Analyse von Chromosomenaberrationen disseminierter Prostatakarzinomzellen im Knochenmark auf Einzelzellebene mittels einer kombinierten Immunzytochemie und Dreifarben Interphase Fluoreszenz–in–situ–Hybridisierung

Christiane Simone Reindl

Aus dem Institut für Immunologie der Universität München
Vorstand: Professor Dr. med. G. Riethmüller (bis 01.10.2002)
Komissarisch: Professor Dr. rer. nat. T. Brocker

Analyse von Chromosomenaberrationen disseminierter Prostatakarzinomzellen im Knochenmark auf Einzelzellebene mittels einer kombinierten Immunzytochemie und Dreifarben Interphase Fluoreszenz–in–situ–Hybridisierung

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

vorgelegt von
Christiane Simone Reindl
aus Starnberg
2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Professor Dr. K. Pantel
Mitberichterstatter:	Professor Dr. U. Löhrs
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. E. Putz
Dekan:	Professor Dr. med. Dr. h.c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	10.04.2003

Meinen Eltern und Andreas

Inhalt

		Seite
	Verzeichnis der Abkürzungen	**3**
1.	**Einleitung**	**5**
2.	**Material und Methoden**	**13**
2.1	Materialgewinnung	13
2.2	Aufarbeitung der Knochenmarkaspirate und Herstellung von Zellkulturen	13
2.3	Zelllinien und Primärkulturen	16
2.4	Immunzytochemische Färbung	17
2.4.1	Kontrollen der immunzytochemischen Färbung	20
2.5	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	22
2.5.1	Vorbereitung der gefärbten Präparate	23
2.5.2	Vorbereitung der DNA-Sonden	24
2.5.2.1	Nick-Translation	25
2.5.2.2	DNA-Fällung	27
2.5.3	Hybridisierung	28
2.5.3.1	Denaturierung der Proben-DNA	28
2.5.3.2	Denaturierung der Objektträger	28
2.5.3.3	Auftragen der Probe	28
2.5.4	Nachweis der Hybridisierung	29
2.5.5	Auswertung	30
2.6	Herstellung von Metaphase-Präparaten	30
3.	**Ergebnisse**	**33**
3.1	Kontrollgruppen	33
3.2	Auswertung der Zelllinien	36
3.3	Auswertung der Primärkulturen	42
3.4	Veränderungen der Zelllinie PC-E1 im Verlauf verschiedener Passagen	49
3.5	Vergleich von Zytokeratin-positiven und Zytokeratin-negativen Zellen	51

3.5.1 Zytokeratin-negative Zellen von Primärkulturen 51
3.5.2 Zytokeratin-negative Zellen von Zelllinien 54

4. **Diskussion** **56**
4.1 Aberrationen aller untersuchten Chromosomenlokalisationen 56
4.1.1 Veränderung von Chromosom 8 57
4.1.1.1 Veränderungen der Chromosomenlokalisation 8p 58
4.1.1.2 Veränderungen der Chromosomenlokalisation 8q 59
4.1.2 Veränderung von Chromosom 6 61
4.1.2.1 Veränderungen der Chromosomenlokalisation 6p 61
4.1.3 Vergleich der chromosomalen Veränderungen im Verlauf von Primärkultur, Nachpunktat und Zelllinie anhand von PC-E1 p1, PC-E1-nach p1 und PC-E1 p23 63
4.2 Heterogenität der Tumorzellen 64
4.3 Zytokeratinexpression von Tumorzellen 68

5. **Zusammenfassung** **70**

6. **Anhang** **72**
6.1 Berechnung der dreifachen Standardabweichung 72
6.2 Auswertung der Zelllinien 73
6.3 Auswertung der Primärkulturen 78
6.4 Auswertung Zytokeratin-negativer Zellen zweier Primärkulturen 88
6.5 Auswertung von Metaphasen von PC-E1 p23 89

7. **Literaturverzeichnis** **90**

Danksagung **103**
Lebenslauf **105**

Verzeichnis der Abkürzungen

AB-Serum	Serum der Blutgruppe AB
ANC	Average number of copies
Aqua bidest.; aqua dest.	Aqua bidestillata; aqua destillata
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	(zu RNA) komplementäre DNA
CEPH	Centre d´Etudes du Polymorphisme Humaine
CGH	Comparative Genomhybridisierung
CK	Zytokeratin
CK+; CK-	Zytokeratin-positiv; Zytokeratin-negativ
Cy3, Cy3,5	Cyanin-Farbstoffe
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukletidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
FCS	Fötales Kälberserumalbumin
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Ig	Immunglobulin
LOH	Loss of Heterocygosity
M	Molar
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
p	Passage
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphat-Saline-Puffer
PC	Prostatakarzinom
PCR	Polymerasekettenreaktion
PSA	Prostata spezifisches Antigen
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

rpm	rounds per minute
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	Sodiumchlorid-Sodiumcitrat-Lösung
SV 40	Simian Virus 40
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
YAC	Yeast Artificial Chromosome

1. Einleitung

Das Prostatakarzinom ist in Deutschland nach dem Bronchialkarzinom der zweithäufigste maligne Tumor des Mannes. Unter den urologischen Tumoren stellt es die häufigste Todesursache dar. Gleichzeitig ist es die häufigste durch Malignome bedingte Todesursache ab dem 80. Lebensjahr. In Deutschland versterben jährlich etwa 10000 Männer an den Folgen eines Prostatakarzinoms. Die Inzidenzrate des Prostatakarzinoms ist altersabhängig. Sie liegt in der Gruppe der 60-jährigen bei 50/100000 und steigt im Lebensalter von 75-85 Jahren bis auf mehr als 400/100000 (Hölzel et al. 1991).
Klinisch ist das Prostatakarzinom häufig symptomlos. Beschwerden wie Dysurie, Hämaturie, erektile Dysfunktion, Harnstau oder Urämie treten meist erst in einem späten Tumorstadium auf. Manchmal führen auch metastasenbedingte Symptome wie Knochenschmerzen als Erstmanifestation zur Entdeckung des Primärtumors. Durch verbesserte diagnostische Möglichkeiten wie die Vorsorgeuntersuchung und die Bestimmung des Prostata spezifischen Antigens (PSA) wurde eine bessere Früherkennung möglich (Gann et al. 1995, Catalona et al. 1993, Brawer et al. 1993). Prognostisch spielen die Tumorausdehnung und der Differenzierungsgrad des Gewebes eine entscheidende Rolle. Die Metastasierung erfolgt primär in das Skelettsystem, gefolgt von den juxtaregionären Lymphknoten, seltener sind Leber oder Lunge betroffen.
Für die klinische und pathologische Einteilung des Prostatakarzinoms, vornehmlich die Klassifizierung der Tumorausbreitung, findet in erster Linie die TNM-Klassifikation Anwendung (Tumor, Noduli, Metastasen). Seltener wird die Stadieneinteilung nach dem American Joint Committee on Cancer (AJCC) oder die Jewett-Klassifikation verwendet. Für die Klassifizierung der histologischen Differenzierung, das sog. Grading, existieren drei verschiedene Systeme. Das WHO-Grading, die Einteilung nach Gleason und das Grading nach den Empfehlungen des Pathologischen-urologischen Arbeitskreises „Prostatakarzinom“. Die Einteilung nach Gleason wird am häufigsten angewendet. Histopathologisch stellt das Adenokarzinom den häufigsten Subtyp des Prostatakarzinoms dar.

Zur Therapie des frühen Prostatkarzinoms liegen noch keine großen, randomisierten und kontrollierten Studien vor. Bisher stehen drei mögliche Therapieoptionen zur Auswahl, nämlich die radikale Operation, die Radiatio oder das Einnehmen einer abwartenden Haltung. Die Entscheidung für eine der Therapieoptionen erfolgt in Anbetracht der Gesamtsituation des Patienten unter Berücksichtigung von Alter und Komorbidität.

Im Vordergrund steht bei jüngeren Männern mit lokal begrenzten Tumoren (pT1/2 N0 M0) ein kurative Zielsetzung in Form einer radikalen Prostatektomie. Bei älteren Männern oder hohem Operationsrisiko wird auch die Strahlentherapie angewendet. Bei lokoregionär fortgeschrittenen Karzinomen wird neben einer lokalen Therapie, wie radikale Prostatektomie oder Bestrahlung, zusätzlich eine ablative Hormontherapie empfohlen (Wirth et al. 2001, Pilepich et al. 1997, Bolla et al. 1997). In allen Fällen von metastasierten Prostatakarzinomen stehen palliative Therapiemaßnahmen im Vordergrund.

Die Ätiologie des Prostatakarzinoms ist nach wie vor nicht geklärt. Multifaktorielle Einflüsse sind sehr wahrscheinlich. Als wichtigste potentielle Risikofaktoren gelten Alter, Ernährung sowie ethnische und genetische Faktoren (Pienta et al. 1993). Das Alter stellt den wichtigsten Risikofaktor dar, da, wie bereits oben erwähnt, die Inzidenzrate des Prostatakarzinoms mit zunehmenden Alter ansteigt (Hankey et al. 1999). Bezüglich der Ernährung scheint möglicherweise der Fettaufnahme eine Rolle als Risikofaktor zuzukommen. So scheint sich eine hohe Aufnahme tierischer Fette negativ auszuwirken, wohingegen die Aufnahme von Fisch mit einem hohen Anteil an Omega-3-Fettsäuren positiv gewertet wird (Pienta et al. 1993, Gann et al. 1994, Terry et al. 2001).
Die Inzidenz des Prostatakarzinoms variiert zwischen unterschiedlichen ethnischen Gruppen. Afroamerikaner sind häufiger betroffen und haben meist eine schlechtere Prognose als Patienten mit weißer Hautfarbe. Möglicherweise spielen hierbei sozioökonomische Gesichtspunkte und genetische Faktoren eine entscheidende Rolle (Hoffman et al. 2001, Krongrad et al. 1996, Powell et al. 1999). Ein familiär gehäuftes Auftreten des Prostatakarzinoms lässt eine genetische Prädisposition vermuten. So konnte in einer Fall-Kontroll-Studie ein vermehrtes Auftreten des Karzinoms bei den Männern festgestellt werden, deren Väter oder Brüder ebenfalls erkrankt waren (Keetch et al. 1995). Weiter konnte ein Trend zu einer steigenden Inzidenz in Familien gezeigt werden, in denen zwei oder drei Verwandte ersten Grades betroffen waren (Steinberg et al. 1990). Eine skandinavische Zwillingsstudie führt 42% des Risikos an einem Prostatakarzinom zu erkranken auf hereditäre Faktoren zurück (Lichtenstein et al. 2000).
Zur Aufklärung der Pathogenese und dem Verständnis der Tumorprogression standen immer wieder genetische Veränderungen von Prostatakarzinomzellen im Mittelpunkt wissenschaftlicher Forschung. In den letzten Jahren gewannen unter anderem numerische Aberrationen für die Chromosomen 1, 7, 8 und 10 besonders an Bedeutung. Neben einer Aneusomie für Chromosom 7 wird vor allem dem Verlust des kurzen Armes von Chromosom

8 (8p) sowie einem Zugewinn des langen Armes von Chromosom 8 (8q) eine Korrelation mit dem klinischen Schweregrad der Tumorerkrankung zugeschrieben (Brothman et al.1996, Bright et al. 1997, Macintosh et al. 1998, König et al. 1999, Virgin et al. 1999). Zusätzlich wird die Mutation oder Deletion der Tumorsuppressorgene PTEN und KLF6 auf Chromosom 10 in der Pathogenese des Prostatakarzinoms diskutiert (Narla et al. 2001, Cairns et al. 1997, Di Cristofano et al. 2001). Vermutlich sind jedoch multiple genetische Veränderungen an der Pathogenese des Prostatakarzinoms beteiligt.

Neben den genetischen Veränderungen des primären Tumorgewebes wurde die Aufmerksamkeit der Wissenschaft mit dem Verständnis der „minimalen residualen Erkrankung“ auch auf disseminierte Tumorzellen in Lymphknoten oder im Knochenmark gelenkt. Das Stadium der „minimalen residualen Erkrankung“ beschreibt das Vorkommen einzelner Zellen des malignen Tumors in Sekundärorganen, auch nach einer therapeutischen Intervention. Initial fand der Terminus bei hämatologisch malignen Erkrankungen Anwendung, inzwischen wird er jedoch auch bei soliden Tumoren verwendet. Hierbei eignet sich der Begriff der Mikrometastasierung weniger, da dieser implizieren würde, dass jede der disseminierten Zellen die Fähigkeit besitzt, zu einer soliden Metastase auszuwachsen. Dies ist jedoch nicht der Fall. Das heutige Verständnis von Tumorzellmetastasierung kann nach folgendem Modell beschrieben werden (Dorudi et al. 1993, Liotta et al. 1991, Tarin et al. 1985, Zetter et al. 1990): Im Verlauf des Tumorwachstums werden einzelne Tumorzellen durch Proteolyse vom primären Tumorverband abgespalten, durchdringen die Basalmembran und gelangen in das Gefäßsystem. Ein großer Teil der Tumorzellen geht dort vermutlich zu Grunde. Einzelne Tumorzellen werden mit dem Blutstrom verschleppt, ihnen gelingt die Adhäsion an der kapillären Gefäßwand und die Invasion in ein neues Zielorgan. Gelingt einer derartigen Zelle nun die Entwicklung eines neuen Zellverbandes mit dem Aufbau einer Gefäßversorgung, so wächst sie zu einer Metastase aus. Allerdings entwickeln sich nicht aus allen disseminierten Tumorzellen Metastasen. Die frühdisseminierten Tumorzellen bleiben während des Stagings meist unentdeckt. Nach der tumor-dormancy-Theorie „schlummern“ diese Zellen im Zell-Zyklus-Arrest beispielsweise im Knochenmark (Pantel et al. 1993), bis ein auslösendes Ereignis erneut die Zellproliferation und Angiogenese anregt. Ist dies geschehen, so erfolgt eine weitere Streuung von Tumorzellen und das Wachstum von Fernrezidiven. Weitgehend ungeklärt sind bisher die dormancy-induzierenden Faktoren einerseits und andererseits die Latenzzeit bestimmenden Faktoren, in der die disseminierten Zellen im überwiegend nicht mitotischen Zustand im Knochenmark verweilen. Hier könnte

eine genauere Charakterisierung und Analyse der frühdisseminierten Tumorzellen zum besseren Verständnis der Metastasierung beitragen.

Im klinischen Alltag hat die Überprüfung auf disseminierte Karzinomzellen im Knochenmark im Rahmen des sog. Staging noch keinen Eingang gefunden. Der Nachweis einzelner disseminierte Karzinomzellen gelingt bisher weder durch hochauflösende bildgebende diagnostische Verfahren noch durch herkömmliche histopathologische Methoden. Zum Auffinden disseminierter Tumorzellen im Knochenmark dienen in erster Linie zwei Methoden: die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR), die tumorspezifische RNA nachweisen kann, und die Immunzytochemie. Der immunzytochemische Nachweis bietet sich für Tumorzellen epithelialen Ursprungs an. Die wesentliche Rolle kommt hierbei dem Zytokeratin (CK) zu. Es handelt sich dabei um ein integriertes Protein des Zytoskeletts, das in epithelialen Zellen relativ konstant exprimiert wird, in mesenchymalen Zellen des Knochenmarks jedoch nicht zu finden ist (Schlimok et al. 1987). ***Pantel et al.*** (1994) beschrieben bei Karzinompatienten eine Nachweisrate von einer Zytokeratin-positiven Zelle unter 10^6 Knochenmarkszellen. ***Schlimok et al.*** (1987) und ***Oberneder et al.*** (1994) konnten im Knochenmark von Nicht-Tumorpatienten keine Zytokeratin-positiven Zellen nachweisen. ***Pantel et al.*** (1996) hingegen beschrieben das Vorkommen Zytokeratin-positiver Zellen bei Patienten ohne bekanntes Karzinom mit 2,5-5%. Weder Herkunft noch Bedeutung der Zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark gesunder Kontrollpersonen sind bis heute geklärt.

Bemerkenswert ist, dass disseminierte Tumorzellen im Knochenmark nicht nur bei den Tumorentitäten gefunden werden, die für eine skelettale Metastasierung bekannt sind, wie z.B. Prostata-, Mamma- oder Bronchialkarzinom, sondern auch bei denjenigen Tumoren, die typischerweise höchst selten Knochenmarkmetastasen bilden, wie beispielsweise das Kolonkarzinom. Die Häufigkeiten, mit denen Zellen von verschiedenen epithelialen Tumoren in einem frühen klinischen Stadium im Knochenmark gefunden werden, sind annähernd gleich, so dass eine tumorspezifische Endothelzelladhäsion des Knochenmarks unwahrscheinlich erscheint. Möglicherweise besitzen aber beispielsweise Mamma- und Prostatakarzinomzellen einen besonderen Selektionsvorteil im Knochenmark, der sie im Sinne der „seed-and-soil“-Theorie befähigt, Skelettmetastasen auszubilden. Zwischen den disseminierten Zellen im Knochenmark der verschiedenen Tumorentitäten sind deutliche Unterschiede in der Phänotypisierung beschrieben. So findet sich die Expression von erbB2 Onkogen an disseminierten Tumorzellen im Knochenmark von Mammakarzinomen

signifikant häufiger als an disseminierten Kolonkarzinomzellen (Pantel et al. 1993). Gleichzeitig stellt die Expression von erbB2 Onkogen, bzw. $p185^{erbB2}$ Onkoprotein an disseminierten Zytokeratin-positiven Mammakarzinomzellen einen unabhängigen negativen Prognosefaktor für den Krankheitsverlauf der Patientinnen dar (Braun et al. 2001). An disseminierten Mammakarzinomzellen fand sich ebenfalls signifikant häufiger als an disseminierten Kolonkarzinomzellen ein Verlust des major histocompatibility complex (MHC) Klasse I Molekül (Pantel et al. 1991). Eine Akkumulation von p53 Protein oder eine Mutation des p53 Tumorsupressorgens wurde interessanterweise nicht häufig in disseminierten Tumorzellen im Knochenmark detektiert, selbst wenn die Primärtumore derartige Veränderungen aufwiesen (Offner et al. 1999). *Putz et al.* (1999) beschrieben in Phänotypisierungsexperimenten an SV 40 immortalisierten Zelllinien disseminierter Karzinomzellen die Expression von Metastasen assoziierten Adhäsionsmolekülen. Insbesondere die Untereinheiten $\mathbf{b}_1$, $\mathbf{b}_3$ und $\mathbf{a}_{v,}$ MUC18/MCAM, ICAM-1 und LFA-3 aus der Immunglobulin Familie sowie CD44 konnten an allen Zelllinien detektiert werden. *Klein et al.* (2002) fanden in Einzelzelluntersuchungen eine hohe Rate von EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer; CD 147) Expression an disseminierten Karzinomzellen.

Ein prognostischer Wert für den Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark wurde für Kolon-, Magen-, Mamma-, Nichtkleinzelliges Bronchial-, Oesophagus- und Ovarialkarzinom festgestellt (Lindemann et al. 1992, Schlimok et al. 1991, Jauch et al. 1996, Cote et al. 1991, Pantel et al. 1996, Thorban et al. 1996, Braun et al. 2000 und 2001). *Kubuschok et al.* (1999) beschrieben eine negative Auswirkung auf das Überleben als unabhängigen Prognosefaktor bei Nachweis von disseminierten Tumorzellen in Lymphknoten nach totaler Resektion von Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen. Auch für andere Karzinomentitäten konnte der Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark erbracht werden. Es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob eine prognostische Bedeutung vorliegt. *Oberneder et al.* (1994) entdeckten bei 33% der Patienten mit Prostatakarzinom in einem klinischen Tumorstadium M0 Zytokeratin-positive Zellen im Knochenmark, im Stadium M1 fanden sie eine Anstieg der Inzidenzrate auf 57%. *Solakoglu et al.* (2002) konnten in der Kultur von aspiriertem Knochenmark von Patienten mit Prostatakarzinom nach einer Kulturdauer von 21 bis 102 Tagen eine Zunahme von 23,9% auf 93,5% bezüglich der Zytokeratinpositivität im Vergleich zur Erstuntersuchung des Knochenmarks vor Kultur nachweisen. Bei Patienten im klinischen Stadium M1 betrug die Zytokeratinpositivität nach Kultur sogar 100%.

Oberneder et al. (1994) beschrieben einen signifikanten Zusammenhang zwischen Zytokeratinpositivität und etablierten Risikofaktoren wie lokale Tumorausdehnung, Differenzierungsgrad und Fernmetastasierung. *Pantel et al.* (1995), *Köllermann et al.* (1999) und *Weckermann et al.* (1999) konnten diese Entdeckung nicht bestätigen. Sie fanden weder eine signifikante Korrelation mit der lokalen Tumorausdehnung, noch mit dem Differenzierungsgrad oder der Fernmetastasierung. Ebenso war kein signifikanter Zusammenhang zwischen Zytokeratinpositivität und Ploidie des Tumorgewebes, präoperativen PSA-Spiegel oder postoperativen PSA-Anstieg, als Verlaufsparameter für eine Rezidivfrüherkennung, festzustellen. Tendenziell schienen Patienten mit drei oder mehr Zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark eine schlechtere Prognose zu haben. *Weckermann et al.* (2001) beschrieben bei Verwendung eines Pan-Zytokeratin-Antikörpers zum Nachweis disseminierter Prostatakarzinomzellen im Knochenmark einen Zusammenhang mit einer biochemischen Tumorprogression nach vier Jahren. *Pantel et al.* (1997) entdeckten ein Verschwinden bzw. eine Reduktion Zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark bei Patienten mit Prostatakarzinom unter einer antiandrogenen Therapie.

In diesem Zusammenhang ist ein von *Loh et al.* (1997) beschriebener Fall besonders bemerkenswert. Es handelt sich dabei um eine Herztransplantation eines Spenders mit lokalisiertem Prostatakarzinom. Zehn Monate nach der Organtransplantation entwickelte der Empfänger osteoblastische Metastasen in der Brustwirbelsäule, dem os sacrum sowie in einigen Rippen. Dieser Fall legt eine klinische und prognostische Bedeutung disseminierter Prostatakarzinomzellen nahe. Es handelt sich hierbei keineswegs um einen Einzelfallbericht von Karzinomerkrankung nach Organtransplantation. Mehrere ähnliche Fälle, in denen Organempfänger nach einer Transplantation von scheinbar gesunden Spendern an einem malignen Tumor erkrankten, der posthum z.T. auch bei den Spendern gefunden worden war, sind in der Literatur beschrieben (Riethmüller et al. 2001). Die Latenzzeit bis zum Krankheitsausbruch lag hierbei zwischen wenigen Monaten und mehreren Jahren.

Letztlich kann jedoch bis jetzt keine definitive Aussage über die prognostische Wertigkeit Zytokeratin-positiver Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit Prostatakarzinom gemacht werden. Eine detailliertere Charakterisierung dieser Zellen und größere Folge-Studien könnten hier zur Aufklärung des prognostischen Wertes und zum besseren Verständnis der frühen Disseminierung beitragen. Hinweise zu diesem Verständnis könnten sich aus der genetischen Analyse disseminierter Karzinomzellen ergeben.

Neben der prognostischen Bedeutung sind die disseminierten Tumorzellen als Angriffspunkt und Verlaufsparameter adjuvanter Therapiestrategien besonders interessant. Gerade der ruhende, nicht proliferierende Zustand der disseminierten Tumorzellen (Pantel et al. 1999) scheint sie gegenüber herkömmlichen Chemotherapien, deren Ansatzpunkt in der Proliferationsphase der Zellen liegt, weitgehend resistent zu machen (Braun et al. 2001). Adjuvante Therapieformen, wie z.B. die Immuntherapie, scheinen deshalb sinnvoll, um durch Oberflächenantigene die Zellen nachzuweisen und sie, auch in einem nicht aktiven Zustand, einer Therapie zugänglich zu machen.

Die klinischen Erfahrungen mit einer Antikörpertherapie bei soliden Tumoren in fortgeschrittenen Stadien waren enttäuschend und konnten nur in einzelnen Fällen eine Remission bewirken (Riethmüller et al. 1992). Ursächlich hierfür schien hauptsächlich die große Tumorzellmasse zu sein. In einer randomisierten Studie mit monoklonalem 17-1A-Antikörper als adjuvante Therapie bei Patienten mit kolorektalem Karzinom im Stadium Dukes C zeigte sich eine Wirksamkeit der Antikörpertherapie auf minimal residuale Zellen. Im Fünf-Jahres-Verlauf zeigte sich bei den mit 17-1A behandelten Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion der Letalität sowie der Fernmetastasen. Bezüglich der Lokalrezidive konnte kein Effekt nachgewiesen werden. Auch nach einer siebenjährigen Verlaufsbeobachtung ließen sich die positiven Ergebnisse der Studie weiter bestätigen (Riethmüller et al. 1994 und 1998). ***Punt et al.*** (2002) veröffentlichten eine randomisierte Studie mit 2761 Patienten, in der drei Gruppen mit reseziertem Kolonkarzinom im Stadium III untersucht wurden. Sie bekamen entweder eine herkömmliche Chemotherapie mit Fluorouracil und Folinsäure oder eine Kombination aus der oben genannten Chemotherapie und dem 17-1A Antikörper Edrecolomab oder Edrecolomab alleine. Im Beobachtungszeitraum konnte keine Überlegenheit von Edrecolomab gegenüber der Chemotherapie gezeigt werden. Im Gegenteil war sogar im Vergleich der Monotherapien die krankheitsfreie Überlebenszeit unter 17-1A Antikörper signifikant geringer als unter der Chemotherapie. Auch eine Kombination von Edrecolomab und Chemotherapie erbrachte keinen Vorteil bezüglich Überlebenszeit oder krankheitsfreier Überlebenszeit gegenüber den Monotherapiegruppen. Welcher Stellenwert einer derartigen adjuvanten Therapie in der Klinik zukünftig zukommen wird, werden weitere Studien im Vergleich bzw. in Kombination mit herkömmlichen Chemotherapien zeigen müssen.

Eine besondere Schwierigkeit in der Antikörpertherapie stellt die oft ausgeprägte Heterogenität der disseminierten Tumorzellen dar (Braun et al. 1999), so dass nicht auf allen Zellen die Oberflächenantigene in gleicher Weise exprimiert werden und die Zellen deshalb

auch nicht alle gleich gut einer Antikörperbehandlung zugänglich sind. So werden möglicherweise nach genauer Charakterisierung der Tumorzellen individuell angepasste Antikörpercocktails zur Anwendung kommen müssen.

Zielsetzung

Numerische Aberrationen von Chromosom 6p und 8 scheinen in Korrelation mit einer Progression von Prostatakarzinomen und dem Schweregrad der Tumorerkrankung zu stehen (Brothmann et al. 1996). Disseminierte Prostatakarzinomzellen finden sich in 33% bis 57% im Knochenmark der Patienten. Neben vielen anderen legen diese Daten folgende Fragen nahe:

- Eignet sich die Kombination von Immunzytochemie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung als Methodik zum Nachweis genetischer Veränderungen auf disseminierten Tumorzellen ?
- Zeigen disseminierte Tumorzellen die gleichen genetischen Aberrationen wie die in der Literatur beschriebenen Primärtumore oder weisen die disseminierten Zellen andere Veränderungen auf ?

In der vorliegenden Arbeit sollte die prinzipielle Durchführbarkeit der Kombination von immunzytochemischer Färbung und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Tumorzellen in der Interphase geprüft werden. Gleichzeitig war es Ziel, die Methodik am Institut zu etablieren, um damit weitere Analysen zu ermöglichen. Die Interphase Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung sollte exemplarisch mit drei verschiedenen Sonden durchgeführt werden. Es wurden disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit Prostatakarzinomen im klinischen Stadium TxM0N0 speziell auf Aberrationen an Chromosom 6p und 8 analysiert. Da insbesondere Veränderungen von Chromosom 8 eine Bedeutung bei der Tumorprogression zugeschrieben wird, sollte geprüft werden, ob die disseminierten Tumorzellen das gleiche Veränderungsmuster aufweisen wie die in der Literatur beschriebenen Veränderungen von primärem Prostatakarzinomgewebe. Die deskriptive Analyse der disseminierten Zellen sollte einen Beitrag zum besseren Verständnis der Biologie der frühen Disseminierung von Karzinomzellen leisten.

2. Material und Methoden

2.1 Materialgewinnung

Die Probengewinnung erfolgte zum Zeitpunkt der Primäroperation des Prostatakarzinoms. Es wurden Knochenmarkaspirate aus den Beckenkämmen (cristae iliacae) beiderseits entnommen. Die beidseitige Punktion des Beckenkammes wurde bevorzugt, um bei der heterogenen Verteilung der Tumorzellen im Knochenmark eine möglichst hohe Trefferquote zu erzielen (Schlimok et al. 1987). Zum Operationszeitpunkt befanden sich alle Patienten im klinischen Tumorstadium TxN0M0.

Aus folgenden Kliniken konnten Proben und Daten bezogen werden:

- Zentralklinikum Augsburg, Stenglinstraße, 86156 Augsburg
- Klinikum Großhadern, Marchioninistraße, 81377 München
- Urologische Klinik der Städtischen Kliniken, Ludwig-Erhard-Straße, 65199 Wiesbaden

Die Knochenmarkaspirate wurden umgehend in das Immunologische Labor geschickt und sofort oder in Ausnahmefällen am nächsten Tag weiter verarbeitet. Dabei wurde ein Teil der Probe sofort aufgearbeitet und auf Objektträger geschleudert, d.h. zu sogenannten Zytospins verarbeitet. Die restliche Probe wurde in Kultur gegeben und mit Nährmedium bei 37°C inkubiert.
Die benutzten Reagenzien sind in Tabelle 2.2-1 aufgeführt.

