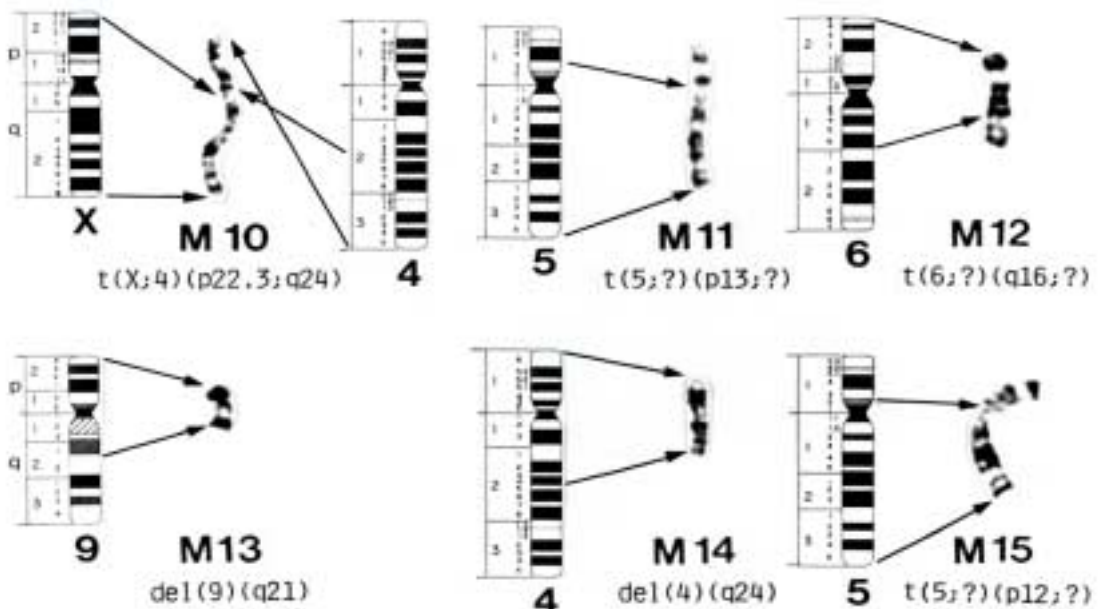


Abb. 14. Ableitung der EFE-184 Marker-Chromosomen M1-M6 in (A) und M10-M15 in (B) (Idiogramme und G-Bänderungen nach Kunzmann & Hölzel, unveröffentlicht).

3.3.2. FISH - Analysen

3.3.2.1. *EFE-184 Zellen*

Die in situ Hybridisierung mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten DNA-Sonden ermöglicht einen direkten Nachweis von Nukleinsäuresequenzen in Metaphase-Chromosomen. Bei den FISH-Analysen wird die spezifische Bindung einer DNA-Probe an komplementäre DNA-Sequenzen des jeweils untersuchten Chromosoms benutzt. Die DNA-Sonden können durch chemische Modifikation markiert und nach der Hybridisierungsreaktion im Fluoreszenz-Mikroskop nachgewiesen werden. Die in dieser Arbeit verwendeten sogenannten „chromosome painting“ Proben oder „total chromosome“ Proben erkennen ganze Chromosomen und deren Bruchstücke. Die Painting-Sonden sind besonders geeignet zum Nachweis von strukturellen Veränderungen an Metaphase-Chromosomen. Bei Tumorzellen sind häufig Chromosomen-Teile abgebrochen und auf andere Chromosomen transloziert. Zur Bestätigung der durch Giemsa-Bänderung gefundenen strukturellen Veränderungen in Metaphase-Chromosomen der Zelllinie EFE-184 und des Klons J-5 wurden die nachfolgend beschriebenen FISH-Analysen durchgeführt.

Beispielhaft ist die Metaphase einer Zelle der Linie EFE-184 Klon J-5 in Passage 70 dargestellt (**Abb. 15**). Benutzt wurde hier die mit FITC markierte Painting Probe für Chromosom 1 (vgl. Abb. 3), und DAPI wurde zur Gegenfärbung der Gesamt-DNA eingesetzt. Die Metaphase hatte 38 Chromosomen; dabei wurden 4 Immun-Fluoreszenz-Signale gefunden: drei normale Chromosomen 1, und ein M1. M1 war in den früheren Untersuchungen als eine Rekombination von Chromosom 1 in Abschnitt p13 und Chromosom 5 in Abschnitt q21 erkannt worden (vgl. Abb. 14A; S. 58). Das gezeigte M1-Signal gibt nur den Anteil für Chromosom 1 wieder, der durch die Sonde für Chromosom 1 erkannt werden kann. Der Bruchpunkt an p13 von Chromosom 1 (kurz über dem Zentromer) ist durch Vergleich mit der DAPI-Färbung (**Abb. 15a** und **15b**) klar zu sehen.

Chromosom 5 ist nicht nur an der Translokation in M1, sondern auch in M11 und M15 beteiligt (vgl. Abb. 14B; S. 58). In der G-Bänderung bestehen M11 und M15

aus jeweils einem abgebrochenen Stück des Chromosoms 5 in Abschnitt p13 bzw. p12, die auf unbekannte Chromosomen-Fragmente transloziert wurden. M11 erscheint etwas länger als M15.

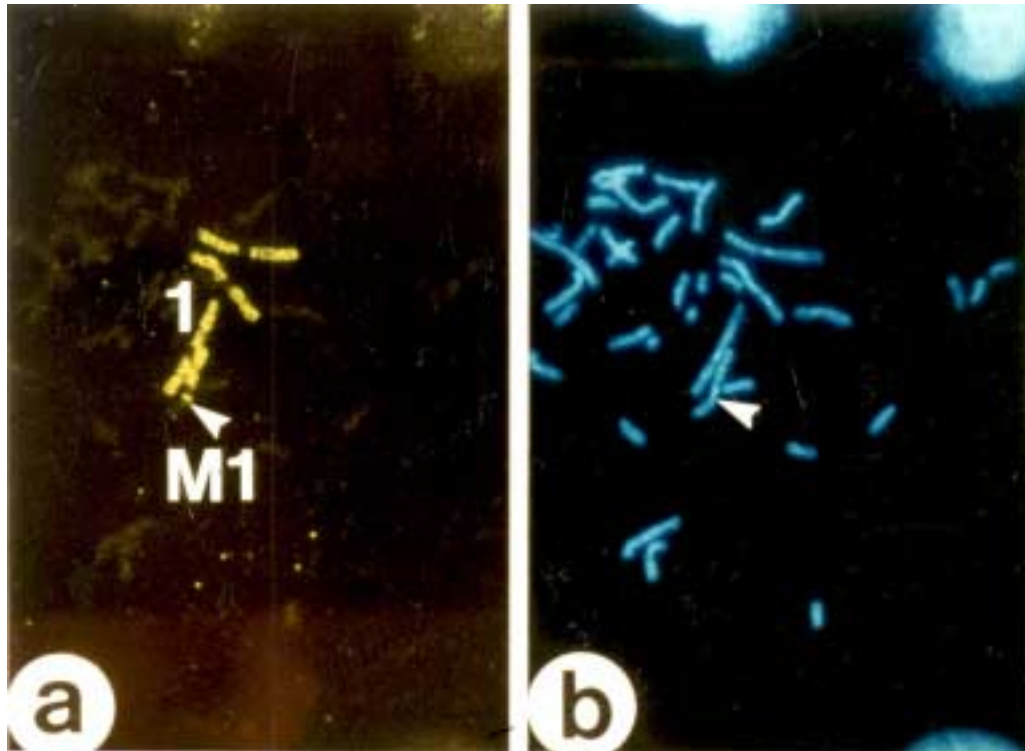


Abb. 15. Metaphase-Zelle der Linie EFE-184 J-5 in Kultur-Passage 70. FISH-Analyse mit einer FITC-markierten Painting Probe für **Chromosom 1**, einem mit FITC markierten zweiten Antikörper und DAPI als Gegenfärbung. Teil (a) zeigt 4 Metaphasen-Signale: Drei normale Chromosomen **1** und ein **M1** (mit Pfeil im Bruchpunkt 1p13; direkte FISH-Methode; vgl. Abb. 3). Auf dem DAPI-Bild (b) ist die Metaphase mit insgesamt 38 Chromosomen sichtbar;

Bei Verwendung einer Digoxigenin-markierten Sonde für Chromosom 5 und eines Fluorescein-gekoppelten zweiten Antikörpers (vgl. Abb. 5) zeigten sich in einer J-5 Metaphase-Zelle mit insgesamt 75 Chromosomen 5 Signale (**Abb. 16**): Zwei normale Chromosomen 5, ein M1, ein M15 und eine Deletion von Chromosom 5 (del 5), die an dem im Vergleich zu Chromosom 5 verkürzten Signal zu erkennen ist. Del (5) entspricht möglicherweise dem Bruchstück von Chromosom 5 in M11 = del (5p13) in Abb. 14B, denn ein etwas größerer Anteil von Chromosom 5 ist durch FISH als del (5) sichtbar als in M15. Bei Vergleich mit der entsprechenden DAPI-Färbung ist del(5) in dieser Metaphase nicht mit einem anderen Chromosomen-Fragment rekombiniert, im Gegensatz zu M11 in Abb. 14B. Möglicherweise hat jedoch in anderen Zellen eine Rekombination von del(5) mit einem unbekanntem Chromosomen-Abschnitt stattgefunden, denn ein ähnlich großes Fragment ist als Teil von M11 = t(5; ?) in der G-Bänderung sichtbar (vgl. Abb. 14B; S. 58). Das als M11 bezeichnete Signal entspricht größtenteils nicht ganz dem Anteil von Chromosom 5 in M1 der Abb. 14A. Zwei Chromosomen 5 sind unversehrt dargestellt, denn Fluoreszenz-Signal und DAPI-Färbung entsprechen sich der Größe nach.

Zwei weitere Metaphase-Zellen der Linie EFE-184, unkloniert in Passage 71, wurden durch FISH-Analysen mit derselben DNA-Sonde für Chromosom 5 untersucht (Abb. 17 und Abb. 18). In **Abb. 17** (Gegenfärbung der DNA mit PI) ist eine Metaphase mit 81 Chromosomen und mehreren Interphasekernen zu sehen; in der Metaphase wurden anhand der Größe ein intaktes Chromosomen 5, drei M1 (Pfeile) und zwei M11 (entsprechend del 5 in Abb. 16; Doppel-Pfeile) als insgesamt sechs Fluoreszenz-Signale detektiert. Die andere Metaphase (**Abb. 18**) hatte insgesamt 143 Chromosomen; dabei wurden zehn chromosomale Fluoreszenz-Signale sichtbar. Diese zeigen drei normale Chromosomen 5, vier M1 (je mit einem Pfeil), ein M15 (mit einem Doppelpfeil) und zwei Signale für Deletionen von Chromosom 5 (del 5). Somit ergibt sich weitgehende Übereinstimmung der FISH-Analysen mit den zuvor etablierten G-Bänderungen (vgl. Abb. 13 und 14).

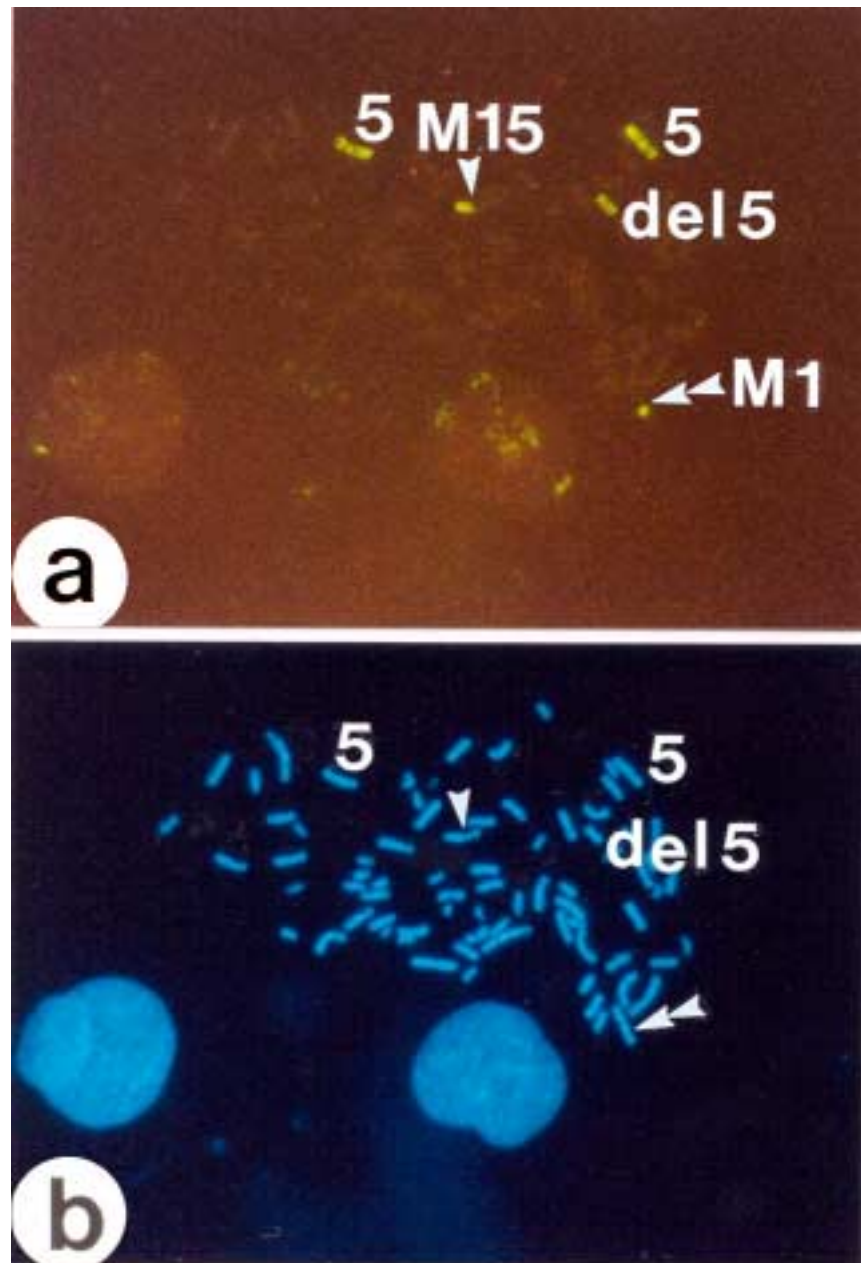


Abb. 16. Metaphase-Zelle von Klon J-5 der Linie EFE-184 in Passage 93 der Kultur. FISH-Analyse mit einer Digoxigenin-markierten Sonde für **Chromosom 5**, mit dem Fluorescein-gekoppelten zweiten Antikörper (vgl. Abb. 5) und DAPI als Gegenfärbung. Auf dem DAPI-Bild (b) ist die Metaphase mit 75 Chromosomen zu sehen. Das Bild (a) zeigt 5 Signale: Zwei normale Chromosomen **5**, ein **M1** (mit Doppel-Pfeil), ein **M15** (mit einem Pfeil) und eine Deletion von Chromosom 5 (mit „**del 5**“ bezeichnet; entsprechend M11 in Abb.14B).

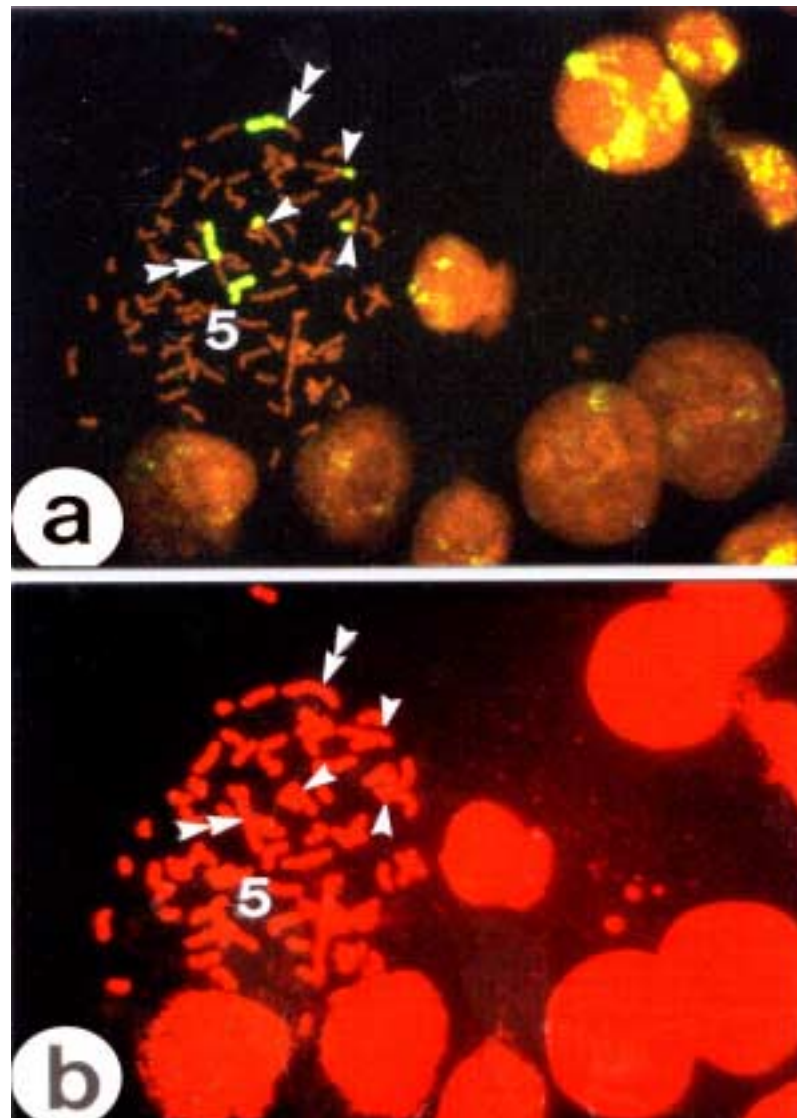


Abb. 17. EFE-184 Zellen in Passage 71 der Kultivierung in der FISH-Analyse mit einer Digoxigenin-markierten „total Chromosome Probe“ für **Chromosom 5** (a). Als Gegenfärbung wurde PI eingesetzt (b). Auf den PI-Bilder sind eine Metaphase mit insgesamt 81 Chromosomen und mehrere Interphasekerne sichtbar. Es sind 6 Signale in der Metaphase zu erkennen: Ein normales Chromosom **5**, drei **M1** (mit je einem Pfeil) und zwei **M11** (entsprechend del 5 in Abb. 16; je mit Doppel-Pfeil) sowie mehrere punktförmige oder aufgequollene Signale für die Chromatin-Bezirke der Chromosomen 5 in den Interphasekernen.

