

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Jonat)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**CHARAKTERISIERUNG VON PRIMÄRKULTUREN
AUS OVARIALKARZINOMEN UND ASCITES**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
NICOLAI MARIUS PURCZ

aus Hamburg

Kiel 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Arnold, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Tönnies, Institut für Humangenetik

Tag der mündlichen Prüfung: 31.05.2010

Zum Druck genehmigt, Kiel den 31.05.2010

gez. Prof. Dr. I. Schreer, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung

1.1.	Epidemiologie und Ätiologie des Ovarialkarzinoms	1
1.2.	Einteilung der Ovarialkarzinome, Staging, Therapie.....	1
1.3.	Charakteristika der Krebsentstehung.....	2
1.4.	Bedeutung von Zelllinien und Primärkulturen in der Forschung.....	3
1.5.	Überblick über die verwendeten Methoden zur Charakterisierung der Primärkulturen.....	4
1.5.1.	Immunhistochemische Färbungen (IHC).....	4
1.5.2.	Mauspassage der Tumorzellen.....	5
1.5.3.	Transmigrationsassay.....	6
1.5.4.	„Comparative Genomic Hybridisation“ (CGH).....	6
1.5.5.	„Fluorescence-in-situ-Hybridisation“ (FISH).....	7
1.5.6.	„fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics as a tool for investigating neoplasms“ (FICTION)....	7
1.6.	Ziel der Arbeit.....	7

2. Material:

2.1.	Patientinnenkollektiv und Primärkulturen, Zelllinien.....	9
2.2.	Geräte.....	10
2.3.	Material.....	11
2.4.	Gebrauchsfertige Puffer und Chemikalien.....	12
2.5.	Herzustellende Lösungen.....	14

3. Methoden:

3.1.	Zellkultur.....	15
3.1.1.	Anlegen einer Primärkultur aus Tumorgewebe.....	15
3.1.2.	Anlegen einer Primärkultur aus Ascites.....	15
3.1.3.	Kultivierung der Zelllinien und Fibroblasten.....	15
3.1.4.	Passagieren von Zellen.....	15
3.1.5.	Bestimmung der Zellzahl.....	16
3.1.6.	Vorbereitung der Objektträger für immunhistochemische Färbungen.....	16
3.1.7.	Zellgewinnung zur DNA-Isolation.....	16
3.1.8.	Zellgewinnung für „Fluorescence-in-situ-Hybridisation“....	16

3.1.9.	Einfrieren von Zellen.....	16
3.2.	Immunhistochemische Färbungen (IHC).....	17
3.2.1	Durchführung der Färbungen.....	17
3.2.2.	Auswertung der Färbungen.....	17
3.3.	Mauspassage.....	17
3.4.	Transmigrationsassay.....	18
3.4.1.	Beschichten der Zellkultureinsätze.....	18
3.4.2.	Vorbereiten der Zellen und Inkubation.....	18
3.4.3.	Auswertung der Assays.....	18
3.5.	„Comparative Genomic Hybridisation“ (CGH).....	18
3.5.1.	DNA-Isolierung.....	18
3.5.1.1.	DNA-Isolierung aus Blut.....	18
3.5.1.2.	DNA-Isolierung aus Zellkultur.....	19
3.5.2.	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	19
3.5.3.	Agarose-Gelelektrophorese zur Beurteilung der DNA-Größe.....	19
3.5.4.	Markieren der DNA durch Nick-Translation.....	20
3.5.5.	Mischen von Tumor- und Kontroll-DNA für die Hybridisierung.....	20
3.5.6.	Vorbereiten der DNA für die Hybridisierung.....	21
3.5.7.	Vorbereiten der Objektträger für die Hybridisierung.....	21
3.5.8.	Hybridisierung.....	21
3.5.9.	Detektion der Hybridisierung.....	21
3.5.10.	Beurteilung und Dokumentation der CGH-Hybridisierung..	22
3.5.11.	Karyotypisierung der Metaphasen.....	22
3.5.12.	Auswertung der CGH-Ergebnisse.....	22
3.6.	„Fluorescence-in-situ-Hybridisation“ (FISH).....	23
3.6.1.	Verwendete Sonden.....	23
3.6.2.	Herstellung der Sonde t(11q13.1; 19p13.13).....	23
3.6.3.	Kultivierung der Bakterien und Isolierung der Plasmid-DNA.....	23
3.6.4.	Amplifikation mit DOP-PCR.....	23
3.6.5.	Markierung der DNA mittels DOP-PCR und Überführung in Hybridisierungs-Mix.....	24

3.6.6.	Ermittlung des cut-off der verwendeten Sonden.....	24
3.6.7.	Vorbereitung der Objektträger.....	24
3.6.8.	Vorbereiten der Zellsuspension.....	24
3.6.9.	Tropfen der Objektträger.....	24
3.6.10.	Denaturieren der Zellkerne	25
3.6.11.	Denaturieren der Sonde und Hybridisierung.....	25
3.6.12.	Detektion der Signale.....	25
3.7.	FICTION.....	26
3.7.1.	Immunhistochemie mit Fluoreszenz-Farbstoff.....	26
3.7.2.	FISH auf den Immunhistochemie-Objektträgern.....	26
3.7.3.	Auswertung.....	26
4.	Ergebnisse	
4.1.	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen.....	27
4.2.	Ergebnisse der Transmigrationsassays.....	31
4.3.	Ergebnisse der CGH-Analyse.....	33
4.4.	Ergebnisse der FISH-Analyse.....	36
4.5.	Ergebnisse der FICTION-Experimente.....	42
5.	Diskussion	
5.1.	Interpretation der immunhistochemischen Färbungen.....	43
5.2.	Epithelial-Mesenchymale-Transition (EMT).....	44
5.3.	Interpretation der Mauspassage und der Transmigrationsassays..	45
5.4.	Interpretation der CGH.....	46
5.5.	Interpretation der FISH und FICTION.....	47
5.6.	Beurteilung der Primärkulturen.....	48
6.	Zusammenfassung	50
7.	Literaturverzeichnis	52
8.	Abbildungsverzeichnis	55
9.	Tabellenverzeichnis	56
10.	Anhang	57
11.	Danksagung	65
12.	Lebenslauf	66

Abkürzungen:

Asc	Ascites
CGH	„Comparative Genomic Hybridisation“
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DOP-PCR	„degenerate oligonucleotide-primed polymerase-chain-reaktion“
EMT	Epithelial-Mesenchymale-Transition
ERG	Eppendorf Reaktionsgefäß
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	„Fetal Calf Serum“
FICTION	„fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics as a tool for investigating neoplasms“
FIGO	„International Federation of Gynecology and Obstetrics“
FISH	„Fluorescence-in-situ-Hybridisation“
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
IHC	Immunhistochemische Färbungen
kDa	kiloDalton
min.	Minuten
RT	Raumtemperatur
Tu	Tumor
üN	über Nacht

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie und Ätiologie des Ovarialkarzinoms

In Deutschland treten jährlich ca. 9660 Fälle von Eierstockkrebs auf. Das entspricht 4,7% aller bösartigen Neubildungen bei Frauen und liegt damit an fünfter Stelle hinter den bösartigen Neubildungen der Brustdrüse (27,8%), des Darmes (17,5%), der Lunge (6,4%) und der Gebärmutter (5,7%) (Robert-Koch-Institut, 2008).

Die Ätiologie des Ovarialkarzinoms ist weiterhin Gegenstand aktueller Forschung. Risikofaktoren für die Erkrankung sind zunehmendes Lebensalter, eine belastete Familienanamnese und endokrine Faktoren. Einen protektiven Einfluss haben Parität, Ovulationshemmer, Hysterektomie und Tubenligatur (Lux et al., 2006, Schmalfeldt et al., 2006, Whittimore et al., 1992). 90-95% der Ovarialkarzinome treten sporadisch auf, bei ca. 5-10% geht man von einer genetischen Disposition aus. Bei ungefähr 60% der Familien liegt eine Mutation des Tumorsuppressor-Gens BRCA1, bei ungefähr 15% eine Mutation des Tumorsuppressor-Gens BRCA2 vor (Lux et al., 2006).

1.2. Einteilung der Ovarialkarzinome, Staging, Therapie

Die histopathologische Einteilung der Ovarialkarzinome erfolgt in seröse Tumoren, muzinöse Tumoren, endometroide Tumoren, Klarzelltumoren, Brenner-Tumoren, undifferenzierte Tumoren und nicht-klassifizierte Tumoren (Pecorelli et al., 1999).

Das chirurgische Staging erfolgt gemäß der FIGO-Klassifikation (FIGO, 2009, Pecorelli et al., 1999) und ist in Tabelle 1 dargestellt.

Die Therapie des Ovarialkarzinoms besteht in der operativen Entfernung und nachfolgender platinhaltiger Chemotherapie (Schmalfeldt et al., 2006).

Nur bei etwa 30% der Patientinnen ist die Erkrankung bei Diagnose, aufgrund der meist späten Entdeckung, auf das kleine Becken begrenzt (Stadium FIGO I oder FIGO II). Lediglich bei Stadium I A Grad I (Tumor beschränkt auf einen Ovar, kein Ascites mit malignen Zellen, kein Tumor auf der Oberfläche, Kapsel intakt) besteht die Empfehlung, dass auf eine adjuvante Chemotherapie verzichtet werden kann (AGO, 2009). Die 5-Jahresüberlebensrate liegt für Stadium FIGO I und II zwischen 65 bis 90% (Schmalfeldt et al., 2006).