2.2 Aufarbeitung des Knochenmarkaspirates und Herstellung von Zellkulturen

Das aspirierte Knochenmark wurde mit Hanks-Lösung auf 20 ml aufgefüllt und anschließend 10 Minuten bei 25°C und 850 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit der Fettphase bis auf ein Restvolumen von 10 ml abpipettiert und das Pellet vorsichtig resuspendiert. Im nächsten Schritt wurden 20 ml Ficoll mit dem verdünnten Knochenmark vorsichtig überschichtet, um eine Vermischung zu vermeiden. Es folgte eine weitere Zentrifugation über 30 Minuten bei 25°C und 2300 rpm. Hierbei gelangten die segmentkernigen Granulozyten und die Erythrozyten weitgehend in das Pellet, wohingegen die mononukleären Zellen in der Interphase angereichert wurden. Die Interphase und die

obere Phase wurden vorsichtig abgenommen, in ein neues Röhrchen überführt und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Es folgte wiederum eine Zentrifugation von 10 Minuten bei 4 °C und 1500 rpm. Der Überstand wurde verworfen.
Lag ein hoher Erythrozytenanteil vor, so wurde das Pellet mit 2-5 ml Erythrozytenlysepuffer 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert, mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und 10 Minuten lang bei 4°C und 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.
War der Erythrozytenlyseschritt nicht notwendig, wurde das Pellet in PBS resuspendiert und auf 2 ml aufgefüllt. Anschließend wurden 10 µl Suspension und 10 µl Trypanblau-Lösung vermischt und damit in einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl ermittelt. Dazu fand folgende Formel Anwendung:

Gesamtzahl/Volumen [ml] = (ermittelte Zellzahl/Quadratanzahl) x Verdünnungsfaktor x 10^4

Von allen Patienten wurden je zwei Objektträger mit insgesamt $1x10^6$ Zellen im Routinelaborbetrieb auf Zytokeratin-positive Zellen hin untersucht. Die restlichen Zellen wurden in Kultur gegeben.

Bei der nachfolgenden Herstellung von Zellpräparaten aus Zellkulturen wurden $3x10^4$ Zellen pro Objektträger verwendet. Diese Zellen wurden aus einer PBS-Suspension mit 1000 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur auf die Objektträger zentrifugiert. Verwendet wurde eine Hettich Universal 30F-Zentrifuge. Es erfolgte keine spezielle Fixierung. Die Objektträger wurden mindestens 12 Stunden an der Luft getrocknet und entweder sofort gefärbt oder bei -80°C eingefroren.

Zur Herstellung des Zellkulturmediums wurden die Einzelkomponenten bestehend aus 10 ml Penicillin/Streptomycin, 5 ml L-Glutamin, 2,83 mg Insulin, 166 µl Transferrin und 50 ml FCS in eine 50 ml Spritze überführt und mit 0,2 µm Filterhalter in 500 ml Medium (RPMI 1640) filtriert. Zwischen $1x10^7$ bis $6x10^7$ Zellen wurden mit Medium in eine Kulturflasche gegeben. Um ein gutes Wachstum zu erreichen, wurden den Zellkulturflaschen folgende Wachstumsfaktoren zugefügt: human epidermal growth factor (50 ng/ml Kulturmedium), human basic fibroblast growth factor (10 ng/ml Kulturmedium) und Methyltrienolone (R1881) (0,1 µM).

Die Zellen wurden anschließend im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die relative Feuchtigkeit betrug 100%, der Sauerstoffgehalt (O_2) 10% und der Kohlendioxidanteil (CO_2) 5%. Die Kulturen mussten etwa alle 48 h überprüft und durch einen Mediumwechsel versorgt werden. Sobald eine Flasche mit Zellen zugewachsen war, war eine Passage (p) vorüber und die Kultur musste geteilt werden.

Die Ablösung der adhärenten Zellen aus den Kulturflaschen erfolgt mit Trypsin. Zuvor wurde das Kulturmedium abpipettiert, dann wurden 2 ml Trypsin-Lösung zugegeben und die Flasche vorsichtig geschwenkt, um die Lösung gleichmäßig zu verteilen. Nach etwa 20 Sekunden wurde das Trypsin wieder abpipettiert. Nach wenigen Sekunden Wartezeit und leichtem Klopfen gegen den Flaschenboden wurde eine mikroskopische Kontrolle durchgeführt. Sobald sich die adhärenten Zellen gelöst hatten, konnte PBS zugegeben und mit den Zellen weiter in Suspension verfahren werden.

Tabelle 2.2-1: Reagenzien und Lösungen zur Aufarbeitung von Knochenmark und Herstellung von Zellkulturen

- Sterile Hankslösung ohne Phenolrot — *Biochrom, Berlin*
- Kaliumhydrogenkarbonat $KHCO_3$ — *Merck, Darmstadt*
- Ammoniumchlorid NH_4Cl — *Merck, Darmstadt*
- EDTA Triplex III — *Merck, Darmstadt*
- Kalilauge KOH — *Merck, Darmstadt*
- Ficoll- Paque — *Pharmacia, Freiburg*
- Di-Hydrogen-Kaliumphosphat KH_2PO_4 — *Merck, Darmstadt*
- Natriumchlorid NaCl — *Merck, Darmstadt*
- Di-Natrium-Hydrogenphosphat Na_2HPO_4 x 2 H_2O — *Merck, Darmstadt*
- Trypanblau — *Serva, Heidelberg*
- Erythrozytenlysepuffer: 1,0 g $KHCO_3$; 14,33 g Na_2HPO_4 x 2 H_2O; 2,67 g KH_2PO_4 in 1000 ml aqua dest., pH 7,4
- Kulturmedium RPMI 1640 — *Gibco, Eggenstein*
- Fötales Kälberserum (FCS) — *Gibco, Eggenstein*
- Penicillin/Streptomycin 10000 IU/ml — *Gibco, Eggenstein*
- L-Glutamin 200 mM — *Gibco, Eggenstein*
- Transferrin 30 mg/ml — *Boehringer, Mannheim*
- Insulin 10 mg/ml — *Boehringer, Mannheim*

- Human epidermal growth factor (EGF) *PBH, Hannover*
  10µg/ml gelöst in 0,5% BSA/PBS
- Human basic fibroblast growth factor (bFGF) *PBH, Hannover*
  5µg/ml gelöst in 0,5% BSA/PBS
- Methyltrienolone (R1881) *Du Pont, Bad Homburg v. d. Höhe*
  Lyophilisat in Ethanol absolut gelöst und mit aqua dest. auf 1 mM verdünnt
- 10 x Trypsin-EDTA *Gibco, Eggenstein*
  1:5 mit PBS pH 7,4 verdünnt

2.3 Zelllinien und Primärkulturen

Die Herstellung der analysierten Zytospins erfolgte in verschiedenen Passagen. Die Versuche wurden zunächst an fünf etablierten Zelllinien von disseminierten Tumorzellen aus dem Knochenmark von Patienten mit Prostatakarzinom durchgeführt. Drei dieser Zelllinien wurden SV 40 transfiziert und damit immortalisiert (Tabelle 2.3-1).

Tabelle 2.3-1: Zelllinien aus disseminierten Tumorzellen von Patienten mit Prostata Karzinom

Zelllinien	**Transfektion mit SV 40**	**Zytospins aus Passage**
PC-E1 (Putz et al. 1999)	Ja	p1 und p23
PC-H1 (Putz et al. 1999)	Nein	p12
PC-R1 (Putz et al. 1999)	Ja	p13
PC-S1 (Putz et al. 1999)	Ja	p17
PC-Y1	Nein	p8

Eine zweite Versuchsreihe wurde an Primärkulturen durchgeführt. Dabei handelt es sich um Kurzzeitzellkulturen disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Prostatakarzinom-patienten. Diese Kurzzeitkulturen wurden nicht als Zelllinien etabliert und nicht SV 40 transfiziert. Nicht alle verwendeten Zytospins konnten in den ersten beiden Passagen angefertigt werden (Tabelle 2.3-2).

Tabelle 2.3-2: Primärkulturen aus disseminierten Tumorzellen von Patienten mit Prostatakarzinom

Primärkulturen	**Zytospins aus Passage**
PC-E1 Nachpunktat	p1
PC-H3	p1
PC-L2	p1
PC-M2	p1
PC-P1	p6
PC-S2	p2
PC-S3	p1
PC-S8	p2
PC-S9	p1
PC-W2	p3

In allen folgenden Abschnitten wird die Untersuchung von PC-E1 p1 den Primärkulturen zugeordnet. Aus diesem Tumor ist zwar eine Zelllinie hervorgegangen, die Zellen der ersten Passage waren jedoch nur kurze Zeit in Kultur. PC-E1 Nachpunktat (PC-E1-nach) bezeichnet die Primärkultur disseminierter Tumorzellen aus dem Knochenmark des Patienten E.. Bei diesem Patienten wurde im Abstand von sieben Monaten zweimal eine Knochenmarkpunktion durchgeführt. PC-E1 bezeichnet die Zellen der ersten Punktion, PC-E1-nach bezeichnet die Zellen der zweiten Punktion desselben Patienten.

Als Kontrollen dienten normale Nierenzellen, die sich für ein bis zwei Passagen in Kultur befunden hatten. Sie wurden nicht SV 40 transfiziert. Sie wurden dem gleichen Verfahren der immunzytochemischen Färbung und der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wie die Tumorzellen unterzogen. Eine zweite Kontrollgruppe wurde durch normale periphere Blutlymphozyten gebildet. Sie werden unter Punkt 2.6 genauer besprochen.

2.4 Immunzytochemische Färbung

Die immunzytochemische Färbung erfolgte nach dem Prinzip der Alkalischen Phosphatase Anti-Alkalischen-Phosphatase-Methode (APAAP) (Cordell et al. 1994). Bei dieser Methode werden drei verschiedene Antikörper benötigt: ein Primärantikörper, ein Sekundär- oder

Brückenantikörper und der APAAP-Komplex. Dieser APAAP-Komplex besteht aus dem Enzym alkalische Phosphatase und einem Antikörper gegen alkalische Phosphatase. Der Primärantikörper ist spezifisch gegen ein zu untersuchendes Antigen gerichtet. Der Sekundär- oder sog. Brückenantikörper kann sowohl an den Primärantikörper, als auch an den APAAP-Komplex binden. Wird der Sekundärantikörper im Überschuß zugefügt, so bindet nur ein Fab-Fragment an den Primärantikörper, das zweite Fab-Fragment bleibt frei und kann eine Bindung mit dem Antikörper des APAAP-Komplex eingehen. Anschließend erfolgt eine Substrat-Chromagenreaktion, in der die alkalische Phosphatase sichtbar gemacht wird. Mit diesem Farbstoffsignal ist die Antikörperbindungsreaktion im Lichtmikroskop nachweisbar. Eine schematische Darstellung der immunzytochemischen Färbung nach dem Prinzip der APAAP-Methode findet sich in Abbildung 2.4-1.

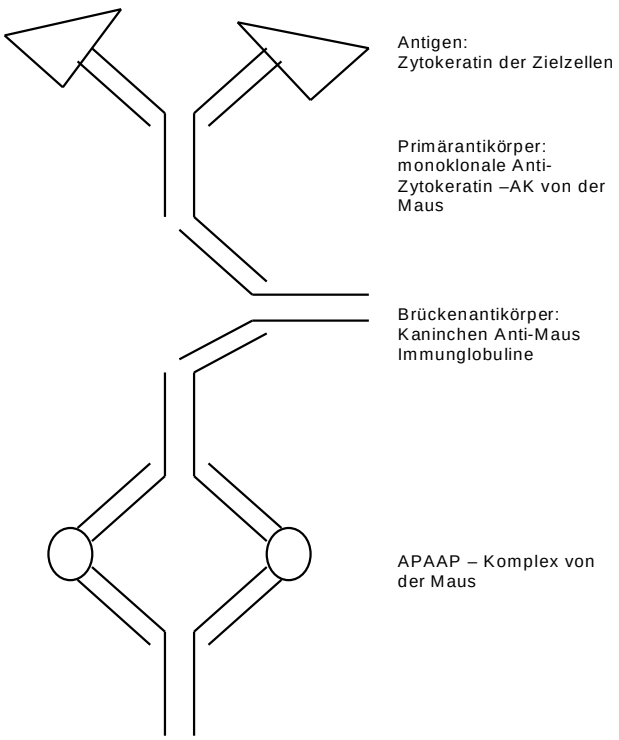


Abbildung 2.4-1: Schematische Darstellung der APAAP-Methode

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Cocktail aus drei verschieden Primärantikörpern gegen unterschiedliche Zytokeratinkomponenten verwendet, um möglichst viele Karzinomzellen zu detektieren.

Die Objektträger mussten zunächst vollständig aufgetaut werden bis das gesamte Kondenswasser getrocknet war. Um ein zielgenaues Pipettieren zu ermöglichen, wurden die

Zellen mit einem Wachsstift (Dako, Hamburg) umrandet. Sämtliche Färbe- und Inkubationsschritte fanden, falls nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur und in einer feuchten Kammer statt. Alle verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 2.4-4 aufgelistet.

Zum Abdecken der unspezifischen Bindungsstellen wurden die Objektträger zunächst mit 10% AB-Serum/PBS für 20 Minuten inkubiert. Nach Abklopfen des AB/PBS musste sofort der Antikörper-Cocktail aufgetragen werden um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden. Der verwendete Antikörper-Cocktail bestand aus drei monoklonalen Maus-Antikörpern, die gegen verschiedene Komponenten des Zytokeratins gerichtet waren. Sie dienten als Primärantikörper. Die Verdünnung der jeweiligen Primärantikörper mit 10% AB/PBS wurden für die Versuchsreihe genau austitriert und ist in Tabelle 2.4-1 zusammengestellt.

Tabelle 2.4-1: Primärantikörper

Klon	**Antigen**	**IgG**	**Konzentration**	**Verdünnung**	**Hersteller**
A45-B/B3	Pan CK	1	0,2 mg/ml	1:100	Micromet, Martinsried
AE1-AE3 AE1 AE3	Pan CK Acidic subfamily: 56,5, 50, 50`, 48, 40 kD basic subfamily: 65-67, 64, 59, 58, 56, 52 kD	1	90 µg/ml	1:1000	Dako, Hamburg
5D3-LP34 5D3 LP34	Pan CK 8, 18 5, 6, 18	1	600 µg/ml	1:100	Medac, Hamburg

Die Inkubationszeit des Antikörper-Cocktails betrug 45 Minuten. Anschließend wurden die Objektträger dreimal je drei Minuten mit 1% PBS gewaschen. Danach erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit dem monoklonalen Kaninchen Anti-Maus-Antikörper Z0259, der als Brückenantikörper fungierte (Tabelle 2.4-2).
Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Objektträger erneut dreimal für je drei Minuten mit 1% PBS gewaschen. Zum Nachweis des Brückenantikörpers wurde der APAAP-Antikörper D0651 verwendet (Tabelle 2.4-2). Es folgten wiederum 30 Minuten Inkubationszeit mit diesem monoklonalen Maus-Antikörper und anschließendes Waschen der Objektträger drei mal drei Minuten mit 1% PBS.

Tabelle 2.4-2: Sekundärantikörper für die APAAP-Färbung

Produkt	**Konzentration**	**Verdünnung**	**Hersteller, Code-Nr.**
Kaninchen Anti-Maus Immunglobuline	3,2 mg/ml	1:20	Dako, Hamburg, Z 0259
Maus APAAP-Komplex	0,1 mg/ml	1:100	Dako, Hamburg, D 0651

Als Entwicklerlösung zum Nachweis der Phosphatase-Reaktion wurde Fast-Blue verwendet. Die Entwicklerlösung setzte sich aus 10 mg Naphthol AS-MX-Phosphat gelöst in 1 ml Dimethylformamid, 12 mg Levamisol und 50 mg Fast-Blue-BB-Salz jeweils gelöst in Tris-Puffer 0,1 M pH 8,2 (insgesamt 49 ml) zusammen. Alle Komponenten wurden einzeln gelöst und erst direkt vor Gebrauch zusammen in eine Küvette filtriert.
Die Präparate wurden unter Sichtkontrolle 20 bis 30 Minuten in der Entwicklerlösung belassen, anschließend nochmals drei Minuten mit 1% PBS sowie zweimal drei Minuten mit aqua dest. gewaschen. Danach wurden die Objektträger an der Luft getrocknet und mit Glycerol eingedeckelt oder in einer Küvette mit 70% Ethanol bei 4°C aufbewahrt oder sofort für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung vorbereitet.

2.4.1 Kontrollen der immunzytochemischen Färbung

Bei jeder immunzytochemischen Färbung wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgefärbt.
Als Positivkontrollen dienten Zytospins der Zelllinie SW480. Dabei handelt es sich um eine Zytokeratin-positive Zelllinie eines Kolonkarzinoms.
Die Negativkontrolle erfolgte über zwei verschiedene Tests; zum einen durch eine zelluläre Kontrolle mit U937, eine Zytokeratin-negative menschliche Lymphomzelllinie, zum anderen wurde eine Isotyp-Kontrolle durchgeführt. Hierbei diente MOPC 21 (Tabelle 2.4-3) als Primärantikörper.

Tabelle 2.4-3: Primärantikörper zur Isotyp-Kontrolle

Klon		**IgG**	**Konzentration**	**Verdünnung**	**Hersteller**
MOPC 21	Mineral oil induced plasmocytoma	1	1,0 mg/ml	1:125	Sigma, Deisenhofen

Tabelle 2.4-4: Reagenzien und Lösungen zur immunzytochemischen Färbung

- AB-Serum — *Biotest AG, Dreieich*
- Tris: Trishydroxymethylaminomethan — *Paesel und Lorei, Hanau*
- Naphthol AS-MX Phosphat — *Sigma, Deisenhofen*
- Levamisol Hydrochlorid — *Sigma, Deisenhofen*
- Fast-Blue-BB-Salt: 4-Benzoylamino-2,5-diethoxybenzenediazonium chloride hemi (zinc chloride) salt — *Sigma, Deisenhofen*
- N-N-Dimethylformamide (DMF) — *Sigma, Deisenhofen*
- 10 x PBS: 180 g NaCl (Tab.2.2-1)
  28,66g Na_2HPO_4 x $2H_2O$ (Tab.2.2-1)
  5,34g KH_2PO_4 (Tab.2.2-1) in 2l H_2O
- 1 x PBS, pH 7,4

2.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Durch die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist es möglich spezielle DNA-Sequenzen auf einer Ziel-DNA durch markierte DNA-Sonden (= Proben-DNA) zu detektieren. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Markierung der Sonden mit fluoreszierenden Farbstoffen. Die Doppelstränge der Ziel- und der Proben-DNA werden durch Denaturierung, z.B. durch Erhitzen, auseinander gelöst. Anschließend wird die Proben-DNA auf die Ziel-DNA aufgetragen. Während der Inkubationszeit gehen komplementäre Einzelstränge von Ziel- und Proben-DNA Bindungen ein. Unter dem Fluoreszenzmikroskop können dann die fluoreszierenden DNA-Sonden, die an die Ziel-DNA gebunden haben, nachgewiesen werden. Das Prinzip der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ist in Abbildung 2.5-1 schematisch dargestellt.

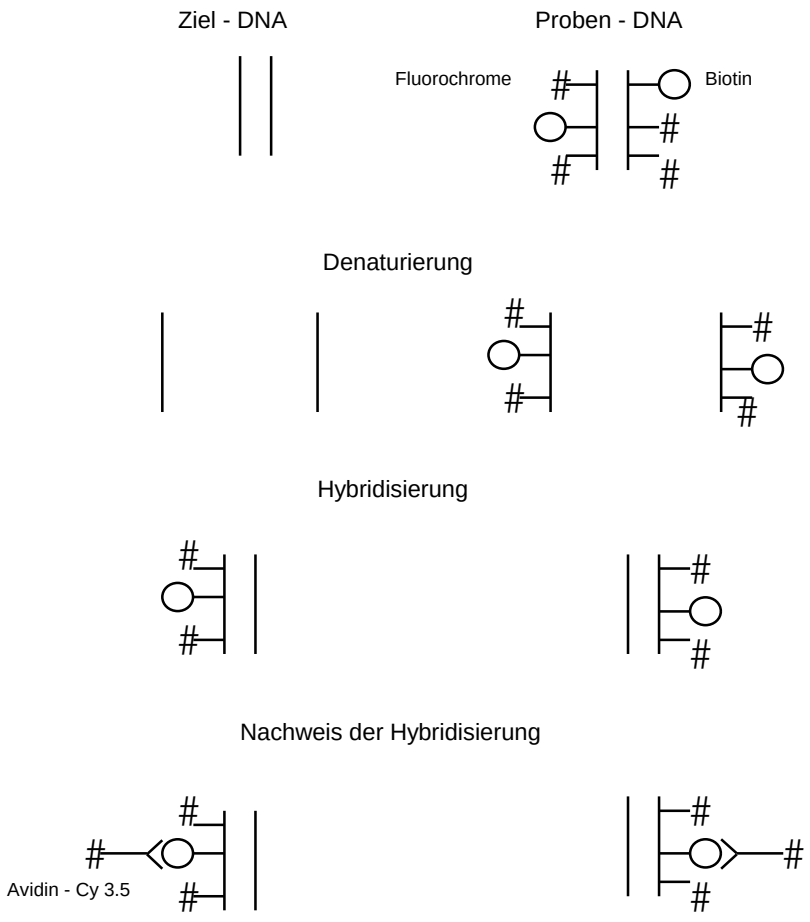


Abbildung 2.5-1: Schematische Darstellung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

2.5.1 Vorbereitung der gefärbten Präparate

Eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung konnte nur dann gelingen, wenn die Ziel-DNA der gefärbten Zellen auf den Objektträgern den DNA-Sonden zugänglich gemacht wurde. Diese Voraussetzung wurde durch eine Vorbehandlung der Objektträger mit RNase und Pepsin erreicht. Durch die RNase wurde RNA der Tumorzellen abgebaut, um keine falschen Bindungen zwischen Proben-DNA und Tumorzell-RNA zu erhalten. Durch die proteolytische Aktivität des Pepsins wurden die Zellmembranen partiell aufgelöst, um eine Durchgängigkeit für die DNA-Sonden zu erreichen. Alle benutzten Reagenzien sind in Tabelle 2.5-1 aufgeführt. Es wurde nach folgendem Procedere verfahren:

Zunächst erfolgte die RNase Behandlung. Dazu wurden die Objektträger kurz in 2% SSC gewaschen, abgeklopft, mit 200 µl RNase Stocklösung eine Stunde bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert und anschließend dreimal fünf Minuten in 2% SSC gewaschen.
Zum Pepsin-Verdau wurden die Objektträger in einer Küvette mit 50 µl Pepsin-Stocklösung in 100 ml 0,01 M HCl bei 37°C 10 Minuten inkubiert und anschließend zwei mal fünf Minuten in 1% PBS und einmal fünf Minuten in 50 mM $MgCl_2$/1% PBS gewaschen.
Im Anschluß an diese Verfahren musste eine Nachfixierung der Zellen durchgeführt werden. Dazu wurden die Objektträger mit 1% Paraformaldehyd/50 mM $MgCl_2$/1% PBS fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, fünf Minuten in 1% PBS gewaschen und je drei Minuten in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 90% und 100%) entwässert. Schließlich wurden die Objektträger an der Luft getrocknet und in 70% Ethanol bei 4°C aufbewahrt oder sofort den nächsten Arbeitsschritten der Hybridisierung zugeführt.

Tabelle 2.5 -1: Reagenzien und Lösungen zur Vorbehandlung der Objektträger

- RNase Stocklösung: 1 mg RNase in 10 ml 2% SSC — *Boehringer, Mannheim*
- 20 x SSC: 175,3 g NaCl (Tab. 2.2-1); 88,2 g Sodiumcitrat — *Merck, Darmstadt*; in 800 ml aqua dest.; pH 7,0 einstellen, auf 1000 ml auffüllen
- Pepsin-Stocklösung: 10% Pepsin in H_2O — *Boehringer, Mannheim*
- 1 M HCl — *Merck, Darmstadt*
- 0,01 M HCl
- Paraformaldehyd — *Sigma, Deisenhofen*

- 50 mM $MgCl_2$ in 1xPBS (Tab. 2.4-4) *Merck, Darmstadt*
- Ethanol *Merck, Darmstadt*

2.5.2 Vorbereitung der DNA-Sonden

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurde an den immunzytochemisch gefärbten Zellen mit drei verschiedenen DNA-Sonden durchgeführt. Die Proben-DNA wurde freundlicherweise von Priv.-Doz. Dr. med. M. Speicher zur Verfügung gestellt.
Zwei YAC Klone (yeast artificial chromosom, YAC) für 6p und 8p sowie ein half YAC Klon für 8q fanden Verwendung. Yeast artificial chromosomes bestehen aus zwei Telomer-, einer Zentromerregion und einem Element mit autonom replizierenden Sequenzen. Diese Elemente sind für das YAC funktionell wichtig. Zusätzlich wird dem YAC ein humanes Fremd-DNA-Fragment zugefügt. Eine direkte Transfektion des entstandenen YACs in Hefezellen ist jedoch nicht möglich. Von den Hefezellen muss zunächst die äußere Zellwand entfernt werden. Den dadurch entstandenen Hefesphäroplasten kann nun das YAC zugeführt werden. Aufgrund der osmotischen Instabilität muss die Zelle in Agar eingebettet werden. Die eingesetzten humanen DNA-Fragmente werden mit Hilfe von Polymerasen kopiert. Die Ausbeute ist mit etwa einer Kopie pro Zelle sehr gering. YACs eignen sich besonders, um große DNA-Fragmente, bis 2 Mb, zu klonieren (Strachan and Read 1996). Half YACs sind ähnlich aufgebaut wie YACs, der entscheidende Unterschied besteht jedoch darin, dass sie nur eine Telomerregion der Hefe enthalten und die zweite Telomerregion durch humane DNA gebildet wird.

Die verwendeten Sonden konnten spezifisch die Subtelomerregion der Chromosomen 6p, 8q und 8p nachweisen. Die Proben-DNA wurde mit verschiedenen Fluorochromen, bzw. in einem Fall mit Biotin, markiert (Tabelle 2.5-2). Biotin wurde dann in einem zweiten Schritt mit Fluorochrom markiertem Streptavidin nachgewiesen.
Als fluoreszierende Farbstoffe wurden Fluorescein (FITC; Anregungsmaximum: 490 nm, Emissionsmaximum: 520 nm) und die beiden Cyanin-Farbstoffe Cy3 (Anregungsmaximum: 554 nm, Emissionsmaximum: 568 nm) und Cy3.5 (Anregungsmaximum: 581 nm, Emissionsmaximum: 588 nm) verwendet.

Tabelle 2.5-2: FISH Sonden

Klon	**Bindungsstelle**	**Markierung**	**Nachweis**
6p 870 d 6 (www.CEPHb.FR)	6p25	Fluorescein	-
8p 931 b 2 (Bray-Ward et al. 1996)	8p23	Biotin	Cy3.5
8q YRM 2053	8q24.3	Cy3	-

Mit Hilfe der *Alu*-PCR wurde die Proben DNA amplifiziert (Lengauer et al. 1993). Die *Alu*-PCR wurde entwickelt, um DNA-Abschnitte, die zwischen repetitiven Sequenzen liegen, zu vervielfältigen. Die Besonderheit bei dieser PCR liegt darin, dass für die Reaktion nur ein Primer notwendig ist. Voraussetzung ist allerdings, dass nach einigen Kilobasen regelmäßig die repetitiven Sequenzen vorhanden sind. Im menschlichen Genom eignet sich dafür die hochrepetitive *Alu*-Familie.

2.5.2.1 Nick-Translation

Zum Markieren der verschiedenen Sonden wurde die Nick-Translation gewählt. Mit enzymatischer Hilfe wurden markierte Nukleotide in die Proben-DNA eingebaut. Desoxyribonuclease I (DNase I, aus dem Pankreas) verursachte durch Spaltung von Phosphodiesterbindungen artifizielle DNA-Einzelstrang-Brüche. Dadurch entstanden freie 5´-Phosphat- und 3´-Hydroxylenden. Die zugegebene DNA-Polymerase I aus Escherichia coli erfüllte zwei Aufgaben. Zum einen wurden durch die Exonuklease-Funktion der Polymerase alte Nukleotide abgebaut. Zum anderen dienten die freien 3´-Hydroxylenden der Polymerase als Ansatzpunkt zum Einbau neuer, mit Fluorochrom, bzw. Biotin markierter Nukleotide in die Proben-DNA.

Die gesamte Vorbereitung wurde nach dem Pipettierschema der Tabelle 2.5-3 auf Eis vorgenommen.

Tabelle 2.5-3: Pipettierschema der Nick-Transaltion

Probe	**µl**	**10 x NT**	**0,1 M**	**dNTP**	**Flu**	**aqua bidest.**	**DNase 1:10000**	**Polymerase**
6p-FITC	13	5	5	AGT 5	1	13	6	2
8p-Bio	13	5	5	AGC 5	1	2	18	1
8q-Cy3	13	5	5	AGC 5	1	16	4	1

Legende: (Mengenangaben in µl)

- **10 x NT**: Nick-Translations-Puffer: 0,5 M Tris-HCl pH 8,8; 50 mM $MgCl_2$; 0,5 mg/ml BSA
- **0,1 M**: 0,1 ml β-Mercaptoethanol *Serva,Heidelberg*
  in 14,4 ml aqua bidest.
- **dNTP**: dCTP *Boehringer, Mannheim*
  mit aqua bidest. auf 2 mM Lösung verdünnt, daraus eine Stocklösung mit Verdünnung 1:3 aqua bidest. angelegt.
  dTTP *Boehringer Mannheim*
  mit aqua bidest. auf 2 mM Lösung verdünnt, daraus eine Stocklösung mit Verdünnung 1:19 aqua bidest. angelegt.
- **Flu**orochrome: Fluorescein (FITC): FluorX-dCTP *Amersham, Braunschweig*
  Biotin-16 dUTP *Boehringer, Mannheim*
  Cy3-dUTP *Amersham, Braunschweig*
- **DNase I** Stocklösung: 1 mg/ml *Boehringer Mannheim*
  (0,5 ml 0,3 M NaCl + 0,5 ml Glycerin)
- **DNA-Polymerase I**: Kornberg Polymerase *Boehringer Mannheim*

Das Pipettieren geschah in folgender Reihenfolge: aqua bidest. vorlegen, dann der Reihe nach NT-Puffer, Mercaptoethanol, Nukleotide, Fluorochrom, Proben-DNA, Polymerase und DNase. Da die DNase extrem empfindlich war, wurde aqua bidest. zum Verdünnen eisgekühlt benutzt und die DNase sofort verwendet.
Nach dem Pipettieren wurden die Tubes kurz vermischt und dann unverzüglich auf 15°C gestellt, da dies die beste Temperatur für die Enzymaktivität darstellte. Nach 90 Minuten wurde die Nick-Translation auf Eis gestellt, um die Reaktion kurzzeitig zu stoppen und das Ergebnis zu testen.