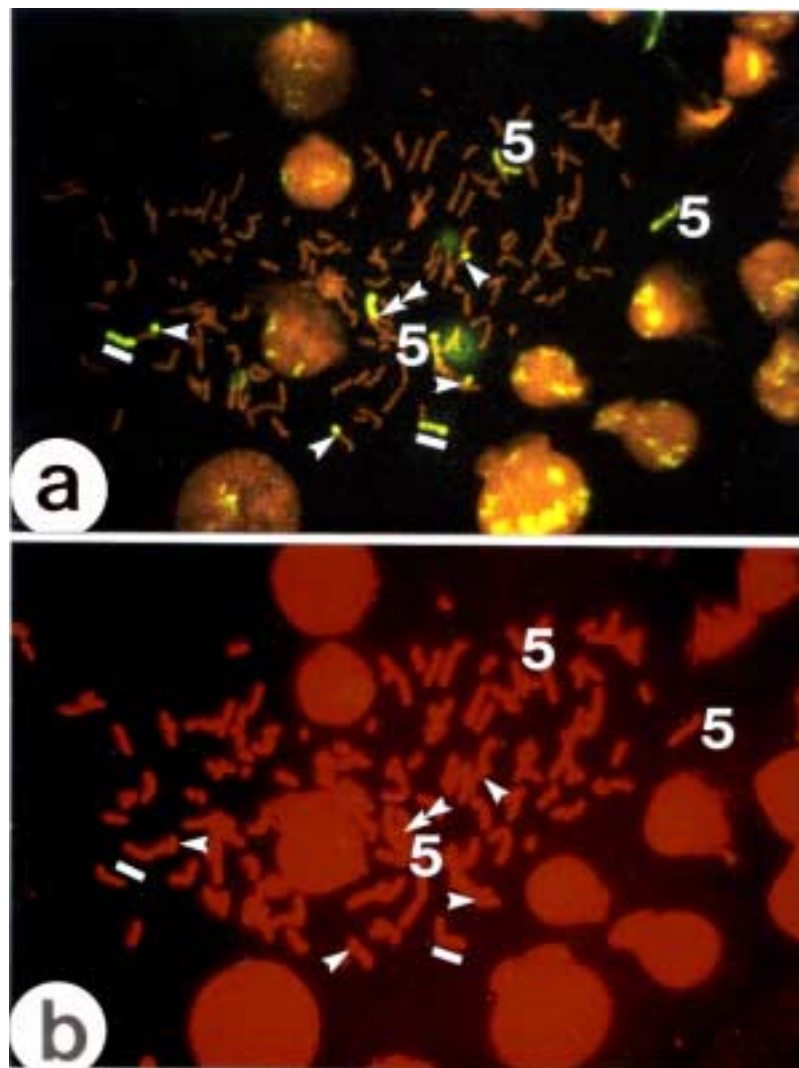


Abb. 18. Zellen desselben Präparats wie in Abb. 17 mit einer anderen Metaphase. FISH-Analyse mit derselben Probe für **Chromosom 5** wie in Abb. 17. Auf dem PI-Bild (b) sind eine Metaphase mit insgesamt 143 Chromosomen und mehrere Interphasekerne zu sehen. Das Bild (a) zeigt 10 Signale in der Metaphase: Drei normale Chromosomen **5**, vier **M1** (mit je einem Pfeil), ein **M15** (mit Doppel-Pfeil) und zwei Signale für **del (5)** ("□" bezeichnet als M11 in Abb. 14B). Zusätzlich sind mehrere aufgequollene Regionen für DNA von Chromosom 5 in den Interphasekernen sichtbar.

Chromosom 2 ist an Translokationen in M2 und M3 (vgl. Abb. 14A; S. 58) sowie in M8 und M6* beteiligt (vgl. Abb. 13B; S. 57). Daher wurde eine Metaphase von EFE-184 Klon J-5 Zellen in Passage 74 untersucht (**Abb. 19**). Die FISH-Analyse mit einer Biotin-markierten Painting Sonde für Chromosom 2 (vgl. Abb. 4) ergab ein normales Chromosom 2, zwei M2, ein M3 und ein M8. Je nach der Größe konnten die Signale durch Vergleich mit der G-Bänderung und der DAPI-Kontroll-Färbung zugeordnet werden. Das längste intakte Signal ist Chromosom 2. Jeweils ein Teil von M2 ist jeweils der p-Arm von Chromosom 2, hier als die kürzesten Signale gezeigt (vgl. Abb. 14A). Ein Teil von M3 ist der q-Arm von Chromosom 2; das Signal in M3 ist länger als der p-Arm des Chromosoms 2 (M2) und kürzer als M8. M8 wurde als Deletion von Chromosom 2 mit der Bruchstelle in q31 erkannt (vgl. Abb. 13B) und ist deshalb etwas kürzer als das normale Chromosom 2. Die untersuchte Metaphase hat 75 Chromosomen. Dies entspricht in etwa dem G-Bänderungs-Karyotyp einer EFE-184 Zelle mit 82 Chromosomen in Passage 69 der Kultivierung, in dem ein normales Chromosom 2, ein M2 und jeweils einmal M3 und M8 sichtbar waren (vgl. Abb. 13B).

Zum Vergleich wurde eine unklonierte Metaphase-Zelle der Linie EFE-184 in Passage 69 durch FISH-Analyse mit genau derselbe Probe-DNA für Chromosom 2 wie in Abb. 19 untersucht (**Abb. 20**). Diese Metaphase hatte mehr als 100 Chromosomen; dabei waren 9 chromosomale Fluoreszenz-Signale zu erkennen: Zwei normale Chromosomen 2 (n), drei M2 (mit je einem Pfeil) und vier M3 (je mit Doppelpfeil). Das fehlende M8 ist als Variation des Karyotyps zu erklären. Davon abgesehen gab es keinen grundsätzlichen Unterschied zwischen den beiden Metaphasen von klonierten und unklonierten Zellen (**Abb. 19** und **20**).

Die jeweils komplementären Teile von M2 und M3 entstanden aus den Fragmenten 3p und 3q. Die Fragmente sind in Abb. 19a und Abb. 20a nicht dargestellt, jedoch in den entsprechenden DAPI-Färbungen (Abb. 19b und Abb. 20b) wurden die Marker 2, Marker 3 und die Bruchstellen sichtbar.

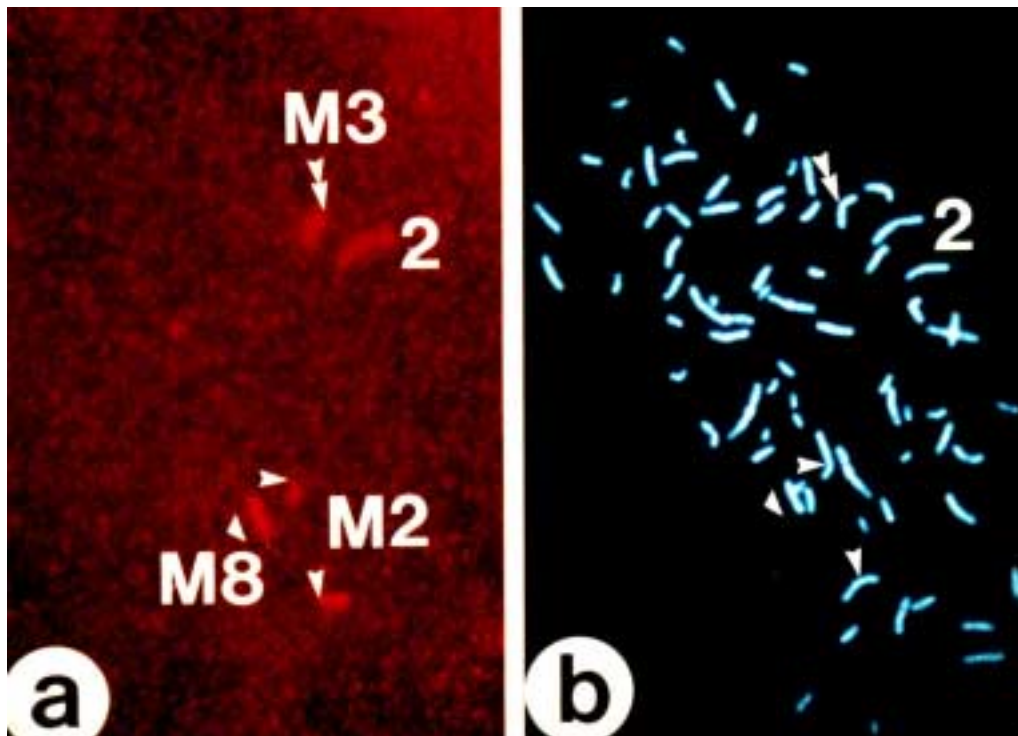


Abb. 19. Metaphase von Klon J-5 der Linie EFE-184 in Passage 74 der Kultivation. FISH-Analyse mit einer Painting Probe (Biotin-markiert) für **Chromosom 2**, Texas-Red-markiertem Antikörper und DAPI als Gegenfärbung (indirekte FISH-Methode; vgl. Abb. 4). Auf dem DAPI-Bild (b) ist eine Metaphase mit insgesamt 75 Chromosomen sichtbar. Das linke Bild (a) zeigt 5 Signale: Ein normales Chromosom **2**, zwei **M2** (mit je einem Pfeil), ein **M3** (mit Doppelpfeil) und ein **M8** (mit Dreieck). Die beiden einfachen Pfeilspitzen zeigen auf die Bruchpunkte in M2. Die doppelte Pfeilspitze zeigt auf den Bruchpunkt in M3.

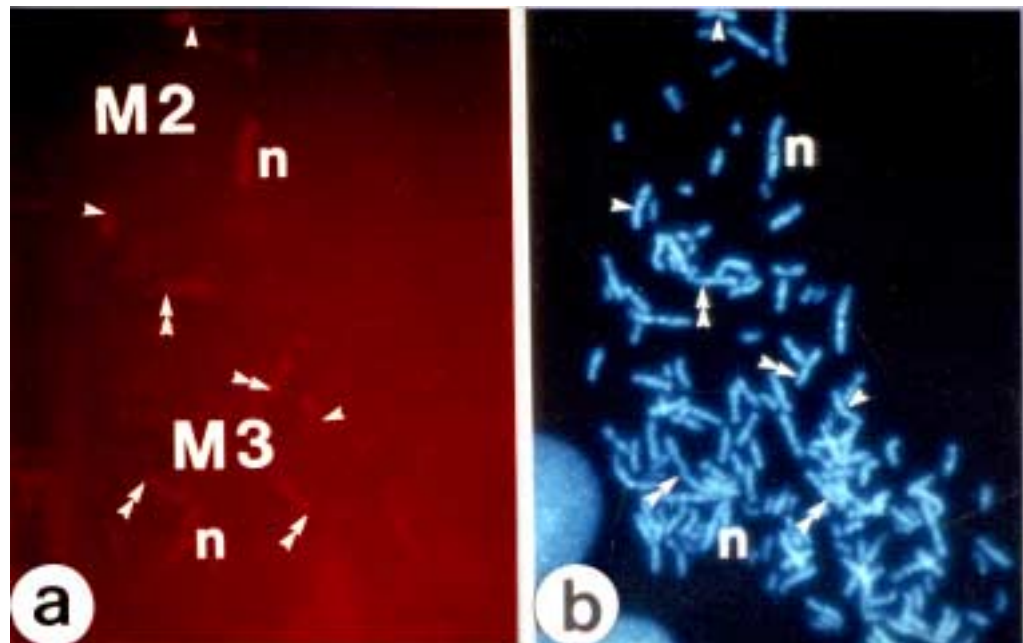


Abb. 20. Metaphase-Zelle der Linie EFE-184, unkloniert in Passage 69 der Kultur. FISH-Analyse mit einer Painting Probe (Biotin-markiert) für **Chromosom 2** (der 2. Antikörper war mit Texas-Red gekoppelt) und DAPI als Gegenfärbung. Auf dem rechten Bild (DAPI) ist die Metaphase mit mehr als 100 Chromosomen sichtbar. Das linke Bild zeigt 9 Signale: Zwei normale Chromosomen **2** (mit „n“ bezeichnet), drei **M2** (mit je einem Pfeil) und vier **M3** (jeweils mit Doppel-Pfeil).

Um die Fragment von Chromosom 3 in M2 und M3 darzustellen, wurde als Ergänzung eine DNA-Sonde für Chromosom 3 in die FISH-Analyse eingebracht (**Abb. 21**). Dazu wurde eine EFE-184 Metaphase-Zelle von Klon J-5 in Passage 82 analysiert, die 69 Chromosomen besaß. Zur FISH-Analyse wurde eine FITC-markierte Painting Sonde für Chromosom 3 eingesetzt (vgl. Abb. 3). Damit wurden 5 Signale erkannt: Zwei normale Chromosomen 3, ein M2 (Pfeil) und zwei M3 (Doppelpfeile). Bei M2 zeigt das Signal den Abschnitt 3p und bei M3 jeweils den Abschnitt 3q. Der translozierte Abschnitt 3p in M2 ist etwas kürzer als der zu M3 gehörige Abschnitt 3q, wie aus der entsprechenden G-Bänderung (vgl. Abb. 14A) in Übereinstimmung mit Abb. 19 bis Abb. 21 hervorgeht.

M4 stammt aus Chromosom 3 mit Bruchpunkt in p14. Dieses Fragment ist länger als 3q in M3 und kürzer als ein normales Chromosom 3 (vgl. Abb. 14A). Bei der vorhergehenden FISH-Analyse an J-5 Zellen (vgl. Abb. 21) wurde zunächst kein M4 gefunden. Deshalb wurden die Untersuchungen an unklonierten EFE-184 Zellen weitergeführt, und M4 wurde entdeckt (**Abb. 22**). Dazu wurde dieselbe Probe wie in Abb. 21 für Chromosom 3 verwendet. Es sind eine Metaphase mit 65 Chromosomen und mehrere Interphasekerne dargestellt. In der Metaphase zeigten sich 5 Signale: Zwei normale Chromosomen 3 (n) und einmal M2 (mit einem roten Pfeil), M3 (mit weißem Doppelpfeil) und M4 (mit rotem Doppelpfeil). Das kleinste Signal in **Abb. 22** gehört zu M2; das nächstgrößere Signal entspricht M3, das längere Fluoreszenz-Signal zeigt M4, während die längsten Signale von den beiden normalen Chromosomen 3 stammen (vgl. Abb. 14A). In den Interphasekernen gab es verschieden häufig Signale für Chromosom 3.

Bei der weiteren Suche nach M4 wurde das entsprechende Signal auch in J-5 Zellen der Kultur in Passage 88 entdeckt. Dazu wurde dieselbe Digoxigenin-markierte Probe für Chromosom 3 benutzt (**Abb. 23**), die nach Behandlung mit Rhodamin-markierten 2. Antikörper eine Metaphase mit insgesamt 78 Chromosomen und einen Interphasekern zeigt. Es gibt 6 Signale in der Metaphase: Zwei normale Chromosomen 3, ein M2 (Pfeil), ein M3 (Doppelpfeil) und zwei M4. Im Interphasekern sind sechs aufgequollene Signale zu erkennen. Damit wurde die Anwesenheit von M4 sowohl in unklonierten als auch in

klonierten EFE-184 Zellen bestätigt. Möglichweise ist M4 jedoch nicht in allen J-5 Zellen vorhanden.