Die Therapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms ist primär die radikale Tumoroperation. Die Größe des postoperativen Tumorrests ist der stärkste

unabhängige Prognosefaktor. Im Anschluss an die Operation ist eine platin- und taxanhaltige Chemotherapie Standard (Schmalfeldt et al., 2006). Alle Tumorstadien zusammen betrachtet liegt die 5-Jahresüberlebensrate bei 47% (Robert-Koch-Institut, 2008).

FIGO-Stadium	Befund
I	Karzinom auf Ovarien beschränkt
Ia	beschränkt auf ein Ovar, kein Ascites
Ib	beschränkt auf beide Ovarien, kein Ascites
Ic	beschränkt auf ein oder beide Ovarien; Kapseldurchbruch und/oder Tumorzellen in Ascites oder Peritoneallavage
II	Ausdehnung auf das kleine Becken
IIa	Ausdehnung oder Metastasen auf Uterus und/oder die Tuben
IIb	Ausdehnung auf andere Organe des Beckens
IIC	IIa oder IIb mit Tumorzellen in Ascites oder Peritoneallavage
III	Ausdehnung auf ein oder beide Ovarien, Peritonealmetastasen (außerhalb des Beckens) und/oder regionäre Lymphknoten-Metastasen
IIIa	Mikrometastasen
IIIb	Metastasen < 2 cm, keine Lymphknotenmetastasen
IIIc	Metastasen > 2 cm und /oder Lymphknotenmetastasen
IV	Fernmetastasen (außerhalb der Bauchhöhle)

Tab. 1: Staging des Ovarialkarzinoms (modifiziert nach (FIGO, 2009)).

Neue Therapieregime sind Gegenstand klinischer Forschung. Ein Angriffspunkt gezielter Therapien ist z.B. der „Epidermal Growth Factor Receptor“ (Palayekar and Herzog, 2008). Um weitere neue Ziele an den Krebszellen finden zu können, ist das Verständnis der Charakteristika der Krebsentstehung maßgeblich.

1.3. Charakteristika der Krebsentstehung

Damit eine Krebszelle entsteht, muss diese bestimmte Fähigkeiten erwerben. Diese beinhalten die Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren („self-sufficiency in growth signals“), die Unempfindlichkeit gegen Wachstumsinhibitoren („insensitivity to anti-growth signals“), Gewebeinvasion und Metastasierung („tissue invasions and metastasis“), unbegrenztes Potential zur Replikation („limitless replicative potential“), anhaltende Angiogenese („sustained angiogenesis“) und Vermeidung der Apoptose („evading apoptosis“) (Hanahan and Weinberg, 2000, Olson and Hanahan, 2009).

Die Mechanismen, wie Zellen diese Fähigkeiten erlangen, stellen potentielle Angriffspunkte für eine gezielte Therapie dar.

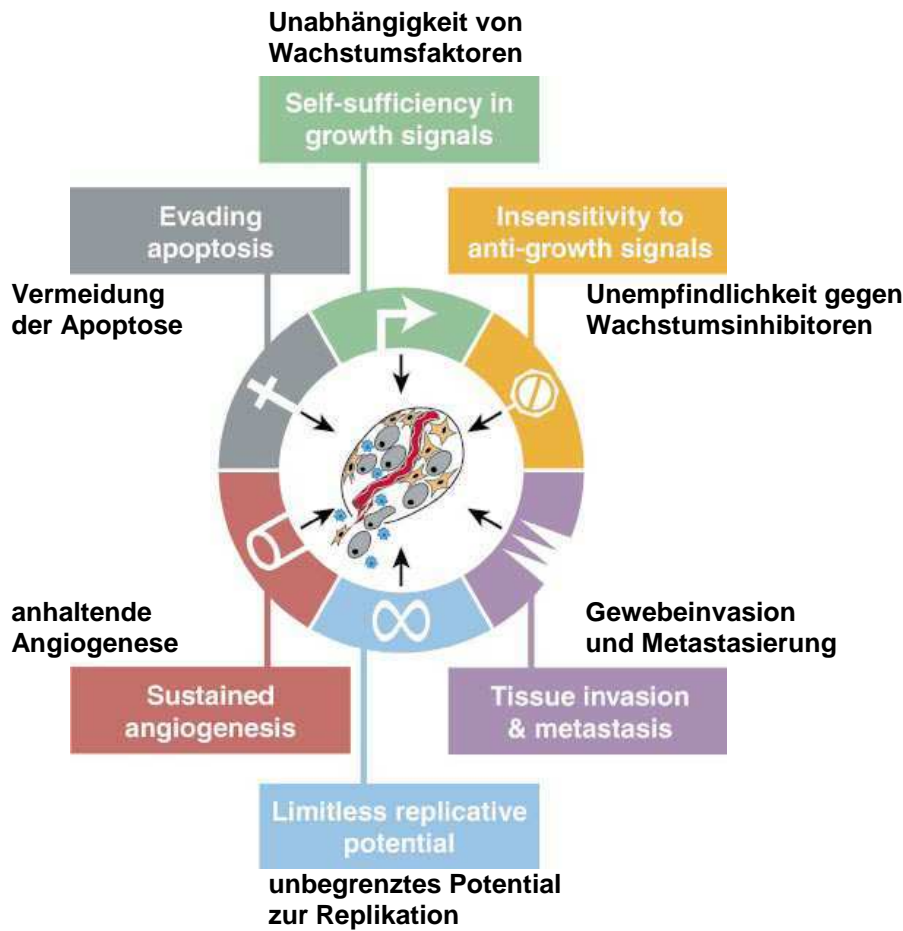


Abb.1: Erworbene Fähigkeiten von Krebszellen (modifiziert nach (Hanahan and Weinberg, 2000)).

1.4. Bedeutung von Zelllinien und Primärkulturen in der Forschung

Um die Entstehung dieser Fähigkeiten bei der Entwicklung einer Krebszelle in-vitro untersuchen zu können und zur Testung von neuen Medikamenten werden Zelllinien eingesetzt (Baguley and Marshall, 2004, Holbeck, 2004). Die Bedeutung dieses Bereiches wird deutlich, wenn man bei PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) die Anzahl der Veröffentlichungen zu diesem Themenkomplex zählt. Die Suche nach „ovarian cancer and cell lines“ liefert 8343 Treffer. Zelllinien können käuflich erworben werden, z.B. die Zelllinie OVCAR-3. Diese Zelllinie wurde 1983 aus dem Ascites einer Patientin mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom etabliert (Hamilton et al., 1983). Die Bildung von Ascites ist eine häufige Komplikation bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom. Tumorzellen können den Gewebeverbund verlassen und sich in die Bauchhöhle, also in die Ascitesflüssigkeit,

absiedeln. Die Untersuchung der malignen Zellen im Ascites im Vergleich zum Tumorgewebe ist von großem Interesse, da es sich dabei möglicherweise um Tumorzellen handelt, die zur Metastasenbildung befähigt sind. Der Nachweis maligner Zellen ist auf Grund der i. d. R. geringen Anzahl von Zellen in der im Ascites vorliegenden Mischpopulation schwierig. Deshalb ist eine genaue Charakterisierung der Zellen in der Primärkultur bezüglich einer Aussagekraft nachfolgender Analysen unabdingbare Voraussetzung.

Eine Beschränkung auf etablierte Zelllinien, wie z.B. OvCar-3 aus Ascites, beinhaltet den Nachteil, dass ursprünglich in-vivo vorhandene Eigenschaften und Marker verloren gegangen sein können, da die Zellen nicht mehr im ursprünglichen Gewebe und Zellverbund wachsen (Baguley and Marshall, 2004). Der Vorteil von Untersuchungen an Primärkulturen liegt u. a. darin, dass sie bei den Experimenten nur eine Kulturzeit von einigen Passagen durchlaufen haben und dadurch weniger kulturbedingte Veränderungen aufweisen. Primärkulturen, aus Tumorgewebe oder Ascites, müssen, bevor sie für Forschungszwecke eingesetzt werden können, auf ihre Zellzusammensetzung und den Tumorzellgehalt untersucht werden. Auch bei der Verwendung etablierter Zelllinien besteht das Risiko, dass die Zellen einem anderen Ursprungsgewebe entstammen als angenommen oder die Zelllinien kontaminiert sind (Lacroix, 2008).

1.5. Überblick über die verwendeten Methoden zur Charakterisierung der Primärkulturen

1.5.1 Immunhistochemische Färbungen (IHC)

Die immunhistochemischen Färbungen mit DIA 100, Ep-Cam, Anti-Cytokeratin und Anti-Vimentin dienen dazu, die Zusammensetzung der Zellkulturen, eine Co-Kultivierung von Fibroblasten und den Phänotyp der Zellen, wie z. B. ihre epithelialen Eigenschaften, zu untersuchen. Gewebe- und Zellantigene können durch immunhistochemische Verfahren farbig markiert werden. Der jeweilige Antikörper bindet an das Antigen und die Enzymkomplexe reagieren mit dem farblosen Substratchromogen wodurch sie farbige Komplexe bilden. Es wurden vier Antikörper ausgesucht:

DIA 100 (dianova), ein monoklonales Maus IgG, bindet an humanes CD90 (Thy-1), einem GPI-verankerten Glykoprotein der Immunglobulin-Superfamilie mit einem Molekulargewicht von 25 – 35 kDa (Saalbach et al., 1996). CD90 wird im Menschen

von Nervenzellen, einer Subpopulation von Blutstammzellen und Fibroblasten exprimiert. Der Antikörper bindet an Fibroblasten unterschiedlichen Ursprungs, bindet nicht an humane Blutzellen oder Keratinozyten (Saalbach et al., 1996).