Um die Fragmentlänge der nick-translatierten Proben-DNA zu prüfen, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde zunächst ein 1% Agarose-Gel gegossen; die Reagenzien hierfür sind in Tabelle 2.5-4 aufgelistet. Je 5 µl der nick-translatierten Probe wurde mit 1 µl Gelloading-Puffer vermischt und in eine Geltasche einpipettiert. Eine Geltasche wurde mit dem Längenmarker Lamda Hind III bestückt. Bei 100 Volt wurden die Proben im elektrischen Feld, vom Minus- zum Pluspol, für etwa 60 Minuten ihrer Länge nach aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel mit Ethidiumbromid eingefärbt und mit einem Geltransilluminator dokumentiert. Die Ziellänge der DNA Fragmente betrug 200-500 Basenpaare. War die gewünschte Länge erreicht, konnte die Nick-Translation gestoppt

werden. Waren die Fragmentstücke noch zu groß, so wurde die Nick-Translation erneut auf 15°C gestellt, evtl. unter nochmaliger Zugabe von DNase, und die Probenlänge zu einem späteren Zeitpunkt wiederum durch eine Gelelektrophorese evaluiert. Die Nick-Translation wurde durch Zugabe von: 1,5 µl EDTA und 0,5 µl 10% SDS gestoppt. Danach wurden die Proben für 15 Minuten auf 65°C erhitzt.

Tabelle 2.5-4: Reagenzien und Lösungen zur Gelelektrophorese

- Agarose *BRL, Neu Isenburg*
- EDTA: Ethylendiamintetraazetat *Merck, Darmstadt*
- SDS: Sodiumdodeylsulfat *Sigma, Deisenhofen*
- TAE-Puffer: 0,089 M Tris Base, Acetic acid, 0,002 M EDTA pH 8,0
- Gelloading-Puffer: 0,25% Bromphenolblau, 30% Glycerin
- Lamda Hind III Längenmarke *MBI Fermentas, St. Leon Rot*
- Ethidiumbromid *Sigma, Deisenhofen*

2.5.2.2 DNA-Fällung

Zur DNA-Fällung eignete sich die Salzfällung. Die Reagenzien sind in Tabelle 2.5-5 zusammengestellt.
Etwa 100 - 200 ng markierte Proben-DNA wurde mit 20 - 30 µl human Cot-1 DNA, 5 µl salmon testis DNA, 1/10xVolumen NaAcetat und 2,5xVolumen 100% Ethanol vermischt und 30 Minuten bei -80°C oder über Nacht bei -20°C gelagert.
Das Tube mit der gefällten Proben-DNA wurde anschließend bei 13000 rpm und 4°C 30 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand abpipettiert, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Danach wurde der Überstand erneut abpipettiert und das Pellet kurz auf 37°C gestellt, um den restlichen Alkohol verdampfen zu lassen. Zur Hybridisierungsvorbereitung wurde dem Pellet 5 µl Formamid zugegeben und das Tube 60 Minuten bei 37°C auf dem Schüttler belassen, bis die DNA wieder vollständig gelöst war. Kurz vor der Probendenaturierung wurde 5 µl Mastermix in das Tube pipettiert, gut gemischt und kurz abzentrifugiert.

Tabelle 2.5-5: Reagenzien zur DNA-Fällung

- Human Cot-1 DNA, 500µg (1mg/ml) *Gibco, Eggenstein*
- Salmon testis DNA *Sigma, Deisenhofen*

- NaAcetat: Sodiumacetat *Sigma, Deisenhofen*
- Ethanol *Merck, Darmstadt*
- Master-Mix: 20% Dextransulfat in 2 x SSC
- Formamid *Sigma, Deisenhofen*

2.5.3 Hybridisierung

2.5.3.1 Denaturierung der Proben-DNA

Vor einer Hybridisierung ist es notwendig, die Doppelstränge der Proben-DNA auseinanderzulösen, damit eine Bindung zwischen Proben-DNA und Zell-DNA stattfinden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde dies durch Erhitzen der Proben-DNA erreicht. Dazu wurde die in Formamid und Mastermix gelöste DNA fünf Minuten bei 75°C denaturiert. Anschließend wurde das Tube für 60 Minuten auf 37°C gestellt, um den repetitiven Sequenzen der Proben-DNA ein Preannealen zu ermöglichen und damit eine unspezifische Bindung an die Zell-DNA zu vermeiden.

2.5.3.2 Denaturierung der Objektträger

Die Denaturierung der Zell-DNA erfolgte aus dem gleichen Grund wie die der Proben-DNA und konnte ebenfalls durch Erhitzen erreicht werden. Die Objekttäger wurden für 105 Sekunden bei 70°C in die Denaturierungslösung (35 ml Formamid, 5 ml 20 x SSC, 10 ml H_2O, pH 7,4) gestellt, anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und an der Luft getrocknet.

2.5.3.3 Auftragen der Probe

Nach dem Preannealen der Proben-DNA wurde die Probe auf einer Heizplatte bei 37°C auf die vorbereiteten Objektträger aufgetragen, sofort mit einem Deckglas überdeckt und mit Hilfe von Fixogum (Marabu, Tamm) verschlossen, um ein Austrocknen zu verhindern. Das auf diese Weise geschützt Präparat wurde in einer feuchten, dunklen Kammer 24 bis 72 Stunden bei 37°C hybridisiert.

2.5.4 Nachweis der Hybridisierung

Alle Waschschritte wurden, falls nicht anders angegeben, im Dunklen auf einem Schüttler bei 42°C über drei mal fünf Minuten durchgeführt, alle Inkubationsschritte in einer dunklen, feuchten Kammer bei 37°C. Die verwendeten Reagenzien sind in der Tabelle 2.5-6 aufgeführt.

Nach Entfernen von Fixogum und Deckglas wurden die Objektträger zunächst in einer 45°C warmen 50% Formamid Lösung gewaschen. Im zweiten darauffolgenden Waschschritt wurde 60°C warmes 0,1 % SSC verwendet. Um die Oberflächenspannung herabzusetzen wurden die Objektträger anschließend kurz in 4% SSC/ 0,2% Tween gestellt, abgeklopft und mit 1 ml 3% Bovinem Serumalbumin (BSA) für 30 Minuten inkubiert. Das 3% BSA diente als Blocklösung, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken.
Nach Abklopfen des 3% BSA und erneutem Senken der Oberflächenspannung durch kurzes Eintauchen in die SSC/Tween-Lösung, wurden 200 µl Avidin-Cy3.5 Verdünnung auf die Objekttäger aufgetragen und für mindestens 45 Minuten inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit erfolgte der dritte Waschschritt mit 4% SSC/0,2% Tween.
Anschließend wurden die Objektträger zwei Minuten mit DAPI inkubiert, um die gesamte DNA anzufärben und somit das Auswerten zu erleichtern. Zuletzt wurden die Objektträger kurz und vorsichtig mit aqua dest. abgewaschen, um das Salz zu entfernen, im Dunklen an der Luft getrocknet und mit Vectashield eingedeckelt.

Tabelle 2.5-6: Reagenzien und Lösungen zum Nachweis der Hybridisierung

- 1.Waschlösung: 75 ml Formamid *Merck, Darmstadt*
  15 ml 20 x SSC (Tab.2.5-1)
  60 ml H_2O pH auf 7,0 einstellen, Lösung auf 45°C erwärmt
- 2. Waschlösung: 0,1 x SSC: 1 ml 20 x SSC in 200 ml aqua bidest., Lösung auf 60°C erwärmt
- 3.Waschlösung: 4 x SSC/0,2% Tween:
  20 ml 20 x SSC (Tab.2.5-1)
  80 ml aqua bidest.
  200 µl Tween 20 *Sigma, Deisenhofen*
  Lösung auf 42°C erwärmt
- 3% BSA: 150 mg Bovines Serumalbumin *Boehringer, Mannheim*
  in 5 ml 4 x SSC/0,2% Tween
- Strept-Avidin-Cy3.5: Verdünnung 1:200 mit Antikörperstammlösung (1,5% BSA)

- DAPI: 4,6-Diamidino-2-Phenylindol 2 HCL — *Serva, Heidelberg*
  Stammlösung: 0,2 mg/ml aqua bidest.
- Vectashield — *Vector Laboratories, Camon Laborservice, W*iesbaden

2.5.5 Auswertung

Die gesamte Auswertung der Präparate wurde von jeweils zwei verschiedenen Personen unabhängig voneinander vorgenommen. Zur Verfügung stand ein Leica DMRXA Mikroskop. Für jedes Fluorochrom wurde ein separater Anregungs-, Teilungs- und Emissionsfilter benutzt.

Für die Kontrollzellen wurden die Mittelwerte und die doppelte und dreifache Standardabweichung ausgerechnet und mit den Mustern der verschiedenen Zelllinien und Primärkulturen verglichen. Berücksichtigt wurde hierbei jedes Muster, das entweder in den Kontrollgruppen oder in den Zelllinien oder in den Primärkulturen in mindestens 5% der untersuchten Zellen zu finden war.

2.6 Herstellung von Metaphase-Präparaten

Zur Austestung der hergestellten Sonden wurde immer eine Testhybridisierung an peripheren Blutlymphozyten von gesunden Probanden durchgeführt. Um eine genaue Lokalisation der Sonden-Bindung feststellen zu können, wurden von den Lymphozyten Metaphase-Präparate angefertigt. Um dies zu ermöglichen, wurden Kurzzeitkulturen angelegt, in denen die frisch gewonnenen Blutzellen zu Wachstum und Teilung angeregt wurden. Nach 72 Stunden wurden den Kulturen das Spindelgift Colcemid zugesetzt, um die Zellteilung möglichst in der Metaphase zu stoppen. Mittels einer hypotonen Lösung erfolgte die Läsion der Zellmembran, so dass es beim Auftropfen der in Fixationssuspension befindlichen Zellen zum Zerplatzen der Membran und zur gleichmäßigen Verteilung der Chromosomen kam.

Das genaue Versuchsprotokoll wird im folgenden beschrieben. Die Reagenzien sind in Tabelle 2.6-1 zusammengestellt.

Von einem gesunden Probanden wurden in einer heparinisierten Spritze 5 ml venöses Blut abgenommen. Die Einzelkomponenten des Zellkulturmediums wurden, wie unter Punkt 2.2 beschrieben, filtriert. Dem fertigen Medium wurde das Blut zugesetzt und die gesamte Flüssigkeit wurde in Zellkulturflaschen zu je 10 ml aliquotiert und wie unter Punkt 2.2 beschrieben bei 37°C inkubiert.

Nach 72 Stunden wurde jeder Kulturflasche 100 µl Colcemid-Stocklösung zugegeben und die Flaschen für 50 Minuten weiter bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Flascheninhalte in Tubes überführt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur und 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, das Pellet resuspendiert, unter vortexen langsam mit 10 ml vorgewärmter Kalium-Chlorid-Lösung aufgefüllt und für etwa 7 bis 9 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Inkubation in der hypotonen Lösung war der entscheidende Schritt zur Erhaltung guter Metaphase-Präparate. Die optimale Inkubationszeit war variabel und musste deshalb zuerst an einer Kulturflasche ausgetestet werden. Bemerkenswert war, dass Tumorzellen zumeist einen wesentlich längeren hypotonen Schock benötigten als periphere Blutlymphozyten.

Nach der Inkubationszeit erfolgte erneut bei Raumtemperatur eine zehnminütige Zentrifugation der Tubes mit 1200 rpm. Der Überstand wurde abpipettiert, das Pellet resuspendiert und unter vortexen vorsichtig mit 10 ml eisgekühlter Fixierungslösung aufgefüllt. Sofort wurden die Tubes erneut mit 1200 rpm zentrifugiert, diesmal allerdings bei 4°C. Der Überstand wurde abpipettiert, das Pellet resuspendiert und wiederum mit eisgekühlter Fixierungslösung aufgefüllt. Diese Schritte wurden mindestens dreimal wiederholt, bis sich der Überstand völlig klar zeigte.

Zum Auftropfen der Zellen auf die Objektträger wurde das Pellet nach dem letzten Zentrifugieren und Verwerfen des Überstandes resuspendiert, mit ungefähr 0,5 ml Fixationslösung verdünnt und auf Eis gestellt.
Die vorgesehenen Objektträger wurden am Tag zuvor zur Reinigung in 100% Ethanol gestellt und einige Stunden vor Verwendung in aqua dest. auf -20°C. Zum Auftropfen der Zellsuspension wurden sie direkt aus dem Eiswasser entnommen. Auf die noch feuchten, eisgekühlten Objektträger wurden drei bis vier Tropfen der Zellsuspension aus einem Abstand von 30 bis 40 cm aufgetropft. Unverzüglich wurden die Objektträger auf einer Wärmeplatte mit feuchtem Tuch bei 37°C getrocknet. Die Metaphase-Präparate wurden vor ihrer

Verwendung etwa eine Woche in 70% Ethanol bei 4°C gelagert, um sie ein wenig „altern“ zu lassen.

Tabelle 2.6-1: Reagenzien und Lösungen zur Herstellung von Metaphase-Präparaten

- Zellkulturmedium: (siehe auch Tabelle 2.2-1)
  125 ml RPMI Medium 1640,
  15% fötales Kälberserum (FCS) (18,75 ml),
  1,25 ml Glutamin,
  2,5 ml Penicillin/Streptomycin
  1,5 ml Phytohaemagglutinin — *Seromed Biochrom, Berlin*
- Colcemid (10µg/ml) — *Seromed Biochrom,Berlin*
  Stocklösung mit aqua bidest. auf 0,05 µg/ml verdünnt
- Hypotone Lösung: 0,075M KCl — *Merck, Darmstadt*
  auf 37°C erwärmt
- Fixationslösung: 3:1 Methanol: Eisessig, — *Merck, Darmstadt*
  auf -20°C gekühlt

3. Ergebnisse

3.1 Kontrollgruppen

Zum Vergleich der Tumorzellen mit normalen Zellen wurden zwei Kontrollgruppen gewählt:

a: normale Nierenzellen. Diese Zellen wurden ebenso wie die Primärkulturen über wenige Tage in Zellkulturen inkubiert. Anschließend wurden sie in gleicher Weise wie die Tumorzellen der immunzytochemischen Färbung und der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung unterzogen.

b: periphere Blutlymphozyten gesunder Probanden (PBL). Diese Zellen wurden für 72 h in Kurzzeitkultur gegeben und anschließend zu Zytospins verarbeitet. Da es sich um mesenchymale und damit Zytokeratin-negative Zellen handelte, wurde nur die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und keine immunzytochemische Färbung durchgeführt.

Die Auswertung der Kontrollgruppen erfolgte, wie die der Tumorzellen, von zwei unabhängigen Personen. Ausgezählt wurden jeweils 200 Zellen. Dabei wurden die Kriterien nach Hopman beachtet: “a) count only non-overlapping cells; b) count split spots as one; c) count patches only if they are well separated.“ (Hopman et al. 1988).

Aus den Kontrollgruppen wurden für die verschiedenen Muster der Mittelwert und die einfache und doppelte Standardabweichung berechnet. Anschließend wurden diese Werte für jedes Muster mit denen der Tumorzellen verglichen. Auf diese Weise wurde überprüft, ob der prozentuale Anteil der Tumorzellen mit gleichem Muster eines jeden Tumorpatienten signifikant von dem Anteil des entsprechenden Musters der Kontrollgruppen abweicht. Berücksichtigung fand jedes Genommuster, das in einer Kontrollgruppe, einer Zelllinie oder einer Primärkultur in mindestens 5% der ausgewerteten Zellen detektiert wurde.

In Tabelle 3.1-1 werden die entsprechenden Muster und ihr Vorkommen in den Kontrollgruppen tabellarisch dargestellt. Die angegebenen Muster (M) beziehen sich immer auf die Reihenfolge: Anzahl der Signale für 6p-8q-8p. Gleichzeitig sind die Ober- und Untergrenzen für eine signifikante Abweichung in Anzahl und prozentualem Anteil angegeben.

Tabelle 3.1-1: Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen für verschiedene Muster; Vorkommen in den Kontrollgruppen

	KG a	**KG b**								
Muster: 6p-8q-8p	**Anzahl**	**Anzahl**	**Mittel-wert**	**%-Anteil**	**SD**	**2* SD**	**Unter-grenze**	**%-Anteil**	**Ober-grenze**	**%-Anteil**
2-2-2	128	162	145,0	72,50	12,021	24,042	120,958	**60,479**	169,042	**84,521**
3-2-2	13	6	9,5	4,75	2,475	4,950	4,550	2,275	14,450	**7,225**
2-1-2	8	13	10,5	5,25	1,768	3,536	6,965	3,482	14,036	**7,018**
1-2-2	3	10	6,5	3,25	2,475	4,950	1,550	0,775	11,450	**5,725**
2-2-1	6	1	3,5	1,75	1,768	3,536	-0,036	-0,018	7,036	**3,518**
3-2-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-3-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-2-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-1-1	1	0	0,5	0,25	0,354	0,707	-0,207	-0,104	1,207	**0,604**
4-2-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-3-2	4	2	3,0	1,50	0,707	1,414	1,586	0,793	4,414	**2,207**
1-1-2	2	0	1,0	0,50	0,707	1,414	-0,414	-0,207	2,414	**1,207**
2-2-3	5	2	3,5	1,75	1,061	2,121	1,379	0,689	5,621	**2,811**
0-1-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-0-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-4-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-4-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-3-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-3-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-4-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-3-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6-4-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0-2-2	6	0	3,0	1,50	2,121	4,243	-1,243	-0,621	7,243	**3,621**
ANC:										
6p	2,125	1,995	2,060		0,046	0,092	**1,968**		**2,152**	
8q	1,995	1,960	1,978		0,012	0,025	**1,953**		**2,002**	
8p	2,065	2,005	2,035		0,021	0,042	**1,993**		**2,077**	

Legende: **KG a:** Kontrollgruppe a, normale Nierenzellen; siehe auch Tabelle 3.1-2
KG b: Kontrollgruppe b, periphere Blutlymphozyten (PBL) gesunder Probanden; siehe auch Tabelle 3.1-2
SD: Standardabweichung
ANC: average number of copies, durchschnittliche Anzahl der Signale pro Zelle für jede Sonde. Berechnet sich aus der Summe aller Signale für die entsprechende Sonde dividiert durch die Anzahl der ausgewerteten Zellen.

Eine Tabelle mit Berechnung der dreifachen Standardabweichung ist dem Anhang beigefügt.

Tabelle 3.1-2: Auswertung der Kontrollgruppen (KG); genaue Aufschlüsselung aller ausgezählten Zellen

KG a: Auswertung normaler Nierenzellen

		Signale pro Sonde			
Anzahl		**6p-FITC**	**8q-Cy3**	**8p-Biotin**	**%-Anteil**
128		2	2	2	64,0
13		3	2	2	6,5
8		2	1	2	4,0
6		0	2	2	3,0
6		2	2	1	3,0
5		2	2	3	2,5
4		2	3	2	2,0
4		2	3	3	2,0
4		4	4	4	2,0
3		1	2	2	1,5
2		1	1	2	1,0
2		2	1	3	1,0
2		2	2	4	1,0
1		0	1	3	0,5
1		0	2	3	0,5
1		1	3	0	0,5
1		2	0	1	0,5
1		2	1	1	0,5
1		2	2	0	0,5
1		3	1	1	0,5
1		3	1	2	0,5
1		3	1	3	0,5
1		3	2	3	0,5
1		3	3	1	0,5
1		3	3	2	0,5
1		4	1	2	0,5
Gesamt: 200	**ANC:**	**2.125**	**1.995**	**2.065**	

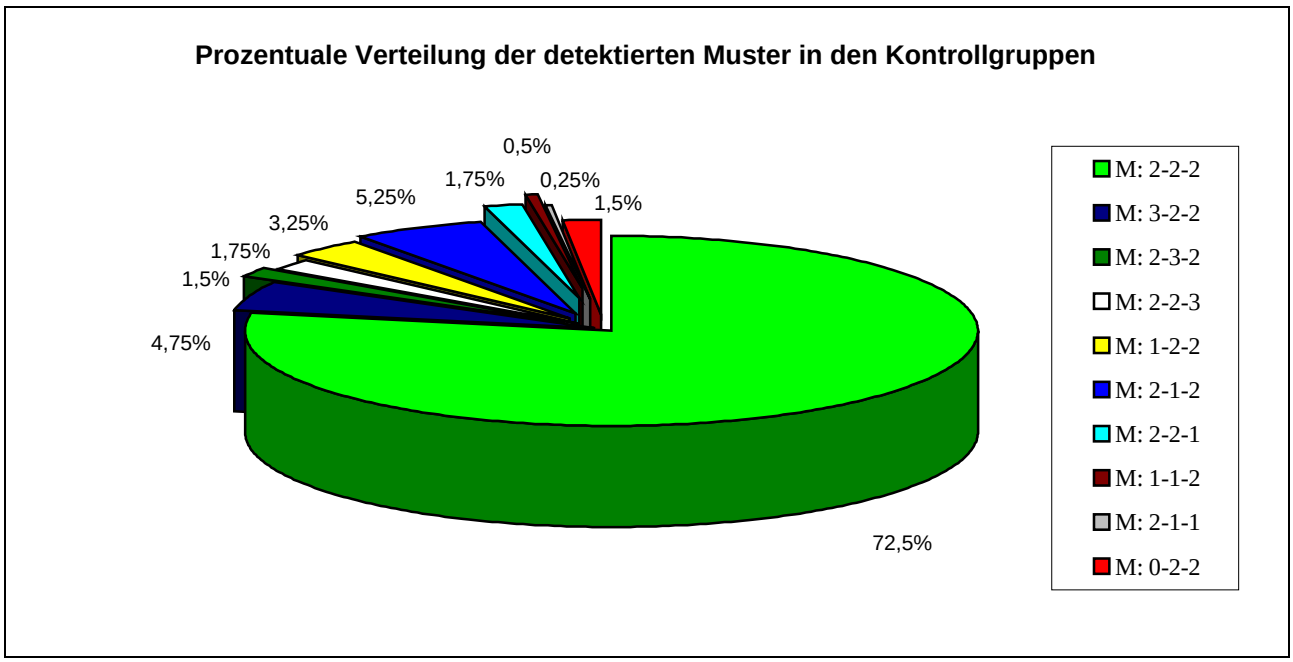
KG b: Auswertung PBL

		Signale pro Sonde			
Anzahl		**6p-FITC**	**8q-Cy3**	**8p-Biotin**	**%-Anteil**
162		2	2	2	81,0
13		2	1	2	6,5
10		1	2	2	5,0
6		3	2	2	3,0
2		2	3	2	1,0
2		3	3	2	1,0
2		2	2	3	1,0
1		1	3	2	0,5
1		2	2	1	0,5
1		4	2	2	0,5
Gesamt: 200	**ANC:**	**1.995**	**1.960**	**2.005**	

Legende: ANC: average number of copies

Das Diagramm 3.1-1 zeigt zur Vereinfachung nochmals die prozentuale Verteilung der detektierten Muster in den Kontrollgruppen. In der Legende rechts sind die jeweiligen Muster (M) angegeben. Berücksichtigt wurden, wie oben beschrieben, alle Muster, die in mindestens einer Kontrollgruppe, einer Zelllinie oder einer Primärkultur einen Anteil von größer oder gleich 5% der untersuchten Zellen ausmachte. Muster, die nur in Tumorzellen, nicht aber in den Kontrollgruppen zu finden waren, wurden nicht in die Legende aufgenommen (Tabelle 3.1-1). Jedem Muster wurde eine unterschiedliche Farbe zugeordnet. Die verschiedenen Farben wurden in allen nachfolgenden 3D-Kreisdiagrammen jeweils für das entsprechende Muster verwendet.

Diagramm 3.1-1:



3.2 Auswertung der Zelllinien

Die Auswertung der Zelllinien erfolgte ebenfalls, wie oben beschrieben, unter Beachtung der Kriterien nach *Hopman et al.* (1988) von zwei unabhängigen Personen (Monika Hofbauer, Institut für Humangenetik und der Doktorandin Christiane Reindl, Institut für Immunologie der LMU München). Es wurden mit zwei Ausnahmen für alle Tumore 200 Zytokeratin-positive Zellen ausgezählt. Die Ausnahmen stellen PC-H1 und PC-E1 p23 dar. Im Falle PC-H1 wurden nur insgesamt 100 Zytokeratin-positive Zellen ausgewertet. Im Falle PC-E1 p23 war eine Zytokeratinpositivität auch mit Titrierung des AK-Cocktails nicht mehr nachweisbar. Es wurden schließlich 200 Zytokeratin-negative Zellen gewertet. Die genaue Aufschlüsselung aller ausgezählten Zellen wurde für jeden Tumor im Anhang abgedruckt.

In Tabelle 3.2-1 sind die Auswertungen der Zelllinien tabellarisch zusammengefasst. In der ersten Spalte finden sich die verschiedenen Muster. Sie sind immer in der geltenden Reihenfolge angegeben: Anzahl der Signale für 6p-8q-8p. Die Berücksichtigung der Muster ist unter der Auswertung der Kontrollgruppen beschrieben (siehe Punkt 3.1).

Nachfolgend sind jeweils zwei Spalten von der gleichen Zelllinie belegt. Zum Beispiel PC-E1 p23; PC-E1 ist der Name der Zelllinie, wobei PC für Prostatakarzinom steht. E ist der Anfangsbuchstabe des Nachnamens des betroffenen Patienten und 1 bedeutet, dass es sich um die erste Prostatakarzinom Zelllinie eines Patienten, dessen Nachname mit E beginnt, handelt, die in dem Labor etabliert wurde. Für jede Zelllinie sind die Anzahl der Zellen mit gleichem Muster und der entsprechende prozentuale Anteil angegeben. Die beiden prozentual größten Gruppen gleicher Muster wurden jeweils fett gedruckt.

Tabelle 3.2-1: Vorkommen der Muster bei den Zelllinien; Anzahl und prozentualer Anteil

	PC-E1	**p23**	**PC-H1**	**p12**	**PC-R1**	**P13**	**PC-S1**	**p17**	**PC-Y1**	**p8**
Muster: 6p-8q-8p	**Anzahl**	**%-Anteil**	**Anzahl**	**%-Anteil**	**Anzahl**	**%-Anteil**	**Anzahl**	**%-Anteil**	**Anzahl**	**%-Anteil**
2-2-2	7	3,5	12	**12,0**	1	0,5	67	**33,5**	70	**35,0**
3-2-2	4	2,0	3	3,0	2	1,0	6	3,0	2	1,0
2-1-2	0	0	3	3,0	0	0	18	**9,0**	2	1,0
1-2-2	0	0	5	5,0	0	0	9	4,5	11	5,5
2-2-1	1	0,5	14	**14,0**	85	**42,5**	14	7,0	27	**13,5**
3-2-1	3	1,5	1	1,0	27	**13,5**	0	0	0	0
2-3-1	0	0	1	1,0	12	6,0	4	2,0	2	1,0
1-2-1	0	0	1	1,0	11	5,5	1	0,5	1	0,5
2-1-1	0	0	3	3,0	11	5,5	7	3,5	9	4,5
4-2-1	0	0	0	0	10	5,0	0	0	0	0
2-3-2	2	1,0	4	4,0	0	0	8	4,0	11	5,5
1-1-2	0	0	0	0	0	0	7	3,5	2	1,0
2-2-3	1	0,5	6	6,0	0	0	1	0,5	2	1,0
0-1-2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1,5
2-0-2	0	0	0	0	0	0	1	0,5	1	0,5
5-4-3	18	**9,0**	1	1,0	0	0	0	0	0	0
4-4-3	17	**8,5**	1	1,0	0	0	1	0,5	0	0
5-3-3	14	7,0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-3-2	12	6,0	0	0	1	0,5	0	0	1	0,5
3-4-3	10	5,0	0	0	1	0,5	0	0	0	0
4-3-3	10	5,0	1	1,0	0	0	0	0	0	0
6-4-3	10	5,0	1	1,0	0	0	0	0	0	0
0-2-2	0	0	1	1,0	0	0	3	1,5	4	2,0
ANC:										
6p	4,315		2,650		2,305		1,995		1,930	
8q	3,365		2,410		2,030		2,000		2,260	
8p	2,780		2,380		1,015		1,975		2,045	

Legende: ANC: average number of copies
p: Passage

Von den fünf untersuchten Zelllinien zeigten zwei eine große Gruppe von Zellen mit einem normalen Hybridisierungsmuster, also je zwei Signale für 6p, 8q und 8p. Allerdings war bei allen Tumoren der Anteil von Zellen mit normalem Hybridisierungsmuster signifikant geringer als in den Kontrollgruppen ($p < 0,01$). In zwei Zelllinien wurde die größte Gruppe von Zellen mit dem Hybridisierungsmuster 2-2-1 gebildet (PC-H1, PC-R1), von Zellen also mit isoliertem, einfachen 8p Verlust. Diese Zellen stellten in einer anderen Zelllinie die zweitgrößte Gruppe der untersuchten Zellen dar (PC-Y1). Die jeweils größten und zweitgrößten Gruppen sind in den Tabellen 3.2-2 und 3.2-3 herausgegriffen.