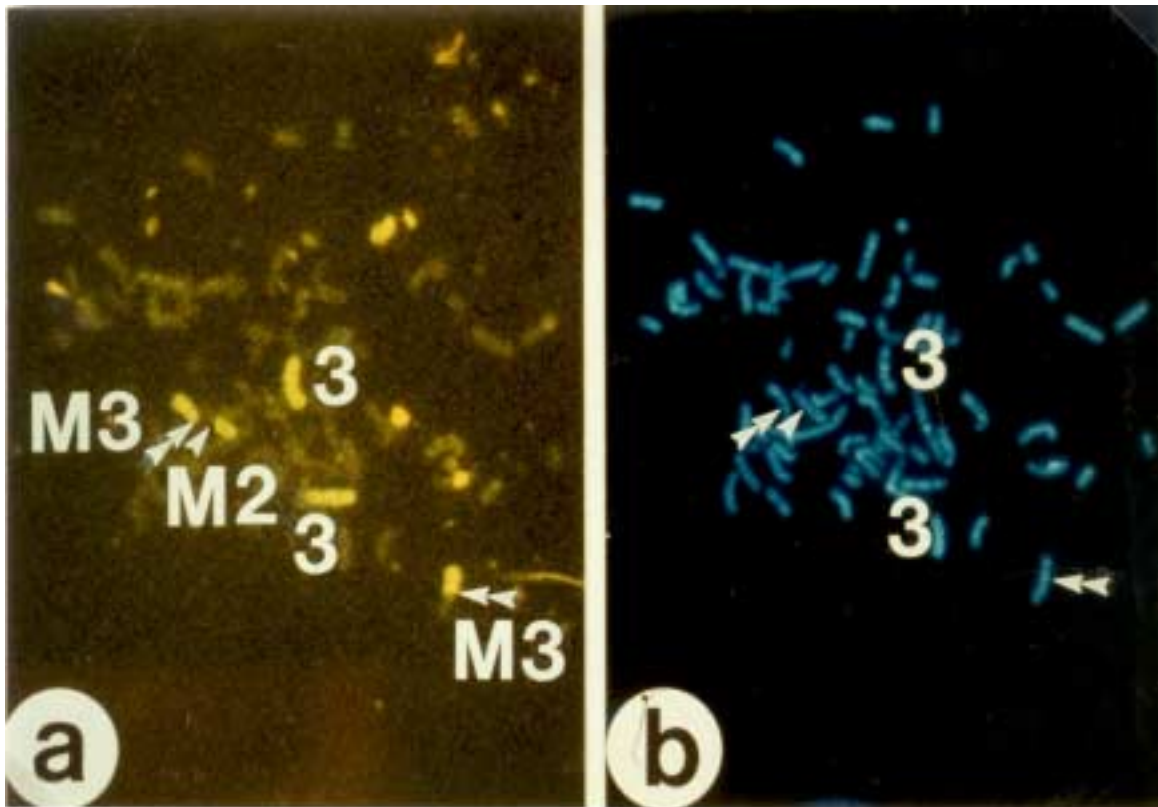


Abb. 21. FISH-Analyse mit einer Painting Probe (FITC markiert) für **Chromosom 3** bei der Metaphase einer Zelle der Linie EFE-184 J-5 in Passage 82 der Kultivation, mit FITC-markierten zweiten Antikörper und DAPI als Gegenfärbung. Auf dem DAPI-Bild (b) ist die Metaphase mit insgesamt 69 Chromosomen sichtbar. Das linke Bild (a) zeigt 5 Immunofluoreszenz-Signale: Zwei normale Chromosomen **3**, ein **M2** (mit einem Pfeil) und zwei **M3** (jeweils mit Doppel-Pfeil; direkte FISH-Methode; vgl. Abb. 3).

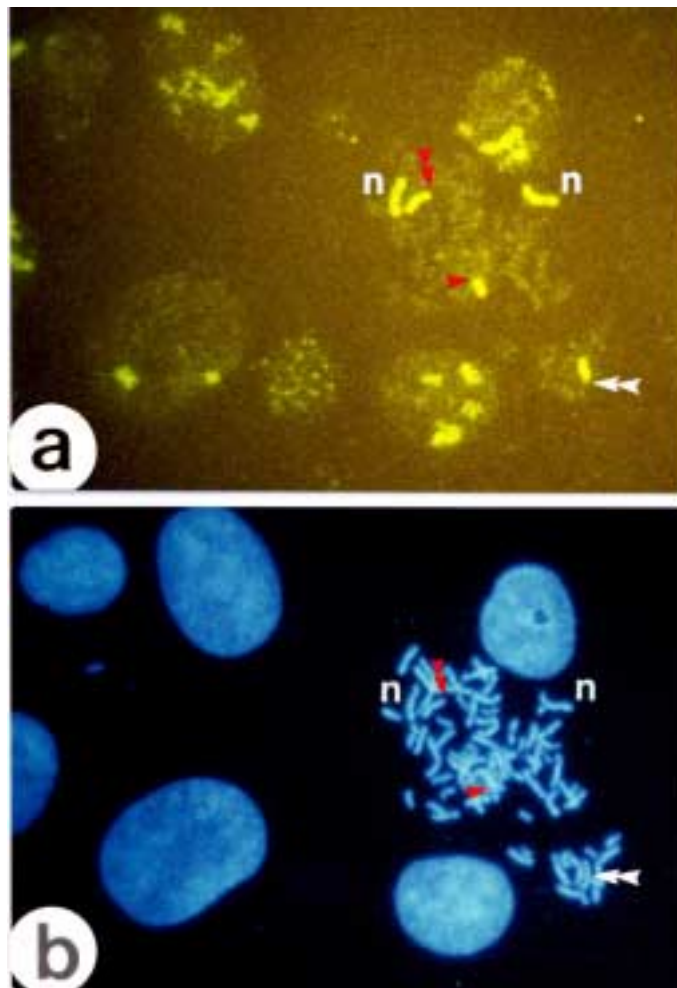


Abb. 22. Zellen der Linie EFE-184, unkloniert in Passage 69 der Kultivation. FISH-Analyse mit derselbe Probe für **Chromosom 3** wie in Abb. 21 und DAPI als Gegenfärbung. Auf dem DAPI-Bild (b) sind eine Metaphase mit 65 Chromosomen und mehrere Interphasekerne sichtbar. Das Bild (a) zeigt 5 Signale in der Metaphase: zwei normale Chromosomen **3** (mit „n“ bezeichnet), ein **M2** (mit einem roten Pfeil), ein **M3** (mit weißem Doppel-Pfeil) und ein **M4** (mit rotem Doppel-Pfeil). In den Interphasekernen sind jeweils unterschiedliche Anzahlen von Signalen zu sehen.

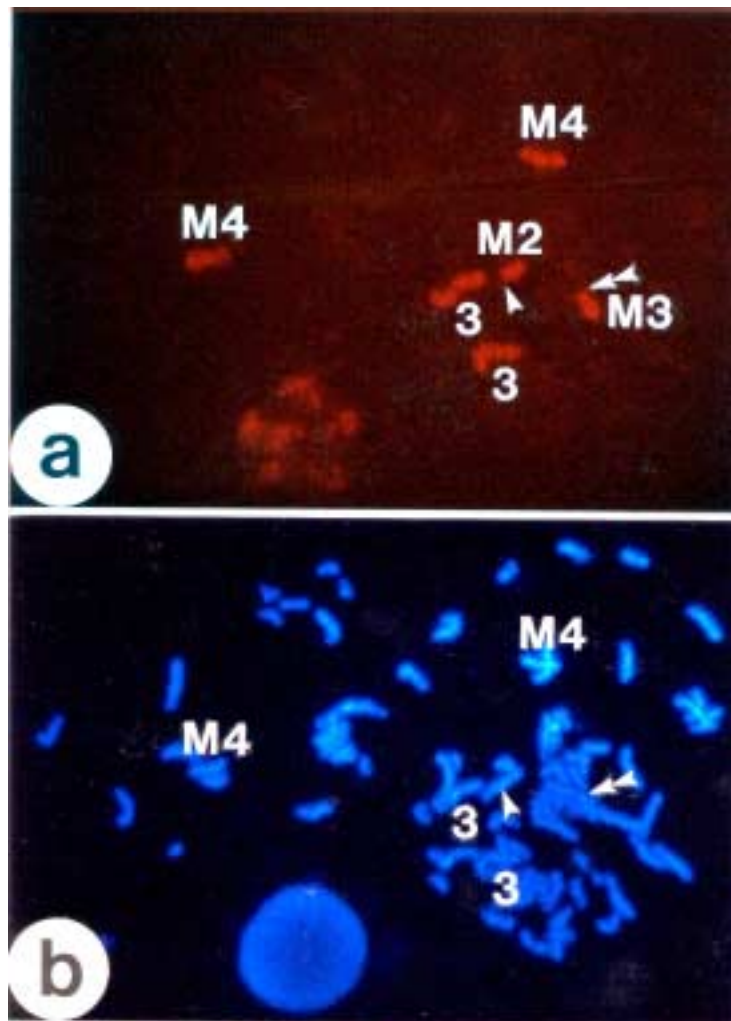


Abb. 23. J-5 Zellen der Linie EFE-184 in Passage 88 der Kultur. FISH-Analyse mit einer Digoxigenin-markierten „total Chromosome Probe“ für **Chromosom 3**, einem Rhodamin-gekoppelten zweiten Antikörper (vgl. Abb. 5) und DAPI als Gegenfärbung. Auf dem DAPI-Bild (b) sind eine Metaphase mit insgesamt 78 Chromosomen und ein Interphasekern zu sehen. In der Metaphase sind 6 chromosomale Signale dargestellt: Zwei normale Chromosomen **3**, ein **M2** (mit einem Pfeil), ein **M3** (mit Doppel-Pfeil) und zwei **M4**. Im Interphasekern sind 6 aufgequollene Signale zu erkennen.

Eine Probe von Chromosom 4 zur Untersuchung der Herkunft von M5, M10, M14 und M5* sowie eine Probe von Chromosom 6 zur Bestätigung der Herkunft von M12 (vgl. Abb. 13 und 14) wurden in dieser Arbeit nicht verwendet.

Bei den FISH-Analysen von EFE-184 Zellen in Passage 71 mit einer DNA-Probe für Chromosom 13 wurde eine Metaphase mit insgesamt 69 Chromosomen untersucht (**Abb. 24**). Es waren drei Immunfluoreszenz-Signale zu beobachten, darunter ein normales Chromosom 13 und ein M6 als del 13 (Pfeil; vgl. Abb. 14A; S. 58). Zusätzlich wurde ein M6* als t(13; 2) (Doppelpfeil) detektiert (vgl. Abb. 13B; S. 57). In ähnlicher Weise war in der früher durchgeführten G-Bänderung ein Karyotyp mit zwei Chromosomen 13, einem M6 und einem M6* erkennbar. M6 ist eine del(13), und der Bruchpunkt in M6 wurde in der G-Bänderung bei q31 bestimmt. M6* wurde als Translokation von M6 mit einem Abschnitt (q31) von Chromosom 2 interpretiert, $M6^*=t(13;2)(q31;q31)$ (**Kunzmann & Hölzel**, unveröffentlicht).

In einer weiteren FISH-Analyse von EFE-184 Zellen desselben Präparats zeigten sich mit derselben Probe für Chromosom 13 ein M6 und zwei M6* in einer Metaphase-Zelle, die 48 Chromosomen hatte (**Abb. 25**). Ein normales Chromosom 13 ist nicht zu erkennen. In Übereinstimmung damit sind jeweils drei Signale in den Interphasekernen zu beobachten. Die Interpretation von M6 und M6* der FISH-Analysen entspricht somit den früher durchgeführten G-Bänderungen. Möglicherweise ist ein normales Chromosom 13 nicht mehr in allen EFE-184 Zellen der relativ hohen Kultur-Passage 71 vorhanden.

Bei einer weiteren Untersuchung ließ sich durch Verwendung der „total chromosome probe“ für Chromosom 7 die Anwesenheit von Marker 9 (M9) zeigen (**Abb. 26**). M9 enthält eine Translokation zwischen 7q und 17q (vgl. Abb. 13B; S. 57). Die Bruchstelle im Chromosom 7 ist durch den Pfeil jeweils in der FISH-Analyse und nach DAPI-Anfärbung angezeigt. Zusätzlich zu M9 sind drei intakte Chromosomen 7 zu erkennen. Das DAPI-Bild zeigt eine EFE-184 Metaphase mit insgesamt 68 Chromosomen und 5 Zellkernen. In den Interphasekernen sind mehrere Signale zu beobachten. Dies entspricht der G-

Bänderung von EFE-184 Zellen in Passage 69 (vgl. Abb. 13B), in der drei normale Chromosomen 7 und ein M9 gefunden wurden.

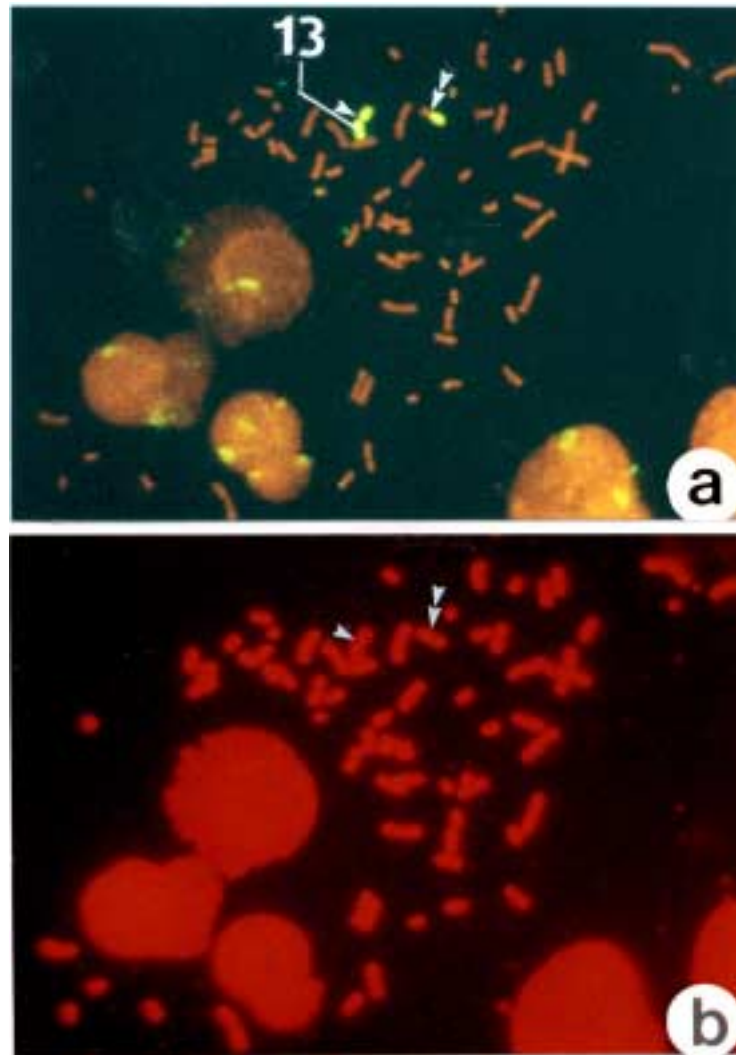


Abb. 24. EFE-184 Metaphase der Kultur-Passage 71 mit 69 Chromosomen in der FISH-Analyse mit einer Digoxigenin-markierten „total Chromosome Probe“ für **Chromosom 13**. Die Gegenfärbung war Propidium-Iodid. Es sind 3 Signale in der Metaphase sichtbar: Ein normales Chromosom **13**, ein **M6** als Deletion (mit einem Pfeil) und ein **M6*** als Translokation (mit Doppel-Pfeil). Zusätzlich sind 5 Interphasekerne mit mehreren Signalen zu sehen.

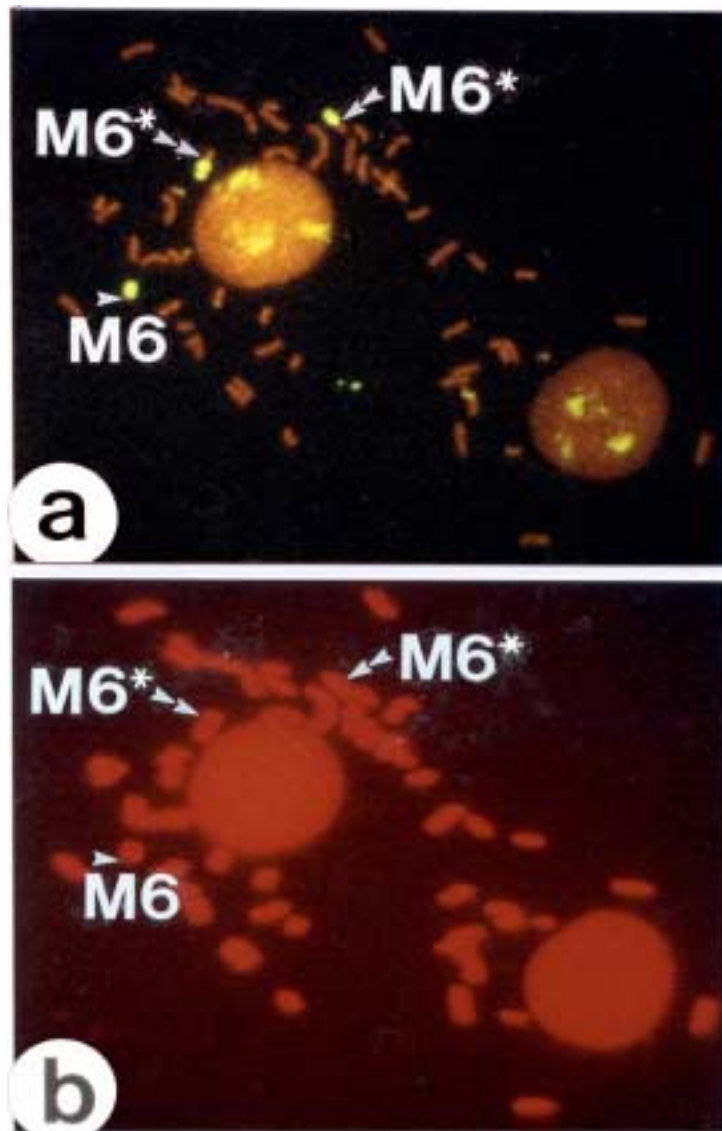


Abb. 25. Zellen desselben Präparats wie in Abb. 24 in der FISH-Analyse mit derselbe Probe für **Chromosom 13**. Es sind 3 Signale in der Metaphase mit 48 Chromosomen zu erkennen: Ein **M6** als del 13 und zwei **M6*** als t(13; 2). Das Signal für ein reguläres Chromosom **13** ist offenbar nicht vorhanden. Zusätzlich sind 2 Interphasekerne mit jeweils drei Signalen sichtbar.