Ep-Cam (biologo), ein monoklonales Maus IgG, bindet an das 34 kD epithelspezifische Membran-Glykoprotein HEA 125. Der Antikörper bindet an Karzinome (u. a. Ovar, Darm, Magen, Pankreas, Leber, Lunge, Mamma, Schilddrüse, Niere) und deren Metastasen. Der Antikörper dient zur Erkennung entarteter Epithelzellen mit einer erhöhten Ep-Cam-Expression (Momburg et al., 1987).

Anti-Cytokeratin (Klone AE1/AE3) (DakoCytomation) besteht aus zwei monoklonalen Maus IgG, die an humane Cytokeratine binden. Cytokeratine sind wasserlösliche Proteine mit Molekulargewichten zwischen 40 – 70 kD, die das Cytoskelett der Epithelzellen bilden. Diese Antikörper dienen zum Nachweis der epithelialen Herkunft von Zellen (Moll et al., 1982). Unterschiedliche Platten- und Zylinderepithelien von Normalgeweben zeigten eine positive Färbung, ebenso wie unterschiedliche epitheliale Neoplasien (Montag et al., 1988).

Anti-Vimentin (Klon V9, DakoCytomation) ist ein monoklonales Maus IgG und bindet an Vimentin, ein 57 kDa schweres Intermediärfilament und markiert Zellen mesenchymaler Herkunft. Co-Expression von Vimentin und Cytokeratin wurde in 10 – 57% der Karzinome nachgewiesen, auch an Ovarialkarzinomen (Azumi and Battifora, 1987, Osborn et al., 1984).

1.5.2. Mauspassage der Tumorzellen

Durch die Injektion der kultivierten Zellen in Mäuse kann untersucht werden, ob die Zellen in der Lage sind Tumoren auszubilden. Durch den Vergleich der Untersuchungsergebnisse an den Primärkulturen der Tumore vor und nach Mauspassage können Veränderungen an Phänotyp und Genotyp untersucht werden. Die Mausexperimente wurden freundlicher Weise durch die Firma Bayer-Schering Pharma AG (Berlin) durchgeführt.

1.5.3. Transmigrationsassay

Die Invasionstests überprüfen die Fähigkeit der kultivierten Zellen zur Invasion in Gewebe und zur Metastasenbildung. Ein kritischer Schritt bei der Bildung von Metastasen ist das Durchbrechen der Tumorzellen durch die Basalmembran. Zellen mit erhöhter Motilität können in-vivo aus dem Zellverbund in das Gewebe übertreten und Metastasen bilden.

Ein Filter wird mit Matrigel, einem Extrakt aus Basalmembranproteinen (Albini et al., 2004, Kleinman and Martin, 2005), beschichtet um eine Basalmembran zu simulieren. Die Zellen werden auf die beschichtete Zellkulturmembran gegeben und die Anzahl der Zellen, die durch die Membran hindurchwandern, wird gezählt.

1.5.4. „Comparative Genomic Hybridisation“ (CGH):

Mit der „Comparative Genomic Hybridisation“ können die Kulturen auf cytogenetischer Ebene analysiert werden. Diese Methode erlaubt das Erkennen von genetischen Imbalancen, diese können auf Veränderungen im Verlauf der Kultur untersucht werden. Bei Ovarialkarzinomen finden sich u. a. häufig Zugewinne an den Chromosomen 3q, 8q und 20q und Verluste an den Chromosomen 18q, 4, und 13q (Arnold et al., 1996, Kiechle et al., 2001).

Bei der CGH werden mit Fluorochromen markierte Tumor- und Kontroll-DNA in gleicher Menge simultan auf gesunde Metaphasen hybridisiert. Wenn in der Tumor-DNA Abschnitte überrepräsentiert sind, wird, da Tumor- und Kontroll-DNA um die Bindung konkurrieren, dort vermehrt Tumor-DNA binden. Das Verhältnis der gebundenen Tumor-DNA-Menge im Verhältnis zur Kontroll-DNA-Menge wird über die Messung der Fluoreszenzintensität unter einem Fluoreszenz-Mikroskop erfasst. Bei Überwiegen der Tumor- oder Kontroll-DNA überwiegt auch die Intensität des entsprechenden Fluorochromes.

1.5.5. „Fluorescence-in-situ-Hybridisation“ (FISH):

Die „Fluorescence-in-situ-Hybridisation“ ermöglicht Zellen auf Einzelzell-Niveau gezielt auf bestimmte genetische Veränderungen zu untersuchen. Auf diese Weise kann der Anteil der Tumorzellen in den Kulturen bestimmt werden.

Die mit Fluoreszenz-Farbstoffen markierten DNA-Sonden binden an homologe Bereiche der DNA. Anhand der Anzahl und der Lokalisation der Sonden im Zellkern bzw. auf den Chromosomen lassen sich der Ploidiegrad und gezielt das Vorhandensein von Translokationen und deren Anzahl bestimmen.

1.5.6. „fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics as a tool for investigating neoplasms“ (FICTION)

Die FICTION-Untersuchungen erlauben den direkten Vergleich der immunhistochemischen Färbungen und der „Fluorescence-in-situ-Hybridisation“ auf den gleichen Zellen. Phänotyp und genetische Veränderungen werden gleichzeitig visualisiert (Weber-Matthiesen et al., 1992, Martin-Subero et al., 2002).

Um die Diskrepanz zwischen dem geringen Anteil an anzunehmenden Tumorzellen aus den immunhistochemischen Färbungen und dem sehr hohen Anteil an Zellen mit genetischen Veränderungen in der FISH näher zu untersuchen, wurden exemplarisch Untersuchungen mit der FICTION-Technik durchgeführt.

1.6. Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist die Charakterisierung der angelegten Primärkulturen und die Bestimmung des Anteils an Tumorzellen.

Durch immunhistochemische Färbungen sollen die Primärkulturen auf ihre Anteile an Fibroblasten, auf mesenchymale Zellen und Tumorzellen untersucht werden. Das tumorigene Potential der Kulturen wird durch die Tumorbildung in Mäusen gezeigt (Bayer-Schering Pharma AG, Berlin). Um das Wachstumsverhalten der Kulturen und die Fähigkeit zur Gewebeinvasion untersuchen zu können, werden Transmigrationsassays durchgeführt. Die genetische Analyse erfolgt durch „Comparative Genomic Hybridisation“ (CGH) und „Fluorescence-in-situ-Hybridisation“ (FISH). In einem „fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics as a tool for investigating neoplasms“ (FICTION) – Experiment erfolge der direkte Vergleich von Immunhistochemie und FISH. Der Tumorzellanteil in den Kulturen wird mittels Interphase-FISH bestimmt.

Die Primärkulturen aus Tumorgewebe sollen mit den korrespondierenden Primärkulturen aus Ascites verglichen werden, da es sich bei letzteren um fortgeschrittenere entdifferenzierte Krebszellen handeln könnte. Hierzu kann die Ausprägung der epithelialen Marker in den immunhistochemischen Färbungen, das Ausmaß der Invasivität in den Transmigrationsassays und die Anzahl der Aberrationen in der CGH verglichen werden. Ein Vergleich der Aberrationen in der CGH ermöglicht auch eine Beurteilung, ob die Tumorzellen aus dem Ascites von dem korrespondierenden Tumorgewebe abstammen können. Ein entsprechender Vergleich kann an den einzelnen Kulturen vor und nach Mauspassage vorgenommen werden, um zu beurteilen, ob hier eine weitere Entdifferenzierung stattgefunden hat.

2. Material

2.1. Patientinnenkollektiv und Primärkulturen, Zelllinien

Aus im Haus entnommenem Gewebe von Ovarialkarzinomen und Zellen aus Ascites-Punktaten wurden Primärkulturen angelegt. Von drei Patientinnen stand sowohl Tumorgewebe als auch Ascitesflüssigkeit zur Verfügung.

Aus den Primärkulturen wurden Zellen in Mäuse injiziert und aus den entstandenen Tumoren erneut Primärkulturen angelegt. Weiterhin wurden die Zelllinien OvCar 3 und OvCar 8 und kultivierte Fibroblasten, die in der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde aus Fibroblasten gewonnen wurden, verwendet.

Die folgende Tabelle liefert eine Übersicht über die angelegten Kulturen und die Nummerierung:

Kultur - Nr.	Patientin -Nr	Material	pathologische Untersuchung	vor/nach Mauspassage
K1	1	Tumor	Serös-papilläres Ovarialkarzinom, gering differenziert	vor
K2	1	Ascites		vor
K3	2	Tumor	Mäßig differenziertes, seröses adenomatöses Ovarialkarzinom	vor
K4	2	Ascites		vor
K5	3	Tumor	Gering differenziertes seröses und psammomatöses Ovarialkarzinom	vor
K6	3	Ascites	Nachweis atypischer Zellen	vor
K7	1	Tumor		nach
K8	1	Ascites		nach
K9	2	Tumor		nach
K10	2	Ascites		nach
K11	3	Tumor		nach
K12	3	Ascites		nach

Tab.2: Übersicht über die Primärkulturen

In den Spalten ist von links nach rechts die Nummer der Primärkultur, die Nummer der Patientin, die Art des Ausgangsmaterials und das Ergebnis der pathologischen Untersuchung eingetragen und ganz rechts, ob es sich um eine Kultur vor oder nach Mauspassage handelt. Bei den Kulturen nach Mauspassage sind keine pathologischen Untersuchungen durchgeführt worden.