Tabellen 3.2-2 und 3.2-3: Muster der größten und zweitgrößten Gruppen

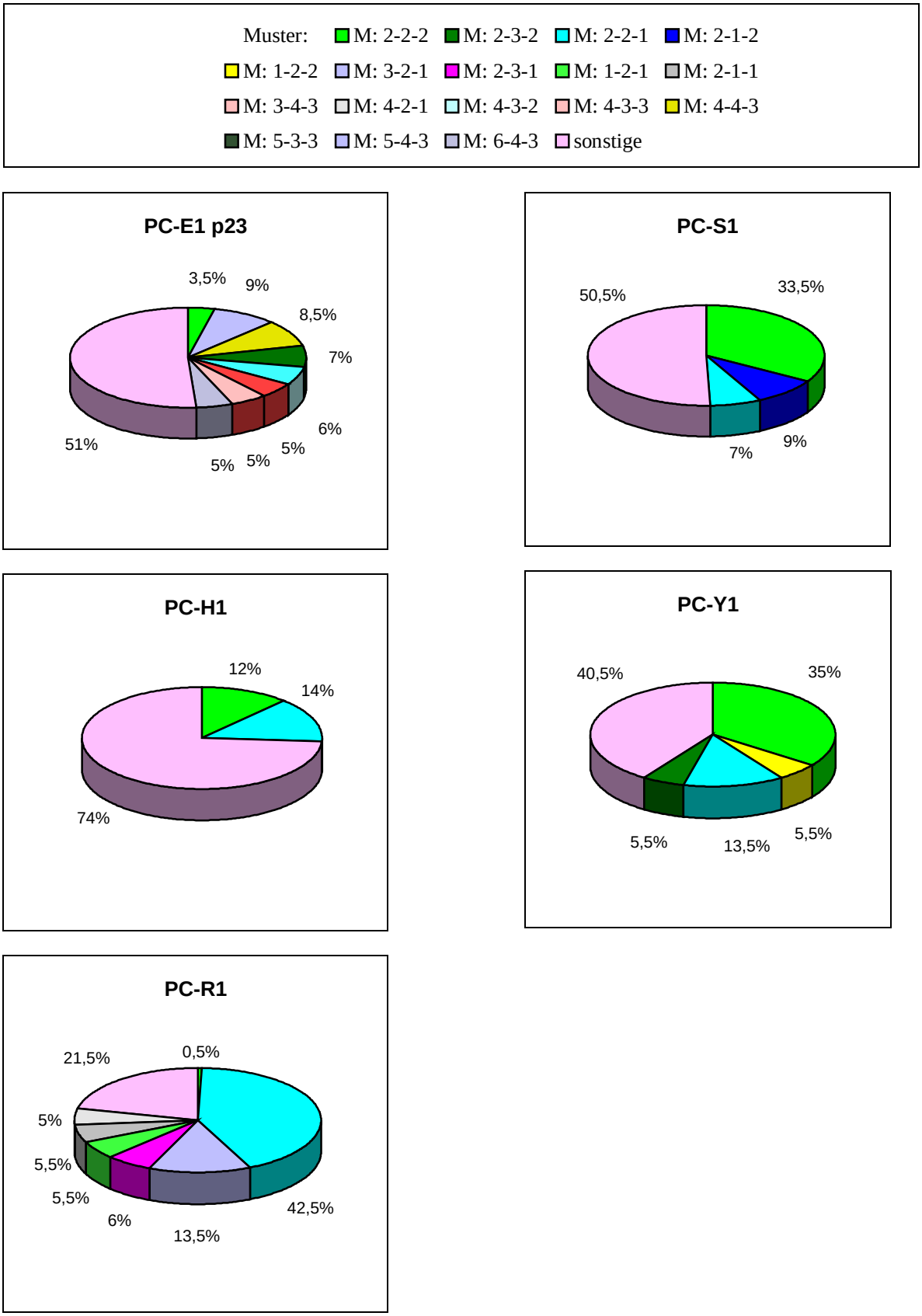
Muster der größten Gruppe: 6p-8q-8p	**Vorkommen**
2-2-2	2; (PC-S1, PC-Y1)
2-2-1	2; (PC-H1, PC-R1)
5-4-3	1; (PC-E1 p23)

Muster der zweitgrößten Gruppe: 6p-8q-8p	Vorkommen
2-2-2	1; (PC-H1)
2-2-1	1; (PC-Y1)
2-1-2	1; (PC-S1)
3-2-1	1; (PC-R1)
4-4-3	1; (PC-E1 p23)

Legende: Unter „Vorkommen“ ist die Anzahl der Zelllinien angegeben, in denen das Muster eine entsprechend große Gruppe darstellte. In Klammern dahinter wurden die betroffenen Zelllinien aufgeführt.

Zur vereinfachten Darstellung der Vorkommen des Muster dienen 3D-Kreisdiagramme (Diagramm 3.2-1). In den Diagrammen wurden alle Muster aufgezeigt, die in der jeweiligen Zelllinie in mindestens 5% der Zellen detektiert wurden. Eine Ausnahme bildet in diesem Fall das Muster: 2-2-2. Der prozentuale Anteil des normalen Hybridisierungsmusters ist ohne Berücksichtigung des Wertes für jede Zelllinie angegeben. Andere Muster, die nur in weniger als 5% der untersuchten Zellen zu finden waren, sind unter der Gruppe „sonstige“ zusammengefasst. Die genaue Aufschlüsselung dieser Gruppe wurde im Anhang abgedruckt. Insgesamt war eine hohe Heterogenität aller Zelllinien auffällig.

Diagramm 3.2-1: Musterverteilung der Zelllinien



Alle Muster, die im Diagramm 3.2-1 aufgeführt wurden, d.h. deren Anteil in einer Zellinine mindestens 5% der ausgewerteten Zellen ausmachte und gleichzeitig signifikant von der Anzahl der Kontrollzellen (Tabelle 3.1-1) mit dem entsprechenden Muster abwich ($p < 0,01$), wurden in Tabelle 3.2-4 zusammengefasst.

Tabelle 3.2-4:

Muster: 6p-8q-8p	**Vorkommen**
2-2-1	4; (PC-H1, PC-R1, PC-S1, PC-Y1)
2-1-2	1; (PC-S1)
3-2-1	1; (PC-R1)
2-3-1	1; (PC-R1)
1-2-1	1; (PC-R1)
2-1-1	1; (PC-R1)
4-2-1	1; (PC-R1)
2-3-2	1; (PC-Y1)
6-4-3	1; (PC-E1 p23)
5-4-3	1; (PC-E1 p23)
5-3-3	1; (PC-E1 p23)
4-4-3	1; (PC-E1 p23)
4-3-3	1; (PC-E1 p23)
4-3-2	1; (PC-E1 p23)
3-4-3	1; (PC-E1 p23)

Legende: Angegeben sind die Muster, die signifikant häufiger in den Zelllinien detektiert wurden ($p < 0,01$) als in den Kontrollgruppen und mindestens einen Anteil von 5% der untersuchten Zellen je Zelllinie darstellten.
Unter „Vorkommen“ ist die Anzahl der Zelllinien angegeben, in denen ein entsprechender Zellanteil die Kriterien erfüllte. In Klammern dahinter wurden die betroffenen Zelllinien aufgeführt.

Vergleich der durchschnittlichen Anzahl an Kopien (ANC)

Ein Vergleich der durchschnittlichen Anzahl an Kopien (ANC-Werte) der Tumorzellen für jede Sonde mit den Signifikanzbereichen der ANC-Werte der Kontrollgruppen würde in allen Zelllinien für mindestens eine Sonde eine signifikante Abweichung ermitteln (Tabellen 3.1-1 und 3.2-1). Dreimal müsste ein 6p-Zugewinn (PC-E1 p23, PC-H1, PC-R1) festgestellt werden, wobei in einem Fall sogar von durchschnittlich vier Kopien von 6p ausgegangen werden müsste (PC-E1 p23). Ein 6p-Verlust würde in einer Zelllinie auftreten (PC-Y1). Ein Zugewinn von 8q könnte in vier Fällen nachgewiesen werden (PC-E1 p23, PC-H1, PC-R1, PC-Y1). Ein Zugewinn von 8p fände sich in zwei Zelllinien (PC-E1 p23, PC-H1), ebenso wie ein 8p-Verlust (PC-R1, PC-S1).

Bei genauer Betrachtung der ANC-Werte erscheint ein direkter Vergleich der ANC-Werte mit dem Signifikanzbereich der ANC-Werte der Kontrollgruppen jedoch nicht zulässig, da nicht erwiesen ist, dass bei den Zelllinien, die eher einem fortgeschrittenen Tumor entsprechen, ebenfalls ein diploider Chromosomensatz vorliegt, wie er in den Kontrollgruppen erwartet werden darf. Ursprünglich erfolgte die Auswahl der Sonden 8p und 8q aufgrund der in der Literatur beschriebenen Veränderungen der Primärtumore. Hierzu sei auch auf Einleitung und Diskussion dieser Arbeit verwiesen. Für Chromosom 6p waren für das Prostatakarzinom bisher kaum Veränderungen beschrieben, so dass die 6p-Sonde als Kontrolle dienen sollte. Werden die ANC-Werte der Zelllinien unter dieser Annahme betrachtet, so kann 6p ein Maß für die Ploidie der Zellen sein. Dann wäre z.B. bei PC-E1 p23 von einem tetraploiden Chromosomensatz auszugehen. In diesem Fall läge für 8p kein Zugewinn sondern ein relativer Verlust vor. Diese These deckt sich mit den Ergebnissen von CGH-Analysen, die durch die Arbeitsgruppe um Priv.-Doz. Dr. M. Speicher im Institut für Humangenetik durchgeführt wurden.

Auch bei den anderen Zelllinien ist damit von einem relativen Verlust oder Zugewinn auszugehen. Werden die Ergebnisse unter diesem Gesichtspunkt betrachtet, so ergibt sich für 8p insgesamt viermal ein 8p Verlust, nämlich in den Zelllinien PC-E1, PC-H1, PC-R1 und PC-S1.

Zusammenfassend lassen sich für die Zelllinien folgende Aussagen treffen:

1. Insgesamt fanden sich signifikante Veränderungen an allen drei untersuchten Chromosomenlokalisationen.
2. In nur zwei der fünf Zelllinien wurde die jeweils größte Gruppe der untersuchten Tumorzellen von Zellen mit unauffälligem Hybridisierungsmuster, also je zwei Signale für 6p, 8q und 8p gebildet. Diese Gruppen waren signifikant kleiner, als die der entsprechenden Kontrollgruppen.
3. Unter der Annahme einer genetischen Instabilität lag unter der Berücksichtigung der Ploidie in vier Zelllinien ein relativer 8p-Verlust vor.
4. In allen Zelllinien lag eine starke Heterogenität der Zellen vor.

3.3 Auswertung der Primärkulturen

Die Auswertung der Primärkulturen erfolgte in gleicher Weise wie die der Zelllinien (siehe Punkt 3.2). Für alle Primärkulturen wurden 200 Zytokeratin-positive Zellen ausgezählt. Die genaue Aufschlüsselung aller ausgezählten Zellen wurde für jede Primärkultur im Anhang abgedruckt.

Die Auswertung aller Muster, die in mindestens einer Kontrollgruppe, einer Zelllinie oder einer Primärkultur in mindestens 5% der untersuchten Zellen detektiert wurden, ist in Tabelle 3.3-1 zusammengefasst. In der ersten Spalte finden sich die verschiedenen Muster wiederum in der Reihenfolge: Anzahl der Signale für 6p-8q-8p. Nachfolgend sind jeweils zwei Spalten von der gleichen Primärkultur belegt. Für jede Primärkultur sind die Anzahl der Zellen mit gleichem Muster und der entsprechende prozentuale Anteil angegeben. Der prozentual größte und zweitgrößte Anteil der Zellen mit gleichem Hybridisierungsmuster wurde für jede Primärkultur fett gedruckt (vergl. Tabelle 3.2-1).

Tabelle 3.3-1: Vorkommen der Muster bei den Primärkulturen

	PC-E1	**p1**	**PC-E1 -nach**	**p1**	**PC-H3**	**p1**	**PC-L2**	**p1**	**PC-M2**	**p1**	**PC-P1**	**p6**
Muster: 6p-8q-8p	**Anzahl**	**%-Anteil**	**Anzahl**	**%-Anteil**	**Anzahl**	**%-Anteil**	**Anzahl**	**%-Anteil**	**Anzahl**	**%-Anteil**	**Anzahl**	**%-Anteil**
2-2-2	108	**54,0**	103	**51,5**	75	**37,5**	74	**37,0**	76	**38,0**	61	**30,5**
3-2-2	8	4,0	1	0,5	8	4,0	5	2,5	8	4,0	11	5,5
2-1-2	24	**12,0**	6	3,0	24	**12,0**	33	**16,5**	21	**10,5**	28	**14,0**
1-2-2	13	6,5	29	**14,5**	17	8,5	19	9,5	14	7,0	15	7,5
2-2-1	8	4,0	17	8,5	7	3,5	12	6,0	10	5,0	10	5,0
3-2-1	2	1,0	0	0	0	0	0	0	2	1,0	0	0
2-3-1	1	0,5	1	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0
1-2-1	0	0	2	1,0	1	0,5	2	1,0	1	0,5	0	0
2-1-1	2	1,0	6	3,0	8	4,0	4	2,0	14	7,0	11	5,5
4-2-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-3-2	5	2,5	2	1,0	6	3,0	4	2,0	16	8,0	6	3,0
1-1-2	5	2,5	2	1,0	11	5,5	11	5,5	10	5,0	7	3,5
2-2-3	5	2,5	2	1,0	4	2,0	6	3,0	2	1,0	10	5,0
0-1-2	0	0	0	0	4	2,0	4	2,0	0	0	0	0
2-0-2	1	0,5	1	0,5	3	1,5	7	3,5	2	1,0	6	3,0
5-4-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-4-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-3-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-3-2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,5	0	0
3-4-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-3-3	0	0	0	0	0	0	1	0,5	0	0	0	0
6-4-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0-2-2	0	0	3	1,5	1	0,5	2	1,0	0	0	3	1,5
ANC:												
6p	2,035		1,755		1,875		1,825		1,995		2,025	
8q	1,885		1,905		1,695		1,640		1,800		1,670	
8p	2,005		1,810		1,975		1,940		1,835		1,935	

Fortsetzung Tabelle 3.3-1

	PC-S2	p2	PC-S3	P1	PC-S8	p2	PC-S9	p1	PC-W2	p3
Muster: 6p-8q-8p	**Anzahl**	**%-Anteil**	**Anzahl**	**%-Anteil**	**Anzahl**	**%-Anteil**	**Anzahl**	**%-Anteil**	**Anzahl**	**%-Anteil**
2-2-2	73	**36,5**	95	**47,5**	86	**43,0**	58	**29,0**	35	**17,5**
3-2-2	3	1,5	6	3,0	6	3,0	1	0,5	3	1,5
2-1-2	32	**16,0**	16	**8,0**	16	**8,0**	22	**11,0**	13	6,5
1-2-2	10	5,0	8	4,0	5	2,5	9	4,5	38	**19,0**
2-2-1	10	5,0	10	5,0	15	7,5	5	2,5	8	4,0
3-2-1	0	0	0	0	1	0,5	0	0	0	0
2-3-1	0	0	1	0,5	1	0,5	2	1,0	0	0
1-2-1	0	0	1	0,5	2	1,0	4	2,0	1	0,5
2-1-1	10	5,0	4	2,0	5	2,5	10	5,0	2	1,0
4-2-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-3-2	6	3,0	4	2,0	16	**8,0**	2	1,0	15	7,5
1-1-2	2	1,0	5	2,5	0	0	12	6,0	5	2,5
2-2-3	7	3,5	8	4,0	7	3,5	5	2,5	10	5,0
0-1-2-	1	0,5	3	1,5	0	0	14	7,0	4	2,0
2-0-2	7	3,5	4	2,0	8	4,0	14	7,0	2	1,0
5-4-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-4-3	0	0	0	0	0	0	1	0,5	1	0,5
5-3-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-3-2	0	0	0	0	2	1,0	0	0	0	0
3-4-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-3-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6-4-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0-2-2	3	1,5	2	1,0	0	0	1	0,5	14	7,0
ANC:										
6p	1,880		1,955		2,090		1,630		1,510	
8q	1,620		1,880		1,895		1,360		2,040	
8p	1,970		1,910		1,875		1,880		2,255	

Legende: ANC: average number of copies
p: Passage

Bei zehn von elf untersuchten Primärkulturen bildeten Zellen mit einem unauffälligen Hybridisierungsmuster für die untersuchten Regionen die größte Gruppe der untersuchten Zellen. Allerdings war ihr Anteil in allen Tumorpatienten signifikant geringer ($p < 0,05$) als der Anteil von Zellen mit unauffälligen Hybridisierungsmuster der Kontrollgruppen. In einer Primärkultur (PC-W2) fanden sich, als anteilmäßig größte Gruppe, Zellen mit dem Genommuster 1-2-2, d.h. ein Signal für 6p und je zwei Signale für 8q und 8p. Dieses Muster stellte in einer anderen Primärkultur (PC-E1-nach) die zweitgrößte Gruppe der vorkommenden Zellen dar und war außerdem in fünf weiteren Primärkulturen signifikant häufig zu finden (PC-E1, PC-H3, PC-L2, PC-M2, PC-P1). Die jeweiligen Muster der größten und zweitgrößten Gruppen sind in den Tabelle 3.3-2 und 3.3.-3 nochmals herausgestellt.

Tabellen 3.3-2 und 3.3-3: Muster der größten und zweitgrößten Gruppen

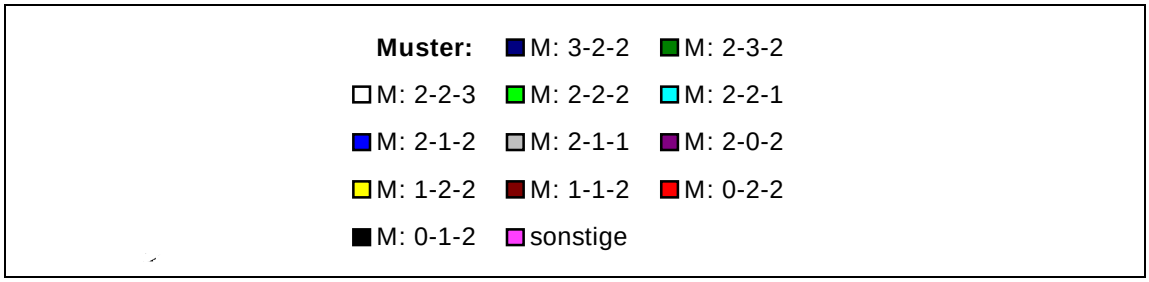
Muster der größten Gruppe: 6p-8q-8p	Vorkommen
2-2-2	10; (PC-E1, PC-E1-nach, PC-H3, PC-L2, PC-M2, PC-P1, PC-S2, PC-S3, PC-S8, PC-S9)
1-2-2	1; (PC-W2)

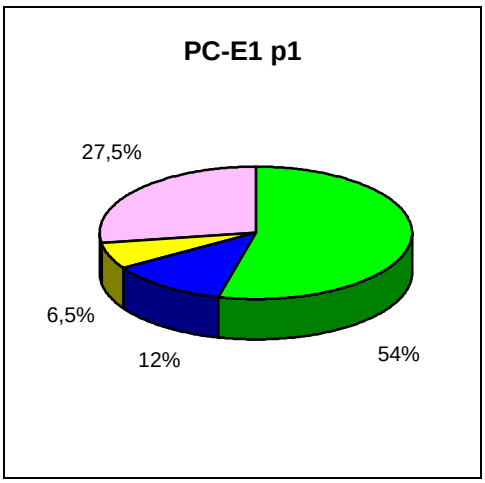
Muster der zweitgrößten Gruppe: 6p-8q-8p	**Vorkommen**
2-1-2	9; (PC-E1, PC-H3, PC-L2, PC-M2, PC-P1, PC-S2, PC-S3, PC-S8, PC-S9)
2-2-2	1; (PC-W2)
1-2-2	1; (PC-E1-nach)
2-3-2	1; (PC-S8)

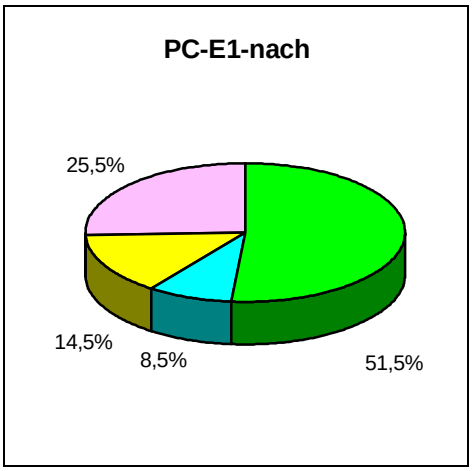
Legende: Unter „Vorkommen“ ist die Anzahl der Primärkulturen angegeben, in denen ein entsprechender Zellanteil die Kriterien erfüllte. In Klammern dahinter wurden die betroffenen Primärkulturen aufgeführt.

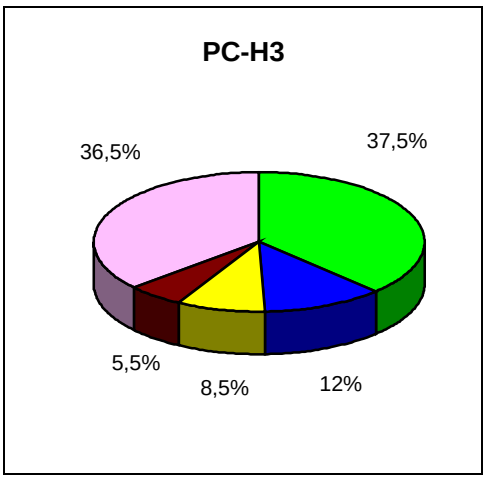
Insgesamt fiel eine große Heterogenität der Zellen auf. Zur vereinfachten Darstellung wurden die prozentualen Verteilungen der Muster für alle Primärkulturen in 3D-Kreisdiagrammen (Diagramm 3.3-1) zusammengestellt. Alle Muster, die in der jeweiligen Primärkultur in mindestens 5% der Zellen detektiert wurden, wurden in den Digrammen aufgezeigt. Eine Ausnahme bildete das Muster: 2-2-2 (Anzahl der Signale für 6p-8q-8p). Der prozentuale Anteil des unauffälligen Hybridisierungsmusters wurde ohne Berücksichtigung des Wertes für jede Primärkultur angegeben. Andere Hybridisierungsmuster, die nur in weniger als 5% der Zellen zu finden waren, wurden unter „sonstige“ zusammengefasst. Die genaue Aufschlüsselung der Gruppe „sonstige“ befindet sich im Anhang.

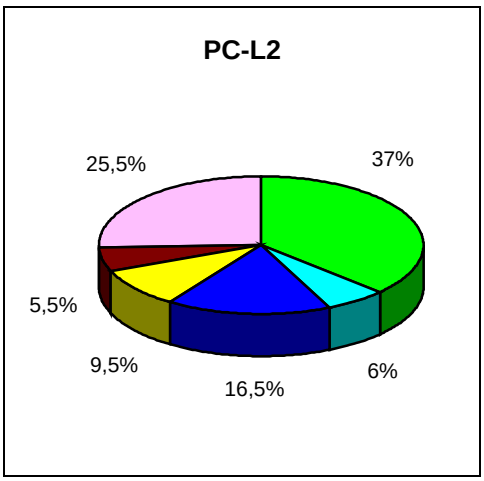
Diagramm 3.3-1: Musterverteilung der Primärkulturen

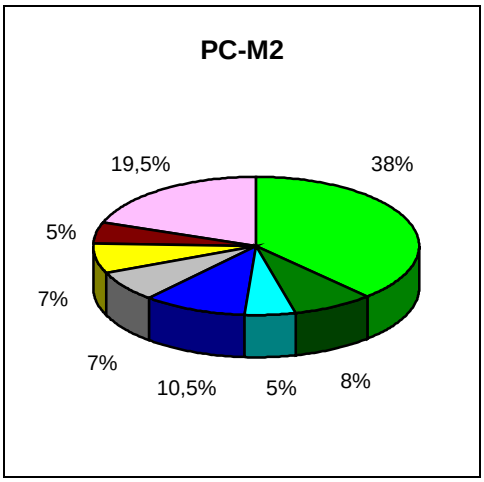


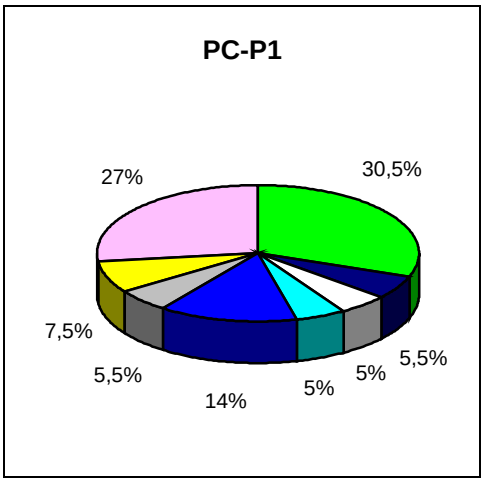


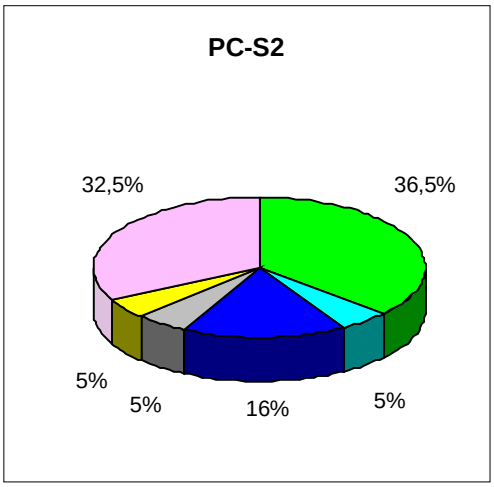


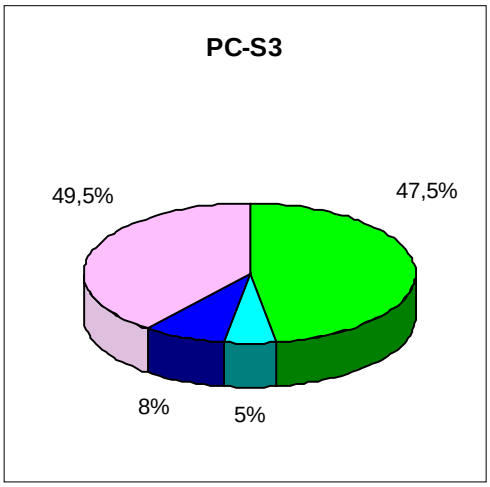


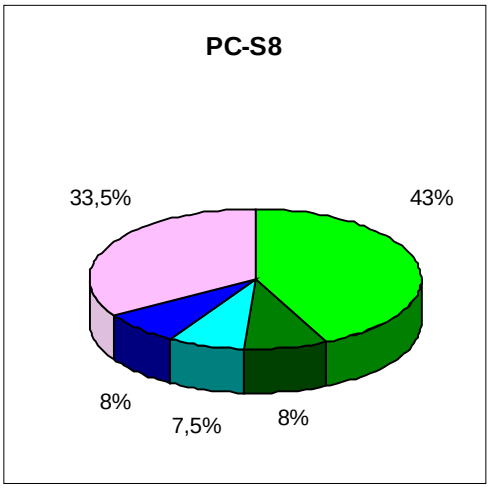


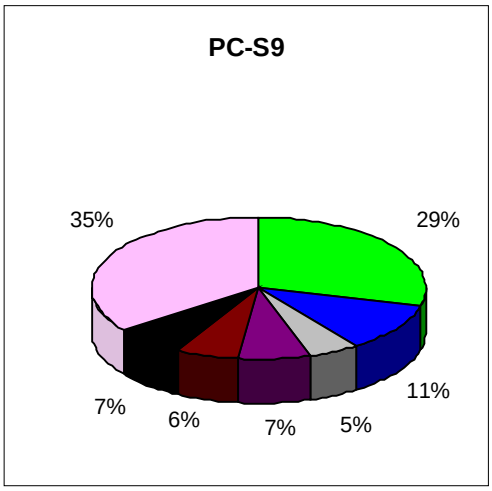


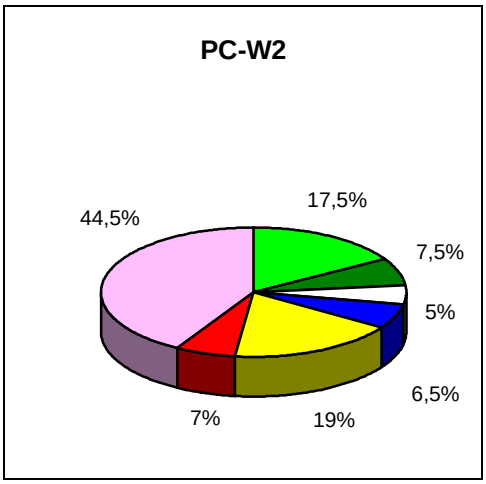



PC-S2
32,5%
36,5%
5%
5%
16%
5%


PC-S3
49,5%
47,5%
8%
5%


PC-S8
33,5%
43%
8%
7,5%
8%


PC-S9
35%
29%
11%
7%
6%
7%
5%


PC-W2
17,5%
44,5%
7,5%
5%
6,5%
7%
19%

Alle Hybridisierungsmuster, die im Diagramm 3.3-1 aufgeführt wurden, d.h. die in mindestens 5% der untersuchten Zellen einer Primärkultur auftraten und gleichzeitig signifikant häufiger in den Tumorzellen als in den Kontrollgruppen detektiert wurden, sind in Tabelle 3.3-4 zusammengefaßt.