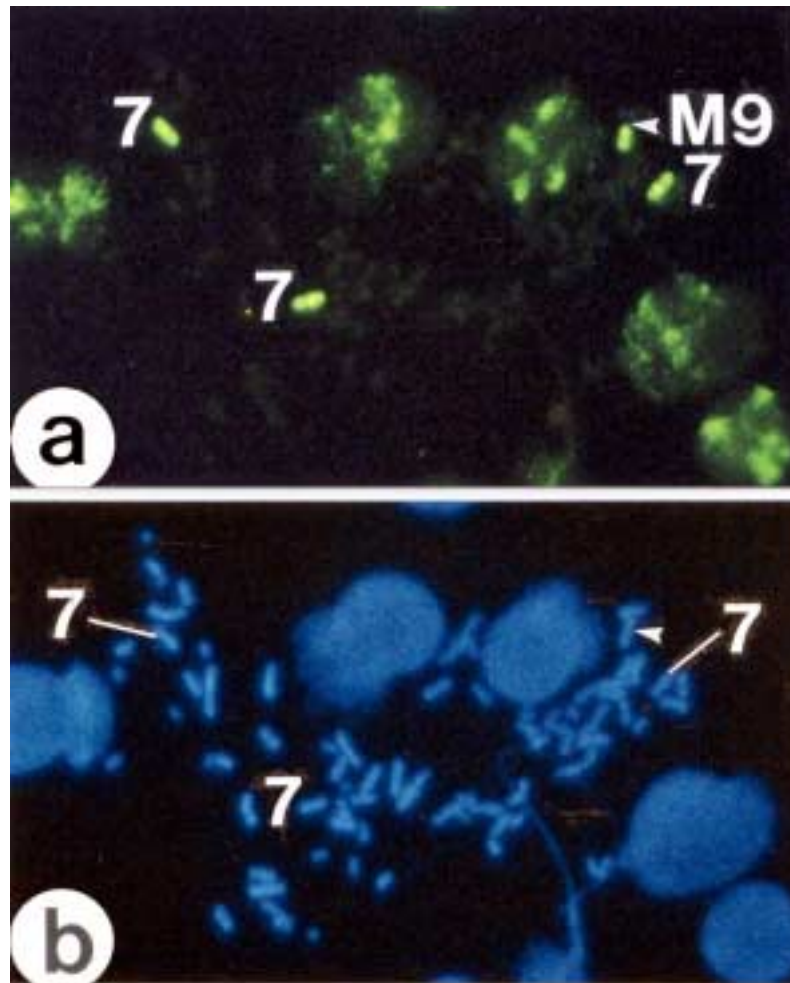


Abb. 26. EFE-184 Metaphase der Kultur-Passage 71 in der FISH-Analyse mit einer Digoxigenin-markierten „total chromosome Probe“ für **Chromosom 7** und einem FITC-markierten Antikörper (Bild a). Markierung des entsprechenden Chromatins in den Interphasekernen. Als Gegenfärbung wurde DAPI eingesetzt (Bild b). Auf den insgesamt 68 Chromosomen sind 4 Signale zu erkennen: Drei normale Chromosomen **7** und ein **M9**. Die Bruchstelle des Chromosoms **7** in **M9** ist mit Pfeil angezeigt.

Die Signale in Interphasekernen können überlappend liegen; daher ist die Bestimmung der Anzahl der Signale im Interphasekern von Tumorzellen mit Hilfe von Painting-Sonden sehr unzuverlässig. Bei Verwendung von Autosom-Proben sind gewöhnlich in normalen diploiden Interphase-Zellkernen jeweils zwei Signale zu erwarten, wenn das betreffende Chromatin bzw. die entsprechenden DNA-“Territories“ nicht überlappen. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, sind bei Tumorzellen gewöhnlich mehr als zwei Signale in den Interphasekernen zu sehen. Die in dieser Arbeit untersuchten Tumorzellen hatten meistens hyperdiploide Chromosomenzahlen mit mehr als $2n$, und manche Zellen hatten mehr als das Zweifache desselben Chromosoms, d.h. einzelne Chromosomen können mehrfach auftreten, wie in dieser Untersuchung gezeigt (z.B. drei normale Chromosomen 7 und ein M9 in Abb. 26). Wegen der häufigen Chromosomen-Brüchen mit Translokation der Bruchstücke kann das Chromatin eines bestimmten Chromosoms jedoch weiter verteilt sein. Dadurch wird eine zusätzliche Vermehrung der Interphase-Signale erreicht (vgl. Abb. 17, 18 und 22-26). Deshalb ist die FISH-Analyse von Metaphase-Chromosomen besser geeignet, die Anzahl der vermehrten Chromosomen und deren Aberrationen festzustellen als die Untersuchung von Interphasekernen. Ein wichtiger Grund für die Durchführung von FISH-Analysen ist außerdem die Bestätigung der nach G-Bänderung beschriebenen strukturellen Veränderungen.

Bei einer weiteren FISH-Analyse wurden mit der DNA-Probe für Chromosom 7 in einer EFE-184 Metaphase der Passage 71 insgesamt 119 Chromosomen und zwei M9 entdeckt (**Abb. 27**), deren Bruchstellen jeweils mit Pfeil bezeichnet sind. Zusätzlich zu den beiden M9 waren sechs intakte Chromosomen 7 sichtbar, die anhand der Größe deutlich von M9 unterschieden werden können. In M9 ist 7q enthalten (vgl. Abb. 13B; S. 57). Ein anderer Teil von M9 stammt aus 17q, das durch die DNA-Probe für Chromosom 7 nicht erkannt wird, aber in der Gegenfärbung mit Propidium-Iodid sichtbar ist. Daher können die beiden verkürzten Signale in **Abb. 27** mit großer Wahrscheinlichkeit als M9 anzusehen sein. In den gezeigten drei Interphasekernen sind mehrere aufgequollene Signale für Chromosom 7 Territorien gut zu erkennen. In der gezeigten hypertetraploiden Metaphase sind die Signale für Chromosom 7 zusammen mit den beiden M9 doppelt so zahlreich wie im früheren, durch Giemsa-Färbung

bestimmten Karyotyp mit 82 Chromosomen aus vergleichbar hoher Kulturpassage (vgl. Abb. 13B).

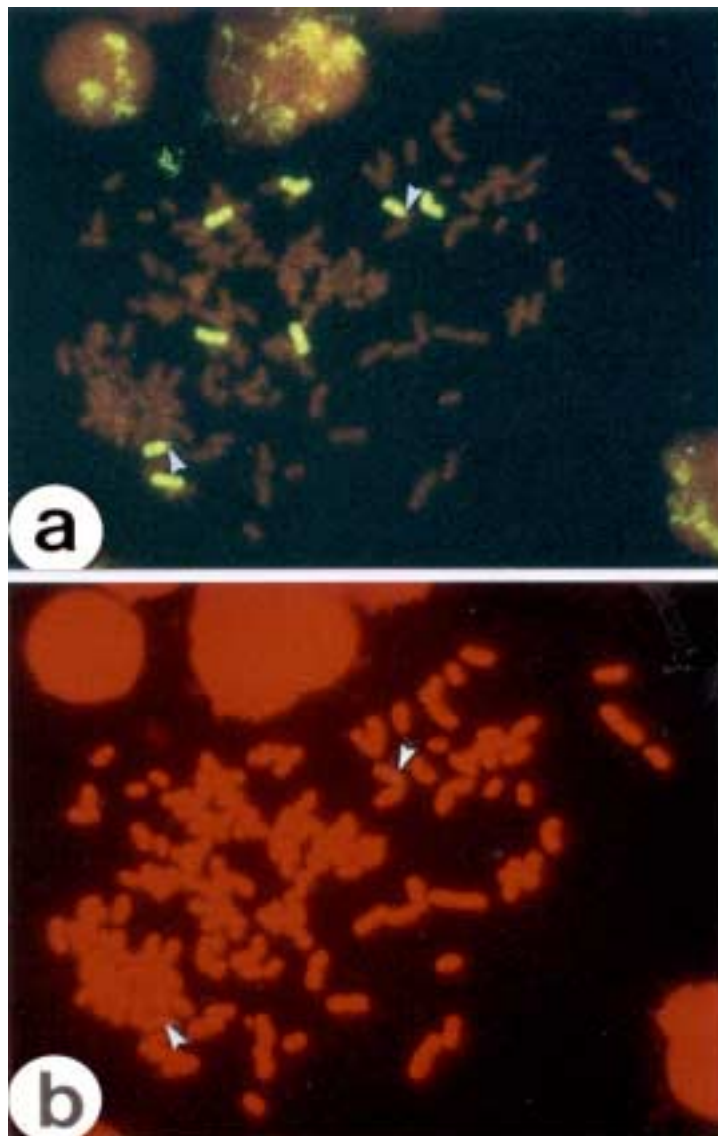


Abb. 27. Metaphase-Zelle der Linie EFE-184 in Passage 71 mit insgesamt 119 Chromosomen. Zur FISH-Analyse (Bild a) wurden eine Digoxigenin-markierten „total Chromosome Probe“ für **Chromosom 7** und ein Fluorescein-gekoppelter Antikörper sowie als Gegenfärbung Propidium-Iodid (Bild b) verwendet. Es sind 8 Signale sichtbar: sechs normale Chromosomen **7** und zwei **M9** (mit je einem Pfeil im Bruchpunkt).

Zum Nachweis des anderen Teils der Translokation in M9, der in der gezeigten FISH-Analyse nicht zu erkennen ist und von Chromosom 17 stammen sollte (vgl. Abb. 13B), wurde eine weitere FISH-Analyse mit einer Biotin-markierten DNA-Probe für Chromosom 17 bei einer EFE-184 Zelle mit über 100 Chromosomen durchgeführt (**Abb. 28**). Für die Markierung wurde der Farbstoff Texas-Red verwendet und DAPI als Gegenfärbung. Der relativ kleine Abschnitt von Chromosom 17 (vgl. Abb. 13B) ist bei beiden M9 gerade eben noch detektierbar; die Bruchstellen ließen sich durch Vergleich mit der DAPI-Kontroll-Färbung erkennen (Pfeil). Daneben sind vier normale Chromosomen 17 in der Texas-Red-Färbung dargestellt. In der früheren Karyotyp-Analyse mit G-Bänderung wurden in einer unklonierten EFE-184 Zelle der Kultur-Passage 69 bei insgesamt 82 Chromosomen nur drei normale Chromosomen 17 und ein M9 gefunden. Die Diskrepanz ist erklärbar durch den Befund, daß die Zahl der Chromosomen pro einzelne Tumorzelle häufig variiert sein kann (vgl. Abb. 11A - H). Wie die in **Abb. 28** gezeigte Metaphase erneut erkennen läßt, ist die Gesamtzahl von über 100 Chromosomen nicht immer exakt bestimmbar, so daß die Abweichung in der Chromosomenzahl und in der Anzahl der Signale für Chromosom 17 zwischen Zellen des Klons J-5 und unklonierten EFE-184 Zellen nicht überraschend ist.

Bei der FISH-Analyse mit der FITC-markierten Painting Sonde für Chromosom 9 ergaben sich Hinweise für ein Chromosom Iso 9p (**Abb. 29**); die Bestimmung ergibt sich aus der Länge des Signals in der FISH-Analyse. Der Unterschied zum normalen Chromosom 9 ist anhand des Vergleichs mit der DAPI-Färbung erkennbar. Offenbar ist in der FISH-analysierten Metaphase das abgesprengte komplementäre Iso 9q nicht sichtbar, und ist im früher durchgeführten Giemsa-Karyogramm als Iso 9q (vgl. Abb. 13B; S. 57) bestimmt worden. Die Unterscheidung zwischen Iso 9p und Iso 9q ist sehr schwierig, da die Bruchstücke annähernd gleich groß sind. Die im früheren Karyotyp mit G-Bänderung als M7 und nicht identifizierbar angesprochene Chromosomen-Aberration (vgl. Abb. 13A; S. 57) entspricht offenbar nach den in **Abb. 29** gezeigten Daten dem in Abb.14B gezeigten M13 = del(9); der Bruchpunkt ist in q21. In der früheren Analyse ist durch Giemsa-Bänderung M13 als del(9)(q21) benannt worden; d.h. nach Korrektur durch FISH-Analyse wäre M7 jedoch als

M13 = del(9)(q21) anzusprechen. Der Rest von Chromosom 9q21-qter ist offenbar mit einem anderen unbekanntem Chromosomen-Fragment rekombiniert und kann nach der FISH-Analyse in Übereinstimmung mit der früheren Untersuchung (**Kunzmann & Hölzel, 1987**) als M7* = t(9; ?) bezeichnet werden (vgl. Abb. 13A und 13B; S. 57).

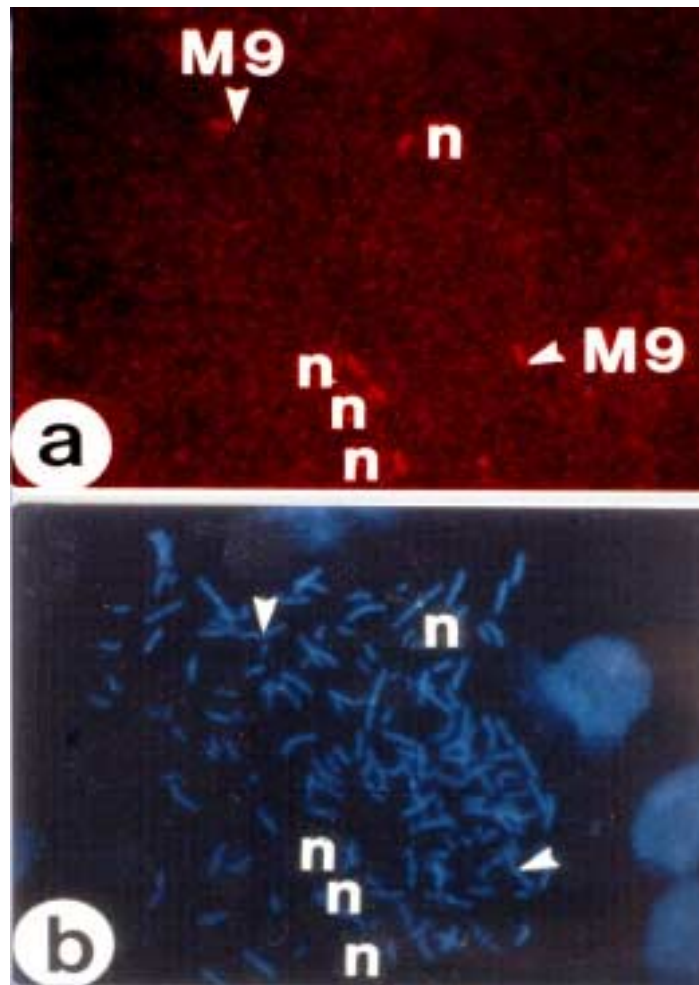


Abb. 28. Zellen von Klon J-5 der Linie EFE-184 in Kultur-Passage 70. FISH-Analyse mit einer „painting“ Probe für **Chromosom 17** (Biotin-markiert, mit Texas-Red-gekoppeltem 2. Antikörper) und DAPI als Gegenfärbung. Auf dem DAPI-Bild (b) ist eine Metaphase mit mehr als 100 Chromosomen und 3 Zellkernen sichtbar. Das Bild (a) zeigt 6 Signale in der Metaphase: Vier normale Chromosomen 17 (mit „n“ bezeichnet) und zwei **M9** (jeweils mit Pfeil).

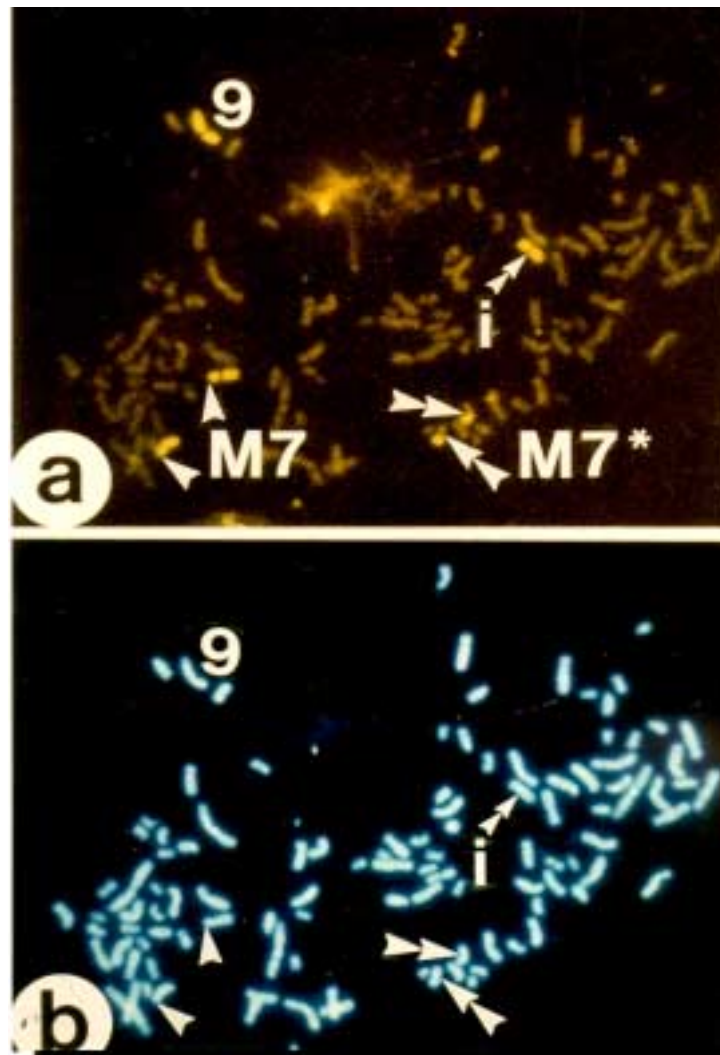


Abb. 29. Eine Metaphase von Klon J-5 der Linie EFE-184 in Passage 82 der Kultivierung in der FISH-Analyse mit einer FITC-markierten „painting“ Probe für **Chromosom 9** und DAPI als Gegenfärbung. Auf dem DAPI-Bild (b) sind insgesamt 106 Chromosomen sichtbar. Bild (a) zeigt 6 Signale: Ein normales Chromosom **9**, ein **Iso 9p** (mit „i“ und kleinem Doppel-Pfeil), zwei **M7** = del 9(q21) (mit je einem Pfeil) und zwei **M7***= t(9; ?)(q21-qter; ?) (jeweils mit großem Doppel-Pfeil).