2.2. Geräte

Brutschrank, CO₂ water jacket incubator (Forma Scientific, USA)

Elektrophoresekammer Mini-subcell GT (Bio Rad, USA)

Electrophoresis Power Supply EPS 600 (Pharmacia Biotech, UK)

Fluoreszenz-Mikroskop Axioplan2 (Zeiss, BRD) inklusive:

- Dualbandpass-Strahlungsteile und Sperrfilter sowie getrennte Anregungsfilter für Dapi und FITC
- Cy-3-Filterset V1, AHF
- Cy-3.5-Filterset V1, AHF
- Cy-5-(revised) Filterset, AHF
- Cy-5.5-Filterset V1, AHF
- HBO-100/2-Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe (Osram, BRD)
- fluoreszenzfähige CCD-Kamera

Gelelektrophorese-Apparatur (Bio-Rad, USA)

Image Master VDS (Pharmacia Biotech, UK)

Meßküvette LG 100 UV-K (Implen, BRD)

Mikroskop Axiolab (Zeiss, BRD) inklusive:

- Achromastigmat 10x (Zeiss, BRD)
- Achromastigmat 20x (Zeiss, BRD)
- Achroplan 40x (Zeiss, BRD)

PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Reseach, Biozym, BRD)

Photometer Ultraspec3000 (Pharmacia Biotech,UK)

Power-Supply (Bio-Rad, USA)

Qualifreeze Einfriergerät (Nalgene, UK)

Speed vac plus (Savant, USA)

Sterilwerkbank (Nuair, USA)

Stickstofftank (air Liquide, Frankreich)

Tischzentrifuge (Hettich, BRD))

Vortex Genie 2 (Scientific Industries, USA)

Wasserbad (GFL mbH, BRD)

Wärmeplatte (Medax, BRD)

2.3. Material

Antikörper:

- DIA 100 (dianova, BRD)
- Ep-Cam BioPrime HEA125, Egp34 (biologo, BRD)
- Anti-Cytokeratin (Klone AE1/AE3) (DakoCytomation, Dänemark)
- Anti-Vimentin (Klon V9) (DakoCytomation, Dänemark)
- biotin-gelabeltes Ziege Anti-Maus Immunglobulin (DakoCytomation, Dänemark)
- Streptavidin/FITC (DakoCytomation, Dänemark)

CGH Metaphase Slides (Abbott, USA)

Chamber slides (Nunc, USA)

Cryovials (Biozym, Österreich)

Deckgläser 7x7mm (Geyer, BRD)

DNeasy Tissue Kit (Qiagen, BRD)

EDTA-Blutröhrchen (Sarstedt, BRD)

Eppendorf-Reaktionsgefäße 0,5ml, 1,5ml, 2ml (Eppendorf, BRD)

Falcon-Röhrchen steril (50 ml) (Becton Dickinson, USA)

Glashäkchen (hergestellt aus Glaspasteurpipetten)

Glaspasteurpipetten (Hecht-Assistent, BRD)

Kulturflaschen T75 (Sarstedt, BRD)

Kunststoffpipetten 1ml, 5ml, 10ml, 25ml (Sarstedt, BRD)

Objektträger Mattrand (Geyer, BRD)

Pipettierhilfe Easypet (Eppendorf, BRD)

Matrigel (BD Biosciences, USA)

Neubauer-Zählkammer (Marienfeld, BRD)

Petrischale (Sarstedt, BRD)

Pipetten 0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl (Eppendorf, BRD)

Pipettenspitzen 10µl, 10µl, 1000µl (Sarstedt, BRD)

Pipettierhilfe (Eppendorf, BRD)

24-well Platten (Greiner Bio-One, BRD)

Zellkultureinsatz für 24-well Platten, 8µm Porengröße (Greiner Bio-One, BRD)

2.4. gebrauchsfertige Puffer und Chemikalien

Agarose (Biozym, BRD)

Bac Max DNA Purification Kit (Epicentre, USA)

Bakterienkolonien mit Plasmid-DNA (imaGenes, Deutschland)

Biotin-Mix (Bioprime, invitrogen, USA)

Chem Mate Dako Envision (DakoCytomation, Dänemark)

Chloramphenicol 40mg/ml (Sigma-Aldrich, BRD)

Cot-1 DNA (Gibco,USA)

DAPI/Antifade (vector shield) (Vektor Laboratories, UK)

Dextransulfat (Pharmacia Biotech, UK)

DIG-DNA-Labeling-Mix 10x (Roche Diagnostics GmbH, BRD)

DMSO (Sigma, BRD)

DNA-Längen-Standard: 1kb-Ladder *improved*, 200ng/5µl (MBI-Fermentas, BRD)

DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Niederlande)

EDTA (Amresco, USA)

Eisessig (Merck, BRD)

EnVision-Doppelfarbsystem (DakoCytomation, Dänemark)

EtBr (Bio-Rad, USA)

Ethanol absolut (Merck, BRD)

Faramount (DakoCytomation, Dänemark)

Fetal Calf Serum FCS (Gibco/Invitrogen, USA)

FISH-Sonden: all mouse centromer (MP, Frankreich), Sonde (7cen, 3q26.2, 8q24.1)
(Kreatech, Niederlande)

Fixogum (Marabu, BRD)

Fluoreszenzfarbstoffe: Spectrum green (Vysis, USA), Texas Red (MoBiTec, BRD),
Dig 11-dUTP (Roche Diagnostics GmbH, BRD), Cy5 Streptavidin (Ge-
Healthcare, USA)

Formamid (Geyer, BRD)

Gelladepuffer 6x (Fermentas, BRD)

Hanks solution (Biochrom, BRD)

Hämatoxilin (Merck, BRD)

Insulin (Biochrom, BRD)

Isopropanol (Merck, BRD)

Kollagenase (Sigma-Aldrich, USA)

LB Medium (Difco, Frankreich)
Marvel (Premier Brands, UK)
Methanol (Merck, BRD)
MgCl₂ (Fermentas, BRD)
Mounting Medium (Leica, BRD)
NaCl 6M (Merck, BRD)
Na-Citrat (Merck, BRD)
Nick Translation Kit (Vysis, USA)
Paraformaldehyd (Merck, BRD)
PBS w/o Ca⁺⁺ Mg⁺⁺ (Biochrom, BRD)
Penicillin/Streptomycin (Gibco/Invitrogen, USA)
Pepsin (Roche Diagnostics GmbH, BRD)
Proteinase K (Roche Diagnostics GmbH, BRD)
RNase A (Roche Diagnostics GmbH, BRD)
Saccharose (Merck, BRD)
SDS 20% (Roth, BRD)
Stickstoff (flüssig) (Höhlmann, BRD)
TBE (Merck, BRD)
Tris (Merck, BRD)
Triton X-100 (Sigma, USA)
Trypanblau (Biochrom, BRD)
Trypsin/EDTA w/o Ca⁺⁺ Mg⁺⁺ (Biochrom, BRD)
Tween20 (Sigma, USA)
VLE RPMI (Biochrom, BRD)
Wasser, destilliert (Ampuwa) (Fresenius, BRD)

2.5. herzustellende Lösungen

Agarose-Gel: 1% Agarose in 0.5x TBE

Denaturierungslösung (70% Formamid, 2xSSC, pH 7,1)

EtBr-Färbegrad: 100µg/ml EtBr in dH₂O

EtOH: 70% in dH₂O

Fixativ: 3ml Methanol (Merck, BRD) auf 1ml Essigsäure (Merck, BRD)

Hybridisierungs-Mix: 2xSSC, 50% Formamid, 10% Dextransulfat,
1% Tween20, pH 7,1

Kollagenaselösung: 4,46 mg (2000 Units) Kollagenase auf 1 ml Hanks solution

Kryomedium: VLE RPMI 1640, 10% DMSO (45ml VLE RPMI 1640, 5ml DMSO)

Kulturmedium: 500 ml VLE RPMI 1640, 50ml inaktiviertes (30min 56°C) Fetal Calf
Serum (Gibco/Invitrogen, USA), 500µl (10mg/ml) Insulin (Biochrom, BRD),
3ml 10000 Units/10000µg/ml) Penicillin/Streptomycin (Gibco/Invitrogen, USA)

Lysispuffer: 320mM Saccharose, 1nM Tris, 5mM MgCl₂ x 6 H₂O, 1% Triton X-100 in
dH₂O, pH 7,5

SE-Puffer: 75mM NaCl, 25mM EDTA in dH₂O, pH 8,0

SSC 20x: 3M NaCl, 0,3M Na-Citrat in dH₂O

SSCT: 4xSSC, 0.05% Tween 20, pH 7.0

SSCTM: 0,5g fettfreie Trockenmilch (Marvel) in 10ml SSCT auf einem Schüttler
gelöst und anschließend bei 1500 Upm 5min. abzentrifugiert. Die oberste
Schicht, die noch Fettreste enthält, sowie das Pellet (ungelöste
Milchpulverpartikel) werden verworfen.

TBE 0,5x: TBE mit dH₂O verdünnen

TE-Puffer: 10mM Tris, 1mM EDTA in dH₂O, pH 8,0

3. Methoden

3.1. Zellkultur

Sämtliche Arbeiten an Zellkulturen erfolgten an einer sterilen Werkbank.

3.1.1 Anlegen einer Primärkultur aus Tumorgewebe

In eine Petrischale wurden 10ml Zellkulturmedium und 1ml Kollagenase pipettiert um das Tumorgewebe in dieser mit einem Skalpell in möglichst feine Stückchen zu zerkleinern. Ein Ansatz wurde 3 Stunden, ein Ansatz üN im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Der Inhalt der Petrischale wurde, nach der entsprechenden Zeit, in ein Falcon überführt und mit 10ml Medium verdünnt. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 10min. bei 330x g und Raumtemperatur. Der Überstand wurde mit einer Glaspasteurpipette abgesaugt und verworfen. Das Pellet wurde in 10ml Medium aufgelöst und in eine Kulturflasche (T75) mit bereits 13ml Medium gegeben. Die Zellen wurden im Brutschrank inkubiert. Das Medium wurde ca. alle 2 Tage gewechselt, spätestens aber, wenn die Farbe des Mediums von rot nach gelb umschlug. Damit potentielle Unterschiede zwischen den einzelnen Kulturflaschen die Ergebnisse nicht beeinflussen können, wurden alle Flaschen gepoolt, bevor das Material für die Experimente entnommen wurde.