Tabelle 3.3-4:

Muster: 6p-8q-8p		**Vorkommen**
2-1-2		9; (PC-E1**, PC-H3**, PC-L2**, PC-M2**, PC-P1**, PC-S2** , PC-S3*, PC-S8*, PC-S9**)
2-2-1		7; (PC-E1-nach**, PC-L2**, PC-M2**, PC-P1**, PC-S2**, PC-S3**, PC-S8**)
1-2-2		7; (PC-E1*, PC-E1-nach**, PC-H3**, PC-L2**, PC-M2*, PC-P1**, PC-W2**)
2-1-1		4; (PC-M2**, PC-P1**, PC-S2**, PC-S9**)
1-1-2		4; (PC-H3**, PC-L2**, PC-M2**, PC-S9**)
2-3-2		3; (PC-M2**, PC-S8**, PC-W2**)
2-2-3		2; (PC-P1**, PC-W2**)
0-2-2		1; (PC-W2**)
0-1-2		1; (PC-S9**)
2-0-2		1; (PC-S9**)

Legende: Angegeben sind die Muster, die signifikant häufiger (** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$) in den Primärkulturen auftraten als in den Kontrollgruppen und mindestens einen Anteil von 5% der untersuchten Zellen darstellten.
Unter „Vorkommen“ ist die Anzahl der Primärkulturen angegeben, in denen ein entsprechender Zellanteil die Kriterien erfüllte. In Klammern dahinter wurden die betroffenen Primärkulturen aufgeführt.

Vergleich der durchschnittlichen Anzahl an Kopien (ANC)

Beim Vergleich der ANC-Werte (average number of copies) mit den Kontrollgruppen fanden sich in den Primärkulturen insgesamt folgende signifikanten Veränderungen:
sieben mal ein 6p Verlust (PC-E1-nach, PC-H3, PC-L2, PC-S2, PC-S3, PC-S9, PC-W2), zehn mal ein 8q Verlust (PC-E1 p1, PC-E1-nach, PC-H3, PC-L2, PC-M2, PC-P1, PC-S2, PC-S3, PC-S8, PC-S9) einmal ein 8q Zugewinn, neun mal ein 8p Verlust (PC-E1-nach, PC-H3, PC-L2, PC-M2, PC-P1, PC-S2, PC-S3, PC-S8, PC-S9) und einmal ein Zugewinn von 8p (PC-W2).

Tabelle 3.3-5: Signifikante Abweichungen der ANC-Werte

Sonde	Zugewinn	Verlust
6p	0	7; (PC-E1-nach**, PC-H3**, PC-L2**, PC-S2**, PC-S3*, PC-S9**, PC-W2**)
8q	1; (PC-W2**)	10; (PC-E1p1**, PC-E1-nach**, PC-H3**, PC-L2, PC-M2**, PC-P1**, PC-S2**, PC-S3**, PC-S8**, PC-S9**)
8p	1; (PC-W2**)	9; (PC-E1-nach**, PC-H3*, PC-L2**, PC-M2**, PC-P1**, PC-S2*, PC-S3**, PC-S8**, PC-S9**)

Legende: ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$

Zusammenfassend lassen sich für die Primärkulturen folgende Aussagen treffen:

1. Insgesamt fanden sich an allen drei untersuchten Chromosomenlokalisationen signifikante Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollgruppen.
2. In zehn der elf untersuchten Primärkulturen wurden die anteilsmäßig größten Gruppen von Tumorzellen mit unauffälligem Hybridisierungsmuster gebildet. Hierbei waren die Anteile jeweils signifikant kleiner als die entsprechenden Anteile in den Kontrollgruppen.
3. Im Vergleich der durchschnittlichen Anzahl an Kopien (ANC) je Sonde (Tab. 3.3-5), zeigten sich für alle drei Chromosomenlokalisationen überwiegend Verluste. Zugewinne für 8q und 8p wurden in nur einer Primärkultur entdeckt.
4. In allen Primärkulturen lag eine starke Heterogenität der Zellen vor.

3.4 Veränderung der Zelllinie PC-E1 im Verlauf verschiedener Passagen

Als besonders interessant erwies sich die Beobachtung einer Zelllinie über mehrere Passagen. Der betroffene Patient erhielt Aufgrund eines Tumorrezidivs im Abstand von sieben Monaten zweimal eine Knochenmarkpunktion. Von beiden Punktaten wurden Zellen nach der ersten Passage p1 analysiert. Die Zellen der ersten Punktion konnten durch SV 40 Transfektion in Langzeitkultur gehalten werden. So war es möglich, eine erneute Analyse in p23 durchzuführen (PC-E1). Die Primärkultur der zweiten Knochenmarkpunktion ist mit PC-E1-nach gekennzeichnet. In Tabelle 3.4-1 sind die verschiedene Muster der Untersuchungen von PC-E1 p1, PC-E1 p23 und PC-E1-nach p1 tabellarisch zusammengestellt. Wie unter Punkt 3.2 aufgeführt erfolgte auch hier die Berücksichtigung der Muster in gleicher Weise.

Tabelle 3.4-1: Vorkommen der Muster bei PC-E1 p1, PC-E1 p23 und PC-E1-nach p1

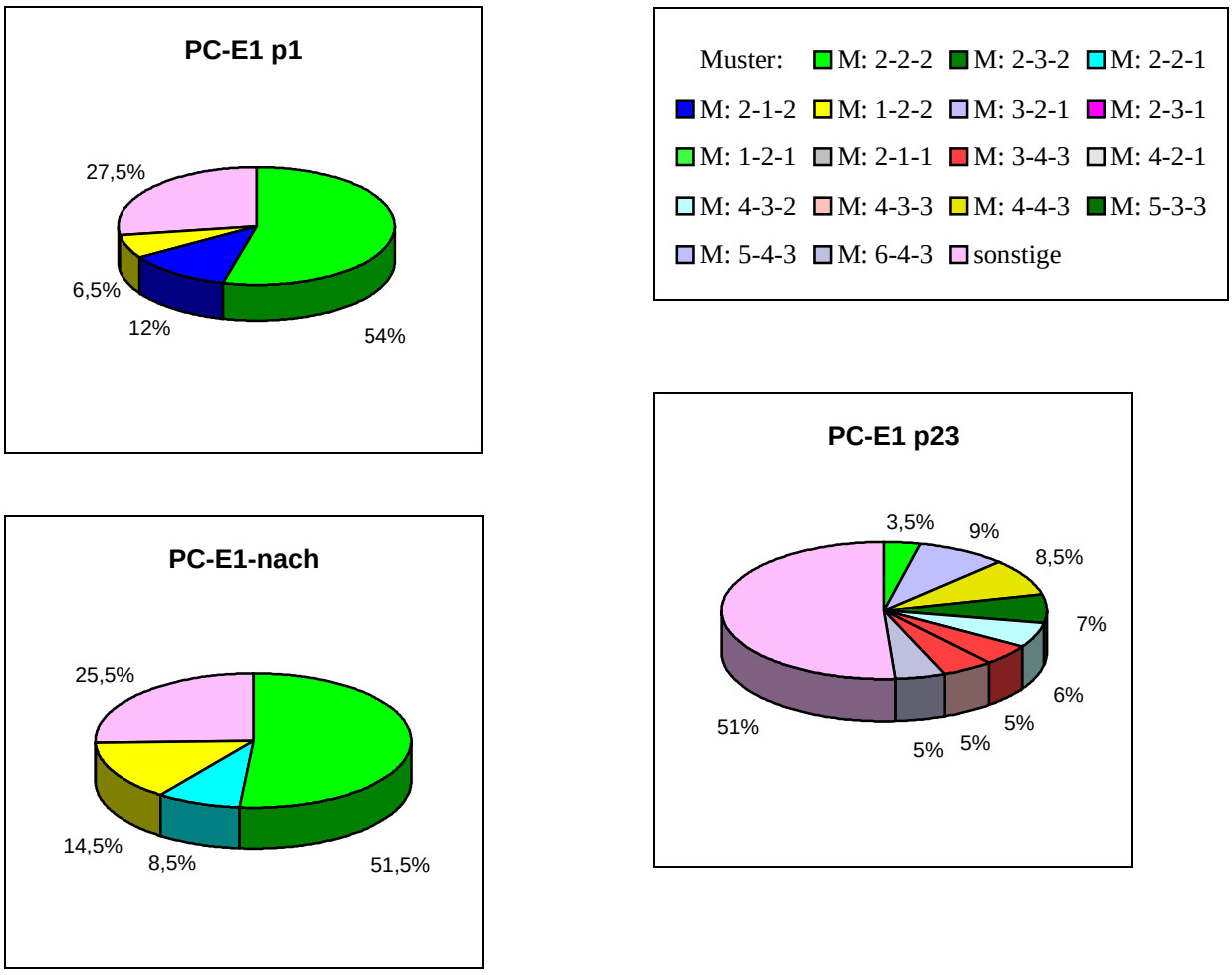
	PC-E1	**p1**	**PC-E1**	**p23**	**PC-E1**	**p1**	**PC-E1-**	**nach p1**
Muster: 6p-8q-8p	**Anzahl**	**%-Anteil**	**Anzahl**	**%-Anteil**	**Anzahl**	**%-Anteil**	**Anzahl**	**%-Anteil**
2-2-2	108	**54,0**	7	3,5	108	54,0	103	**51,5**
3-2-2	8	4,0	4	2,0	8	4,0	1	0,5
2-1-2	24	**12,0**	0	0	24	12,0	6	3,0
1-2-2	13	6,5	0	0	13	6,5	29	**14,5**
2-2-1	8	4,0	1	0,5	8	4,0	17	8,5
3-2-1	2	1,0	3	1,5	2	1,0	0	0
2-3-1	1	0,5	0	0	1	0,5	1	0,5
1-2-1	0	0	0	0	0	0	2	1,0
2-1-1	2	1,0	0	0	2	1,0	6	3,0
4-2-1	0	0	0	0	0	0	0	0
2-3-2	5	2,5	2	1,0	5	2,5	2	1,0
1-1-2	5	2,5	0	0	5	2,5	2	1,0
2-2-3	5	2,5	1	0,5	5	2,5	2	1,0
0-1-2	0	0	0	0	0	0	0	0
2-0-2	1	0,5	0	0	1	0,5	1	0,5
5-4-3	0	0	18	**9,0**	0	0	0	0
4-4-3	0	0	17	**8,5**	0	0	0	0
5-3-3	0	0	14	7,0	0	0	0	0
4-3-2	0	0	12	6,0	0	0	0	0
3-4-3	0	0	10	5,0	0	0	0	0
4-3-3	0	0	10	5,0	0	0	0	0
6-4-3	0	0	10	5,0	0	0	0	0
0-2-2	0	0	0	0	0	0	3	1,5
ANC:								
6p	2,035		4,315		2,035		1,755	
8q	1,885		3,365		1,885		1,905	
8p	2,005		2,780		2,005		1,810	

Legende: Es wurden je 200 Zellen gezählt. ANC: average number of copies, p: Passage

Aus den Zellen der Passage p1 ergab sich jeweils die größte Gruppe von Zellen (54% bzw. 51,5%) mit einem unauffälligen Hybridisierungsmuster für die untersuchten Regionen, während in p23 lediglich 3,5% der Zellen ein normales Signalmuster aufwiesen. In p23 zeigte sich eine deutliche Zunahme der Heterogenität, so dass die größte Gruppe der Zellen mit gleichem Signalmuster nur einen Anteil von 9% der ausgewerteten Zellen ausmachte. In p23 wurde außerdem eine Tendenz zur Polyploidie festgestellt. Als weitere Besonderheit erwies sich die Zytokeratinnegativität in p23. Das Präparat wurde der gleichen Prozedur unterzogen, wie alle anderen; eine Färbung konnte jedoch auch durch Titrierung des AK-Cocktails nicht erzielt werden.

Um die unterschiedlichen Veränderungen der drei Kulturen zu verdeutlichen wurden die Diagramme aus 3.2-1 und 3.3-1 herausgenommen und im Diagramm 3.4-1 zusammengestellt.

Diagramm 3.4-1: Musterverteilung von PC-E1 p1, PC-E1 p23 und PC-E1-nach p1



3.5 Vergleich von Zytokeratin-positiven und Zytokeratin-negativen Zellen

3.5.1 Zytokeratin-negative Zellen von Primärkulturen

An zwei Primärkulturen wurden neben den 200 Zytokeratin-positiven Zellen auch 200 Zytokeratin-negative Zellen in gleicher Weise ausgewertet. In Tabelle 3.5-1 sind die Ergebnisse für die gleichen Muster zusammengestellt, wie sie unter den Punkten 3.2 und 3.3 berücksichtigt wurden. Die genaue Aufschlüsselung aller ausgezählten Muster ist im Anhang zu finden.

Tabelle 3.5-1: Vorkommen der Muster bei PC-E1 p1 und PC-H3 p1 an Zytokeratin-positiven und Zytokeratin-negativen Zellen

	PC-E1	p1 CK-	PC-E1	p1 CK+	PC-H3	p1 CK-	PC-H3	p1 CK+
Muster: 6p-8q-8p	Anzahl	%-Anteil	Anzahl	%-Anteil	Anzahl	%-Anteil	Anzahl	%-Anteil
2-2-2	**134**	67,0	**108**	54,0	**124**	62,0	**75**	37,5
3-2-2	**20**	10,0	**8**	**4,0**	**8**	**4,0**	**8**	**4,0**
2-1-2	**8**	**4,0**	**24**	12,0	**10**	**5,0**	**24**	12,0
1-2-2	**15**	**7,5**	**13**	**6,5**	**15**	7,5	**17**	**8,5**
2-2-1	**7**	**3,5**	**8**	**4,0**	**0**	**0**	**7**	**3,5**
3-2-1	**0**	**0**	**2**	**1,0**	**4**	**2,0**	**0**	**0**
2-3-1	**0**	**0**	**1**	**0,5**	**2**	**1,0**	**0**	**0**
1-2-1	**1**	**0,5**	**0**	**0**	**0**	**0**	**1**	**0,5**
2-1-1	**1**	**0,5**	**2**	**1,0**	**2**	**1,0**	**8**	**4,0**
4-2-1	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
2-3-2	**6**	**3,0**	**5**	**2,5**	**0**	**0**	**6**	**3,0**
1-1-2	**0**	**0**	**5**	**2,5**	**2**	**1,0**	**11**	**5,5**
2-2-3	**4**	**2,0**	**5**	**2,5**	**7**	**3,5**	**4**	**2,0**
0-1-2	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**4**	**2,0**
2-0-2	**0**	**0**	**1**	**0,5**	**0**	**0**	**3**	**1,5**
5-4-3	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
4-4-3	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
5-3-3	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
4-3-2	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
3-4-3	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
4-3-3	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
6-4-3	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
0-2-2	**0**	**0**	**0**	**0**	**4**	**2,0**	**1**	**0,5**
ANC:								
6p	**2,040**		**2,035**		**1,960**		**1,875**	
8q	**1,990**		**1,885**		**2,050**		**1,695**	
8p	**1,980**		**2,005**		**2,080**		**1,975**	

Legende: Es wurden jeweils 200 Zellen ausgewertet.
CK-: Cytokeratin-negative Zellen
CK+: Cytokeratin-positive Zellen
ANC: average number of copies

Beide Primärkulturen wiesen in einem sehr hohen Prozentsatz Zellen mit normalem Genommuster für die untersuchten Regionen auf. Diese Zellgruppen mit dem Muster M:2-2-2 lagen innerhalb des Signifikanzbereiches der Kontrollgruppen. Außerhalb des Signifikanzbereiches ($p < 0,01$) lag jedoch auch hier mindestens ein Subklon pro Primärkultur. Berücksichtigt wurden Klone, die einen Anteil von mindestens fünf Prozent der untersuchten Zellen ausmachten. Dies war bei PC-E1 p1 für die Muster M: 3-2-2 und M: 1-2-2, bei PC-H3 p1 für das Muster M: 1-2-2 der Fall.

Die ANC-Werte der Zytokeratin-negativen Zellen lagen im Fall von PC-E1 p1 für 6p und 8q innerhalb des Signifikanzbereiches der Kontrollgruppen, der ANC-Wert für 8p wich signifikant vom entsprechenden ANC-Wert der Kontrollgruppen ab ($p < 0,05$). Bei PC-H3 wich der ANC-Wert 8q ($p < 0,01$) signifikant vom ANC-Wert der Kontrollgruppen ab, wohingegen bei den Werten für 6p und 8p kein signifikanter Unterschied festgestellt wurde. Das heißt im Durchschnitt aller untersuchten Zellen wiesen die Zytokeratin-negativen Zellen der Primärkultur PC-E1 einen 8p-Verlust, die Zytokeratin-negativen Zellen der Primärkultur PC-H3 p1 einen 8q Zugewinn auf.

Ein Vergleich der Zytokeratin-positiven Zellen mit den Zytokeratin-negativen ergibt für PC-E1 p1 folgende Unterschiede:

1. Die Hauptgruppe aller untersuchten Zellen wurde jeweils durch Zellen mit normalem Hybridisierungsmuster für die untersuchten Regionen (M:2-2-2) gebildet. Bei den Zytokeratin-positiven Zellen (PC-E1 p1 CK+) war der Anteil mit diesem Hybridisierungsmuster jedoch signifikant kleiner als der der Kontrollgruppen ($p < 0,05$) wohingegen er bei den Zytokeratin-negativen Zellen (PC-E1 p1 CK-) nicht signifikant von dem der Kontrollgruppen abwichen.
2. Zytokeratin-positive und -negative Zellen wiesen unterschiedliche Subklone auf:
   PC-E1 p1 CK+ : M: 2-1-2.
   PC-E1 p1 CK- : M: 3-2-2; M: 1-2-2.
3. Bei PC-E1 p1 CK+ zeigt der ANC-Wert für 8q-Verlust eine signifikante Abweichung von den Kontrollgruppen. Bei PC-E1 p1 CK- lagen die ANC-Werte für 6p und 8q innerhalb des Signifikanzbereiches. Der ANC-Wert für 8p wich signifikant vom entsprechenden ANC-Wert der Kontrollgruppen ab und markierte einen 8p-Verlust.

Ein Vergleich der Zytokeratin-negativen mit den Zytokeratin-positiven Zellen ergibt für PC-H3 p1 folgende Unterschiede:

1. Die Hauptgruppe aller untersuchten Zellen wurde jeweils durch Zellen mit unauffälligem Hybridisierungsmuster für die untersuchten Regionen (M:2-2-2) gebildet, lag aber bei den Zytokeratin-positiven Zellen (PC-H3 p1 CK+) außerhalb des Signifikanzbereiches der Kontrollgruppen ($p < 0,01$). Bei den Zytokeratin-negativen Zellen (PC-H3 p1 CK-) war sie innerhalb des Signifikanzbereiches zu finden.
2. Die Subklone der Zytokeratin-positiven und der Subklon der Zytokeratin-negativen Zellen glichen sich in einem Muster:

   PC-H3 p1 CK+: M: 2-1-2; M: 1-2-2; M: 1-1-2.
   PC-H3 p1 CK-: M: 1-2-2.

3. Bei PC-H3 p1 CK+ lagen die ANC-Werte aller Sonden außerhalb des Signifikanzbereiches ($p < 0,05$) und zeigten einen durchschnittlichen Verlust der Region 6p, 8q und 8p an. Im Falle von PC-H3 p1 CK- unterschied sich der ANC-Wert für 6p und 8p nicht signifikant von den Kontrollgruppen. Der Wert für die 8q Region zeigte einen durchschnittlichen Zugewinn und wich signifikant von den Kontrollgruppen ab.

3.5.2 Zytokeratin-negative Zellen von Zelllinien

Für die Zelllinien wurden nicht zusätzlich 200 Zytokeratin-negative Zellen ausgewertet. Es erfolgte eine Auszählung von 100 Zytokeratin-negativen und 100 Zytokeratin-positiven Zellen auf den gleichen Präparaten, die nur die Anzahl der Signale pro Sonde, nicht aber eine genaue Musteraufschlüsselung für jeden Zellkern berücksichtigte. Die Ergebnisse wurden in der Tabelle 3.5-2 zusammengestellt.

Tabelle 3.5-2: Zytokeratin-positive und -negative Zellen der Zelllinien

Auswertung PC-H1 p12; Zytokeratin-positive Zellen (59%)										
	Anzahl	**Signale pro Sonde**							**ANC**	**ANC Abeichung**
		0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**		
6p-FITC	100	3	2	60	3	26	0	6	**2,71**	**+****
8q-Cy3	100	3	5	63	10	15	0	4	**2,45**	**+****
8p-Biotin	100	2	12	48	11	16	0	11	**2,71**	**+****
Auswertung PC-H1 p12; Zytokeratin-negative Zellen										
6p-FITC	100	4	2	56	9	16	0	13	**2,83**	**+****
8q-Cy3	100	3	9	45	18	18	0	7	**2,67**	**+****
8p-Biotin	100	3	12	45	12	22	0	6	**2,62**	**+****

Auswertung PC-R1 p13 + SV 40; Zytokeratin-positive Zellen (85,3%)										
	Anzahl	**Signale pro Sonde**							**ANC:**	**ANC Abweichung**
		0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**		
6p-FITC	100	0	4	60	19	16	0	1	**2,51**	**+****
8q-Cy3	100	0	10	73	14	2	0	1	**2,12**	**+****
8p-Biotin	100	4	88	8	0	0	0	0	**1,04**	**-****
Auswertung PC-R1 p13 + SV 40; Zytokeratin-negative Zellen										
6p-FITC	102	0	4	58	27	12	0	1	**2,50**	**+****
8q-Cy3	102	1	5	61	23	11	0	1	**2,41**	**+****
8p-Biotin	102	4	88	10	0	0	0	0	**1,06**	**-****

Auswertung PC-S1 p17 +SV40; Zytokeratin-positive Zellen (38%)										
	Anzahl	**Signale pro Sonde**							**ANC:**	**ANC Abweichung**
		0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**		
6p-FITC	100	7	13	68	3	7	0	2	**1,98**	**0**
8q-Cy3	100	7	26	62	2	3	0	0	**1,68**	**-****
8p-Biotin	100	9	22	69	0	0	0	0	**1,60**	**-****
Auswertung PC-S1 p17 +SV40; Zytokeratin-negative Zellen										
6p-FITC	100	2	15	71	4	8	0	0	**2,01**	**0**
8q-Cy3	100	4	23	61	6	6	0	0	**1,87**	**-****
8p-Biotin	100	4	11	69	8	8	0	0	**2,05**	**0**

Auswertung PC-Y1 p8; Zytokeratin-positive Zellen (54,6%)										
	Anzahl	**Signale pro Sonde**							**ANC:**	**ANC Abweichung**
		0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**		
6p-FITC	100	3	7	86	1	3	0	0	**1,94**	**-***
8q-Cy3	100	4	6	80	6	4	0	0	**2,00**	**0**
8p-Biotin	100	1	18	75	1	5	0	0	**1,91**	**-****
Auswertung PC-Y1 p8; Zytokeratin-negative Zellen										
6p-FITC	100	2	2	90	1	5	0	0	**2,05**	**0**
8q-Cy3	100	2	4	82	4	7	0	1	**2,14**	**+****
8p-Biotin	100	0	5	89	3	3	0	0	**2,04**	**0**

Legende: ANC: average number of copies
ANC Abweichung gibt eine signifikante Abweichung von den ANC-Werten der Kontrollgruppen unter der Annahme eines diploiden Chromosomensatzes an (siehe auch Punkt 3.2.1), wobei:
* : $p < 0,05$
** : $p < 0,01$
+ : Zugewinn
- : Verlust
0 : nicht signifikant verändert.

Ein Vergleich der ANC-Werte zeigte für zwei Zelllinien (PC-H1 und PC-R1) ein identisches Verhalten der Zytokeratin postiven und negativen Zellen. Die beiden anderen Zelllinien wiesen unterschiedliche ANC-Werte für Zytokeratin-negative und Zytokeratin-positive Zellen auf. In keinem Fall aber zeigte sich ein Verlust versus eines Zugewinnes, sondern nur Verluste versus nicht signifikant verändert.

4. Diskussion

4.1 Aberrationen aller untersuchten Chromosomenlokalisationen

Der prognostische Wert von Zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark bei Patienten mit Prostatakarzinom ist bis heute nicht eindeutig geklärt und wird in der Literatur kontrovers diskutiert. *Oberneder et al.* (1994) beschrieben einen signifikanten Zusammenhang zwischen Zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark und etablierten Risikofaktoren wie lokale Tumorausdehnung, Differenzierungsgrad und Fernmetastasierung. Diese Entdeckung konnte von *Pantel et al.* (1995), *Köllermann et al.* (1999) und *Weckermann et al.* (1999) nicht bestätigt werden. Sie konnten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen lokaler Tumorausdehnung, Differenzierungsgrad oder Fernmetastasierung mit Zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark feststellen. *Weckermann et al.* (2001) fanden eine Korrelation der Zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark mit einer biochemischen Tumorprogression nach vier Jahren. Erwähnenswert ist ein von *Loh et al.* (1997) beschriebenener Fall einer Herztransplantation. Der Organspender war an einem lokalisierten Prostatakarzinom erkrankt. Zehn Monate nach der Organübertragung entwickelte der Organempfänger osteoblastische Metastasen. Hierbei handelt es sich keinesfalls um einen Einzelfallbericht. In der Literatur sind mehrere Fälle von Karzinomerkrankungen bei Organempfängern nach Organtransplantationen von scheinbar gesunden Spendern beschrieben. Zum Teil konnten die selben Karzinome posthum bei den Organspendern gefunden werden (Riethmüller et al. 2001). Wenngleich dieser einzelne Fall von *Loh et al.* (1997) natürlich kein Beweis für eine prognostische Wertigkeit disseminierter Tumorzellen ist, so lässt er dennoch ein solche Wertigkeit vermuten. Sicherlich wird es Aufgabe weiterer Studien sein zur Aufklärung der Bedeutung disseminierter Karzinomzellen bei Patienten mit Prostatakarzinom beizutragen.

Ziel dieser vorliegenden Dissertation war zum einen die Prüfung der prinzipiellen Durchführbarkeit von einer Kombination aus immunzytochemischer Färbung und Dreifarben Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Interphasezellen sowie die Etablierung der Methodik am Institut. Zum anderen sollten exemplarisch drei Sonden für Chromosom 6p, 8p und 8q getestet werden, um die disseminierten Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit lokalisiertem Prostatakarzinom speziell auf Veränderungen in diesem Bereich zu analysieren. Die Auswahl der Sonden erfolgte nach Überprüfung der Literatur, in der Veränderungen an Chromosom 8 in primärem Prostatakarzinomgewebe häufig beschrieben ist. Es sollte geprüft werden, ob derartige Veränderungen auch an den disseminierten Karzinomzellen

nachgewiesen werden können. Die Sonde für Chromosom 6p sollte ursprünglich als Kontrolle dienen. Schon bald zeigte sich jedoch, dass auch für Chromosom 6p Veränderungen auftreten.

4.1.1 Veränderung von Chromosom 8

Die in der Literatur beschriebenen genetischen Veränderungen konnten sowohl an Gewebsschnitten, als auch an Zellkulturen von Prostatakarzinomen und zum Teil auch an Metastasen bestätigt werden. Für Chromosom 8 sind für beide Arme Zugewinne und Verluste beschrieben. Chromosom 8p-Alterationen scheinen nicht nur an der Karzinogenese des Prostatakarzinoms, sondern auch an der Karzinogenese von anderen Tumoren, wie Hepatozelluläres Karzinom, Bronchialkarzinom (non-small cell lung cancer) und Kolorektales Karzinom, beteiligt zu sein (Emi et al. 1992, Fujiwara et al.1993).

Bei Versuchen mit Zentromer-Proben für Chromosom 8 an Prostatakarzinomgewebe beschrieben *Takahashi et al.* (1996) eine Chromosom 8-Aneuploidie mit einer hohen Assoziation zu einer systemischen Tumorprogression. Die gleiche Bedeutung kommt auch einem Zugewinn von Chromosom 8 zu. Eine signifikant erhöhte Assoziation zum Tod durch Prostatakarzinom konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Verlust von Homozygotie und Allel-Verlust von 8p insbesondere im Bereich 8p22 werden immer wieder beschrieben, v.a. auch die Korrelation mit einem hohen Tumorgrad und einem fortgeschrittenen Tumorstadium. Dies suggeriert die Lokalisation eines oder mehrerer Tumorsuppressorgene in dieser Region. (Bergerheim et al. 1991, Bova et al. 1993, MacGrogan et al. 1994, Macoska et al. 1994 und 1995, Matsuyama et al. 1994).
In Bezug auf das Tumorstadium werden 8p-Verluste als ein frühes Ereignis diskutiert, da sie sowohl im frühen und fortgeschrittenen Tumor als auch in Metastasen gefunden werden konnten. Auch die Bedeutung der Kombination eines Allel-Verlustes von 8p in Prostatakarzinomzellen und einem gleichzeitigen Zugewinn von 8q wird beschrieben und diskutiert. *Virgin et al.* (1999) fanden an einer Prostatakarzinom-Zelllinie in der CGH Analyse den Verlust des gesamten 8p Armes mit der Bildung eines Isochromosomes 8q assoziiert. *Macoska et al.* (1994) entdeckten in FISH-Versuchen an Prostatakarzinomgewebe ebenfalls eine Kombination von 8p-Verlust und 8q-Zugewinn. Ebenso konnten sie aber auch einen kombinierten Verlust von 8p und 8q nachweisen.

Die Tumorsuppressorgen-Deletion und die Onkogen-Amplifikation sind Schritte, die zur Tumorprogression in soliden Tumoren führen. Auch für das Prostatakarzinom wurden Veränderungen verschiedener Onkogene untersucht, um ein näheres Verständnis der Tumorprogression zu erlangen und damit frühzeitig die Patienten zu erkennen, die eine schlechtere Prognose haben und deshalb z.B. einer aggressiveren Therapie bedürfen. Die Lokalisation des Onkogens c-myc auf dem Chromosom 8q im Bereich 8q24.2-8q24.3 ist bekannt. Eine Amplifikation dieses Gens isoliert oder in Kombination mit einem Chromosom 8 Zugewinn wurden v.a. bei progredienten Tumoren beschrieben, konnte aber auch bereits bei lokalisierten Tumoren gefunden werden (Jenkins et al. 1997, Miyoshi et al. 2000). Es ist deshalb besonders interessant, ob auch die frühdisseminierten Tumorzellen im Knochenmark von Prostatakarzinomen ähnliche Veränderungen aufweisen.