Nach dieser Korrektur sind in dieser Untersuchung somit zwei Derivate von Chromosom 9q als M7* in **Abb. 29** sichtbar, die Rekombinationen mit je einem unbekanntem Chromosomen-Abschnitt sind. Der Unterschied zur früheren Analyse ist, daß M7* als Derivat von M7 (M7*=del M7) bezeichnet war und keine Translokation von 9q21-qter gefunden wurde. Die Fehl-Interpretation kommt erst nach Verwendung der DNA-Probe für Chromosom 9 in der FISH-Analyse heraus. Die in **Abb. 29** gezeigte Metaphase der Linie EFE-184 Klon J-5 in Passage 82 hatte 106 Chromosomen. Insgesamt sind 6 Signale sichtbar: Ein normales Chromosom 9, ein Iso 9p (d.h. zwei translozierte p-Abschnitte von Chromosom 9), zwei M7=del(9)(q21) und zwei M7*=t(9;?)(q21-qter;?). In der vorhergehenden Karyotyp-Analyse mit G-Bänderung war Iso 9q beschrieben worden (vgl. Abb. 13B; S. 57).

Eine weitere Aberration von Chromosom 9 wurden in demselben Präparat wie in Abb. 29 besprochen durch FISH-Analyse mit derselben Painting-Probe für Chromosom 9 gefunden (**Abb. 30**). Die Metaphase hatte 103 Chromosomen, dabei waren 5 Signale sichtbar: Vier normale Chromosomen 9 und ein Iso 9q, wie der Vergleich mit der DAPI-Färbung zeigt. Eines der Signale für Chromosom 9 ist offenbar mit einem anderen unbekanntem Chromosom rekombiniert und ist durch Einzelpfeil angezeigt. In dieser Metaphase ist in Übereinstimmung mit der vorherigen Analyse der Abb. 29 ebenfalls ein Iso 9q zu beobachten. Dies entspricht der früher durchgeführten G-Bänderung (vgl. Abb. 13B; S. 57).

Chromosom X ist offenbar selten an Translokationen in EFE-184 Zellen beteiligt (vgl. Abb. 13A und B sowie 14A). In der gezeigten FISH-Analyse (**Abb. 31**) wurden zwei normale Chromosomen X gefunden. Die untersuchte Metaphase mit 69 Chromosomen stammte aus J-5 Zellen der Linie EFE-184 in Passage 74 der Kultivation und wurde mit einer FITC-markierten Painting Probe für Chromosom X analysiert. Das Ergebnis entspricht den Daten der früheren Untersuchung mit G-Bänderung, in der die meisten analysierten EFE-184 Metaphasezellen zwei normale Chromosomen X besaßen; nur in seltenen Fällen war Chromosom X an Translokationen wie z.B. in M10 beteiligt: M10 = t (X; 4) (p22.3; q24), (vgl. Abb. 14B; S. 58).

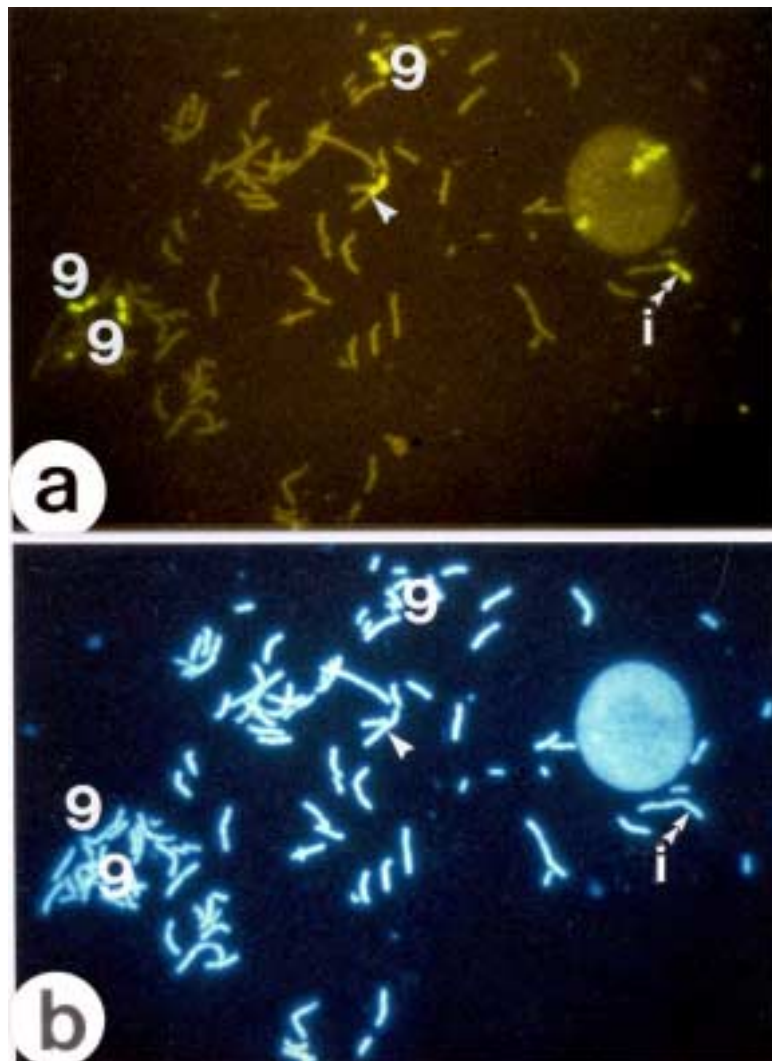


Abb. 30. Metaphase einer J-5 Zelle der Linie EFE-184 in Passage 82 der Kultur. FISH-Analyse mit einer FITC-markierten „painting“ Probe für **Chromosom 9**, einem FITC-markierten zweiten Antikörper und DAPI als Gegenfärbung. Auf dem DAPI-Bild (b) ist die Metaphase mit insgesamt 103 Chromosomen sichtbar. Das Bild (a) zeigt 5 chromosomale Signale: Drei normale Chromosomen **9**, ein **Iso 9q** (“i”); und ein intaktes Chromosom **9**, das anscheinend mit einem unbekanntem Chromosom rekombiniert ist (Pfeil).

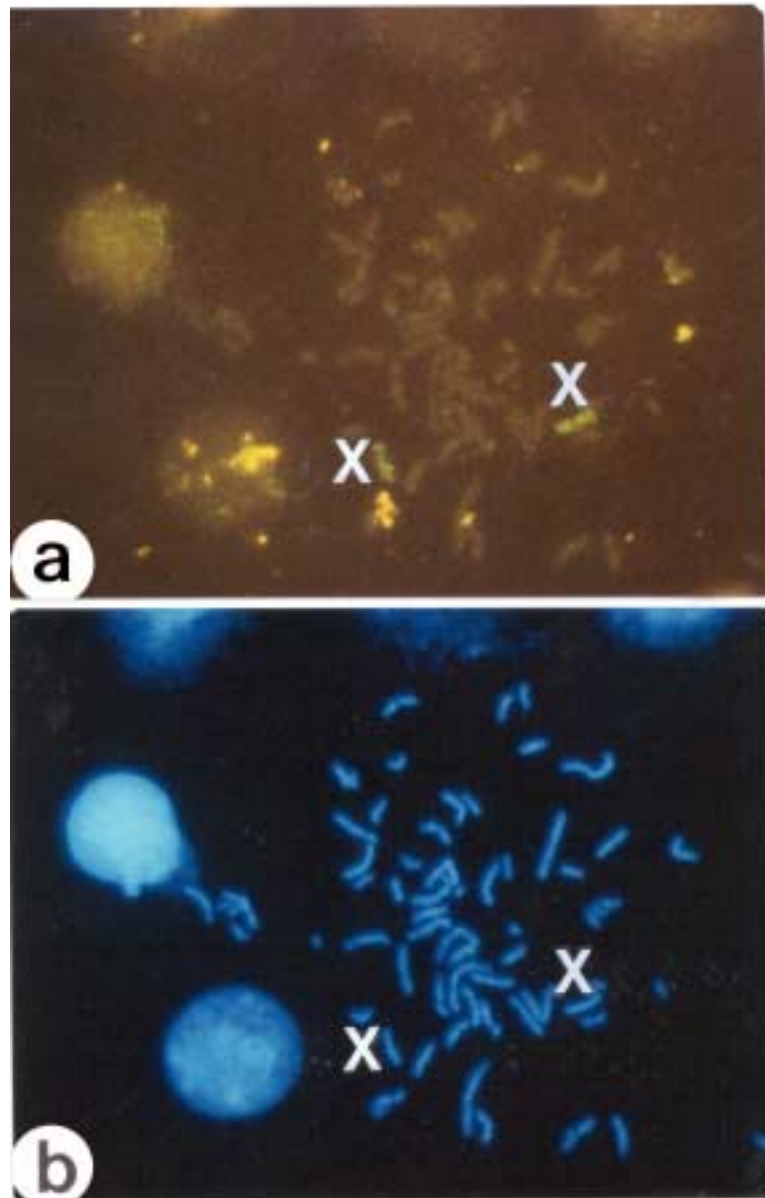


Abb. 31. J-5 Metaphase der Linie EFE-184 in Passage 74 der Kultivation. FISH-Analyse mit einer „painting“ Probe (FITC-markiert) für **Chromosom X**, FITC-markiertem zweiten Antikörper und DAPI als Gegenfärbung. Das DAPI-Bild (unten) zeigt insgesamt 69 Chromosomen. Im oberen Bild sind zwei Immunfluoreszenz-Signale für normale Chromosomen **X** sichtbar.

3.3.2.2. EFO-27 Ovariakarzinomzellen

Aus Vergleichsgründen wurden einige FISH-Analysen mit Zellen der Ovariakarzinom-Linie EFO-27 durchgeführt, die u.a. in Passage 179 der Kultivation ebenfalls durch G-Bänderung karyotypisiert war (**Kunzmann & Hölzel, 1987**). Dabei wurden mehrere Marker-Chromosomen beschrieben (**Abb. 32**):

M1 = del (X) (q12)

M2 = t (X; 2) (q12; q37)

M3 = del (9) (p13)

M4 = t (4; 9) (p16; p13)

M5 = t (8; 9) (p12; q13)

M6 = t (10q14q)

M7 = 16qh

Zur Bestätigung der Bruchstellen bei den EFO-27 Marker-Chromosomen wurden Digoxigenin-markierte DNA-Proben für Chromosom 9 und Chromosom X eingesetzt.

Die in **Abb. 33** gezeigte Metaphase einer EFO-27 Zelle ließ insgesamt 78 Chromosomen erkennen, dabei sind mit der DNA-Probe für Chromosom 9 vier Signale sichtbar: Zwei normale Chromosomen 9 und zwei M3. In der früheren Untersuchung (**Kunzmann & Hölzel, 1987**) war M3 als Deletion von Chromosom 9 in Abschnitt p13 beschrieben worden (vgl. Abb. 32). M3 entspricht del (9) sowohl in der Giemsa-Bänderung als auch in der FISH-Analyse. Die übrigen in Abb. 32 dargestellten Marker M4 und M5, an denen Fragmente von Chromosom 9 beteiligt sein sollten, wurden in der FISH-Analyse nicht gefunden. Aufgrund des paarigen Vorkommens von M3 muß angenommen werden, daß der Bruch eines Chromosoms 9 bereits vor der Hyperdiploidisierung geschehen ist.

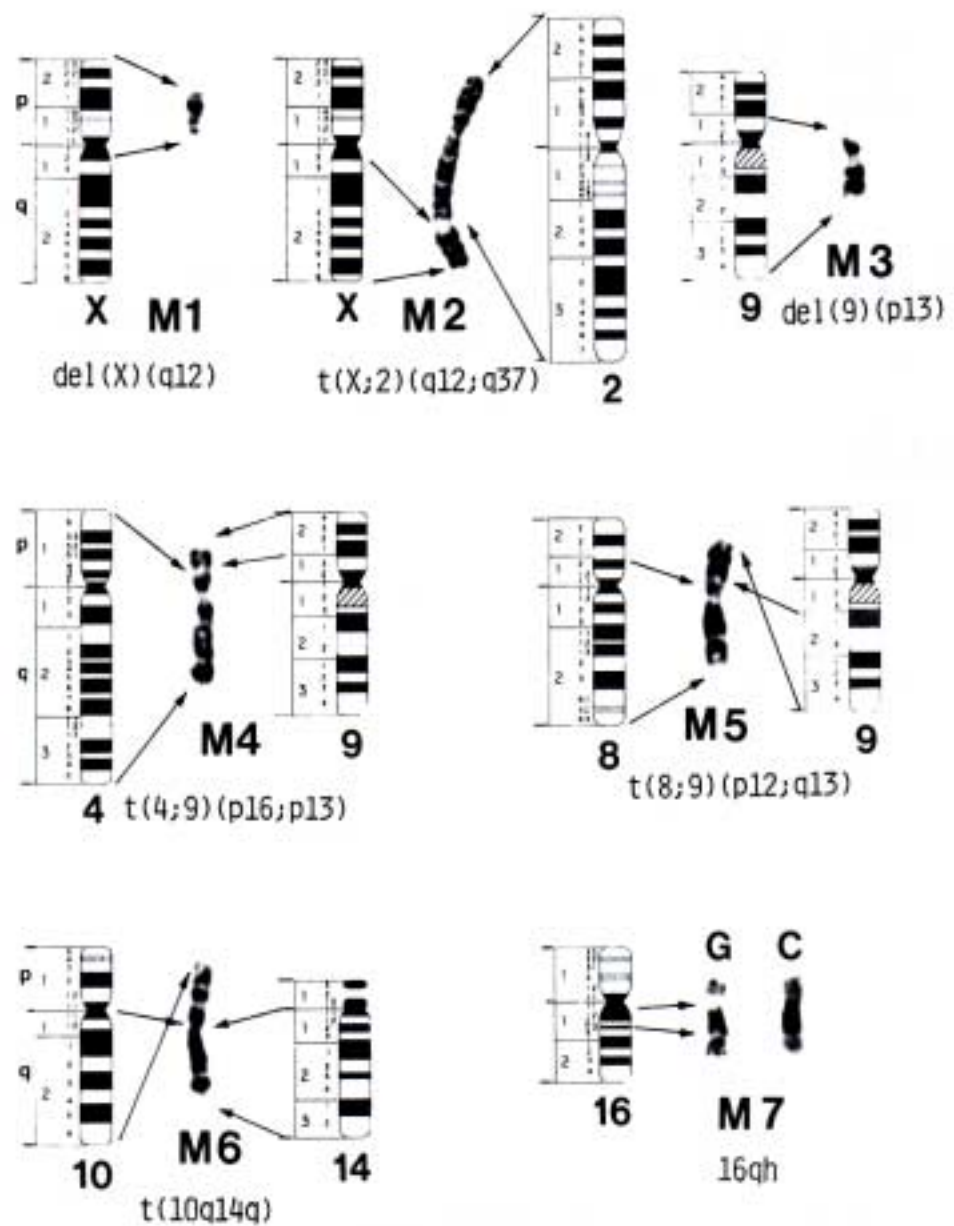


Abb. 32. Ableitung der Marker-Chromosomen in Zellen der Ovarialkarzinomlinie EFO-27 in Kulturpassage 179. Die Pfeile zeigen die Projektion vom jeweiligen Idiotyp auf die betreffenden Marker-Chromosomen und lassen die Bruchstellen erkennen (aus **Kunzmann & Hölzel, 1987**).

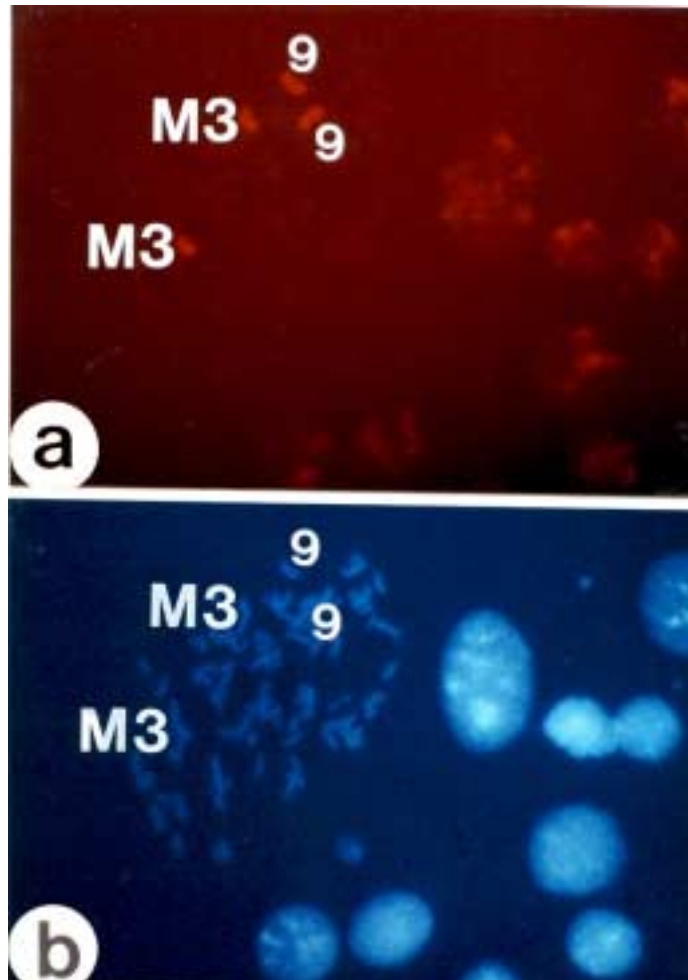


Abb. 33. Zellen der Linie EFO-27 in Passage 89 der Kultivation in der FISH-Analyse mit einer Digoxigenin-markierten „total Chromosome Probe“ für **Chromosom 9** und DAPI als Gegenfärbung. Die Metaphase zeigt 78 Chromosomen und mehrere Interphasekerne mit aufgequollenen Signalen. Auf dem oberen Bild sind vier Signale in der Metaphase dargestellt: Zwei normale Chromosomen **9** und zwei **M3** = del (9).