3.1.2. Anlegen einer Primärkultur aus Ascites

Die Ascitesflüssigkeit wurde auf Falcon-Tubes verteilt und für 10min. bei 330x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde in Medium gelöst und in einer Kulturflasche (T75) im Brutschrank kultiviert. Das weitere Prozedere erfolgte analog dem Prozedere für Primärkulturen aus Tumorgewebe.

3.1.3. Kultivierung der Zelllinien und Fibroblasten

Die Kultivierung der Zelllinien und Fibroblasten erfolgte in Kulturflaschen (T75) mit Zellkulturmedium im Brutschrank.

3.1.4. Passagieren von Zellen

Wenn die Flaschen konfluent bewachsen waren, wurden die Zellen abgelöst und auf zwei neue Flaschen verteilt. Dazu wurde zuerst das Medium abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. Dann wurde das PBS wieder abgesaugt und

5ml Trypsin auf den Flaschenboden verteilt. Nach 10-15min. hatten sich die Zellen vom Boden abgelöst und die Reaktion wurde mit 10ml Medium gestoppt und die Zellen in ein Falcon-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation (10min bei 330x g) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in ca. 5ml Medium aufgelöst und in zwei neue Flaschen pipettiert. In die Flaschen wurden noch je ca. 10ml Medium gegeben. Die Kultivierung erfolgte wieder im Brutschrank.

3.1.5. Bestimmung der Zellzahl

Von dem in 5ml gelösten Pellet wurden 10µl entnommen und 1:1 mit Trypanblau gemischt. Dies wurde in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Zellen unter dem Mikroskop gezählt. Die Anzahl an Zellen in der Lösung ließ sich dann rechnerisch bestimmen.

3.1.6. Vorbereitung der Objektträger für immunhistochemische Färbungen

Auf den chamber slides (2-well) wurden pro well 1×10^5 Zellen ausgesät und für ca. 2 Tage, abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen, im Brutschrank kultiviert. Dann wurden die Objektträger mit PBS gewaschen und 10min. mit -20°C kaltem Methanol fixiert und anschließend getrocknet.

3.1.7. Zellgewinnung zur DNA-Isolation

Ca. 5×10^6 Zellen wurden in 200ml PBS gelöst und in 1,5ml ERG gefüllt. Die Zellen konnten wahlweise eingefroren oder direkt weiter verarbeitet werden.

3.1.8. Zellgewinnung für Fluorescence-in-situ-Hybridisation

Ca. 5×10^6 Zellen wurden in 1,5ml Fixativ (-20°C) gelöst und in ein 2ml ERG gefüllt. Die Zellen wurden 10min. bei 330x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet wieder in Fixativ (-20°C) gelöst. Die Zellen werden bei -20°C gelagert.

3.1.9. Einfrieren von Zellen

Das Zellpellet (lebende, unfixierte Zellen) wurde in 2ml Kryomedium gelöst und auf 2 Cryovials verteilt. Die Cryovials werden in einem Cryo-Einfriergerät, mit Isopropanol befüllt, und einer Abkühlrate von 1°C pro Minute üN bei -80°C gelagert und konnten im Anschluss in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

3.2. Immunhistochemische Färbungen (IHC)

Die optimalen Konzentrationen der Antikörper wurden in einer Verdünnungsreihe ausgetestet. Dabei ergab sich für CD-90 und Ep-Cam eine Verdünnung von 1:50, für Anti-Cytokeratin und Anti-Vimentin von 1:100.

3.2.1. Durchführung der Färbungen

Es wurden zwei verschiedene Farbe-Kits verwendet. Chem Mate Dako Envision für die Färbungen mit CD-90 und Ep-Cam. Für die Doppelfärbungen mit Anti-Cytokeratin und Anti-Vimentin wurde das DakoCytomation EnVision-Doppelfarbsystem angewendet. Die Gegenfärbung mit Hämatoxilin ergab bei einer Dauer von 5min. eine ausreichende Intensität bei weiterhin guter Beurteilbarkeit der immunhistochemischen Färbung.

Die Färbungen mit CD-90 und Ep-Cam wurden kurz durch eine aufsteigende Alkoholreihe und danach durch Xylol (100%) gezogen und mit Mounting Medium eingedeckelt, die Doppelfärbungen wurden mit Faramount eingedeckelt.

3.2.2. Auswertung der Färbungen

Die Objektträger wurden lichtmikroskopisch bei 4- bis 40-facher Vergrößerung beurteilt. Die Bereiche sollten einen dichten, flachen Zellbewuchs aufweisen. Es wurden jeweils 100 Zellen ausgewertet. Dabei wurde zwischen stark gefärbten, schwach gefärbten und nicht gefärbten Zellen unterschieden. Als Positiv- bzw. Negativkontrolle dienten die Zelllinie OvCar-3 oder OvCar-8 und kultivierte Fibroblasten.

3.3. Mauspassage

Um nachzuweisen, dass es sich bei den angelegten Primärkulturen um Tumorzellen handelt, wurde überprüft, ob die Zellen in Mäusen Tumore bilden. Dieser Teil der Arbeit wurde freundlicher Weise durch die Firma Bayer-Schering Pharma AG (Berlin) durchgeführt. Es wurden je Primärkultur 3×10^6 Zellen subcutan in die Flanke von SCID Fox chain non liky-Mäusen (6-7 Wochen alt) injiziert. Nach ca. einer Woche konnten Tumoren mit ca. 5 mm Durchmesser getastet werden. Aus diesen Tumoren wurden dann in unserem Labor Primärkulturen angelegt. Der Anteil Mäusezellen in den Kulturen wurde mit einer all mouse centromer-FISH Sonde überprüft und lag in allen Kulturen unter 1%.

3.4. Transmigrationsassay

3.4.1. Beschichten der Zellkultureinsätze

6 wells einer 24-well-Platte werden mit 0,75ml einer sterilen verdünnten Matrigel-Lösung (1:100 in PBS) gefüllt. Die Zellkultureinsätze, mit einer Porengröße von 8µm, werden eingetaucht und mit 200µl der Matrigel-Lösung befüllt und üN bei RT inkubiert. 12 wells der 24-well-Platte werden mit PBS gefüllt, 6 wells werden mit dem üblichen Zellkulturmedium gefüllt. Die Zellkultureinsätze werden in die mit PBS gefüllten wells gesetzt und die Matrigellösung aus dem Innern der Zellkultureinsätze abgesaugt. Der Vorgang wird wiederholt und die Zellkultureinsätze anschließend in die mit Medium gefüllten wells gesetzt.

3.4.2. Vorbereiten der Zellen und Inkubation

Die Zellen werden in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen pro ml in Zellkulturmedium mit einem reduzierten Gehalt an FCS (2%) überführt. Je 500µl der Zellsuspension werden luftblasenfrei in die vorbereiteten Zellkultureinsätze pipettiert. Anschließend folgt die Inkubation im Brutschrank für 4h.

3.4.3. Auswertung der Assays

Die Zellkultureinsätze werden durch Schwenken in PBS gewaschen und dann 20min. in mit Methanol gefüllten wells fixiert. Nach 30min. Lufttrocknen werden die Zellen auf den Zellkultureinsätzen in Hämatoxylin gefärbt und mit dH₂O von Farbrückständen gereinigt. Die Innenseite der Zellkultureinsätze wurde mit Watteträgern gereinigt um hier möglicherweise vorhandene Zellen zu entfernen, damit nur die Anzahl der tatsächlich migrierten Zellen erfasst wird. Die Anzahl der Zellen wurde unter einem Mikroskop mit 20-facher Vergrößerung auf einem Areal der Größe 440 x 335µm ausgezählt.

3.5. Comparative Genomic Hybridisation (CGH)

3.5.1. DNA-Isolierung

3.5.1.1. DNA-Isolierung aus Blut

Von klinisch gesunden männlichen Spendern wurden 10ml Blut in EDTA-Röhrchen abgenommen und üN bei -20°C eingefroren. Das Blut wurde in ein 50ml Falcon-Röhrchen umgefüllt und 30ml Lysis-Puffer dazugegeben. Während der folgenden

30minütigen Inkubation auf Eis wurde das Röhrchen alle 10min. geschwenkt. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 15min. bei 4100x g und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10ml Lysis-Puffer gelöst. Es folgte eine erneute Inkubation auf Eis für 15min. mit anschließender Zentrifugation (s. o.). Das Pellet wurde in SE-Puffer gelöst und 25µl Proteinase K (10mg/ml) und 250µl SDS (20%) dazugegeben und dann üN bei 37°C in einem Schüttelwasserbad gelöst. Nach Zugabe von 1,4ml gesättigter NaCl-Lösung (6 M) und kurzem Vortexen wurde das Falcon-Röhrchen für 15min. bei 4100x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Falcon-Röhrchen überführt und 10ml Isopropanol (-20°C) dazugegeben. Unter vorsichtigem Schwenken fiel die DNA sichtbar aus und wurde mit einem Glashäkchen herausgefischt. Die DNA wurde in 70% EtOH gewaschen und am Glashäkchen getrocknet und anschließend in bis zu 500µl TE-Puffer gelöst. Falls keine DNA ausfiel, wurde das Falcon-Röhrchen üN bei -20°C eingefroren. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 30min. bei 4100x g und 4°C. Das Pellet wurde mit 10ml 70% EtOH gewaschen und nach dem Trocken ebenfalls in TE-Puffer aufgenommen.