4.1.1.1 Veränderungen der Chromosomenlokalisation 8p

Veränderungen der Chromosomenlokalisation 8p an den untersuchten Zelllinien:
Ein Vergleich der ANC-Werte (Tabellen 3.1-1 und 3.2-1) unter Berücksichtigung der Ploidie zeigt in vier Zelllinien mindestens einen relativen 8p-Verlust. In der genaueren Aufschlüsselung der Muster (Tabelle 3.2-4) finden sich in vier der fünf untersuchten Zelllinien signifikant mehr Zellen mit isoliertem 8p-Verlust als in den Kontrollgruppen. Sie weisen also das Chromosomenmuster 2-2-1 auf. Zu dieser Gruppe gehört auch PC-Y1, eine Zelllinie, die im Vergleich der Mittelwerte weder einen signifikanten Verlust noch einen signifikanten Zugewinn von 8p verzeichnen kann. Sie scheint dennoch einen Subklon mit isoliertem 8p-Verlust zu haben. Alle weiteren Muster weisen multiple Veränderungen auf.
In keiner Zelllinie liegt ein Subklon mit isoliertem 8p-Zugewinn vor (M: 2-2-3).

Veränderungen der Chromosomenlokalisation 8p an den untersuchten Primärkulturen:
Hier zeigt ein Vergleich der ANC-Werte (Tabelle 3.3-5) in neun der elf untersuchten Primärkulturen einen signifikanten 8p-Verlust und nur in einem Fall einen signifikanten Zugewinn.
Eine genauere Aufschlüsselung der Chromosomenmuster (Tabelle 3.3-4) ergibt in nur sieben Primärkulturen signifikant mehr Zellen mit isoliertem 8p-Verlust als in den Kontrollgruppen. PC-H3 und PC-S9 gehören nicht zu dieser Gruppe. Sie weisen zwar im Mittel einen 8p-Verlust auf, nicht jedoch einen Subklon mit isoliertem 8p-Verlust-Muster.

Vier der Primärkulturen weisen Zellen mit kombiniertem 8p und 8q-Verlust auf (M: 2-1-1), davon gehören drei der Gruppe mit isoliertem 8p-Verlust an.
Zwei Primärkulturen zeigen einen Subklon mit isoliertem 8p-Zugewinn (M: 2-2-3).

4.1.1.2 Veränderungen der Chromosomenlokalisation 8q

Veränderungen der Chromosomenlokalisation 8q an den untersuchten Zelllinien:
Ein Vergleich der ANC-Werte (Tabellen 3.1-1 3.2-1) zeigt in einer (PC-Y1) der fünf untersuchten Zelllinien einen 8q-Zugewinn und lässt, unter Berücksichtigung der Ploidie, in drei Fällen einen 8q-Verlust vermuten (PC-E1 p23, PC-H1 und PC-R1). In der genaueren Aufschlüsselung der Muster weisen zwei Zelllinien je einen Subklon mit 8q-Verlust auf. Im Falle von PC-S1 ein isolierter 8q-Verlust (M: 2-1-2), im Falle von PC-R1 ein kombinierter 8q und 8p-Verlust (M: 2-1-1) (Tabelle 3.2-4).
Ein isolierter 8q-Zugewinn findet sich nur in einer Zelllinie (PC-Y1; M: 2-3-2). Und ebenfalls nur in einer Zelllinie (PC-R1) lässt sich das in der Literatur mehrmals beschriebene Muster eines kombinierten 8q-Zugewinnes und 8p-Verlustes (M: 2-3-1) nachweisen. Alle weiteren Muster weisen multiple Veränderungen auf.

Veränderungen der Chromosomenlokalisation 8q an den untersuchten Primärkulturen:
Ein Vergleich der ANC-Werte (Tabelle 3.3-5) zeigt in zehn der elf untersuchten Primärkulturen einen 8q-Verlust und nur in einem Fall einen signifikanten 8q-Zugewinn. Wird auch hier die genauere Aufschlüsselung der Chromosomenmuster betrachtet (Tabelle 3.3-4), so sind es in diesem Fall neun Primärkulturen, die einen Subklon an Zellen mit isoliertem 8q-Verlust besitzen. Nicht zu dieser Gruppe gehört PC-E1-nach, obwohl auch diese Primärkultur im Mittel aller ausgezählten Zellen einen 8q-Verlust aufweist. Vier Primärkulturen besitzen zusätzlich Subklone mit kombiniertem 8q und 8p, bzw. 6p und 8q-Verlust (M:2-1-1, bzw. 1-1-2) (zwei Primärkulturen überlappend). Alle weiteren Muster weisen multiple Veränderungen auf.
In drei Primärkulturen ließ sich ein Subklon mit isoliertem 8q-Zugewinn detektieren (M: 2-3-2), darunter PC-W1, die Primärkultur, die auch im Mittel aller ausgewerteten Zellen als einziges einen 8q-Zugewinn aufweist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen:
Für die Primärkulturen suggerieren die ANC-Werte (Tabelle 3.3-5) die Schlußfolgerung, dass diejenigen Primärkulturen, die einen 8p-Verlust bzw. Zugewinn aufweisen, auch gleichzeitig einen 8q-Verlust bzw. Zugewinn aufweisen. Im Durchschnitt der untersuchten Zellen ist dies wohl mit einer Ausnahme richtig. Die genauere Aufschlüsselung der Muster (Tabelle 3.3.-4) zeigt aber sehr deutlich, dass es sich hierbei nicht um ein und dieselben Zellen handelt. Die genaue Aufschlüsselung zeigt vielmehr, dass nur in wenigen Zellen ein kombinierter Verlust vorliegt, was für eine Monosomie sprechen würde. Vielmehr weist jede Primärkultur eine Reihe von Subklonen mit unterschiedlichem Genommuster auf.
Das häufige Vorkommen des 8p-Verlustes deckt sich zwar mit den Beschreibungen der Primärtumoren, es zeigt sich jedoch auch, dass die multiplen Veränderungen wesentlich komplexer sind und nicht auf eine durchschnittliche Signalanzahl beschränkt werden sollte.
Die 8q-Verluste in den Primärkulturen stimmen nicht mit den Beschreibungen der Primärtumoren aus der Literatur überein.

Betrachtet man zusätzlich die Zelllinien, so gilt natürlich auch hier das Vorliegen von multiplen Subklonen. Im Vergleich zu den Primärkulturen fällt ebenfalls ein relativer 8q Verlust auf sowie in einem Fall ein 8q-Zugewinn. Dieser 8q-Zugewinn deckt sich zwar teilweise mit der Literatur, dennoch liegt in den wenigsten Zellen eine Kombination von 8q-Zugewinn und 8p-Verlust vor.

Letztlich kann also ein 8p-Verlust sowohl in den Primärkulturen als auch in den Zelllinien bestätigt werden. Ein Klon mit kombiniertem 8p-Verlust und 8q-Zugewinn liegt aber nur in einer einzigen Zelllinie vor. Es wäre also denkbar, dass eine Deletion eines Tumorsuppressorgenes auf 8p vor der Disseminierung der Tumorzellen ins Knochenmark stattgefunden hat, da sie bereits in der ersten Passage der Primärkulturen detektiert werden konnte. Dennoch finden sich auch disseminierte Tumorzellen mit intakter 8p Region. Es muss sicherlich von einer multifaktoriellen Beteiligung bei der Disseminierung ausgegangen werden. Nicht geklärt bleibt weiterhin, ob in der Zellkultur für bestimmte Muster ein Selektionsvorteil entsteht. Auf diesen Punkt wird unter 4.2 näher eingegangen.

4.1.2 Veränderungen von Chromosom 6

In der Literatur sind Veränderungen, die den kurzen Arm des Chromosoms 6 betreffen, selten und zum Teil widersprüchlich beschrieben. *Gibas et al.* (1984) beschrieben zwar eine Translokation t(6;16) der Zelllinie LNCaP, die aus einer Prostatakarzinom-Metastase etabliert wurde, *Hyytinen et al.* (1997) zeigten jedoch mit CGH Analysen an derselben Zelllinie LOH für 6q, jedoch nicht für 6p.
Atkin et al. (1985) untersuchten mit einer Chromosomenstudie vier Prostatakarzinome und ein Leiomyosarkom der Prostata. Sie detektierten in einem Fall eine Translokation von Chromosom 2 und Chromosom 6 t(2;6) mit 6q+, sowie in drei Fällen das partielle Vorliegen einer Monosomie für Chromosom 6. *Gao et al.* (1994) screenten 57 Patienten mit Adenokarzinom der Prostata mit 18 Mikrosatellitenmarkern auf insgesamt 12 Chromosomen und entdecken hierbei in zehn dieser Patienten einen mutierten Genotyp, im Sinne von Mikrosatelliteninstabilität, an mindestens einem Lokus auf Chromosom 6p. *Brown et al.* (1994) untersuchten mit Hilfe von Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung frisches Tumorgewebe von 40 Patienten mit Prostatakarzinom. Hier konnte in keinem Fall eine Aneusomie für Chromosom 6 festgestellt werden. *Cher et al.* (1996) beschrieben bei etwa 40 Prozent von 31 mittels CGH und Allelotyping untersuchten Prostatakarzinomen einen Zugewinn für die Region 6p22-cen. *Cooney et al.* (1996) fanden in nur einem von 52 untersuchten Prostatakarzinomen einen Verlust für 6p21.2, in keinem Fall einen Zugewinn.

Ursprünglich sollte die 6p-Sonde in dieser Versuchsreihe als Kontrolle und Maß für die Ploidie dienen. Schon bald zeigte sich jedoch, dass sowohl in den Primärkulturen als auch in den Zelllinien Veränderungen an 6p vorliegen, die signifikant von den Kontrollgruppen abweichen. Innerhalb der Arbeitsgruppe konnten diese Veränderungen durch CGH-Analysen bestätigt werden, weshalb sie als reell angenommen wurden. So dienten die Versuche dazu, die Konstellation für 6p an den disseminierten Tumorzellen zu erforschen.

4.1.2.1 Veränderungen der Chromosomenlokalisation 6p

Veränderungen der Chromosomenlokalisation 6p an den untersuchten Zelllinien:
Im Durchschnitt zeigt sich durch den Vergleich der ANC-Werte (Tabellen 3.1-1 und 3.2-1) in drei von fünf Zelllinien ein Zugewinn, wobei es sich hierbei möglicherweise nicht um einen

isolierten Zugewinn von 6p handelt, sondern vermutlich um einen nicht diploiden Chromosomensatz. In einer Zelllinie liegt ein 6p Verlust vor (PC-Y1).
Genauere Aufschlüsselungen der Muster (Tabelle 3.2-4) zeigen keinen isolierten 6p-Zugewinn und keinen isolierten 6p-Verlust, also weder Muster 3-2-2 noch 1-2-2. In einem Fall (PC-R1) findet sich ein kombinierter 6p-Zugewinn und 8p-Verlust (M: 3-2-1), in dieser Zelllinie ist auch eine Kombination von 6p und 8p-Verlust nachweisbar (M: 1-2-1). Alle weiteren Muster weisen multiple Veränderungen auf.

Veränderungen der Chromosomenlokalisation 6p an den untersuchten Primärkulturen:
In den Primärkulturen zeigt sich im Vergleich der ANC-Werte in sieben von elf untersuchten Primärkulturen ein signifikanter Verlust von 6p (Tabelle 3.3-5), wohingegen in keinem Fall ein Zugewinn nachweisbar ist. In der genaueren Aufschlüsselung der Muster liegt in sieben Fällen ein isolierter 6p-Verlust vor und außerdem in vier Fällen ein kombinierter 6p und 8q-Verlust (zwei Primärkulturen überlappend, siehe auch Tabelle 3.3-4).

Besonders die Ergebnisse der Primärkulturen sind hinsichtlich der Genomveränderung von großem Interesse, da durch die kurze Kulturdauer eine artifizielle Veränderung unwahrscheinlich scheint und hier also noch mehr als bei den Zelllinien von „ursprünglichen“ Chromosomenmustern auszugehen ist. In diesem Zusammenhang scheint gerade der 6p Veränderung eine besondere Bedeutung zuzukommen, da 6p-Verluste in dieser Form nur in einem einzigen Fall in der Literatur zu finden sind (Cooney et al. 1996) und sich weiter nie bestätigen ließen. So lässt sich darüber spekulieren welche Rolle dem 6p-Verlust bei der Disseminierung von Prostatakarzinomzellen ins Knochenmark zukommt. Möglicherweise befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 ebenfalls ein Tumorsuppressorgen, wie es auch für 8p diskutiert wird. Es wird jedoch Aufgabe weiterführender Studien bleiben, derartige Vermutungen zu bestätigen.

Des weiteren ist es erstaunlich, dass der 6p-Verlust in den Zelllinien nur in einem Fall nachweisbar ist, wohingegen drei Zelllinien sogar einen 6p-Zugewinn aufweisen. Dies wiederum deckt sich mit den Angaben von *Cher et al.* (1996). Inwieweit spätere Passagen der Zelllinien das Zellmuster eines fortgeschrittenen Tumores repräsentieren und ob dies den Zugewinn für alle drei untersuchten Chromosomenlokalisationen in den Zelllinien erklärt, bleibt letztlich offen.

Fraglich ist, inwieweit die Chromosomenveränderungen das Verhalten der Zellen bezüglich Disseminierung und Malignitität beeinflussen und ob eine isolierte Veränderung oder erst die Kombination aus mehreren Veränderungen wirkungsvoll ist. Die Bedeutung der hier detektierten Veränderungen bleibt letztlich unklar. Natürlich haben diese Entdeckungen nur deskriptiven Charakter. Dennoch kann es ein neuer Anstoß sein, neben den bisher bekannten Veränderungen auch das Chromosom 6p genauer zu erforschen.
Zunächst wird sicherlich zu prüfen sein, ob die Daten auch mit anderen Methoden reproduzierbar sind und welche Rolle den bisher nicht beschriebenen Chromosom 6p Veränderungen bei der Disseminierung von Prostatakarzinomzellen ins Knochenmark zukommt. Auch wäre ein klinischer Zusammenhang zwischen 6p Veränderung und Tumorprogression und Patientenprognose von großem Interesse.

In den ausgewerteten Zellen zeigte sich keine Musterkombination für 6p, 8q und 8p, die in tatsächlich allen Tumoren signifikant vorhanden gewesen ist und als auffälliges „Tumor-Muster“ für disseminierte Prostatakarzinomzellen im Knochenmark zu beschreiben gewesen wäre.

4.1.3 Vergleich der chromosomalen Veränderungen im Verlauf von Primärkultur, Nachpunktat und Zelllinie anhand von PC-E1 p1, PC-E1-nach p1 und PC-E1 p23

Bei dem Patienten E. wurde im Verlauf von sieben Monaten zweimal eine Knochenmarkpunktion durchgeführt. Von beiden Punktaten konnten Zellen untersucht werde. Die Zellen der ersten Punktion wurden in der ersten und 23. Passage analysiert (PC-E1 p1 und PC-E1 p23), die Zellen des Nachpunktates nur in der ersten Passage (PC-E1-nach p1).
Die ANC-Werte für PC-E1 p23 zeigen jeweils einen Zugewinn für 6p, 8q und 8p (Tabelle 3.4-1). In der genaueren Aufschlüsselung der Muster liegen keine isolierten, sondern nur kombinierte Veränderungen vor. In den meisten Fällen scheint ein tetraploider Chromosomensatz vorhanden zu sein, der wiederum multiple Veränderungen aufweist (Tab. 3.4-1). Bei einem tetraploiden Chromosomensatz kann dann allerdings wiederum, z.B. bei Muster 4-4-3, von einem isolierten 8p-Verlust ausgegangen werden.

Die ANC-Werte (Tabelle 3.4-1) für PC-E1 p1 hingegen zeigen lediglich einen signifikanten 8q-Verlust. 6p und 8p sind im Durchschnitt aller untersuchten Zytokeratin-positiven Zellen nicht signifikant verändert. In der genaueren Aufschlüsselung der Muster finden sich Subklone mit isoliertem 8q-Verlust, aber auch mit isoliertem 6p-Verlust.

Die ANC-Werte (Tabelle 3.4-1) für PC-E1-nach p1 zeigen jeweils einen Verlust für 6p, 8q und 8p. Hier findet sich jedoch in der genaueren Aufschlüsselung der Muster nur signifikante Subklone mit isoliertem 6p und 8p-Verlust.

Zusammenfasssend lässt sich feststellen, dass sich PC-E1 p1 und PC-E1-nach p1, abgesehen von dem großen Hauptklon an Zellen mit normalem Genommuster, in nur einem Subklon gleichen, nämlich im isolierten 6p-Verlust (M: 1-2-2). Zusätzlich liegt bei beiden Primärkulturen im Durchschnitt aller untersuchten Zytokeratin-positiven Zellen ein 8q-Verlust vor.
Ein Vergleich der beiden Primärkulturen PC-E1 p1 und PC-E1-nach p1 mit der Zelllinie PC-E1 p23 kann in keiner der untersuchten Chromosomenlokalisation eine völlige Übereinstimmung feststellen. Auffällig ist hingegen, dass der in den Primärkulturen vorliegende Verlust von 6p und 8q sich, beim Vergleich der ANC-Werte, in der Zelllinie zu einem Zugewinn umgewandelt hat. Auch bei der Annahme eines tetraploiden Chromosomensatzes für PC-E1 p23 kann keine isolierte 6p Deletion detektiert werden, sondern nur ein kombinierter Verlust von 6p und 8p (M: 3-4-3). Dagegen findet sich ein Subklon mit isoliertem 8p-Verlust (M: 4-4-3), wie auch in der Primärkultur PC-E1-nach p1. Eine Ähnlichkeit dieser beiden Kulturen könnte man erwarten, wenn man von der Hypothese ausgeht, dass sich die Zellen der Primärkultur PC-E1-nach p1 im Körper des Patienten weiterentwickelten, in der Zeit, in der sich die Zellen von PC-E1 bereits in Zellkultur befanden. Allerdings sind Ähnlichkeiten, wie der 8p-Verlust nur unter der Annahme einer Tetraploidie vorhanden und könnten ebenso zufällig sein.

4.2 Heterogenität der Tumorzellen

Eine genetische Heterogenität innerhalb eines Tumors stellt insofern eine Besonderheit dar, als die Tumorgenese zumeist von einer Mutterzelle ausgeht und damit als monoklonal gilt. Im fortlaufenden Prozeß der unkontrollierten Proliferation und Differenzierung sowie der

Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen scheint es jedoch nicht verwunderlich, dass sich häufig bereits frühzeitig Subpopulationen der Tumorzelle entwickeln, wodurch der klinisch in Erscheinung tretende Tumor eine Zellheterogenität aufweist.
So ist auch für das Prostatakarzinom eine intratumorale Heterogenität beschrieben (Lundberg et al. 1987, O´Malley et al. 1993, Steilen et al. 1994, Takahashi et al. 1994, Jenkins et al. 1997). Histologisch finden sich häufig pluriforme Karzinome, d.h. es liegen im Karzinom mehrere Wachstumsmuster nebeneinander vor. In der Ermittlung des Gleason-Scores werden dementsprechend auch verschiedene Tumortypen berücksichtigt.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden bereits in einer frühen Passage (p1 oder p2) zumindest je eine Subpopulation in jedem Tumor detektiert. Wie in Tabelle 3.6 dargestellt handelt es sich dabei um einen Subklon, der meistens deutlich kleiner ist als der jeweilige Hauptklon. Dieser Hauptklon besteht in zehn von elf Primärkulturen aus Zellen mit normalem Hybridisierungsmuster. Eine Kontamination durch mesenchymale Zellen des Knochenmarks ist nahezu ausgeschlossen, da nur die Zytokeratin-positiven Zellen der Objektträger bei der Auswertung Berücksichtigung fanden und durch eine Anfärbung mit dem monoklonalen Antikörper-Cocktail eine epitheliale Abstammung der Zellen nachgewiesen ist (Pantel et al. 1994).

Das Vorkommen von Heterogenität und ihr Zusammenhang mit der Zellkultur wird in der Literatur kontrovers diskutiert. ***Steilen et al.*** (1994) und ***Takahashi et al.*** (1994) beschrieben eine intratumorale Heterogenität am frischen Tumorgewebe von Prostatakarzinomen, ohne dem Einfluss einer Zellkultur. So kann also auch die Heterogenität der Primärkulturen als „echte“ Heterogenität gewertet werden, da zum einen ein Einfluss der Zellkulturen auf chromosomale Aberrationen in einer so frühen Passage unwahrscheinlich erscheint und zum anderen Zellheterogenitäten wie oben beschrieben auch in nicht kultiviertem Prostatakarzinom-Gewebe nachgewiesen wurde. Letztlich bleibt aber die Frage offen, ob es sich bei den nachgewiesenen heterogenen Zellen tatsächlich um eine echte Polyklonalität handelt oder ob die verschiedenen Tumorsubpopulationen in der gleichen Mutterzelle ihren Ursprung haben.

Der Einfluss der Zellkultur auf genetische Alterationen und mögliche Selektionsvor- oder nachteile von bestimmten Zellen werden ebenfalls immer wieder diskutiert. ***Micale et al.***

(1993) verglichen Interphase-FISH-Analysen an Paraffinschnitten von Prostatakarzinomen mit Metaphasen-Karyotypisierungs-Analysen von kultivierten Zellen der gleichen Prostatakarzinome. Zu berücksichtigen bleibt, dass die Anzahl der ausgewerteten Metaphasen wesentlich geringer war als die Anzahl der durch FISH analysierten Zellen. Dennoch konnten die durch FISH detektierten Aneusomien für vier verschiedene Chromosomen in der Metaphasenanalyse der kultivierten Zellen nicht bestätigt werden. Diese Zellen wiesen eine Eusomie auf. Ob es sich hierbei um Zellen aus normalem Prostatagewebe handelt, die in Kultur gewachsen sind, oder ob Karzinomzellen mit Aneusomie in Kultur einen Selektionsnachteil haben oder nur einen geringeren Mitotischen Index aufweisen, bleibt unklar. *Brothman et al.* (1992) bestätigten zwar den Unterschied von Interphase-FISH-Analysen versus Metaphasen-Karyotypisierung in gleicher Hinsicht, die Untersuchungen wurden jedoch in beiden Analysen an zuvor kultivierten Zellen durchgeführt. So scheint also in erster Linie der Informationsgewinn bei Interphase-FISH versus Metaphase-Karyotypisierung bestätigt, die Veränderung in Kultur bleibt jedoch umstritten.
Ketter et al. (1996) untersuchten schließlich frisches Prostatakarzinom-Gewebe und kultivierte Prostatakarzinomzellen sowohl mit Interphase-FISH als auch mit Metaphase-FISH. Sie fanden eine zunehmende Abnahme von Aneuploidie an kultivierten Prostatakarzinomzellen und zusätzlich bestätigten sie auch die Präsenz von normalen Metaphasen an kultivierten Zellen bei gleichzeitig, mittels Interphase-FISH, nachgewiesener Aneuploidie. *Bernardino et al.* (1997) detektierten ein zunehmendes genetisches Rearrangement und nahezu Tetraploidie im Verlauf der Langzeitzellkultur eines Adenokarzinoms.

In den vorliegenden Untersuchungen der Primärkulturen und Zelllinien zeigten sich folgende Veränderungen:
Eine zunehmende genetische Veränderung mit Tendenz zur Polyploidie ist im Verlauf der Langzeitkultur von PC-E1 auffällig. Wie bereits oben erwähnt, wurden bei diesem Patienten zweimal im Abstand von sieben Monaten Knochenmarkpunktionen durchgeführt (12.02.97 und 18.09.97). Beide Punktate wurden in Kultur gegeben und nach p1 analysiert. Die Zellen der ersten Punktion wurden erneut nach p23 untersucht. Im Vergleich der drei Analysen zeigt sich zum einen eine deutlich Zunahme der Zellheterogenität. So machte in p23 die größte Gruppe mit gleichem Signalmuster nur 9% der untersuchten Zellen aus, wohingegen es in p1 54% waren. Zum anderen lässt sich in p23 eine deutliche Tendenz zur Polyploidie nachweisen.

Zusätzlich wurden an dem Präparat von PC-E1 p 23 Metaphasen ausgewertet (Anhang). Auch diese bestätigen eine sehr ausgeprägte Heterogenität. Die beiden am häufigsten aufgetretenen Muster gleichen sich in den Interphasen und in den Metaphasen. Letztlich bleibt die Frage unbeantwortet, ob es sich bei diesen Veränderungen um „reale“ Entwicklungen der Tumorzellen im Laufe ihrer Progression handelt, oder ob es Artefakte sind, die durch den Einfluss der langen Zellkultur entstanden sind.

Zusammenfassend lassen sich für die untersuchten Zelllinien und Primärkulturen folgende Aussagen festhalten:
In allen untersuchten Prostatakarzinomen liegen heterogene Zellmuster vor, mit einem dominierenden Haupt- und mindestens einem Subklon, während zahlreiche Zellen ein normales Hybridisierungsmuster aufweisen. Die untersuchten Zellen stammen aufgrund ihrer Zytokeratin-Positivität mit hoher Wahrscheinlichkeit von den jeweiligen Karzinomen ab und stellen keine Kontamination mit mesenchymalen Knochenmarkszellen dar. Letztlich kann keine definitive Aussage getroffen werden, ob aneuploide Zellen in der Kultur tatsächlich einen Selektionsnachteil haben. In der Beobachtung der Zelllinien, die über mehrere Passagen in Kultur waren und insbesondere unter Beachtung von PC-E1 p23, kann mit diesen Versuchen ein Verlust von Aneuploidie in der Zellkultur nicht bestätigt werden. Im Gegenteil nehmen hier sogar Polyploidie und Heterogenität der Zellkulturen versus den Primärkulturen zu. Ein Selektionsnachteil in Kultur für aneuploide Zellen oder ein geringerer mitotischer Index kann hinsichtlich der geringen Anzahl der ausgewerteten Metaphasen nicht ausreichend beurteilt werden, zumindest ergibt sich in den wenigen Metaphasen verglichen mit den Interphasen kein Hinweis dafür.

Bedauerlicherweise bleibt jedoch in jeder Zellkultur unklar, ob die zytogenetischen Veränderungen tatsächlich den größten Anteil des Tumorkaryotypes repräsentieren und ob möglicherweise in vitro entstandene Veränderungen vorliegen. Letztlich wäre deshalb eine Analyse der einzelnen, im Knochenmark detektierten, epithelialen Zellen in unkultiviertem Zustand wünschenswert, wie es ***Klein et al.*** (1999) bereits gelungen ist.

4.3 Zytokeratinexpression von Tumorzellen

An zwei Primärkulturen (PC-E1 p1 und PC-H3 p1) wurde ein Vergleich der Zytokeratin-positiven Zellen und der auf dem gleichen Objektträger befindlichen Zytokeratin-negativen Zellen durchgeführt (Punkt 3.5). Interessanterweise wichen die Hauptklone der Zytokeratin-negativen Zellen mit normalem Hybridisierungsmuster nicht signifikant von den entsprechenden Kontrollgruppen ab, wohingegen eine signifikante Abweichung der Hauptklone der Zytokeratin-positiven Zellen mit normalem Hybridisierungsmuster in beiden Primärkulturen nachgewiesen wurde. So könnten die in einer frühen Passage auftretenden Zytokeratin-negativen Zellen als eine mögliche Kontamination durch z.B. mesenchymale Knochenmarkszellen interpretiert werden. Allerdings würden dann keine Subklone innerhalb dieser Zellen zu erwarten sein, die signifikant von den Kontrollgruppen abweichen. Im Falle PC-E1 p1 und PC-H3 p1 fanden sich jedoch jeweils mindestens ein Subklon mit aberrantem Muster, was gegen eine Kontamination spricht.
Das Phänomen, dass Tumorzellen die Expression des Zytokeratins, bzw. einzelner Zytokeratin-Komponenten regulieren können, ist bekannt (Fuchs et al. 1988, Valles et al. 1990, Pantel et al. 1994). Wahrscheinlich ist, dass es sich auch bei den Zytokeratin-negativen Zellen der Primärkulturen um Tumorzellen handelt. Welche Rolle den Zytokeratin-negativen Zellen zukommt und ob diese einen Selektionsvor- oder nachteil besitzen ist völlig unklar. Um trotz der möglichen Herunterregulierung einzelner Zytokeratin-Komponenten den Anteil nicht erfaßter Tumorzellen gering zu halten, wurde ein Breitspektrum Zytokeratin-Antikörper-Cocktail verwendet.

Zur Hypothese der Herunterregulierung von Zytokeratin paßt auch die Erkenntnis, dass im Falle von PC-E1 p23 keine Zytokeratin-Positivität mehr nachweisbar gewesen ist. Dieses Phänomen wurde innerhalb der Arbeitsgruppe bereits vorher beobachtet (Putz, nicht veröffentlichte Daten).
Ein Vergleich Zytokeratin-positiver und negativer Zellen der Zelllinien (Punkt 3.5) zeigt für die ANC-Werte von zwei Zelllinien eine vollständige Angleichung, was ebenfalls als Regulationsmechanismus der Tumorzellen bezüglich ihrer Zytokeratinexpression interpretiert werden kann, zumal die Hybridisierungsmuster darauf hindeuten, dass es sich bei beiden Arten von Zellen um Karzinomzellen handelt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kombination aus immunzytochemischer Färbung und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung prinzipiell durchführbar ist. Es können damit Tumorzellen epithelialen Ursprungs in der Interphase analysiert werden.