In einer weiteren EFO-27 Metaphase aus Passage 82 der Kultivierung wurden bei Verwendung der DNA-Sonde für Chromosom X vier Signale sichtbar (**Abb. 34**): Zwei M1 als del (X) (Xp; vgl. Abb. 32; in **Abb. 34** mit X** markiert) und zwei etwas größere q-Fragmente von Chromosom X mit dem möglichen Bruchpunkt q12 (X* in **Abb. 34**).

Die Unterscheidung zwischen Xp und del X(q12) ist schwierig bei der FISH-Analyse. Die beiden Abschnitte X* = del X(q12, qter) sind bei der Analyse in Kulturpassage 82 der vorliegenden Untersuchung offenbar noch nicht mit Chromosom 2 zu M2 rekombiniert, wie in Abb. 32 (S. 85) aus einer früheren Arbeit dargestellt. Für die Unterscheidung der beiden Fragmente X* und X** spricht die etwas größere Länge von Fragment X* im Vergleich zu X**. Da in den früheren Analysen ein disomes Vorkommen von M2 u.a. auch in der weitaus höheren Kultivierungspassage 179 beobachtet wurde, ist anzunehmen, daß Zellen der Linie EFO-27 bereits vor der Hyperdiploidisierung die Translokation zwischen Chromosomen-Bruchstück Xq (q12) und Chromosom 2 (q37) zu Marker M2 erworben haben. Dabei wird unterstellt, daß der Bruch nur in einem Chromosom X und die nachfolgende Hyperdiploidisierung die Selektion für EFO-27 Zellen mit den zwei entsprechenden Bruchstücken begünstigt haben. Ein X Chromosom ist möglicherweise bereits vor der Hyperdiploidisierung verlorengegangen. Dies ist ein ähnlicher Vorgang wie die in Abb. 33 beschriebene Entstehung von zwei M3 bei Chromosom 9.

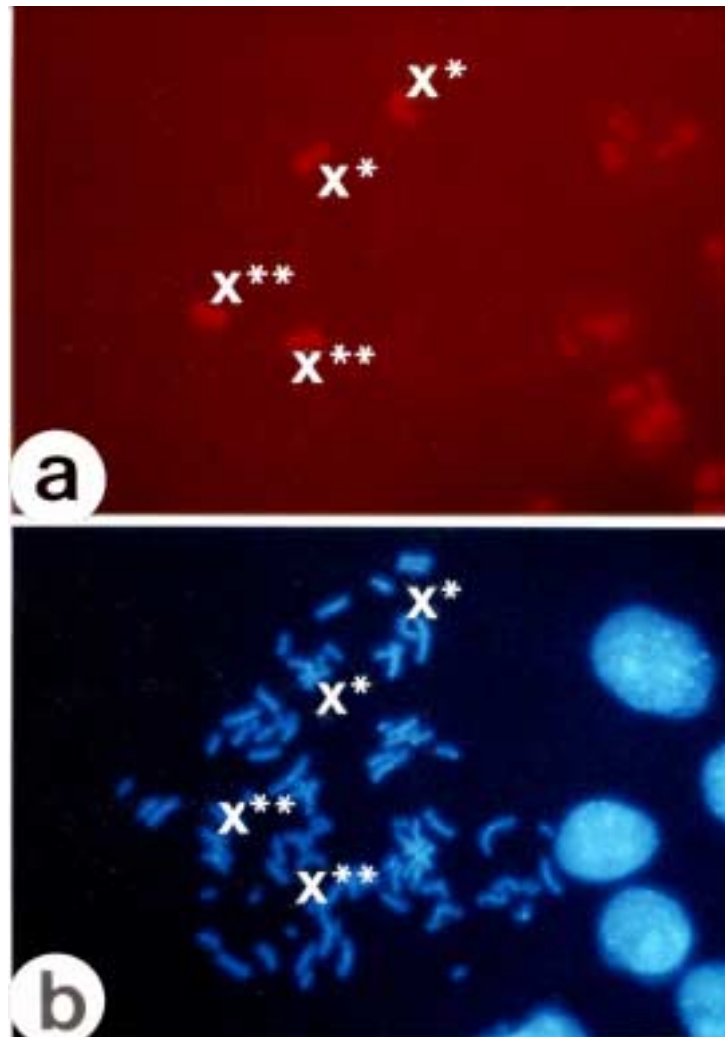


Abb. 34. Zellen der Linie EFO-27 in Kultur-Passage 82. FISH-Analyse mit einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde für **Chromosom X**, einem Rhodamin-gebundenen zweiten Antikörper und DAPI als Gegenfärbung. Das untere Bild zeigt eine Metaphase mit insgesamt 85 Chromosomen und mehrere Interphasekerne. Es sind vier Signale in der Metaphase zu sehen: Zwei kleinere Fragmente **M1** als **del X** (mit **X**** bezeichnet) und zwei etwas größere Abschnitte von Chromosom X mit der möglichen Bruchstelle in q12 (mit **X*** bezeichnet). Die Interpretation geht davon aus, daß Chromosom X in q12 gebrochen ist, und daß das kurze Fragment X** als M1 gilt, während das längere Fragment X* noch nicht mit Chromosom 2 zu **M2** rekombiniert hat (vgl. Abb. 32). Durch die Hyperdiploidisierung sind vier Signale von jeweils zwei gleich großen Fragmenten sichtbar.

4. Diskussion

Der Zusammenhang zwischen Chromosomeninstabilität und Tumorentwicklung ist bisher weitgehend ungeklärt (**Lengauer et al.**, 1998; **Hanahan & Weinberg**, 2000). Die Tatsache, daß in vielen Tumoren epithelialer Gewebe multiple Chromosomen-Aberrationen vorhanden sind, ist seit etwa einem Jahrhundert bekannt (**Boveri**, 1914). Die bei Karyotyp-Untersuchungen an explantierten Tumorzellen gefundenen Aberrationen stehen offenbar am Ende einer jahrelangen Entwicklung (**Nowell**, 1976). Naturgemäß ist die Analyse von frühen Veränderungen des Karyotyps bei humanen Karzinomen kaum durchzuführen, da die Anfangsstadien der Tumorentwicklung beim Menschen selten zur Verfügung stehen. Wahrscheinlich ist die Karzinogenese ein Mehrschritt-Prozess, bei dem eine Anhäufung von Mutationen in Genen der Regulation von Wachstum und Differenzierung stattfindet (**Hanahan & Weinberg**, 2000). Im späteren Verlauf der Erkrankung könnten aufgrund der vielfältigen Rekombinationen des genetischen Materials und der klonalen Evolution die kausalen und möglicherweise ungerichtet (stochastisch) entstandenen Veränderungen des Genoms nicht mehr vorhanden sein (**Loeb et al.**, 1974; **Nowell**, 1976; **Lengauer et al.**, 1998; **Hülskamp**, 2000). Bei der Analyse von explantierten Tumorzellen während des meist progredient verlaufenden Krankheitsprozesses wird demnach nur das Bild eines aktuellen Zustands zu gewinnen sein. Wenn es tatsächlich fortwährend zu Veränderungen in der Zusammensetzung der Tumorzellpopulation kommt, die aufgrund der genomischen Instabilität nicht vorhersehbar sind, werden mit Sicherheit sehr viele, für das Überleben von Einzelzellen letal wirkende Mutationen vorhergegangen sein. Allerdings werden auch Mutationen entstanden sein, die einigen Tumorzellen bessere Chancen zur Überwindung von systemischen Therapie-Maßnahmen verschaffen und die Herausbildung von chemoresistenten Subpopulationen gewährleisten. Während der in vivo Tumorzell-Proliferation haben somit einige Zellen mit bestimmten Aberrationen offenbar genomisch fixierte Vorteile erworben und wachsen zu Zellklonen heran, während andere Zellen im Wachstum zurückbleiben, so daß durch den Selektionsprozess neue Subpopulationen mit veränderten Eigenschaften

entstanden sind. Von diesen Zellpopulationen führen einige aufgrund ihrer Aggressivität zum Tod des Patienten. Aus den nachfolgend genannten Gründen sind in vitro Untersuchungen zur Aufklärung von Mechanismen der Evolution von Tumorzellpopulationen möglicherweise ein wichtiger Beitrag.

Chromosomen-Analysen bei in vitro wachsenden Tumorzellen können mit verbesserter Technik z.B. durch FISH (Fluorescence-in-situ-Hybridisation; **Lichter & Ward**, 1990; **Bentz** et al., 1996) oder durch sogenannte CGH ("Comparative Genomic Hybridisation"; **Weiss** et al., 1999) im größeren Maßstab durchgeführt werden. Wegen der Vielzahl und der Variationsbreite der chromosomalen Veränderungen bietet die Untersuchung an einzelnen Zellen gegenüber der CGH jedoch Vorteile für das Verständnis der Entwicklung von Aberrationsmustern bei der klonalen Evolution der Tumorzellen. Bei CGH-Analysen werden quantitative Veränderungen von Chromosomen oder von chromosomalen Abschnitten ausgewertet, deren Zuordnung zu den Chromosomen des Karyotyps der einzelnen Zelle nicht sichtbar ist. Somit wird das Gesamtbild der Karyotyp-Veränderungen in der einzelnen Zelle durch die CGH nicht verständlich, und die Dynamik der Entwicklung einzelner Zellen innerhalb einer Zellpopulation ist schwer nachvollziehbar.

Wie in vorausgegangenen Untersuchungen an den Zellen derselben EFE-184 Linie (**Nollau** et al., 1990) sowie an den vorliegenden Ergebnissen erkennbar wird, ist die Stabilisierung einzelner Aberrationen in dieser Zelllinie offenbar derzeit noch nicht abgeschlossen. So konnte beispielsweise in einigen EFE-184 Zellen ein Iso9p identifiziert werden (Abb. 29), während in anderen Zellen derselben Kultur (Abb. 30) sowie in der früheren Untersuchung Iso9q gezeigt wurde. Demnach ist gegenwärtigen Zeitpunkt offenbar nicht entschieden, welche Zellen einen Selektionsvorteil haben, die mit Iso9p oder die mit Iso9q oder ob es völlig ohne Bedeutung ist, welche der beiden Aberrationen anwesend ist. In ähnlicher Weise ist die Translokation eines Chromosoms 9 mit einem nicht identifizierten Chromosom zu deuten, die in der früheren Untersuchung nicht vorhanden war und in der jetzigen Konstellation zusammen mit Iso9q möglicherweise einen Selektionsvorteil mit sich bringt (vgl. Abb. 30).

In ähnlicher Weise wurden bei EFO-27 Zellen der Kulturpassage 89 in der gegenwärtigen Untersuchung zwei normale Chromosomen 9 beobachtet (Abb. 33); zusätzlich fanden sich zwei Marker M3 als del9(p13). Demgegenüber war M3 in EFO-27 Zellen aus Passage 16 der Kultivation in einer früheren Untersuchung (**Kunzmann & Hölzel, 1987**) nicht auffindbar, wohl aber das unveränderte Chromosom 9 als Tetrasomie. Bei den in der vorliegenden Arbeit in Passage 89 analysierten, nahezu-tetraploiden EFO-27 Zellen ergaben sich zwei M3 und Disomie 9, somit dieselbe Konstellation wie in Zellen aus Passage 179 der früheren Untersuchung. Wegen des disomen Vorkommens von Chromosom 9 und M3 sollte die Entstehung von M3 bereits vor der Hyperdiploidisierung der EFO-27 Zellen erfolgt sein, denn jede Translokation muß als einmaliges Ereignis betrachtet werden. Von den Chromosomen-Fragmenten del(9)(p13) und del(9)(q13), die in der früheren Untersuchung bei M4 und M5 beschrieben wurden (**Kunzmann & Hölzel, 1987**), war in der FISH-Analyse nur M5 in einer einzigen von mehreren Metaphasen aufzufinden. Demnach wurde während der in vitro Kultivation gegen M4 und M5 selektiert, während bei der Passage der EFO-27 Zellen durch die Nacktmaus eine positive Selektion für Zellen mit den Markern M4-M6 stattgefunden hatte (**Kunzmann & Hölzel, 1987**).

In der früheren Analyse besaßen nahe-tetraploide EFO-27 Zellen in Kulturpassage 179 annähernd drei morphologisch intakte X Chromosomen und zusätzlich Disomie für M1 und M2, in denen jeweils die komplementären Fragmente eines X Chromosoms enthalten waren: M1=del(X)(q12-pter) und M2 = t(X;2)(q12-qter;q37) (vgl. Abb. 32). Unter Hinzurechnung von durchschnittlich drei unveränderten X Chromosomen pro nahezu-tetraploider EFO-27 Zelle war somit das X Chromosom 4-mal vertreten. Bei der FISH-Analyse in Passage 82 (Abb. 34) zeigten sich zwei M1 und zwei Fragmente von X, die offenbar del(X)(q12-qter) repräsentierten und nicht mit Chromosom 2 zu M2 rekombiniert hatten. Demnach handelt es sich um die Zelle einer Sublinie, in der vor der Hyperdiploidisierung ein X zwar an der entsprechenden Stelle q12 gebrochen war, in der jedoch das Fragment del(X)(q12-qter) nicht zur Translokation mit Chromosom 2 zu M2 gelangte und ebenso wie das kleinere Fragment del(X)(q12-pter)=M1 im Prozess der Hyperdiploidisierung verdoppelt wurde.

Intakte X Chromosomen waren in der untersuchten Zelle offenbar eliminiert. Die angeführten Beispiele belegen die komplexen Zusammenhänge in der Evolution der EFE-184 und EFO-27 Tumorzellpopulationen, die durch sehr genaue Analysen der Karyotypveränderungen an Einzelzellen sichtbar werden (**Lengauer et al.**, 1999; **Cahill et al.**, 1999).

Die in dieser Arbeit untersuchten beiden Zelllinien wurden etabliert nach Explantation von Zellen aus fortgeschrittenen Tumoren und sind seit etlichen Jahren unter Beobachtung. Daher kann im Verlauf der Langzeit-Kultivation die Evolution von genomischen Veränderungen untersucht werden, die auf ähnliche Vorgänge während des in vivo Wachstums hindeuten (**Kunzmann & Hölzel**, 1987). Nach der Entnahme aus dem Tumor werden allerdings nicht alle explantierten Zellen in Kulturflaschen mit FCS-haltigem, künstlichem Medium überleben, weil die Bedingungen des in vivo und des in vitro Wachstums sehr unterschiedlich sind. Nur ein Teil der Zellen setzt sich in der Kulturflasche bei der Anzucht durch. Somit ist es eine Auswahl von Zellen, die unter den angebotenen in vitro Bedingungen anwachsen und proliferieren können. Nur derartig selektierte Zellen werden für Untersuchungen des Karyotyps und für FISH-Analysen zur Verfügung stehen. In vitro gewonnene Ergebnisse können demnach nur mit Einschränkungen auf die in vivo Situation übertragbar sein.

In den eigenen Untersuchungen an der etablierten Zelllinie EFE-184 waren die Chromosomenzahlen einzelner Zellen sehr unterschiedlich. Das Spektrum der Chromosomenzahlen reichte von nahezu-diploid bis zu ca. 150 Chromosomen pro Metaphase. Zellen mit über 150 Chromosomen wurden nicht berücksichtigt, da möglicherweise in der Präparation zwei Metaphasezellen eng nebeneinander gelangten. Bei Fällen von zwei überlappenden Metaphasen mit weniger als insgesamt 150 Chromosomen können in der Regel die aus verschiedenen Zellen stammenden Chromosomen eindeutig anhand der Struktur und der Anfärbung diskriminiert werden. In Zweifelsfällen wurden derartige Konstellationen jedoch nicht ausgewertet.

Bei der Mitose kann es Unterschiede in der chromosomalen Verteilung geben, so daß zwei Tochterzellen mit asymmetrischen Chromosomenzahlen

resultieren ("Non-disjunction"). Bei der asymmetrischen Verteilung entstehen aus einer Zelle eine Tochterzelle mit niedriger und eine mit höherer Chromosomenzahl (**Buselmaier & Tariverdian**, 1999). Wenn im Extremfall die Chromosomenzahl und der DNA-Gehalt einer Tochterzelle zu gering sind, ist die normale Aufrechterhaltung von Struktur und Stoffwechsel der Zelle nicht gewährleistet, und derartige Zellen werden absterben (**Knippers**, 1997). Bei der symmetrischen Chromosomen-Verteilung entstehen zwei Tochterzellen mit identischer Chromosomenzahl und Qualität - ein normaler Mitose-Vorgang. Im Fall des Ausbleibens der Zellteilung bei ungehemmter DNA-Synthese kommt eine Zelle mit verdoppelter Chromosomenzahl zustande, da DNA und Chromatin vermehrt werden, aber die Zelle keine Teilung vollzieht ("Endoreduplikation"). Die Chromosomenzahlen solcher Zellen werden häufig im weiteren Verlauf der Proliferation durch Verlust einzelner Chromosomen reduziert, d.h., Chromosomen gehen durch Segregation verloren. Daraus können Zellen mit hyperdiploider Chromosomenzahl und bestimmten Chromosomen-Aberrationen entstehen, die sich aufgrund von Selektionsvorteilen während der Zellproliferation durchsetzen. Aus diesen Überlegungen und aus den Ergebnissen dieser Arbeit geht hervor, daß einzelne Tumorzellen auch innerhalb derselben Population unterschiedliche Chromosomenzahlen haben, an denen die genomische Instabilität sichtbar wird.