3.5.1.2 DNA-Isolierung aus Zellkultur

Als Ausgangsmaterial dienten ungefähr 5×10^6 Zellen in 200µl PBS in einem 1,5ml ERG. Die Isolierung erfolgte mit dem Qiagen DNeasy Kit über Säulenzentrifugation und lieferte die DNA in 200µl Puffer. Bei diesem Verfahren wird die gelöste DNA an die Matrix der Zentrifugationssäulen gebunden, bei weiteren Zentrifugationen gereinigt und abschließend in Puffer gelöst.

3.5.2. Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bei 260nm gegen eine Referenz bestimmt. Als Referenz diente der Puffer, in dem die DNA gelöst wurde. Der Quotient aus der optischen Dichte bei 260nm und bei 280nm zeigte an, ob die DNA mit Proteinen verunreinigt war (Normwert 1,70 bis 1,95).

3.5.3. Agarose-Gelelektrophorese zur Beurteilung der DNA-Größe

Die Größe der DNA-Fragmente lässt sich durch Vergleich der Laufstrecke mit einem DNA-Längenstandard in der Gelelektrophorese bestimmen. 1%-ige Agarose diente als Trenngel, als Laufpuffer 0,5x TBE. Ungefähr 500ng DNA wurden mit Ladepuffer

vermischt und parallel mit dem DNA-Längenstandard bei 100 V über das Gel 30min. aufgetrennt. Danach wurde das Gel 5 - 10min. in EtBr-Lösung gefärbt. Um die unspezifische EtBr-Färbung zu entfernen, wurde das Gel dann für ca. 5min in dH₂O gelegt. Die DNA konnte nun in einem UV-Gerät (Image Master VDS) sichtbar gemacht werden.

3.5.4. Markieren der DNA durch Nick-Translation

Bei der Nick-Translation werden in der DNA durch das Enzym DNase I Einzelstrangbrüche (nicks) verursacht. Durch das Enzym Polymerase I werden diese Einzelstrangbrüche mit den vorhandenen Nukleotiden repariert. Wenn markierte Nukleotide (z.B. mit Biotin oder Digoxigenin) vorhanden sind, werden diese eingebaut. An diese markierten Nukleotide können dann Fluoreszenzfarbstoffe gebunden werden, um die markierte DNA im Fluoreszenzmikroskop detektieren zu können.

Auf Eis wurde Folgendes in ein 0,5 ml ERG pipettiert:

DNA:	500ng
Nick Translation Puffer:	2,5µl
Biotin mix oder Digoxigenin mix:	2,5µl
NT-Enzyme mix:	5,0µl
Nucleasen freies Wasser:	auf 25µl auffüllen

In der Regel wurde die Tumor-DNA mit Biotin, die Kontroll-DNA mit Digoxigenin markiert.

Der Reaktionsansatz wurde in der PCR-Maschine für 8h bei 15°C inkubiert. Durch 10-minütiges Erhitzen auf 65°C werden die Enzyme in aktiviert und die Reaktion gestoppt.

Die Größe der DNA-Fragmente lässt sich durch Vergleich der Laufstrecke mit einem DNA-Längenstandard in der Gelelektrophorese bestimmen (s. o.). Die Fragmente sollten zwischen 400 und 2000 Basenpaaren groß sein.

3.5.5. Mischen von Tumor- und Kontroll-DNA für die Hybridisierung

Je 200ng (10µl) der markierten Tumor- und Kontroll-DNA und 5µg Cot-1-DNA werden in einem 0,5ml ERG mit dem 2,5-fachen Volumen 100%igen EtOH (-20°C) üN bei -20°C gefällt. Die nachfolgende Zentrifugation erfolgt für 30min. bei 20160x g und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 30min. im

Wärmeschrank bei 37°C getrocknet. Das Pellet wurde dann in 2µl Hybridisierungsmix aufgenommen und zum Lösen weitere 30min. zurück in den Wärmeschrank gestellt.

3.5.6. Vorbereiten der DNA für die Hybridisierung:

Die Proben wurden für 7min. bei 75°C denaturiert, kurz auf Eis gestellt und 30min. bei 37°C inkubiert, um die hochrepetitiven DNA-Sequenzen mit Cot-1 DNA abzusättigen.

3.5.7. Vorbereiten der Objektträger für die Hybridisierung

Die bei -20°C gelagerten CGH-Objektträger wurden aufgetaut und in 70°C warmer Denaturierungslösung für 1min. 30sec. denaturiert. Sofort danach wurden die Objektträger für jeweils 3min. in eine Küvette mit -20°C kaltem 70%igen, 85%igen und 100%igen EtOH gestellt. Die trockengepusteten Objektträger und 7x7mm Deckgläschen wurden auf eine 37°C-Wärmeplatte gelegt.

3.5.8. Hybridisierung

0,9µl der Probe wurden auf ein kleines Deckgläschen (7 x 7mm, aufgrund der geringen Probenmenge) pipettiert und dieses luftblasenfrei auf dem Objektträger positioniert. Die Ränder des Deckgläschens wurden mit Fixogum versiegelt. Die Hybridisierung des invertierten Objektträgers erfolgte über 2 Nächte in einer feuchten Kammer bei 37°C.

3.5.9. Detektion der Hybridisierung

Die Position der Deckgläschen wurde mit einem Diamantschreiber markiert und die Deckgläschen vorsichtig entfernt. Der Objektträger wurde 5min. in 0,5x SSC bei 72°C gewaschen und anschließend kurz in SSCT getaucht, bevor 100µl SSCTM aufgetragen wurden. Mit einem Plastikfoliedeckglas abgedeckt wurde der Objektträger invertiert für 15min. in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert.

Die Fluoreszenzfarbstoffe, die an Biotin bzw. Digoxigenin binden, wurden jeweils 1:100 verdünnt in SSCT gemischt, kurz gevortext und anschließend 5min. bei 20160x g zentrifugiert. Die Antikörpermischung wurde direkt im Anschluss an die Inkubation der Objektträger mit Marvel aufgetragen, mit einem Plastikfoliedeckglas abgedeckt und invertiert für 45 min. bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Der

Objektträger wurde ab jetzt vor Licht geschützt und zweimal für 5min. in 1x SSCT gewaschen, dann einmal für 5min. in 1x PBS und dann kurz in dH₂O getaucht. Nachdem der Objektträger trockengepustet wurde, konnte er mit Antifade (Vectashield) und counterstain (0,5µg/ml DAPI) eingedeckelt werden. Nach 30 min. Lagerung bei 4°C konnten die Objektträger mit dem Fluoreszenzmikroskop angesehen werden.

3.5.10. Beurteilung und Dokumentation der CGH-Hybridisierung

Die Metaphase-Chromosomen sollten eine möglichst gute Spreitung und eine homogene Anfärbung mit beiden Fluorochromen und DAPI aufweisen. Die Hintergrundfärbung sollte möglichst gleichmäßig und gering sein.

Um ein statistisch abgesichertes CGH-Ergebnis zu gewährleisten wurden pro Fall mindestens 10 Metaphasen aufgenommen. Die Fluoreszenzmuster wurden nacheinander mit den entsprechenden optischen Filtern in der Reihenfolge blau (DAPI), grün (Fluorescein) und rot (Rhodamin) aufgenommen. Dazu wurde eine lichtempfindliche CCD-Kamera an das Mikroskop angeschlossen und die Fotos mit der ISIS-3 Software (Metasystems, Altlußheim) aufgenommen und gespeichert.

3.5.11. Karyotypisierung der Metaphasen

Die Bilder wurden mit der ISIS-3 Software weiter bearbeitet, es wurde eine Hintergrundkorrektur vorgenommen und die oberen und unteren Grenzwerte für die einzelnen Farben festgelegt. Um die Chromosomen voneinander zu trennen wurden an den nötigen Stellen Grenzen festgelegt. Dann erfolgte die Zuordnung der Chromosomen im Karyotypisierungsmodus in invertierter schwarz / weiß-Darstellung der DAPI-Anfärbung. Das dabei entstehende Bild ähnelt dem Bandenmuster in der Giemsa-Färbung, so wurde die Zuordnung der Chromosomen erleichtert. Die Position des Zentromers musste festgelegt werden, um eine separate p- und q-Arm-Skalierung zu ermöglichen.

3.5.12. Auswertung der CGH-Ergebnisse

Für jedes Chromosom berechnet die Software ein Einzelprofil, indem über die Breite des Chromosoms die Intensität der beiden Fluoreszenzfarbstoffe Fluorescein und Rhodamin entlang der gesamten medianen Chromosomenachse gemessen wird.

3.6. „Fluorescence-in-situ-Hybridisation“ (FISH)

3.6.1. Verwendete Sonden

Es wurden zwei FISH-Sonden verwendet. Die Sonde KBI-10704 Cervical Cancer der Firma Kreatech bindet an das Zentromer des Chromosom 7, an Chromosom 3q26.2 und an Chromosom 8q24.1. Das Signal am Zentromer des Chromosoms 7 dient zur Bestimmung des Ploidiegrades, Zugewinne an den Chromosomen 3q und 8q sind häufig an Ovarialkarzinomen in der CGH festgestellte Veränderungen (Arnold et al., 1996, Kiechle et al., 2001).