Weiter lässt sich festhalten, dass die disseminierten Tumorzellen aus dem Knochenmark von Patienten mit klinisch lokalisiertem Prostatakarzinom z.T. ähnliche Veränderungen an den untersuchten Chromosomenlokalisationen aufweisen wie die in der Literatur beschriebenen Primärtumore, ein spezielles Hybridisierungsmuster in allen Tumoren findet sich jedoch nicht. Alle Tumore weisen eine ausgesprochene Heterogenität auf, die tendentiell mit einer längeren Kulturdauer ansteigt. Sowohl in den Primärkulturen als auch in den Zelllinien finden sich Zytokeratin-positive und Zytokeratin-negative Zellen, die sich in ihrem Hybridisierungsmuster mit zunehmender Kulturdauer anzugleichen scheinen. In einer Zelllinie tritt sogar eine komplette Zytokeratinnegativität auf.

Aufgrund der gewonnen Daten konnte eine Charakterisierung der disseminierten Prostatakarzinomzellen im Knochenmark bezüglich der Regionen 6p25, 8q24.3 und 8p23 gemacht werden. Inwieweit die einzelnen Veränderungen der Karzinomzellen für die frühe Disseminierung verantwortlich sind, wird durch weiterführende Studien zu prüfen sein. Insbesondere sollte in Zukunft auch den bisher nur wenig beschriebenen Veränderungen an Chromosom 6p Aufmerksamkeit zukommen. Wünschenswert wären v.a. auch klinische Studien, in denen die chromosomalen Veränderungen mit dem Tumorstadium und der Rezidivrate verglichen werden, um dadurch die prognostische Relevanz der chromosomalen Veränderungen herauszufinden und so Patienten mit einer hohen Rezidivgefahr frühzeitig zu ermitteln.

5. Zusammenfassung

In Deutschland ist das Prostatakarzinom nach dem Bronchialkarzinom der zweithäufigste maligne Tumor des Mannes. Es stellt unter den urologischen Tumoren die häufigste Todesursache dar und gleichzeitig, ab dem 80. Lebensjahr, die häufigste durch Malignome bedingte Todesursache überhaupt. Bereits in einem frühen, klinisch nicht metastasierten Tumorstadium kann es zur systemischen Disseminierung von vereinzelten Karzinomzellen kommen. Im Zell-Zyklus-Arrest oder in einem Gleichgewicht aus Proliferation und Apoptose persistieren diese Zellen dann beispielsweise im Knochenmark, bis ein auslösendes Ereignis die erneute Proliferation anregt, bzw. das Gleichgewicht zu Gunsten der Proliferation verschiebt. Ist dies geschehen, so erfolgt eine weitere Streuung von Tumorzellen und das Wachstum von Fernrezidiven. Die Untersuchung dieser disseminierten Zellen gewinnt immer mehr an Bedeutung, da sie zunehmend als klinisch relevanter Prognosefaktor angesehen werden. Eine genauere Analyse der disseminierten Zellen im Knochenmark ist notwendig, um die systemische Streuung der Zellen besser zu verstehen und speziellere Therapiestrategien entwickeln zu können.

Ziel dieser Dissertation war, die Kombination aus immunzytochemischer Färbung und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Interphasezellen zu etablieren. Als Testobjekt dienten Tumorzelllinien und Primärkulturen, die aus Knochenmarkaspiraten von Patienten mit Prostatakarzinomen gewonnen worden waren. Drei der fünf Zelllinien waren zusätzlich mit SV-40 cDNA transfiziert und immortalisiert worden. Exemplarisch sollten drei Sonden für Chromosom 6p, 8p und 8q getestet werden, um disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit lokalisiertem Prostatakarzinom speziell auf Veränderungen in diesem Bereich zu analysieren. Die Auswahl der Sonden erfolgte aufgrund publizierter Daten, nach denen Veränderungen vom Chromosom 8 an primären Prostatakarzinomen häufig vorkommen. Es war zu untersuchen, ob sich derartige Veränderungen auch an disseminierten Karzinomzellen nachweisen lassen, da sowohl der Verlust des kurzen Armes von Chromosom 8 (8p) als auch der Zugewinn des langen Armes von Chromosom 8 (8q) mit dem klinischen Schweregrad der Tumorerkrankung zu korrelieren scheinen. Veränderungen an Chromosom 6p sind nur wenig in der Literatur beschrieben. Diese Sonde sollte ursprünglich als Kontrolle dienen. Schon bald zeigte sich jedoch, dass auch an der untersuchten 6p Region Veränderungen auftreten.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass immunzytochemische Färbung und Dreifarben-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Interphasezellen kombinierbar sind. Die Methode eignet sich also zur Analyse disseminierter Karzinomzellen in der Interphase.

Sowohl in den immortalisierten Zelllinien wie auch in den Primärkulturen der disseminierten Prostatakarzinomzellen wurden für alle drei untersuchten Chromosomenlokalisationen numerische Aberrationen entdeckt. In fast allen Tumorpräparaten zeigte sich eine verschieden große Zellpopulation mit normalem Hybridisierungsmuster (je zwei Signale für 6p, 8q und 8p) und mindestens ein Zellklon mit pathologischem Muster. Ein konsistentes Muster für 6p25, 8q24.3 und 8p23 Aberrationen, das in allen untersuchten Karzinomen vorhanden oder vorherrschend gewesen wäre, ließ sich nicht definieren. Dominierend war ein heterogenes Bild verschiedener Kombinationen von Aberrationen und eine ausgeprägte Heterogenität vorhanden.

Ebenso wie an den in der Literatur beschriebenen Zellen aus Primärtumoren waren auch in den disseminierten Zellen 8p-Verluste und zum Teil 8q-Zugewinne und 6p-Zugewinne zu finden. Die Zugewinne dieser Chromosomenregionen waren überwiegend in den Zelllinien nachweisbar.
Hervorzuheben ist der Verlust von 6p in sieben der elf Primärkulturen, die von Knochenmarkaspiraten gewonnen worden waren, eine Aberration, die bisher nur in einem einzigen Fall eines primären Prostatakarzinom-Gewebe beschrieben wurde (Cooney et al. 1996).

Weiteren Untersuchungen bleibt es vorbehalten zu prüfen, ob diese chromosomalen Veränderungen der Karzinomzellen in einem kausalen Zusammenhang mit der frühen Disseminierung stehen. Nur prospektive klinische Studien können die Frage beantworten, ob diesen Veränderungen eine prognostische Bedeutung für den klinischen Schweregrad der Tumorerkrankung, die Rezidivrate des Karzinoms und die Überlebenszeit der Patienten zukommt, um somit gefährdete Patienten frühzeitig zu erkennen und eventuell einer intensivierten systemischen Therapie zuzuführen.

6. Anhang

6.1 Berechnung der dreifachen Standardabweichung

Berechnung der dreifachen Standardabweichung für verschiedene Muster; Vorkommen in den Kontrollgruppen

	KG a	KG b							
Muster: 6p-8q-8p	**Anzahl**	**Anzahl**	**Mittel-wert**	**SD**	**3*SD**	**Unter-grenze**	**%-Anteil**	**Ober-grenze**	**%-Anteil**
2-2-2	128	162	145,0	12,021	36,062	108,938	54,469	181,062	90,531
3-2-2	13	6	9,5	2,475	7,425	2,075	1,038	16,925	8,462
2-1-2	8	13	10,5	1,768	5,303	5,197	2,598	15,803	7,902
1-2-2	3	10	6,5	2,475	7,425	-0,925	-0,462	13,925	6,962
2-2-1	6	1	3,5	1,768	5,303	-1,803	-0,902	8,803	4,402
3-2-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-3-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-2-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-1-1	1	0	0,5	0,354	1,061	-0,561	-0,280	1,561	0,780
4-2-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-3-2	4	2	3,0	0,707	2,121	0,879	0,439	5,121	2,561
1-1-2	2	0	1,0	0,707	2,121	-1,121	-0,561	3,121	1,561
2-2-3	5	2	3,5	1,061	3,182	0,318	0,159	6,682	3,341
0-1-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-0-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-4-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-4-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-3-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-3-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-4-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-3-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6-4-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0-2-2	6	0	3,0	2,121	6,364	-3,364	-1,682	9,364	4,682
ANC:									
6p	2,125	1,995	2,060	0,046	0,138	1,922		2,198	
8q	1,995	1,960	1,978	0,012	0,037	1,940		2,015	
8p	2,065	2,005	2,035	0,021	0,064	1,971		2,099	

Legende: **KG a:** Kontrollgruppe a, normale Nierenzellen; siehe auch Tabelle 3.1-2
KG b: Kontrollgruppe b, periphere Blutlymphozyten (PBL) gesunder Probanden; siehe auch Tabelle 3.1-2
SD: Standardabweichung
ANC: average number of copies, durchschnittliche Anzahl der Signale pro Zelle für jede Sonde. Berechnet sich aus der Summe aller Signale für die entsprechende Sonde dividiert durch die Anzahl der ausgewerteten Zellen.

6.2 Auswertung der Zelllinien

Es wurden mit Ausnahme von PC-H1 und PC-E1 p23 jeweils 200 Zytokeratin-positive Zellen von zwei unabhängigen Personen ausgewertet. Im Fall PC-H1 wurden nur 100 Zytokeratin-positive Zellen, im Fall PC-E1 p23 200 Zytokeratin-negative Zellen gezählt.

Auswertung PC-E1 p23 +SV 40; Zytokeratin-negative Zellen

		Signale pro Sonde			
Anzahl		6p-FITC	8q-Cy3	8p-Biotin	%-Anteil
18		5	4	3	9,0
17		4	4	3	8,5
14		5	3	3	7,0
12		4	3	2	6,0
10		3	4	3	5,0
10		4	3	3	5,0
10		6	4	3	5,0
8		5	4	2	4,0
8		6	3	3	4,0
7		2	2	2	3,5
6		3	3	3	3,0
6		5	3	4	3,0
6		4	2	2	2,5
5		4	4	2	2,5
5		5	3	2	2,5
5		5	4	4	2,5
4		3	2	2	2,0
3		3	1	2	1,5
3		3	2	1	1,5
3		4	4	4	1,5
3		4	5	3	1,5
2		2	3	2	1,0
2		3	3	2	1,0
2		5	5	3	1,0
2		5	6	3	1,0
2		6	4	3	1,0
2		6	2	4	1,0
2		7	4	4	1,0
1		2	0	0	0,5
1		2	2	1	0,5
1		2	2	3	0,5
1		2	4	2	0,5
1		3	2	3	0,5
1		3	3	1	0,5
1		3	4	2	0,5
1		3	4	4	0,5
1		4	2	3	0,5

Fortsetzung:

		Signale pro Sonde			
Anzahl		6p-FITC	8q-Cy3	8p-Biotin	%-Anteil
1		4	3	4	0,5
1		2	4	5	0,5
1		3	5	5	0,5
1		4	5	4	0,5
1		5	6	6	0,5
1		5	2	3	0,5
1		5	5	2	0,5
1		5	1	1	0,5
1		5	1	2	0,5
1		5	5	5	0,5
1		5	2	2	0,5
1		6	2	3	0,5
1		6	6	3	0,5
1		7	4	3	0,5
Gesamt: 200	**ANC:**	**4,315**	**3,365**	**2,780**	

Auswertung PC-H1 p12; Zytokeratin-positive Zellen

		Signale pro Sonde			
Anzahl		6p-FITC	8q-Cy3	8p-Biotin	%-Anteil
14		2	2	1	7,0
12		2	2	2	6,0
7		4	2	2	3,5
6		2	2	3	3,0
5		1	2	2	2,5
5		4	4	2	2,5
4		2	3	2	2,0
3		2	1	1	1,5
3		2	1	2	1,5
3		3	2	2	1,5
2		2	2	4	1,0
2		2	3	3	1,0
2		2	3	4	1,0
2		3	3	0	1,0
2		3	3	2	1,0
2		4	2	3	1,0
2		3	5	3	1,0
1		0	2	2	0,5
1		1	0	0	0,5
1		1	2	1	0,5
1		2	0	1	0,5
1		2	3	1	0,5
1		2	4	1	0,5
1		2	4	3	0,5
1		3	1	0	0,5
1		3	1	2	0,5
1		3	2	1	0,5
1		3	2	4	0,5
1		3	3	4	0,5
1		4	1	2	0,5
1		4	3	3	0,5
1		4	4	3	0,5
1		3	3	6	0,5
1		5	2	4	0,5
1		5	4	3	0,5
1		6	6	0	0,5
1		5	4	5	0,5
1		6	1	1	0,5
1		6	6	9	0,5
1		2	5	1	0,5
1		6	4	3	0,5
Gesamt: 100	**ANC:**	**2,650**	**2,410**	**2,380**	

Auswertung PC-R1 p13 +SV 40; Zytokeratin-positive Zellen

		Signale pro Sonde			
Anzahl		6p-FITC	8q-Cy3	8p-Biotin	%-Anteil
85		2	2	1	42,5
27		3	2	1	13,5
12		2	3	1	6,0
11		1	2	1	5,5
11		2	1	1	5,5
10		4	2	1	5,0
7		2	2	0	3,5
7		3	3	1	3,5
5		3	1	1	2,5
3		2	0	0	1,5
3		3	3	2	1,5
2		1	1	1	1,0
2		3	2	2	1,0
2		4	4	2	1,0
1		0	1	4	0,5
1		1	1	0	0,5
1		1	3	1	0,5
1		2	0	1	0,5
1		2	1	0	0,5
1		2	2	2	0,5
1		2	4	1	0,5
1		3	4	1	0,5
1		3	4	3	0,5
1		4	1	1	0,5
1		4	2	2	0,5
1		4	3	2	0,5
1		4	4	1	0,5
Gesamt: 200	**ANC:**	**2,305**	**2,030**	**1,015**	

Auswertung PC-S1 p17 +SV40; Zytokeratin-positive Zellen

		Signale pro Sonde			
Anzahl		6p-FITC	8q-Cy3	8p-Biotin	%-Anteil
67		2	2	2	33,5
18		2	1	2	9,0
14		2	2	1	7,0
9		1	2	2	4,5
8		2	3	2	4,0
7		2	1	1	3,5
7		1	1	2	3,5
6		2	3	3	3,0
6		3	2	2	3,0
5		1	1	1	2,5
4		2	3	1	2,0
3		1	3	3	1,5
3		2	4	4	1,5
3		0	2	2	1,5
2		3	1	1	1,0
2		3	1	2	1,0
2		4	1	1	1,0
2		4	1	2	1,0
2		3	4	2	1,0
2		4	3	3	1,0
2		2	2	4	1,0
2		4	2	2	1,0
2		4	4	4	1,0
1		0	0	1	0,5
1		0	1	1	0,5
1		1	1	0	0,5
1		1	2	1	0,5
1		1	2	3	0,5
1		2	0	0	0,5
1		2	0	2	0,5
1		2	4	1	0,5
1		2	4	2	0,5
1		3	3	1	0,5
1		3	3	2	0,5
1		3	3	4	0,5
1		3	4	4	0,5
1		4	2	3	0,5
1		2	5	4	0,5
1		4	5	5	0,5
1		0	2	1	0,5
1		2	2	3	0,5
1		4	0	4	0,5
1		4	1	1	0,5
1		4	4	2	0,5
1		4	4	3	0,5
Gesamt: 200	**ANC:**	**1,955**	**2,000**	**1,975**	

Auswertung PC-Y1 p8; Zytokeratin-positive Zellen

		Signale pro Sonde			
Anzahl		6p-FITC	8q-Cy3	8p-Biotin	%-Anteil
70		2	2	2	35,0
27		2	2	1	13,5
11		1	2	2	5,5
11		2	3	2	5,5
9		2	1	1	4,5
5		2	4	2	2,5
5		2	4	4	2,5
4		0	2	2	2,0
4		4	4	2	2,0
4		4	4	4	2,0
3		0	1	2	1,5
2		1	0	2	1,0
2		1	1	1	1,0
2		1	1	2	1,0
2		2	0	0	1,0
2		2	1	2	1,0
2		2	2	3	1,0
2		2	3	1	1,0
2		2	3	3	1,0
2		3	2	2	1,0
2		2	5	4	1,0
1		0	0	2	0,5
1		0	1	4	0,5
1		0	2	4	0,5
1		0	3	2	0,5
1		0	3	4	0,5
1		0	4	2	0,5
1		1	0	0	0,5
1		1	0	1	0,5
1		1	2	1	0,5
1		1	4	1	0,5
1		1	4	2	0,5
1		2	0	2	0,5
1		2	1	4	0,5
1		2	2	4	0,5
1		4	0	2	0,5
1		4	2	2	0,5
1		4	3	2	0,5
1		2	5	2	0,5
1		5	5	7	0,5
1		5	5	6	0,5
1		3	6	4	0,5
1		1	5	2	0,5
1		2	5	5	0,5
1		5	3	2	0,5

Fortsetzung:

		Signale pro Sonde			
Anzahl		6p-FITC	8q-Cy3	8p-Biotin	%-Anteil
1		2	6	4	0,5
1		2	0	5	0,5
1		1	4	5	0,5
Gesamt: 200	**ANC:**	**1,930**	**2,260**	**2,045**	

6.3 Auswertung der Primärkulturen

Es wurden jeweils 200 Zytokeratin-positive Zellen von zwei unabhängigen Personen ausgewertet.

Auswertung PC-E1 p1 +SV40;
Zytokeratin-positive Zellen

		Signale pro Sonde			
Anzahl		6p-FITC	8q-Cy3	8p-Biotin	%-Anteil
108		2	2	2	54,0
24		2	1	2	12,0
13		1	2	2	6,5
8		2	2	1	4,0
8		3	2	2	4,0
5		1	1	2	2,5
5		2	2	3	2,5
5		2	3	2	2,5
2		1	0	2	1,0
2		1	1	1	1,0
2		2	1	1	1,0
2		3	2	1	1,0
2		4	3	4	1,0
2		4	4	2	1,0
1		2	0	2	0,5
1		2	1	3	0,5
1		2	3	1	0,5
1		2	4	2	0,5
1		3	1	2	0,5
1		3	2	3	0,5
1		3	3	2	0,5
1		3	3	3	0,5
1		3	3	4	0,5
1		4	1	2	0,5
1		4	2	2	0,5
1		4	4	4	0,5
Gesamt: 200	**ANC:**	**2,035**	**1,885**	**2,005**	

Auswertung PC-E1-nach p1;
Zytokeratin-positive Zellen

		Signale pro Sonde			
Anzahl		6p-FITC	8q-Cy3	8p-Biotin	%-Anteil
103		2	2	2	51,5
29		1	2	2	14,5
17		2	2	1	8,5
7		1	1	1	3,5
6		2	1	1	3,0
6		2	1	2	3,0
4		2	2	0	2,0
3		0	2	2	1,5
3		1	1	0	1,5
2		1	1	2	1,0
2		1	2	1	1,0
2		1	2	3	1,0
2		2	2	3	1,0
2		2	3	2	1,0
1		0	2	1	0,5
1		1	3	3	0,5
1		2	0	0	0,5
1		2	0	2	0,5
1		2	2	4	0,5
1		2	3	1	0,5
1		2	4	2	0,5
1		2	4	4	0,5
1		3	2	2	0,5
1		3	2	4	0,5
1		3	3	3	0,5
1		4	2	2	0,5
Gesamt: 200	**ANC:**	**1,755**	**1,905**	**1,810**	

Anmerkung: Zwischen den beiden Knochenmarkpunktionen der Zellen PC-E1 und PC-E1-nach liegen sieben Monate.

Auswertung PC-H3 p1; Zytokeratin-positive Zellen

		Signale pro Sonde			
Anzahl		6p-FITC	8q-Cy3	8p-Biotin	%-Anteil
75		2	2	2	37,5
24		2	1	2	12,0
17		1	2	2	8,5
11		1	1	2	5,5
8		3	2	2	4,0
8		2	1	1	4,0
7		2	2	1	3,5
6		2	3	2	3,0
4		2	2	4	2,0
4		2	2	3	2,0
4		0	1	2	2,0
3		4	2	2	1,5
3		2	0	2	1,5
3		1	1	1	1,5
2		3	2	3	1,0
2		2	0	0	1,0
2		1	0	2	1,0
2		1	0	1	1,0
1		4	1	2	0,5
1		3	3	2	0,5
1		3	1	2	0,5
1		2	3	3	0,5
1		2	1	3	0,5
1		2	0	1	0,5
1		1	3	2	0,5
1		1	2	3	0,5
1		1	2	1	0,5
1		1	1	4	0,5
1		0	3	2	0,5
1		0	2	3	0,5
1		0	2	2	0,5
1		6	6	4	0,5
1		6	1	1	0,5
Geamt: 200	**ANC:**	**1,875**	**1,695**	**1,975**	

Auswertung PC-L2 p1; Zytokeratin-positive Zellen

		Signale pro Sonde			
Anzahl		6p-FITC	8q-Cy3	8p-Biotin	%-Anteil
74		2	2	2	37,0
33		2	1	2	16,5
19		1	2	2	9,5
12		2	2	1	6,0
11		1	1	2	5,5
7		2	0	2	3,5
6		2	2	3	3,0
5		3	2	2	2,5
4		0	1	2	2,0
4		2	1	1	2,0
4		2	3	2	2,0
4		4	2	2	2,0
2		0	2	2	1,0
2		1	2	1	1,0
2		2	0	1	1,0
1		0	0	2	0,5
1		0	2	1	0,5
1		1	0	2	0,5
1		1	1	1	0,5
1		1	2	3	0,5
1		1	3	3	0,5
1		2	0	3	0,5
1		2	1	3	0,5
1		3	1	1	0,5
1		3	3	2	0,5
1		4	3	3	0,5
Gesamt: 200	**ANC:**	**1,825**	**1,640**	**1,940**	

Auswertung PC-M2 p1; Zytokeratin-positive Zellen

		Signale pro Sonde			
Anzahl		6p-FITC	8q-Cy3	8p-Biotin	%-Anteil
76		2	2	2	38,0
21		2	1	2	10,5
16		2	3	2	8,0
14		1	2	2	7,0
14		2	1	1	7,0
10		1	1	2	5,0
10		2	2	1	5,0
8		3	2	2	4,0
6		3	2	3	3,0
3		2	1	0	1,5
3		3	1	2	1,5
2		2	0	0	1,0
2		2	0	2	1,0
2		2	2	3	1,0
2		2	4	2	1,0
2		3	2	1	1,0
1		1	1	1	0,5
1		1	2	1	0,5
1		2	0	1	0,5
1		2	2	0	0,5
1		2	3	3	0,5
1		3	1	1	0,5
1		3	3	2	0,5
1		4	2	2	0,5
1		4	3	2	0,5
Geamt: 200	**ANC:**	**1,995**	**1,800**	**1,835**	

Auswertung PC-P1 p6; Zytokeratin-positive Zellen

		Signale pro Sonde			
Anzahl		6p-FITC	8q-Cy3	8p-Biotin	%-Anteil
61		2	2	2	30,5
28		2	1	2	14,0
15		1	2	2	7,5
11		2	1	1	5,5
11		3	2	2	5,5
10		2	2	1	5,0
10		2	2	3	5,0
7		1	1	2	3,5
6		2	0	2	3,0
6		2	3	2	3,0
5		4	2	2	2,5
4		3	3	2	2,0
3		0	2	2	1,5
3		1	0	2	1,5
2		2	2	0	1,0
2		3	1	2	1,0
2		4	0	2	1,0
2		4	4	2	1,0
1		0	0	2	0,5
1		0	1	1	0,5
1		1	0	1	0,5
1		2	0	0	0,5
1		2	0	1	0,5
1		2	0	3	0,5
1		2	1	3	0,5
1		2	2	4	0,5
1		2	4	4	0,5
1		4	1	1	0,5
1		4	1	2	0,5
1		4	4	4	0,5
Geamt: 200	**ANC:**	**2,025**	**1,670**	**1,935**	

Auswertung PC-S2 p2; Zytokeratin-positive Zellen

		Signale pro Sonde			
Anzahl		6p-FITC	8q-Cy3	8p-Biotin	%-Anteil
73		2	2	2	36,5
32		2	1	2	16,0
10		1	2	2	5,0
10		2	1	1	5,0
10		2	2	1	5,0
7		2	0	2	3,5
7		2	2	3	3,5
6		1	1	1	3,0
6		2	3	2	3,0
3		0	2	2	1,5
3		2	0	1	1,0
3		3	1	2	1,5
3		3	2	2	1,5
2		0	0	2	1,0
2		1	0	1	1,0
2		1	1	2	1,0
2		2	1	3	1,0
2		3	3	2	1,0
2		4	2	2	1,0
2		4	4	2	1,0
1		0	1	1	0,5
1		0	1	2	0,5
1		1	0	0	0,5
1		1	0	2	0,5
1		1	1	3	0,5
1		1	3	2	0,5
1		1	3	3	0,5
1		2	1	0	0,5
1		2	2	0	0,5
1		3	1	1	0,5
1		2	4	4	0,5
1		3	3	3	0,5
1		5	1	2	0,5
Geamt: 200	**ANC:**	**1,880**	**1,620**	**1,970**	

Auswertung PC-S3 p1; Zytokeratin-positive Zellen

		Signale pro Sonde			
Anzahl		6p-FITC	8q-Cy3	8p-Biotin	%-Anteil
95		2	2	2	47,5
16		2	1	2	8,0
10		2	2	1	5,0
8		1	2	2	4,0
8		2	2	3	4,0
6		3	2	2	3,0
5		1	1	2	2,5
4		2	0	2	2,0
4		2	1	0	2,0
4		2	1	1	2,0
4		2	3	2	2,0
4		3	3	2	2,0
3		0	1	2	1,5
3		1	1	1	1,5
3		4	4	2	1,5
2		0	2	2	1,0
2		0	2	3	1,0
2		2	1	3	1,0
2		2	2	0	1,0
2		2	3	3	1,0
2		3	1	2	1,0
2		4	2	2	1,0
1		0	2	1	0,5
1		1	2	0	0,5
1		1	2	1	0,5
1		1	3	2	0,5
1		2	0	1	0,5
1		2	2	4	0,5
1		2	3	1	0,5
1		3	0	3	0,5
1		5	5	2	0,5
Geamt: 200	**ANC:**	**1,955**	**1,880**	**1,910**	

Auswertung PC-S8 p2; Zytokeratin-positive Zellen

		Signale pro Sonde			
Anzahl		6p-FITC	8q-Cy3	8p-Biotin	%-Anteil
86		2	2	2	43,0
16		2	1	2	8,0
16		2	3	2	8,0
15		2	2	1	7,5
8		2	0	2	4,0
7		2	2	3	3,5
6		3	2	2	3,0
6		4	2	2	3,0
5		1	2	2	2,5
5		2	1	1	2,5
4		3	3	2	2,0
3		1	3	2	1,5
2		1	0	1	1,0
2		1	2	1	1,0
2		2	4	2	1,0
2		3	3	1	1,0
2		4	3	2	1,0
1		0	1	1	0,5
1		1	0	0	0,5
1		1	1	1	0,5
1		2	0	0	0,5
1		2	0	1	0,5
1		2	0	4	0,5
1		2	1	3	0,5
1		2	2	0	0,5
1		2	3	1	0,5
1		3	0	2	0,5
1		3	2	1	0,5
1		4	1	2	0,5
1		4	4	4	0,5
Geamt: 200	**ANC:**	**2,090**	**1,895**	**1,875**	

Auswertung PC-S9 p1; Zytokeratin-positive Zellen

		Signale pro Sonde			
Anzahl		6p-FITC	8q-Cy3	8p-Biotin	%-Anteil
58		2	2	2	29,0
22		2	1	2	11,0
14		0	1	2	7,0
14		2	0	2	7,0
12		1	1	2	6,0
10		2	1	1	5,0
9		1	2	2	4,5
6		1	1	1	3,0
5		2	0	1	2,5
5		2	2	1	2,5
5		2	2	3	2,5
4		1	2	1	2,0
3		0	0	2	1,5
3		1	0	2	1,5
3		2	1	3	1,5
3		4	2	2	1,5
2		0	0	1	1,0
2		0	2	3	1,0
2		1	0	1	1,0
2		2	3	1	1,0
2		2	3	2	1,0
2		4	1	1	1,0
1		0	1	1	0,5
1		0	1	3	0,5
1		0	2	2	0,5
1		1	0	3	0,5
1		1	1	3	0,5
1		1	2	3	0,5
1		1	3	2	0,5
1		2	0	0	0,5
1		2	2	4	0,5
1		3	1	2	0,5
1		3	2	2	0,5
1		4	4	3	0,5
Geamt: 200	**ANC:**	**1,630**	**1,360**	**1,880**	

Auswertung PC-W2 p3; Zytokeratin-positive Zellen

		Signale pro Sonde			
Anzahl		6p-FITC	8q-Cy3	8p-Biotin	%-Anteil
38		1	2	2	19,0
35		2	2	2	17,5
15		2	3	2	7,5
14		0	2	2	7,0
13		2	1	2	6,5
10		2	2	3	5,0
8		2	2	1	4,0
6		2	2	4	3,0
5		1	1	2	2,5
4		0	1	2	2,0
4		0	2	3	2,0
4		1	1	3	2,0
3		1	2	3	1,5
3		3	2	2	1,5
2		0	2	1	1,0
2		0	2	4	1,0
2		1	2	4	1,0
2		1	3	2	1,0
2		1	3	3	1,0
2		2	0	2	1,0
2		2	1	1	1,0
2		2	3	3	1,0
2		2	3	4	1,0
2		2	4	4	1,0
2		3	3	2	1,0
2		4	4	2	1,0
1		0	0	2	0,5
1		0	3	2	0,5
1		1	0	1	0,5
1		1	1	0	0,5
1		1	2	1	0,5
1		1	4	5	0,5
1		2	1	3	0,5
1		2	2	5	0,5
1		2	4	2	0,5
1		2	4	3	0,5
1		3	2	4	0,5
1		4	2	2	0,5
1		4	4	3	0,5
1		6	6	5	0,5
Geamt: 200	**ANC:**	**1,510**	**2,040**	**2,255**	

6.4 Auswertung Zytokeratin-negativer Zellen zweier Primärkulturen

Es wurden die Zytokeratin-negativen Zellen des jeweilig gleichen Präparates ausgewertet, wie die, unter Punlt 6.3 beschriebenen, Zytokeratin-positiven Zellen. Beide Zellarten wurden also in gleicher Weise behandelt. Es wurden 200 Zellen von zwei unabhängigen Personen gezählt.