Eine weitere Möglichkeit für das Auftreten von Zellen mit hoher Chromosomenzahl besteht in der Anwesenheit von mehreren Kernen pro Zelle. In den Kulturen der Zelllinie EFE-184 und des Klons J-5 wurden jeweils große Zellen mit mehreren Zellkernen beobachtet. Aus einer großen, mehrkernigen Zelle könnten bei gleichzeitiger Mitose der Zellkerne durchaus auch Zellen mit polyploider Chromosomenzahl entstehen. Bei der Analyse kann jedoch nicht mit Sicherheit unterschieden werden, ob nach der Präparation die Chromosomen aus einem oder aus mehreren Zellkernen einer einzelnen Zelle stammen. Diese Unsicherheit ist in Kauf zu nehmen, lässt allerdings wegen des relativ geringen Vorkommens von mehrkernigen Zellen an der Tatsache des Auftretens von hyperdiploiden Chromosomensätzen in einkernigen Zellen keinen Zweifel. Darüber hinaus sind mehrkernige Zellen offenbar nicht lebensfähig und gehen durch Nekrose zugrunde, wie in dieser Arbeit gezeigt.

Die Morphologie einzelner Tumorzellen kann sich mit der Zeit verändern, obwohl der Zelltyp des entsprechenden ursprünglichen Gewebes erhalten bleibt. Nach der Klonierung waren Zellen mit annähernd gleichmäßiger Form und Größe zu erwarten. Aber die Ergebnisse haben gezeigt, daß nicht nur in den verschiedenen EFE-184 Klonen die Zellen unterschiedliche Formen besaßen, sondern daß auch bei Zellen desselben Klons morphologische Veränderungen auftraten (vgl. Abb. 6 und 8). Z.B. in Klon J-5 gab es unterschiedliche Zellformen und gemischte Zellgrößen (kleine und größere Zellen) in derselben Weise wie bei den unklonierten Zellen. Dagegen waren in Klon J-2 und J-6 fast nur große Zellen und kaum kleine Zellen vorhanden. Offenbar sind große Zellen weniger gut befähigt zur Proliferation und zum Überleben in der Kultur, denn die Klone J-2 und J-6 waren nach wenigen Kulturpassagen eingegangen. Aus der Beobachtung an klonierten einzelnen Zellen ergab sich, daß die größeren, meistens mehrkernigen Zellen aus kleinen Zellen stammen (vgl. Abb. 8). Die größeren Zellen mit Mehrkernigkeit haben offenbar die reguläre Teilungsfähigkeit weitgehend verloren. Sie gehen durch Nekrose zu Grunde, während Apoptose nur bei kleinen Zellen beobachtet wurde (vgl. Abb. 9). Die Hauptkriterien von Apoptose und Nekrose sind in **Tab. 5** zusammengefasst.

Tab. 5. Morphologische Kriterien von Apoptose und Nekrose (nach **Wyllie** et al., 1980; **Nagata**, 1997)

Apoptose	Nekrose
-- Plasma-Membran bildet Bläschen, kein Verlust der Membranintegrität	--Verlust der Membranintegrität
-- Zellen schrumpfen, apoptotische Abschnürungen werden gebildet	--Zellen schwellen
-- Chromatin verdichtet zu einer einheitlichen Masse	-- Aggregation des Chromatins
-- Phagozytose durch benachbarte normale Zellen und Makrophagen	-- Phagozytose durch Makrophagen
-- Absterben einzelner Zellen	--Tod von Zellverbänden

In vielzelligen Organismen können nicht nur immerfort neue Zellen entstehen, sondern es müssen Zellen auch absterben, die überflüssig oder von der Norm abweichend sind, oder deren Zweck erfüllt ist. Die physiologische Selbstzerstörung durch programmierten Zelltod wird Apoptose genannt (**Wyllie** et al., 1980). Der Vorgang ist für das Gedeihen eines vielzelligen Organismus sehr wichtig und unabdingbar. Auch Tumorzellen sind zur Apoptose befähigt, wie in der eigenen Untersuchung gezeigt, obwohl als ihr Charakteristikum häufig beschrieben wird, daß sie verlernt oder "vergessen" haben zu sterben (**Duke** et al., 1997).

Die andere Form des Zell-Untergangs, die sogenannte Nekrose, ist ein Vorgang des pathologisch bedingten Absterbens, und im Organismus ist dafür eine entzündliche Reaktion charakteristisch. Mikroskopisch lassen sich die beiden Zelltod-Formen gut unterscheiden. Sie können in enger Nachbarschaft in derselben Zellpopulation vorkommen, wie bei beiden untersuchten Zelllinien gezeigt (vgl. Abb. 9). Über die Ursachen, die einzelne Zellen jeweils zur Apoptose oder zur Nekrose bringen können, ist derzeit wenig bekannt. Sauerstoffmangel (**Duke** et al., 1997) kann nicht als einzige Ursache zur Nekrose führen. In der vorliegenden Untersuchung standen alle Zellkulturen (mit kleinen und größeren Zellen) unter gleichmäßigen Wachstums- und O₂-Bedingungen; die Zellen wurden bei 37°C in Brutschränken mit 5% CO₂-Atmosphäre und Wasserdampf-gesättigter Luft gehalten. Aus den äußeren physikalischen Bedingungen ist daher kein Anlaß für das Entstehen von größeren Zellen aus kleinen Zellen abzuleiten. Es ist möglich, daß einzelne kleine Zellen während der Kultivation infolge eines endogenen irreparablen Schadens (z.B. Spontan-Mutation) zur Endoreduplikation angeregt wurden und daraus die größeren Zellen mit mehreren Kernen entstanden. Wie oben bemerkt hatten alle kleinen Zellen einen einzigen Kern.

In den untersuchten Metaphasen der Linie EFE-184 gab es keine einzige mit exakt diploider Chromosomenzahl, weder in den klonierten noch in den unklonierten Zellen, weder bei den früheren noch bei den späteren Kulturpassagen. Neben einigen wenigen hypodiploiden Zellen waren die Zellen hyperdiploid, in einigen Kulturen gab es nahezu-diploide Zellen. Bei den

meisten Kulturen waren die Chromosomenzahlen pro Zelle nahezu-tetraploid. Ein Teil der Subkulturen (vgl. Abb. 11A, B und F - H) enthielt Zellen mit weitgehender Ähnlichkeit der Chromosomenzahlen im Bereich von 60 bis 85; andere Subkulturen (vgl. Abb. 11C – E) zeigten größere Heterogenität der Chromosomenzahlen im Bereich von 46 bis 150 pro Zelle. Bei der weiteren Subkultivierung von Zellen mit ähnlichen Chromosomenzahlen wäre in späteren Passagen ebenfalls eine Zellpopulation mit weitgehend ähnlicher Chromosomenzahl pro Zelle zu erwarten. Und bei Kulturen mit sehr heterogenen Chromosomenzahlen pro Zelle sollten in späteren Passagen wiederum Zellpopulationen mit heterogener Verteilung der Chromosomenzahlen erkennbar sein. Dies war jedoch nicht der Fall; z.B. bei den Kulturen E und F (vgl. Abb. 11E und F), die aus derselbe Vorläufer-Kultur entstanden waren und getrennt gezüchtet wurden, waren die Chromosomen-Verteilungen jeweils anders. Kultur E besaß eine heterogene Verteilung der Chromosomenzahl pro Zelle, während Zellen der Kultur F nahezu-diploid waren. Ebenso ist auffällig, daß die parallel kultivierten Subkulturen A – G (vgl. Abb. 10A – G) eine gemeinsame parentale Vorläufer-Kultur hatten; trotzdem gab es verschiedene Chromosomenzahl-Verteilungen in den späteren Kulturpassagen. Demnach war die Anzahl der Chromosomen in einzelnen Zelle variabel und offenbar nicht von den Kulturpassagen abhängig.

Es wäre möglich, daß die Chromosomen-Präparationen unbewußt mit kleinen Variationen durchgeführt wurden, die das Ergebnis beeinflusst hätten. Die zu dieser Frage angestellten Untersuchungen haben gezeigt, daß weder durch verschiedene Länge der Trypsinierungszeiten noch durch unterschiedlich lange Quellzeiten bei der Präparation eindeutig größere Veränderungen in der Verteilung der Chromosomenzahlen induziert wurden (vgl. Abb. 12A – D). Die Variation der Präparationstechnik kann daher nicht der einzige Grund für die unterschiedlichen Chromosomenzahlen pro Zelle sein. Als Schlußfolgerung bleibt, daß die Chromosomenzahlen von Zellen der Linie EFE-184 nicht stabil sind, und daß dies zur Zeit im einzelnen nicht genau erklärbar ist.

Zusätzlich zu den numerischen Aberrationen werden parallel dazu auch Chromosomenaberrationen beobachtet, die offenbar nach Struktur und Anzahl

für Zellpopulationen aus den Karzinomen verschiedener Patientinnen charakteristisch sind (**Mitelman**, 1983; **Kunzmann & Hölzel**, 1987; **Lengauer et al.**, 1998). In der eigenen Arbeit wurden nur Chromosomen mit strukturellen Veränderungen, die in mehr als 50% der untersuchten Zellen einer Linie vorkamen, als Marker-Chromosomen bezeichnet (**Kunzmann & Hölzel**, 1987), denn sie sind als charakteristisch für die betreffende Zelllinie anzusehen. Dies steht im teilweisen Gegensatz zu Beobachtungen über karyotypische Veränderungen, die spezifisch für bestimmte Tumor-Entitäten sein sollen. So wurde beispielsweise vermehrtes Vorkommen von 1q mit der Entstehung des Endometriumkarzinoms in Verbindung gebracht (**Milatovich et al.**, 1990; **Shah et al.**, 1994; **Bardi et al.**, 1995; **Ketter et al.**, 1995; **Pere et al.**, 1998), während andererseits Verlust der Heterozygotie (LOH) von Chromosom 1p und somit Verlust einer dort lokalisierten Tumor-Suppressorfunktion angenommen wurde (**Arlt et al.**, 1996). Weiterhin wurden Veränderungen an den Chromosomen-Armen 3p, 8p, 9p, 14q, 16q und 18q (**Fujino et al.**, 1994), oder an 10q bzw. 17q (**Peiffer et al.**, 1995) oder auch ein Verlust von 6q (**Tibiletti et al.**, 1997) mit Entstehung und Progression des Endometriumkarzinoms assoziiert. Das intakte Chromosom 1 war bei den in der eigenen Arbeit untersuchten Zellen der Endometriumkarzinomlinie EFE-184 mehr als tetrasom bei der früher durchgeführten G-Bänderung und trisom in der FISH-Analyse einer Zelle mit 38 Chromosomen vorhanden. Mit beiden Methoden wurde die Beteiligung von Chromosom 1 am häufig disom in hyperdiploiden EFE-184 Zellen vorkommenden Marker M1 entsprechend $t(1;5)(p13-qter;q21-qter)$ gefunden (vgl. Abb. 14). Demnach ist auch bei den Endometriumkarzinomzellen der Linie EFE-184 eine Vermehrung von 1q zu beobachten, allerdings nur in teilweiser Übereinstimmung mit den oben zitierten Befunden, denn in allen untersuchten Zellen dieser Linie waren stets morphologisch intakte Chromosomen 1 mehr als disom enthalten. Damit wird möglicherweise die Bedeutung einer Aberration an Chromosom 1q relativiert.

Im Verlauf der Langzeit-Kultivation können auch neue Marker-Chromosomen auftreten (z.B. M6* und M8 in EFE-184 Zellen der Passage 69 der Kultur; vgl. Abb. 13A und B), die in Kulturpassage 24 der früheren Untersuchung nicht gefunden wurden. Auffallenderweise wurden in dieser Arbeit bei den aus EFE-

184 Zellen geklonten und relativ schnell wachsenden J-5 Zellen keine neuen Marker entdeckt. Dies ist möglicherweise auf die zu geringe Anzahl der untersuchten Metaphasen und auf die konstant eingehaltenen in vitro Kulturbedingungen zurückzuführen, die wenig Anreiz für die Herausbildung neuer Zellpopulationen bieten.

Strukturelle Veränderungen der Chromosomen treten nicht oder nur in sehr geringer Anzahl auf während der regulären Entwicklung eines Individuums, die durch intra- und extrazelluläre Signale und Faktoren gesteuert wird. Tumorzellen, die durch genomische Veränderung entstanden sind und in denen ständig neue Veränderungen der DNA stattfinden, können infolge der inhärenten genomischen Instabilität Selektionsvorteile erwerben. Während der Proliferation über längere Zeit setzen sich diese Zellen durch, so daß eine klonale Evolution von Tumorzell-Subpopulationen resultiert. Wie zahlreiche Untersuchungen (**Whang Peng** et al., 1983; **Trent** et al., 1985; **Kunzmann & Hölzel**, 1987; **Duesberg** et al. 1998; **Ferrer-Roca** et al. 1998; **Pihan & Doxsey**, 1999) ergeben haben, wird beim Wachstum von soliden Tumoren fast immer für hyperdiploide Zellen mit bestimmten Marker-Chromosomen selektiert. Dies war auch bei den in dieser Arbeit vorgestellten Zelllinien EFE-184 und EFO-27 der Fall.

Die vorliegende Untersuchung hat ergeben, daß Tumorzellen eine hohe Variabilität des Genoms besitzen, die an zytogenetischen Veränderungen während der Langzeit-Kultivation sichtbar ist. Vergleichbare Selektionsmechanismen sind offenbar nicht nur in vitro sondern auch in vivo wirksam. Dabei sind die durch klonale Selektion entstandenen individuellen Muster an chromosomalen Aberrationen in Zellpopulationen aus verschiedenen Patienten offenbar nicht stabil, sondern können sich ohne erkennbare äußere Einflüsse verändern. Die zeitabhängigen weiteren Veränderungen der Chromosomen-Aberrationsmuster beruhen möglicherweise auf stochastisch ablaufenden Alterationen des Zellgenoms. Sie sind daher nicht vorhersehbar und führen zur ständigen Neu-Entwicklung von zellulären Subpopulationen mit Eigenschaften, die eine erfolgreiche Anwendung von systemischen Therapie-Maßnahmen in der klinischen Behandlung von Karzinomkrankungen sehr erschweren.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Zellen der Endometriumkarzinom-Linie EFE-184 und der Ovarialkarzinom-Linie EFO-27 im Verlauf der in vitro Kultivierung durch FISH-Analysen karyotypisiert. Ziel der Untersuchung war die Charakterisierung von numerischen und strukturellen Chromosomen-Veränderungen während der Langzeit-Kultivierung, deren Ergebnisse zu Aussagen über die genomische Stabilität der untersuchten Tumorzellen führen. Die FISH-Analysen wurden mit den Bänderungsmustern nach Giemsa-Färbung verglichen.

Die untersuchten Einzelzellen der Linie EFE-184 besaßen unterschiedliche Chromosomenzahlen. Das Spektrum der numerischen Aberrationen reichte von nahe-diploid bis zu über 150 Chromosomen pro Metaphase. Bei 5 der 8 untersuchten Subkulturen aus verschiedenen Kultivierungspassagen (Kulturen A, B sowie F, G und H) fanden sich Chromosomenzahlen von 60-85 pro Metaphase. In den übrigen drei Kulturen C, D und E zeigte sich vermehrte Heterogenität der Chromosomenzahl pro Zelle. Die Bestimmung der Chromosomenzahl ist offenbar in starkem Maße von der jeweiligen Präparationstechnik abhängig. In gesonderten Experimenten wurden bei längerer Quellzeit vermehrt numerische Aberrationen unterhalb des Bereichs von 60 bis 85 Chromosomen pro Zelle gefunden, wahrscheinlich bedingt durch Chromosomen-Verlust beim Chromosomen-Spreitungsvorgang während der Präparation. Bei wiederholter Trypsinierung derselben Monolayer-Kultur ergab sich eine weitgehend ähnliche Verteilung der Chromosomenzahl pro Metaphase. Auch Zellen des Klons J-5 besaßen ein relativ breites Spektrum der Chromosomen-Verteilung im Bereich zwischen 60 und 85 pro Zelle, obwohl nach Klonierung und Hochzüchtung aus einer Einzelzelle dieselbe Chromosomenzahl in allen Tochterzellen zu erwarten wäre.

In eingehenden FISH-Analysen mit Painting-Sonden wurden die in vorhergehenden Untersuchungen durch G-Bänderung beschriebenen strukturellen Chromosomenaberrationen bei EFE-184 Zellen weitgehend bestätigt. Bei 7 von 9 beschriebenen Translokationen ließen sich die nach G-

Bänderung aufgefundenen Bruchpunkte durch Verwendung der jeweiligen FISH-Painting-Sonden reproduzieren. Den anhand der G-Bänderung bestimmten 6 Marker-Chromosomen mit Deletionen entsprachen 4 in den FISH-Analysen. Das in einer früheren Untersuchung als iso9q bestimmte Marker-Chromosom wurde in einer J-5 Metaphase gefunden, und zusätzlich stellte sich in der FISH-Analyse einer anderen J-5 Metaphase ein iso9p heraus. Eine andere Ausnahme war M7, das in der früheren Untersuchung nicht identifiziert werden konnte, und das in dieser Arbeit als del(9)(q21) bestimmt wurde. Weiterhin wurde das frühere Derivat von M7 (M7* = del M7) als del(9)(q21-qter) erkannt, das in den hier untersuchten Metaphasen mit einem unbekanntem Chromosomen-Fragment rekombiniert war. Als weitere Ausnahmen wurden zwei neue Marker-Chromosomen bei EFE-184 Zellen identifiziert: del(5) sowie t(9;?)(p24;?). Hinsichtlich der strukturellen Aberrationen ergaben sich keine auffallenden Unterschiede zwischen den parental EFE-184 Zellen und Klon J-5.