Die zweite Sonde ist eine in unserem Labor hergestellte Sonde t(11q13.1; 19p13.13) mit Bindungsstellen an Chromosom 11q13.1 und Chromosom 19p13.13. Die Bezeichnung t(11q13.1; 19p13.13) erhielt die Sonde, da sie zur Untersuchung auf eine in unserem Patientengut häufige Translokation der Chromosomen 11 und 19 dient.

3.6.2. Herstellung der Sonde t(11q13.1; 19p13.13)

Der Bruchpunkt an Chromosom 11 liegt im Bereich 11q13.2, an Chromosom 19 liegt er im Bereich 19p13.12. Die Bac-Klone RP11-15L8 für Chromosom 11 und RP11-56k21 für Chromosom 19 ausgesucht um die DNA der entsprechenden Regionen zu amplifizieren. Bakterienkolonien mit Plasmid-DNA zur Herstellung dieser Klone wurden über die Firma imaGenes (BRD) bezogen.

3.6.3. Kultivierung der Bakterien und Isolierung der Plasmid-DNA

4ml LB Medium mit 40µg/ml Chloramphenicol wurden in ein Kulturröhrchen mit Schnappdeckel gegeben. Mit einer Impföse wurde die Bakterienkolonie hinzugefügt. Das Kulturröhrchen wird bis zum ersten Einrasten des Deckels geschlossen, schräg in einen Ständer gestellt und unter Schütteln üN bei 37°C inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Bac Max DNA Purification Kit gemäß den Herstellerangaben. Man erhielt die DNA in 25µl dH₂O.

3.6.4. Amplifikation mit DOP-PCR

1µl der gewonnenen DNA wird mittels DOP-PCR amplifiziert wie in der Literatur beschrieben (Telenius et al., 1992, Weimer et al., 1999) und wurde mir zur Verfügung gestellt.

3.6.5. Markierung der DNA mittels DOP-PCR und Überführung in Hybridisierungs-Mix

Die Markierung (Weimer et al., 2001) der DNA des Klonen RP11-15L8 für Chromosom 11 erfolgt mit Texas Red, die DNA des Klonen RP11-56k21 für Chromosom 19 mit Spectrum Green mittels DOP-PCR und wurde mir zur Verfügung gestellt. 10µl je Ansatz werden mit 20µl Cot-1 DNA (1 µg/ml) mit EtOH (Zielkonzentration 70% EtOH) üN bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation bei 20160x g wird der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und in 10µl Hybridisierungs-Mix gelöst.

3.6.6. Ermittlung des cut-off der verwendeten Sonden

Der cut-off für die Sonde t(11q13.1; 19p13.13) wurde ermittelt, indem die Signale der FISH-Sonde auf normalen Interphasekernen ausgewertet wurden. Die Anzahl der gezählten Kollokalisierungen (Fusionen) auf normale Zellen wurde bestimmt. In 12 x je 50 gezählten Kernen normaler Ovarzellen wurden im Mittel 14% Fusionen detektiert. Die Standardabweichung der einzelnen Messungen ergab 4%. Der ermittelte cut-off ist 26%, d.h. wenn in mehr als 26% der Zellen eine Fusion detektiert wird, kann davon ausgegangen werden, dass eine Fusion in den Zellen vorhanden ist.

Für die Sonde (7cen, 3q26.2, 8q24.1) liegt der cut-off für normale Interphasekerne bei 10% und für normale Metaphasen bei 5%.

3.6.7. Vorbereitung der Objektträger

Die Objektträger wurden mindestens eine Woche in EtOH mit 1% HCL gelagert.

3.6.8. Vorbereiten der Zellsuspension

Die in Fixativ bei -20°C lagernden Zellen wurden bei 300x g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet in -20°C k altem Fixativ gelöst.

3.6.9. Tropfen der Objektträger

Auf die getrockneten Objektträger wird ein Tropfen der Zellsuspension getropft, wobei der Objektträger leicht schräg gehalten wird, damit sich die Zellen über den Objektträger verteilen. Die getrockneten Objektträger können bei -20°C gelagert werden.

3.6.10. Denaturieren der Zellkerne

Um die Zellkerne freizulegen, wurden die Objektträger mit Pepsin behandelt. 100µl 0,01M HCL wurden auf 37°C vorgewärmt und 40µl Pepsin (100mg/ml) dazugegeben. Die Objektträger wurden darin für 5min bei 37°C behandelt und danach kurz in dH₂O getaucht. Dann wurden sie für 2min. in 1% Paraformaldehyd gestellt, wieder kurz in dH₂O getaucht und dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 95%, 100% EtOH) für je 3min. bei RT dehydriert und trockengepustet. Die Denaturierung erfolgt im Wasserbad auf 72°C erhitzter Denaturierungslösung für 2min., dann werden die Objektträger direkt in -20°C kaltem EtOH abgeschreckt und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (95%, 100% EtOH) für je 3min. bei RT dehydriert und trockengepustet. Anschließend werden die Objektträger auf einer 37°C warmen Heizplatte vorgewärmt.

3.6.11. Denaturieren der Sonde und Hybridisierung

Die Sonde wurde bei 75°C 5min. denaturiert, auf Eis abgekühlt und 30min. bei 37°C vorhybridisiert. Die Sonde (je 1µl) wurde auf die ausgewählten Areale der vorgewärmten Objektträger pipettiert und mit einem 7x7mm Deckglas abgedeckt. Die Deckgläser wurden mit Fixogum fixiert und die Ränder abgedichtet. Die Objektträger wurden $\bar{u}N$ invertiert in einer dunklen feuchten Kammer in einem 37°C Wärmeschrank inkubiert.

3.6.12. Detektion der Signale

Die Position der Deckgläschen wurde mit einem Diamantschreiber markiert und die Deckgläschen abgelöst. Um zu vermeiden, dass die Objektträger austrocknen, können sie kurz in 0,5xSSC gestellt werden. Die Objektträger werden im Wasserbad auf 72°C erhitztem 0,5xSSC für 5min. und dann 3x 3min. in SSCT gewaschen. Abschließend werden die Objektträger kurz in dH₂O getaucht und trockengepustet. Dann können sie mit Antifade (Vectashield) und counterstain (0,5µg/ml DAPI) eingedeckelt werden. Nach 30min. Lagerung bei 4°C konnten die Objektträger mit dem Fluoreszenzmikroskop angesehen werden. Die Filter müssen entsprechend den eingesetzten Fluorochromen verwendet werden. Die Qualitätskriterien sind eine gute Signalstärke und wenig Hintergrundsignale. Je Kultur und Sonde wurden mindestens 50 Zellen ausgezählt. Die Auswertung erfolgt aufgrund der dreidimensionalen Struktur der Zellkerne direkt am Mikroskop.

3.7. FICTION

3.7.1. Immunhistochemie mit Fluoreszenz-Farbstoff

Die Färbung mit dem primären Antikörper Ep-Cam erfolgte wie bei den immunhistochemischen Färbungen beschrieben. Dann wurden die Objektträger 3x in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation für 30min. mit dem sekundären Antikörper, Dako E 0433 in der Verdünnung 1:300. Nach 3maligem Waschen mit PBS wurden die Objektträger für 30min. mit dem fluoreszenzmarkierten Antikörper Dako F 0422 inkubiert, ab jetzt wurden alle weiteren Schritte lichtgeschützt durchgeführt. Nach 3maligem Waschen mit PBS wurden die Objektträger trockengepustet und mit Antifade (Vectashield) und counterstain (0,5µg/ml DAPI) eingedeckelt. Nach 30min. Lagerung bei 4°C konnten die Objektträger mit dem Fluoreszenzmikroskop angesehen werden. Bereiche mit angefärbten Zellen wurden fotografiert und die Position auf dem Objektträger notiert.

3.7.2. FISH auf den Immunhistochemie-Objektträgern

Um die Fluorescence-Signale möglichst gut zu erhalten, wurde der Pepsin-Verdau bei der FISH weggelassen. Die Deckgläschen wurden entfernt, die Objektträger 3x kurz mit PBS und einmal mit dH₂O gewaschen. Das weitere Vorgehen erfolgt analog dem FISH-Protokoll, beginnend mit Inkubation des Objektträgers in 1% Paraformaldehyd für 2min..

3.7.3. Auswertung

Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die FISH-Signale der Zellen ausgezählt. Die zuvor fotografierten Bereiche wurden aufgesucht und erneut fotografiert.

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen

Die Kulturen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Morphologie und des Wachstumsverhaltens der Zellen. Dies ist an den in Abbildung 2 gezeigten Kulturen zu sehen. In Kultur 5 sind kleine kubische Zellen zu sehen, in Kultur 1 eine Mischung aus kleinen kubischen Zellen und fibroblasten-artigen großen Zellen mit flächigen Ausläufern. In den immunhistochemischen Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass letztere Zellen Fibroblasten sind.