PC-E1 p1; Zytokeratin-negative Zellen

		Signale pro Sonde			
Anzahl		6p-FITC	8q-Cy3	8p-Biotin	%-Anteil
134		2	2	2	67,0
20		3	2	2	10,0
15		1	2	2	7,5
8		2	1	2	4,0
7		2	2	1	3,5
6		2	3	2	3,0
4		2	2	3	2,0
2		4	2	2	1,0
1		1	2	1	0,5
1		1	2	3	0,5
1		2	1	1	0,5
1		3	3	2	0,5
Gesamt: 200	**ANC:**	**2,040**	**1,990**	**1,980**	

PC-H3 p1; Zytokeratin-negative Zellen

		Signale pro Sonde			
Anzahl		6p-FITC	8q-Cy3	8p-Biotin	%-Anteil
124		2	2	2	62,0
15		1	2	2	7,5
10		2	1	2	5,0
8		3	2	2	4,0
7		2	2	3	3,5
4		0	2	2	2,0
4		3	2	1	2,0
4		3	3	2	2,0
4		4	4	4	2,0
2		1	1	2	1,0
2		2	1	1	1,0
2		2	3	1	1,0
2		2	3	3	1,0
2		3	2	3	1,0
2		4	2	3	1,0
2		4	4	2	1,0
1		0	2	4	0,5
1		1	2	3	0,5
1		1	3	2	0,5
1		1	4	2	0,5
1		2	1	3	0,5
1		2	4	2	0,5
Gesamt: 200	**ANC:**	**1,960**	**2,050**	**2,085**	

6.5 Auswertung von Metaphasen von PC-E1 p 23

Auswertung von Metaphasen von PC-E1 p23 +SV 40; Zytokeratin-negative Zellen

		Signale pro Sonde			
Anzahl		6p-FITC	8q-Cy3	8p-Biotin	%-Anteil
5		5	4	3	19,23
5		4	4	3	19,23
2		4	3	2	7,69
2		4	3	3	7,69
1		5	5	2	3,85
1		4	5	3	3,85
1		3	1	1	3,85
1		9	6	6	3,85
1		5	3	3	3,85
1		6	4	4	3,85
1		6	4	3	3,85
1		5	3	2	3,85
1		3	4	2	3,85
1		5	4	4	3,85
1		3	4	3	3,85
1		8	5	5	3,85
Gesamt: 26	**ANC:**	4,730	3,850	3,000	

7. Literaturverzeichnis

Atkin NB, Baker MC. Chromosome study of five cancers of the prostate.
Hum. Genet. 70(4):359-64 (1985)

Bergerheim US, Kunimi K et al.. Deletion mapping of chromosomes 8, 10 and 16 in human prostatic carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 3: 215-220 (1991)

Bernardino J, Bourgeois CA et al.. Charakterization of chromosome changes in two human prostatic carcinoma cell lines (PC-3 and DU 145) using chromosome painting and comparative genomic hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.* 96: 123-128 (1997)

Bolla M, Gonzalez D et al.. Improved survival in patients with locally advanced prostate cancer treated with radiotherapy and goserelin. *NEJM* 337: 295-300 (1997)

Bookstein R, MacGrogan D et al.. P53 is mutated in a subset of advanced-stage prostate cancers. *Cancer Res*. 53: 3369-3373 (1993)

Bookstein R, Bova GS et al.. Tumour-suppressor genes in prostatic oncogenesis: a positional approach. *Br. J. Urol.* 79 Suppl 1:28-36 (1997)

Bova GS, Carter BS et al.. Homozygous deletion and frequent allelic loss of chromosome 8p22 loci in human prostate cancer. *Cancer Res.* 53: 3869-73 (1993)

Braun S, Schindlbeck F et al.. Occult tumor cells in bone marrow of patients with locoregionally restricted ovarian cancer predict early distant metastatic relapse. *J. Clin. Onc.* 19: 368-375 (2001)

Braun S, Schlimok G et al.. ErbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients. *Cancer Res.* 61: 1890-1895 (2001)

Braun S, Pantel K. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *NEJM* 342: 525-533 (2000)

Braun S, Pantel K. Biological charakteristics of micrometastatic cancer cells in bone marrow.
Cancer Metastasis Rev. 18: 75-90 (1999)

Braun S, Pantel K. Micrometastatic bone marrow involvement: detection and prognostic significance. *Med. Oncol.* 16: 154-65 (1999)

Brawer MK, Beatie J et al.. Screening for prostatic carcinoma with prostate specific antigen: results of the second year. *J Urol* 150: 106-109 (1993)

Bray-Ward P, Menninger J et al.. Integration of the cytogenetic, genetic and physical maps of the human genome by FISH mapping of CEPH YAC clones. *Genomics* 32: 1-14 (1996)

Bright RK, Vocke CD et al.. Generation and genetic charakterization of immortal human prostate epithelial cell lines derived from prostate cancer specimens. *Cancer Res.* 57: 995-1002 (1997)

Brothman AR. Cytogenetic studies in prostate cancer: Are we making progress?
Cancer Genet. Cytogenet. 95: 116-121 (1996)

Brothman AR, Watson MJ et al.. Evaluation of 20 archival prostate tumor specimens by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.* 75: 40-44 (1994)

Brothman AR, Patel AM et al.. Ananlysis of prostatic tumor cultures using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Cancer Genet. Cytogenet.* 62: 180-185 (1992)

Brothman AR, Peehl DM et al.. Frequency and pattern of karyotypic abnormalities in human prostate cancer. *Cancer Res.* 50: 3795-3803 (1990)

Brothman AR, Lesho LJ et al.. Cytogenetic analysis of four primary prostatic cultures.
Cancer Genet. Cytogenet. 37: 241-248 (1989)

Brown JA, Alcaraz A et al.. Chromosomal aneusomies detected by fluorescent in situ hybridization analysis in clinically localized prostate carcinoma. *J. Urol.* 152: 1157-62 (1994)

Cairns P, Okami K et al.. Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer.
Cancer Res. 57: 4997-5000 (1997)

Carter BS, Ewing CM et al.. Allelic loss of chromosomes 16q and 10q in human prostate cancer.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 8751-5 (1990)

Catalona WJ, Smith DS et al.. Detection of organ-confined prostate cancer is increased through prostate-specific antigen-based screening. *JAMA* 270: 948-954 (1993)

Cher ML, Bova GS et al.. Genetic alterations in untreated metastases and androgen-independent prostate cancer detected by comperative genomic hybridization and allelotyping.
Cancer Res. 56: 3091-3102 (1996)

Cooney KA, Wetzel JC et al.. Distinct regions of allelic loss on 13q in prostate cancer.
Cancer Res. 56: 1142-1145 (1996)

Cooney KA, Wetzel JC et al.. Identification and characterization of proximal 6q deletions in prostate cancer. *Cancer Res.* 56: 4150-3 (1996)

Cordell JL, Falini B et al.. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal antialkaline phosphatase (APAAP complexes).
J. Histochem. Cytochem. 32: 219-229 (1984)

Cote RJ, Rosen PP et al.. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J. Clin. Oncol.* 9: 1749-1756 (1991)

Di Cristofano A, De Acetis M et al.. Pten and p27KIP1 cooperate in prostate cancer tumor suppression in the mouse. *Nat. Genet.* 27: 222-224 (2001)

Dorudi S, Hart IR. Mechanisms underlying invasion and metastasis.
Curr. Opin. Oncol. 5:130-135 (1993)

Emi M, Fujiwara Y et al.. Frequent loss of heterozygosity for loci on chromosome 8p in hepatocellular carcinoma, colorectal cancer and lung cancer. *Cancer Res.* 52: 5368-72 (1992)

Fidler IJ. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res.* 50: 6130-8 (1990)

Fox JL, Hsu PH et al.. Fluorescence in situ hybridization: powerful molecular tool for cancer prognosis. *Clin. Chem.* 41: 1554-1559 (1995)

Fuchs E. Keratins as bichemical markers of epithelial differentiation.
Trends in Genetics 4: 277-281 (1988)

Fujiwara Y, Emi M et al.. Evidence for the presence of two tumor suppressor genes on chromosome 8p for colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 53: 1172-1174 (1993)

Gann PH, Hennekens CH et al.. Prospective study of plasma fatty acids and risk of prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 86: 281-286 (1994)

Gann PH, Hennekens CH et al.. A prospective evaluation of plasma prostate-specific antigen for detection of prostatic cancer. *JAMA* 273: 289-294 (1995)

Gao AC, Lou W et al.. CD44 is a metastasis suppressor gene for prostatic cancer located on human chromosome 11p13. *Cancer Res.* 57: 846-849 (1997)

Gao X, Wu N et al.. High frequency of mutator phenotype in human prostatic adenocarcinoma. *Oncogene* 9: 2999-3002 (1994)

Gibas Z, Pontes E et al.. Chromosome rearrangements in a metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Cancer Genet. Cytogenet.* 16: 301-304 (1985)

Hankey BF, Feuer EJ et al.. Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer - part I: Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates. *J. Natl. Cancer Inst.*91: 1017-1024 (1999)

Höchtlen-Vollmar W, Gruber R et al.. Occult epithelial tumor cells detected in bone marrow by an enzyme immunoassay specific for cytokeratin 19. *Int. J. Cancer* 70: 396-400 (1997)

Hölzel D. Epidemiologie des Prostatakarzinoms. *Fortschr. Med.* 109: 521-525 (1991)

Hoffman RM, Gilliland FD et al.. Racial and ethnic differences in advanced-stage prostate cancer: the Prostate Cancer Outcomes Study. *J. Natl. Cancer Inst.* 93: 388-395 (2001)

Holmgren L, O`Reilly MS et al.. Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature Med.* 1: 149-153 (1995)

Holz E, Pantel K et al.. Diagnosis and therapeutic relevance of micrometastases. *Recent Results Cancer Res.* 146: 214-218 (1998)

Hopman AHN, Ramaekers FCS et al.. In situ hybridization as a tool to study numerical chromosome aberrations in solid bladder tumors. *Histochemistry* 89: 307-316 (1988)

Hyytinen ER, Thalmann GN et al.. Genetic changes associated with the acquisition of androgen-independent growth, tumorigenicity and metastatic potential in a prostate cancer model.
Br. J. Cancer 75: 190-5 (1997)

Isaacs WB. Molecular genetics of prostate cancer. *Cancer Surveys*

Jackson-Cook C, Bae V et al.. Cytogenetic characterization of the human prostate cancer cell line P69SV40T and its novel tumorigenic sublines M2182 and M15.
Cancer Genet. Cytogenet. 87: 14-23 (1996)

Jauch KW, Heiss MM et al.. Prognostoc significance of bone marrow micrometastases in patients with gastric cancer. *J. Clin. Oncol.* 14: 1810-1817

Jellinghaus W, Okada K et al.. Chromosomal studies of human prostatic tumors in vitro.
Invest. Urol. 14: 16-19 (1976)

Jenkins RB, Qian J et al.. Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization.
Cancer Res. 57: 524-531 (1997)

Keetch DW, Rice JP et al.. Familial aspects of prostate cancer: a case control study.
J. Urol. 154: 2100-2102 (1995)

Ketter R, Zwergel T et al.. Selection toward diploid cells in prostatic carcinoma derived cell cultures. *Prostate* 28: 364-371 (1996)

Klein C, Seidl S et al.. Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. http://biotech.nature.com 20: 387-392 (2002)

Klein C, Schmidt-Kittler O et al.. Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 96: 4494-4499 (1999)

Klein G. The approaching era of the tumor suppressor genes. *Science* 238(4833):1539-45 (1987)

Koellermann J, Heseding B et al.. Comperative immunocytochemical assessment of isolated carcinoma cells in lymph nodes and bone marrow of patients with clinically localized prostate cancer. *Int. J. Cancer* 84: 145-149 (1999)

Koellermann MW, Pantel K et al.. Supersensitive PSA - monitored neoadjuvant hormone treatment of clinically localized prostate cancer: effects on positive margins, tumor detection and epithelial cells in bone marrow. *Eur. Urol.* 34: 318-324 (1998)

König JJ, Teubel W et al.. Charakterization of chromosome 8 aberrations in the prostate cancer cell line LNCaP-FGC and sublines. *Urol .Res.* 27: 3-8 (1999)

König JJ, Teubel W et al.. Gain and loss of chromosomes 1, 7, 8, 10, 18, and Y in 46 prostate cancers. *Hum. Pathol. 27*: 720-727 (1996)

König JJ, Teubel W et al.. Loss and gain of chromosomes 1, 18 and Y in Prostate Cancer. *Prostate* 25: 281-291 (1994)

Koivisto PA, Schleutker J et al.. Androgen receptor gene alterations and chromosomal gains and losses in prostate carcinomas appearing during finasteride treatment for benign prostatic hyperplasia. *Clin. Cancer Res.* 5: 3578-82 (1999)

Krongrad A, Lai H et al.. Mortality in prostate cancer. *J. Urol.* 156: 1084-1091 (1996)

Kubuschok B, Passlick B et al. Disseminated tumor cells in lymph nodes as a determinant for survival in surgically resected non–small–cell lung cancer. *J. Clin. Onc.* 17: 19-24 (1999)

Lichtenstein P, Holm NV et al.. Environmental and heritable factors in the causation of cancer-analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *NEJM* 343: 78-85 (2000)

Lindemann F, Schlimok G et al.. Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet* 340: 685-689 (1992)

Liotta LA, Steeg PS et al.. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64: 327-336 (1991)

Loh E, Couch FJ et al.. Development of donor – derived prostate cancer in a recipient following orthotopic heart transplantation. *JAMA* 277: 133-137 (1997)

Lundberg S, Carstensen J et al.. DNA flow cytometry and histopathological grading of paraffin - embedded prostate biopsy specimens in a survival study. *Cancer Res*. 47: 1973-1977 (1987)

MacGrogan D, Levy A et al.. Loss of chromosome arm 8p loci in prostate cancer: mapping by qualitative allelic imbalance. *Genes Chromosomes Cancer* 10: 151-159 (1994)

Macintosh CA, Stower M et al.. Precise microdissection of human prostate cancers reveals genotypic heterogeneity. *Cancer Res*. 58: 23-28 (1998)

Macoska JA, Trybus TM et al.. Evidence for three tumor suppressor gene loci on chromosome 8p in human prostate cancer. *Cancer Res.* 55: 5390-5395 (1995)

Macoska JA, Trybus TM et al.. Fluorescence in situ hybridization analysis of 8p allelic loss and chromosome 8 instability in human prostate cancer. *Cancer Res.* 54 3824-3830 (1994)

Mark HFL, Samy M et al.. Fluorescent in situ hybridization study of c-myc oncogene copy number in prostate cancer. *Experimental and molecular pathology* 68: 65-69 (2000)

Matsuyama H, Pan Y et al.. Deletion mapping of chromosome 8p in prostate cancer by fluorescence in situ hybridization. *Oncogene* 9: 3071-3076 (1994)

Micale MA, Sanford JS et al.. Defining the extent and nature of cytogenetic events in prostatic adenocarcinoma: Paraffin FISH vs. metaphase analysis. *Cancer Genet. Cytogenet.* 69: 7-12 (1993)

Miyoshi Y, Uemura H et al.. Fluorescence in situ hybridization evaluation of c-myc and androgen receptor gene amplification and chromosomal anomalies in prostate cancer in japanese patients. *Prostate* 43: 225-232 (2000)

Müller P, Schlimok G. Bone marrow “micrometastases” of epithelial tumors: detection and clinical relevance. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 126: 607-618 (2000)

Müller P, Carroll P et al.. Low frequency epithelial cells in bone marrow aspirates from prostate carcinoma patients are cytogenetically aberrant. *Cancer* 83: 538-546 (1998)

Müller P, Weckermann D et al.. Detection of genetic alterations in micrometastatic cells in bone marrow of cancer patients by fluorescence in situ hybridization.

Cancer Genet. Cytogenet. 88: 8-16 (1996)

Narla G, Heath KE et al.. KLF6, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer. *Science* 294: 2563-2566 (2001)

Offner S, Schmaus W et al.. P53 gene mutation are not required for early dissemination of cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 6942-6946 (1999)

O´Malley FP, Grignon DJ et al.. DNA heterogeneity in prostatic adenocarcinoma. A DNA flow cytometric mapping study with whole organ sections of prostate. *Cancer* 71: 2797-2802 (1993)

O`Reilly MS, Holmgren L et al.. Angiostatin induces sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nature Med.* 2: 689-692 (1996)

Oberneder R, Riesenberg R et al.. Immunocytochemical detection and phenotypic characterization of micrometastatic tumor cells in bone marrow of patients with prostate cancer. *Urol. Res.* 22: 3-8 (1994)

Pantel K, von Knebel Doeberitz M et al.. Detection and clinical relevance of micrometastatic cancer cells. *Current opinion in oncology* 12: 95-101 (2000)

Pantel K. Minimal residual disease. Introductory overview. *Cancer Metastasis Rev.* 18: 1-2 (1999)

Pantel K, Cote RJ et al.. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J. Natl. Cancer Inst.* 91: 1113-1124 (1999)

Pantel K, Ahrl A. Immunocytochemical and molecular strategies for the detection of micrometastases in patients with solid epithelial tumours: A review. *Nucl. Med Commun.* 19: 521-527 (1998).

Pantel K, Enzmann T et al.. Immunocytochemical monitoring of micrometastatic disease: Reduction of prostate cancer cells in bone marrow by androgen deprivation. *Int. J. Cancer* 71: 521-525 (1997)

Pantel K, Moss TJ. First international ISHAGE symposium on minimal residual cancer. *J. Hematother.* 5: 511-517 (1996)

Pantel K. Detection of minimal disease in patients with solid tumors. *J. Hematother.* 5: 359-367 (1996)

Pantel K, Izbicki J et al.. Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without ouvert metastases. *Lancet* 347: 649-653 (1996)

Pantel K, Aignherr C et al.. Immunocytochemical detection of isolated tumor cells in bone marrow of patients with untreated stage C prostatic cancer. *Europ. J. Cancer* 31A: 1627-1632 (1995)

Pantel K, Dickmanns A et al.. Establishment of micrometastatic carcinoma cell lines: a novel source of tumor cell vaccines. *J. nat. Cancer Inst*. 87: 1162-1168 (1995)

Pantel K, Schlimok G et al.. Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J. Hematother.* 3: 165-173 (1994)

Pantel K, Schlimok G et al.. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J. nat. Cancer Inst.* 85: 1419-1424 (1993)

Pantel K, Schlimok G et al.. Frequent down-regulation of major histocompatibility class I antigen expression on individual micrometastatic carcinoma cells. *Cancer Res.* 51: 4712-4715 (1991)

Pienta KJ, Esper PS. Risk factors for prostate cancer. *Ann. Intern. Med.* 118: 793-803 (1993)

Pilepich MV, Caplan R et al.. Phase III trial of androgen suppression using goserelin in unfavorable-prognosis carcinoma of the prostate treated with definitive radiotherapy: report of Radiation Therapy Oncology Group Protocol 85-31. *J. Clin. Oncol.* 15: 1013-1021 (1997)

Powell IJ, Banerjee M et al.. Should African-American men be tested for prostate carcinoma at an earlier age than white men? *Cancer* 85: 472-477 (1999)

Punt C, Nagy A et al. Edrecolomab alone or in combination with fluorouracil and folinic acid in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: a randomised study. *Lancet* 360: 671-677 (2002)

Putz E, Witter K et al.. Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models for human micrometastases. *Cancer Res.* 59: 241-248 (1999)

Qian J, Bostwick DG et al.. Chromosomal anomalies in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma detected by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res.* 55: 5408-5414 (1995)

Riede UN, Schaefer HE. Allgemeine und spezielle Pathologie. 4. Auflage, *Georg Thieme Verlag*, Stuttgart, 1995

Riethmüller G, Klein CA. Early cancer cell dissemination and late metastatic relapse: clinical reflections and biological approaches to the dormancy problem in patients. *Cancer biology* 11: 307-311 (2001)

Riethmüller G, Klein C et al.. Hunting down the seminal cells of clinical metastases. *Immunol. Today* 20: 294-296 (1999)

Riethmüller G, Holz E et al.. Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J. Clin. Oncol.* 16: 1788-1794 (1998)

Riethmüller G, Schneider-Gädicke E et al.. Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of Dukes´C colorectal carcinoma. *Lancet* 343: 1177-1183 (1994)

Riethmüller G, Johnson JP. Monoclonal antibodies in the detection and therapy of micrometastatic epithelial cancers. *Curr. Opin. Immunol.* 4:647-655 (1992)

Sandberg AA. Chromosomal abnormalities and related events in prostate cancer.
Hum. Pathol. 23: 368-380 (1992)

Schaller G, Fuchs I et al.. Elevated keratin 18 protein expression indicates a favorable prognosis in patients with breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 2: 1879-1885 (1996)

Schlimok G, Funke I et al.. Micrometastatic tumour cells in bone marrow of patients with gastric cancer: methodological aspects of detection and prognostic significance.
Eur. J. Cancer 27: 1461-1465 (1991)

Schlimok G, Funke I et al.. Micrometastatic cancer cells in bone marrow: In vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti 17-1A monoclonal antibodies.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 8672-8676 (1987)

Solakoglu O, Maierhofer C et al.. Heterogeneous proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors. *PNAS* 99: 2246-2251 (2002)

Speicher MR, Ballard SG et al.. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat. Genet.* 12: 368-375 (1996)

Srikantan V, Sesterhenn I et al.. Allelic loss on chromosome 6q in primary prostate cancer. *Int. J. Cancer* 84: 331-5 (1999)

Steilen H, Ketter R et al.. DNA aneuploidy in prostatic adenocarcinoma: a frequent event as shown by fluorescence in situ DNA hybridization. *Hum. Pathol.* 25: 1306-1313 (1994)

Steinberg GD, Carter BS et al.. Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate*;17: 337-347 (1990)

Strachan T, Read AP. Human molecular genetics. *BIOS Scientific Publishers, Oxford* 1996

Strohmayer TG, Slamon DJ. Protooncogenes and tumor suppressor genes in human urological malignancies. *Journal of Urology* 151: 1479-1497 (1994)

Szücs S, Zitzelsberger H et al.. Two - phase short - term culture method for cytogenetic investigations from human prostate carcinoma. *Prostate* 25: 225 - 235 (1994)

Takahashi S, Alcaraz A et al.. Aneusomies of chromosomes 8 and Y detected by fluorescence in situ hybridization are prognostic markers for pathological stage C (pT3N0M0) prostate carcinoma. *Clin. Cancer Res*. 2: 137-145 (1996)

Takahashi S, Qian J et al.. Potential markers of prostate cancer aggressiveness by fluorescence in situ hybridization in needle biopsies. *Cancer Res.* 54: 3574-3579 (1994)

Tarin D. Clinical and experimental studies on the biology of metastasis. *Biochim. Biophys. Acta*;780: 227-235 (1985)

Terry P, Lichtenstein P et al.. Fatty fish consumption and risk of prostate cancer. *Lancet* 357: 1764-1766 (2001)

Thorban S, Roder JD et al.. Immunocytochemical detection of disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with esophageal carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 88: 1222-1227 (1996)

Trapman J, Sleddens HF et al.. Loss of heterozygosity of chromosome 8 microsatellite loci implicates a candidate tumor suppressor gene between the loci D8S87 and D8S133 in human prostate cancer. *Cancer Res.* 54: 6061-6064 (1994)

Tumormanual Urogenitaltumoren. 2.Auflage, Tumorzentrum München (1997)

Uhr JW, Scheuermann RH et al.. Cancer dormancy: Opportunities for new therapeutic approaches. *Nature Med.* 3: 505-508 (1997)

Uhrig S, Bolzer A et al.. Einsatz von Vielfarben-FISH Techniken in der klinischen Diagnostik. *Med. Genetik* 9: 563-569 (1997)

Vagunda V, Landys K et al.. Bone marrow micrometastases in patients with stage I-II localised prostate cancer. *European journal of cancer* 37: 1847-1852 (2001)

Valles AM, Boyer B et al.. Acidic fibroblast growth factor is a modulator of epithelial plasticity in a rat bladder carcinoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1124-1128 (1990)

Van Den Berg C, Guan XY et al.. DNA sequence amplification in human prostate cancer identified by chromosome microdissection: potential prognostic implications. *Clin. Cancer Res.* 1: 11-18 (1995)

Vassilikos EJK, Yu H et al.. Relapse and cure rates of prostate cancer patients after radical prostatectomy and 5 years follow-up. *Clinical Biochemistry* 33: 115-123 (2000)

Veronese ML, Bullrich F et al.. The t(6;16)(p21;q22) chromosome translocation in the LNCaP prostate carcinoma cell line results in a tpc/hpr fusion gene. *Cancer Res.* 56: 728-32 (1996)

Virgin JB, Hurley PM et al.. Isochromosome 8q formation is associated with 8p loss of heterozygosity in a prostate cancer cell line. *Prostate* 41: 49-57 (1999).

Visakorpi T, Kallioniemi A et al.. Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.* 55: 342-347 (1995)

Weckermann D, Müller P et al.. Disseminated cytokeratin positive tumor cells in the bone marrow of patients with prostate cancer: detection and prognostic value. *J. Urol*. 166: 699-703 (2001)

Weckermann D, Wawroschek F Et al.. Does the immunocytochemical detection of epithelial cells in bone marrow (micrometastasis) influence the time of biochemical relapse after radical prostatectomy? *Urol. Research* 27: 285-290 (1999)

Weckermann D, Müller P et al.. Micrometastases of bone marrow in localized prostate cancer: correlation with etablished risk factors. *J. Clin. Oncol.* 17: 3438-3443 (1999)

Wirth M, Tyrrell C et al.. Bicalutamide (Casodex) 150 mg as immediate therapy in patients with localized or locally advanced prostate cancer significantly reduces the risk of disease progression. *Urology* 58: 146-151 (2001)

Zetter BR. The cellular basis of site-specific tumor metastasis. *NEJM* 322: 605-612 (1990)

Zitzelsberger H, Szücs S et al.. Combined cytogenetic and molecular genetic analyses of fifty-nine untreated human prostate carcinomas. *Cancer Genet. Cytogenet.* 90: 37-44 (1996)

Zitzelsberger H, Szücs S et al.. Numerical abnormalities of chromosome 7 in human prostate cancer detected by fluorescence in situ hybridization (FISH) on paraffin-embedded tissue sections with centromere - specific DNA probes. *J. Pathol.* 172: 325-335 (1994)

Zippelius A, Lutterbüse R et al.. Analytical variables of reverse transcription–polymerase chain reaction–based detection of disseminated prostate cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 6: 2741-2750 (2000)

Danksagung

Mein größter Dank gilt Professor Dr. G. Riethmüller, der mir die Promotion am Institut für Immunologie ermöglichte. Er war stets an den Fortschritten der Arbeit interessiert und ermutigte mich mit konstruktiven Vorschlägen.

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. K. Pantel für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die jahrelange geduldige Betreuung und die gründliche Durchsicht und Korrektur der Arbeit.

Weiter gilt mein besonderer Dank Priv.-Doz. Dr. M. Speicher für die Mitbenutzung des Labors und die immer konstruktive Unterstützung, nicht nur bei den FISH-Experimenten. Ohne ihn wäre die Durchführung der Methodik in dieser Weise wohl nicht möglich gewesen.

Vom ersten Tag an wurde mir im „Speicher-Labor“ freundschaftliche und hilfsbereite Zusammenarbeit vermittelt, wofür ich allen Beteiligten sehr dankbar bin. Besonders hebe ich an dieser Stelle Dr. Sabine Uhrig und Andreas Bolzer hervor, die immer ein offenes Ohr für mich hatten, die gerne bereit waren, ihre fachliche Kompetenz weiterzugeben und die Farbe in den manchmal grauen Laboralltag brachten. Von ihnen durfte ich viel lernen.
Tiefer Dank gebührt auch Monika Hofbauer und Dr. Peter Scheunemann für die Hilfe bei der Versuchsauswertung und Anke Förnges für die genaue Korrektur der Arbeit.
Vielen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Immunologie, die hier nicht alle namentlich erwähnt werden können, bin ich zu Dank verpflichtet, für die kommunikative und hilfsbereite Atmosphäre, in der die Arbeit erst entstehen konnte. Besonders danke ich auch den technischen Assistentinnen und hier vor allen Frau Tanja Hoffmann für die gute Zusammenarbeit.

Zu guter Letzt gebührt mein Dank meinen Eltern, Adolf und Rosa Reindl, und Andreas Hofmann. Meinen Eltern danke ich für die persönliche Anteilnahme und die vielen ermutigenden Gespräche, mit denen sie meinen Weg begleiteten. Natürlich schulde ich ihnen auch Dank für die gewährte finanzielle Unterstützung, mit der mein Studium und die Promotion erst möglich wurden. Andreas Hofmann danke ich für die jahrelange geduldige Begleitung, sein großes Verständnis und seine Unterstützung durch Wort und Tat, auf die ich mich immer verlassen konnte.

Lebenslauf

Persönliche Daten	
Name	Reindl
Vorname	Christiane Simone
Geburtsdatum	10. August 1972
Geburtsort	Starnberg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Schulbildung	
1979 – 1983	Grundschule Gauting
1983 – 1992	Gymnasium Gauting Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
1992 – 1993	Auslandsaufenthalt in Frankreich
Studium	
1993	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig – Maximilians - Universität München
9/95	Ärztliche Vorprüfung (Note: 2)
9/96	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 3)
4/99	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1,66)
5/00	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1)
Beruf	
7/00 – 12/01	Ärztin im Praktikum an der Medizinischen Poliklinik, Klinikum Innenstadt der LMU, Professor Dr. D. Schlöndorff
seit 1.1.2002	Wissenschaftliche Assistentin an der Medizinischen Poliklinik, Klinikum Innenstadt der LMU, Professor Dr. D. Schlöndorff