Die mit Zellen der Linie EFO-27 durchgeführten FISH-Analysen haben bestätigt, daß die in früheren Untersuchungen durch G-Bänderung (**Kunzmann & Hölzel**, 1987) bestimmten Marker-Chromosomen 1-3 in Zellen der Kultur-Passagen 82 und 89 tetrasom auftreten. Zwei der durch die G-Bänderung definierten Deletionen wurden in den FISH-Analysen ebenfalls gesehen (M1 und M3). In EFO-27 Zellen der Kulturpassage 82 wurde das X-Chromosomen-Fragment detektiert, das in Passage 179 der Zellkultivation bei den früheren Untersuchungen mit Chromosom 2 rekombiniert als Marker 2 bestimmt wurde. Das kürzere Fragment X(q12-pter) ließ sich in der FISH-Analyse dem Marker M1 zuordnen.

Die Ergebnisse der FISH-Analysen haben gezeigt, daß die mehr als 10 Jahre zuvor durchgeführten G-Bänderungen bis auf wenige Ausnahmen zur nahezu korrekten Identifizierung von Marker-Chromosomen bei beiden Zelllinien geführt hatten. Die vorliegende Arbeit stellt erneut die chromosomale Instabilität als wichtigen Parameter der Selektion von malignen Zellpopulationen heraus.

6. Literaturverzeichnis

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Robert K., Watson J.D. 1990.

Molekularbiologie der Zelle. VCH Verlag, Weinheim, Basel, New York.

Arlt M.F., Herzog T.J., Mutch D.G., Gersell D.J., Liu H., Goodfellow P.J. 1996.

Frequent deletion of chromosome 1p sequences in an aggressive histologic subtype of endometrial cancer. Hum Mol Genet 5: 1017-1021.

Bale A.E., Li F.P. 1997.

Principles of cancer management: Cancer genetics. In : Cancer Principles & Practice of Oncology. DeVita V.T.Jr., Hellman S., Rosenberg S.A. (eds.). Vol.1, 14; 5th Ed.; Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. pp 285-293.

Bardi G., Pandis N., Schousboe K., Hoelund B., Heim S. 1995.

Near-diploid karyotypes with recurrent chromosome abnormalities characterize early-stage endometrial cancer. Cancer Genet Cytogenet 80: 110-114.

Bentz M., Döhner H., Lichter P. 1996.

Allgemeine Tumordiagnostik: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. In: Onkologie. Zeller W.J., zur Hausen H. (eds.). Ecomed Verlag, Landsberg / Lech. pp 1-18.

Bevilacqua R.A., Nunes D.N., Stroum M., Anker P. 1998.

The use of genetic instability as a clinical tool for cancer diagnosis. Semin Cancer Biol 8(6): 447-453.

Boveri T. 1907.

Zellstudien VI: Die Entwicklung dispermer Seeigeleier. Ein Beitrag zur Befruchtungslehre und zur Theorie der Kernes. Zeitschr Naturwiss 43: 1-293.

Boveri T. 1914.

Zur Entstehung der Tumoren. Fischer Verlag. Jena.

Buselmaier W., Tariverdian G. 1999.

Humangenetik. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Cahill D.P., Kinzler K.W., Vogelstein B., Lengauer C. 1999.

Genetic instability and darwinian selection in tumours. Trends Cell Biol. 9: M57-60.

Cairns J. 1987.

Das Krebsproblem. In: Krebs - Tumoren, Zellen, Gene. Schirmacher V. (ed.). Spektrum der Wissenschaft Verlag, Heidelberg. pp10-21.

Coleman W.B., Tsongalis G.J. 1999.

The role of genomic instability in human carcinogenesis. Anticancer Res. 19(6A): 4645-4664.

Cottier H. 1980.

Pathogenese. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Davis L.G., Dibner M.D., Battey J.F. 1986.

Basic Methods in Molecular Biology. Elsevier, Inc., New York.

de Vivie, J. 1998.

BrdU-Replikationsbänder aus unterschiedlichen Zeiten der DNA-Synthesephase bei Chromosomen humaner Lymphozyten und Tumorzellen. Dissertation Fachbereich Medizin, Universität Hamburg.

Dietel M., Bodecker R., Arps H., Bahnsen J., Hölzel F. 1985

Borderline-Tumoren des Ovars. Neue Aspekte zur morphologischen Prognosebestimmung. Geburtsh. Frauenklinik. 45: 213-219.

Duesberg P., Rausch C., Rasnick D., Hehlmann R. 1998.

Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy. Proc Natl Acad Sci USA 95(23): 13692-13697.

Duke R.C., Ojcius D.M., Young J.D. 1997.

Die Apoptose - Regeln und Fehler beim Zellselbstmord. Kunkel A. (ed.). Spektrum der Wissenschaft Verlag, Heidelberg. pp 26-35.

Dutrillaux B. 1995.

Pathways of chromosome alteration in human epithelial cancers. Adv Cancer Res 67: 59-82.

Erbar P. 1994.

Onkologie. Schattauer-Verlag, Stuttgart.

Ferrer-Roca O., Perez-Gomez J.A., Cigudosa J.C., Gomez E., Estevez M. 1998.

Genetic heterogeneity of benign thyroid lesions. Static and flow cytometry, karyotyping and in situ hybridization analysis. Anal Cell Pathol 16(2): 101-110.

Flemming W. 1877.

Zellsubstanz, Kern- und Zellteilung. Chromosomen in sich teilenden Tumorzellen. Vogel Verlag, Leipzig.

Fujino T., Risinger J.I., Collins N.K., Liu F.-S., Nishii H., Takahashi H., Westphal E.-M., Barrett J.C., Sasaki H., Kohler M.F., Berchuck A., Boyd J. 1994.

Allelotype of endometrial carcinoma. Cancer Res 54: 4294-4298.

Ganten D., Ruckpaul K. 1997.

Molekular- und Zellbiologische Grundlagen. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Greven K.M., Corn B.W. 1997.

Endometrial Cancer. Curr Probl Cancer, 21(2): 67-127.

Haagedoorn E.M.L., Oldhoff J., Bender W., Clarke W.D., Sleijfer D.Th. 1996.

Basiswissen Onkologie. Ullstein Mosby, Berlin, Wiesbaden.

Hanahan D., Weinberg RA. 2000.

The hallmarks of cancer. Cell 100: 57-70.

Hienz H.A. 1971.

Chromosomen - Fibel: Einführung in die klinische Zytogenetik für Ärzte und Studenten. Thieme Verlag, Stuttgart.

Hölzel F., Kunzmann R., Simon W.E. 1990.

Causes of heterogeneity and development of resistance to therapy in gynecological carcinomas. Zuckschwerdt Verlag, München, Bern, Wien, San Francisco. pp 505-513.

Hülkamp T. 2000.

DNA-Fingerprint-Analysen mit "multi-locus"-Sonden bei DNA aus humanen Tumorzelllinien. Dissertation Fachbereich Medizin, Universität Hamburg.

Ketter R., von Ballestrem C.L., Lampel S., Seitz G., Zang K.D., Romanakis K., Wullich B. 1995.

Rearrangement of chromosome 1 is a frequent finding in endometrial carcinoma. Cancer Genet Cytogenet 81: 109-114.

Khouri I., Sanchez FG., Deisseroth A. 1997.

Molecular Biology of the Leukemias. In: Cancer Principles & Practice of Oncology. DeVita V.T.Jr., Hellman S., Rosenberg S.A. (eds.). Vol 2, 45; 5th Ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. pp. 2285-2287.

Knippers R. 1997.

Molekulare Genetik. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Kunzmann R., Hölzel F. 1987.

Karyotype alterations in human ovarian carcinoma cells during long-term cultivation and nude mouse passage. *Cancer Genet Cytogenet* 28: 201-212.

Le Beau MM. 1997.

Molecular Biology of Cancer. In : *Cancer Principles & Practice of Oncology*. DeVita V.T.Jr., Hellman S., Rosenberg S.A. (eds.). Vol 1, 5; 5th Ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. pp 103-119.

Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B. 1998.

Genetic instability in human cancers. *Nature* 396: 643-649.

Levi F., Lucchini F., La Vecchia C., Negri E. 1999.

Trends in mortality from cancer in the European Union, 1955-94. *The Lancet* 354: 742-743.

Lichter P., Ward D.C. 1990.

Is non-isotopic in situ hybridization finally coming of age? *Nature* 345: 93-95.

Loeb L.A., Springate C.F., Battula N. 1974.

Errors in DNA replication as a basis of malignant changes. *Cancer Res* 34: 2311-2321.

Marmur J. 1961.

A procedure for the isolation of DNA from microorganismus. *J Mol Biol* 3: 208-216.

Mitelman F. 1983.

Catalogue of chromosome aberrations in cancer. *Cytogenet Cell Genet* 36: 1-515.

Milatovich A., Heerema N.A., Palmer C.G. 1990.

Cytogenetic studies of endometrial malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* 46: 41-54.

Nagata S. 1997.

Apoptosis by death factor. *Cell* 88(3): 355-365.

Nägeli K. 1842.

Zur Entwicklungsgeschichte der Pollen. Zürich.

Nollau P., Rau T., Kunzmann R., Hölzel F. 1990.

Amplification of c-myc oncogene and chromosomal rearrangements in human carcinoma cells. 15th Int. Cancer Congress. Hamburg (Abstr. A2.070.09).

Nollau P. 1991.

Genomische Struktur und Expression von myc und ras Protoonkogenen in Zelllinien aus menschlichen Karzinomen. Dissertation Fachbereich Medizin, Uni. Hamburg.

Nowell P.C. 1976.

The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194: 23-28.

Peiffer S.L., Herzog T.J., Tribune D.J., Mutch D.G., Gersell D.J., Goodfellow P.J. 1995.

Allelic loss of sequences from the long arm of chromosome 10 and replication errors in endometrial cancers. *Cancer Res* 55: 1922-1926.

Pere H., Tapper J., Wahlström T., Knuutila S., Butzow R. 1998.

Distinct chromosomal imbalances in uterine serous and endometrioid carcinomas. *Cancer Res* 58: 892-895.

Pihan G.A., Doxsey S.J. 1999.

The mitotic machinery as a source of genetic instability in cancer. *Semin Cancer Biol* 9(4):289-302.

Pinkel D., Gray J.W., Trask B., van den Engh G., Fuscoe J., van Dekken H. 1986.

Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 51: 151-157.

Riede U.N. 1989.

Störungen des Zellwachstums. In: *Allgemeine und Spezielle Pathologie*. Riede U.N., Schaefer H.E., Wehner H. (eds.). Thieme Verlag, Stuttgart. pp 286-339.

Robb J.A. 1970.

Microcloning and replica plating of mammalian cells. *Science* 170: 857-858.

Rubin E., Farber J.L. 1988.

Chromosomal abnormalities. In: *Pathology*. Rubin E., Farber J.L. (eds.). Lippincott, Philadelphia. pp 210-214.

Sager R. 1997.

Expression genetics in cancer: Shifting the focus from DNA to RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(3): 952-955.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989.

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Vol 2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY. pp 9.14-9.23.

Schirmacher V. 1987.

Vorwort und Einführung. In: *Krebs - Tumoren, Zellen, Gene*. Schirmacher V. (ed.). Spektrum der Wissenschaft Verlag, Heidelberg. pp 7-8.

Schmutte C., Fishel R. 1999.

Genomic instability: First step to carcinogenesis. *Anticancer Res* 19: 4665-4696.

Seabright M. 1971.

A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2: 971-972.

Shah N.K., Currie J.L., Rosenshein N., Campbell J., Long P., Abbas F., Griffin C.A. 1994.

Cytogenetic and FISH analysis of endometrial carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 73: 142-146.

Simon W.E., Hölzel F. 1979.

Hormone sensitivity of gynecological tumor cells in tissue culture. *J Cancer Res Clin Oncol* 94: 307-323.

Simon W.E., Albrecht M., Hänsel M., Dietel M., Hölzel F. 1983.

Cell lines derived from human ovarian carcinomas. *J Natl Cancer Inst USA*, 70: 839-845.

Soost H.J., Baur S. 1990.

Gynäkologische Zytodiagnostik. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Statistik der Städtischen Gesundheitsbehörden in der VR China, Beijing, 1999.

Strachan T. & Read AP. 1996.

Human Molecular Genetics. Bios Scientific Publications, Oxford.

Strassburger E. 1875.

Zellbildung und Zellteilung. Fischer Verlag, Jena.

Sutton W.S. 1903.

The chromosomes in heredity. *Biol Bull* 4: 231-251.

Tibiletti M.G., Bernasconi B., Taborelli M., Furlan D., Fabbri A., Franchi M., Taramelli R., Trubia M., Capella C. 1997.

Involvement of chromosome 6 in endometrial cancer. *Br J Cancer* 75(12): 1831-1835.

Tjio J.H., Levan A. 1956.

The chromosome number in man. *Hereditas* 42: 1-6.

Traut W. 1991.

Chromosomen. Klassische und molekulare Cytogenetik. Springer, Berlin.

Trent JM. 1980.

Cytogenetic analysis of human tumor cells cloned in agar. in: Cloning of Human Tumor Stem Cells. SE Salmon, (ed.). Alan R. Liss, New York, pp. 165-178.

Trichopoulos D., Petridou E., Lipworth L., Adami H.-O. 1997.

Epidemiology of Cancer. In : Cancer Principles & Practice of Oncology. DeVita V.T.Jr., Hellman S., Rosenberg S.A. (eds.). Vol. 1, 12; 5th Ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. pp 231-257.

Wagener C. 1996.

Molekulare Onkologie. Thieme Verlag, Stuttgart.

Waldeyer H.W.G. 1888.

Über Karyokinese und ihre Beziehung zu den Befruchtungsvorgängen. *Arch Mikr Anat* 32: 1.

Weiss M.M., Hermsen M.A., Meijer G.A., van Grieken N.C., Baak J.P., Kuipers E.J., van Diest P.J. 1999.

Comparative genomic hybridisation. *Mol Pathol* 52(5): 243-251.

Whang-Peng J., Lee EC., Kao-Shan CS., Seibert K., Lippman M. 1983

Cytogenetic studies of human breast cancer lines: MCF-7 and derived variant sublines. *J Natl Cancer Inst* 71: 687-695.

Willett W.C., Colditz G.A., Müller N.E. 1997.

Strategien zur Krebsprävention. In: Krebsmedizin. Beginnen K. (ed.). Spektrum der Wissenschaft Verlag, Heidelberg. pp 34-40.

Wyllie AH., Kerr GF., Currie AR. 1980.

Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytoll.* 68: 251-306.

Yamasaki H., Mironov N. 2000.

Genomic instability in multistage carcinogenesis. *Toxicol Lett* 112-113: 251-256.

Yunis J., Chandler M.E. 1977.

High-resolution chromosome analysis in clinical medicine. *Proc Clin Pathol* 7: 267-288.

Yunis J. 1981.

Chromosomes and cancer: New nomenclature and future directions. *Hum Pathol* 12: 449-503.

Yunis J. 1982.

Comparative analysis of high-resolution chromosome techniques for leukemic bone marrows. *Cancer Genet Cytogenet* 7: 43-50.

7. DANKSAGUNG

In erster Linie danke ich sehr herzlich meinem Doktorvater Prof. Dr. Fritz Hölzel für die freundliche Aufnahme, die interessante Aufgabenstellung und die stetige Unterstützung sowie die intensive Betreuung. Ohne seinen Beistand und seine Beratung wäre diese Arbeit in Form und Inhalt nicht möglich gewesen.

Mein Dank gilt auch den Kolleginnen und Kollegen der Frauenklinik des UKE sowie der Abteilung Molekulare Zellbiologie des Instituts für Medizinische Biochemie; dabei möchte ich besonders Frau Dipl.- Biol. Simone Aversch und Herrn Tim Hülskamp hervorheben.

Besonderer Dank geht an dieser Stelle an meine Eltern, die mit ihrer liebevollen Unterstützung den Weg freimachten und mir die Kraft gaben, um diese Arbeit erfolgreich zu beenden.

爸爸妈妈，你们是我的坚强后盾，感谢你们的全力支持。我永远爱你们！

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	ZHENG, Jian
Geschlecht	weiblich
Geburtsdatum	31. Juli 1959
Geburtsort	Beijing, VR China
Staatsangehörigkeit	chinesisch
Anschrift	Stresemannstraße 39, D-76187 Karlsruhe

Schulbildung

Nov. 1967 - Jan. 1972	Grundschule, Beijing.
Feb. 1972 - Jan. 1977	Gymnasium, Beijing.
Sep. 1978 - Juli. 1983	Studium im Fachbereich Medizin an der zweiten medizinischen Armee-Universität in Shanghai.
Sep. 1985 - Juli. 1987	Aufbaustudium im Fachbereich Klinische Medizin am Univ.-Krankenhaus Changzhen in Shanghai.

Berufliche Weiterbildung & Tätigkeiten

Jan. 1977 - Sep. 1978	Ausbildung zur Krankenschwester am Kong-jun-Krankenhaus in Beijing.
Juli. 1983 - Sep. 1990	Stationsärztin und Oberärztin in der Abt. Gynäkologie & Geburtshilfe am Univ.-Krankenhaus Changzhen, in Shanghai.
Okt. 1992 - Mär. 1995	Gastärztin an der Frauenklinik des Univ.-Krankenhaus Eppendorf, in Hamburg.
Mär. 1995 – Dez. 2000	Promotionsarbeit bei Prof. Dr. F. Hölzel in der Abt. Molekulare Zellbiologie des Instituts für Medizinische Biochemie und der Frauenklinik des UKE.

9. Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die Promotionsarbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die Arbeit wurde an keiner anderen Stelle eingereicht.

Hamburg, den 20.07.2001

Jian Zheng