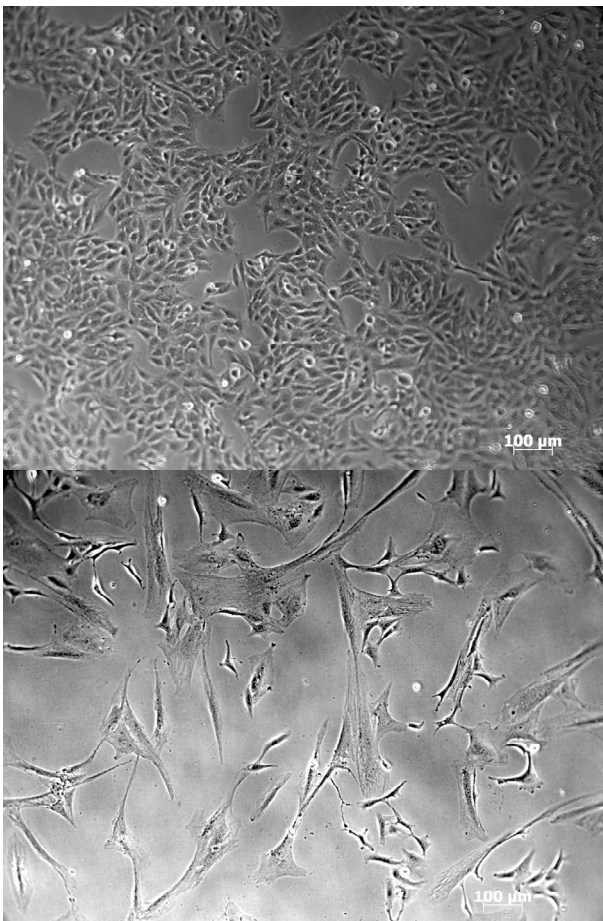


Abb. 2: Exemplarische Bilder für ungefärbte Primärkulturen in Kulturflaschen. Der eingezeichnete Maßstabsbalken entspricht 100µm.

oben: Kultur 5, die Zellen sind klein und zeigen eine für Plattenepithelkarzinome typische kubische Form.

unten: Kultur 1, eine Mischung aus kleinen kubischen Zellen und fibroblasten-artigen großen Zellen mit flächigen Ausläufern.

Bei den Färbungen mit dem DIA 100-Antikörper, ein Anti-CD90 Antikörper, ließen sich lediglich in Kultur 1 Zellen anfärben (43% der Zellen). Dies deutet auf eine Mitkultivierung von Fibroblasten hin. Nach Mauspassage dieser Kultur (Kultur 9) konnten keine CD90 positiven Zellen nachgewiesen werden.

Der Anteil an Ep-Cam positiven Zellen variierte vor Mauspassage zwischen 0 und 47%, nach Mauspassage zwischen 33 und 86%.

Vor Mauspassage ließen sich zwischen 0 und 24% cytokerin-positive Zellen zeigen, nach Mauspassage ließen sich nur in Kultur 1 5% cytokerin-positiven Zellen nachweisen.

Der Anteil der vimentin-positiven Zellen lag vor Mauspassage zwischen 10 und 100%, nach Mauspassage zwischen 29 und 96%. Die Anzahl vimentin-positiver Zellen hat nur in einem der 6 Fälle nach Mauspassage zugenommen.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 graphisch dargestellt, eine Tabelle mit den zugrunde liegenden Daten befindet sich im Anhang. (Tab. 5)

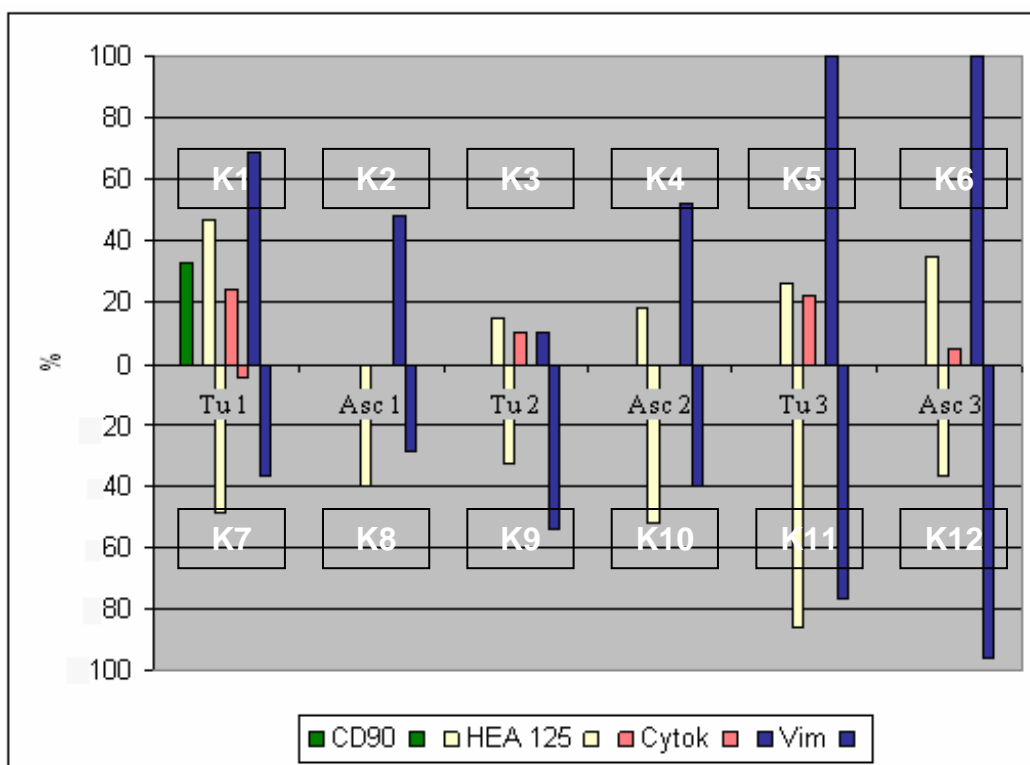


Abb. 3: Übersicht über die Ergebnisse der IHC-Färbungen

Auf der x-Achse sind die verschiedenen Antikörper für die einzelnen Kulturen aufgetragen, auf der y-Achse der Anteil der positiven Zellen in Prozent. Um die Kulturen, die sich vor und nach Maus entsprechen, übersichtlich darstellen zu können, wurde die Prozentzahl der nach Mauspassage angefärbten Zellen nach unten aufgetragen. Eine Tabelle mit den zugrunde liegenden Ergebnissen befindet sich im Anhang (Tab. 5).

Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarische Bilder der Färbungen mit den verschiedenen Antikörpern, in Abb. 4 vor Mauspassage, in Abb. 5 nach Mauspassage, an den Zellen der gleichen Patientin.

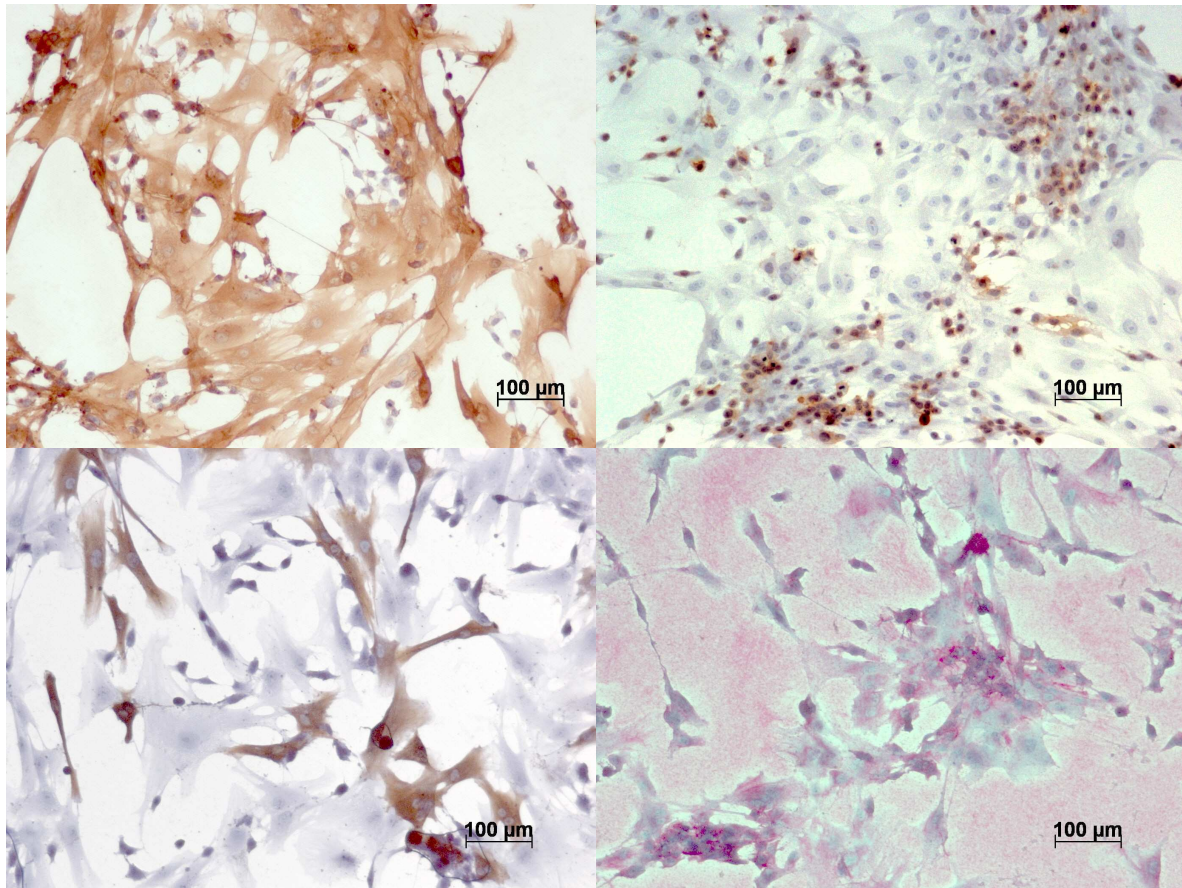


Abb. 4: Exemplarische Bilder für die verwendeten Antikörper an Zellen der Patientin 1 vor Mauspassage, Kultur 1:

oben links: mit dem Fibroblasten-Antikörper

oben rechts: mit dem Ep-Cam-Antikörper

unten links: mit dem Cytokeratin-Antikörper

unten rechts: mit dem Vimentin-Antikörper

Der eingezeichnete Maßstabsbalken entspricht 100µm.

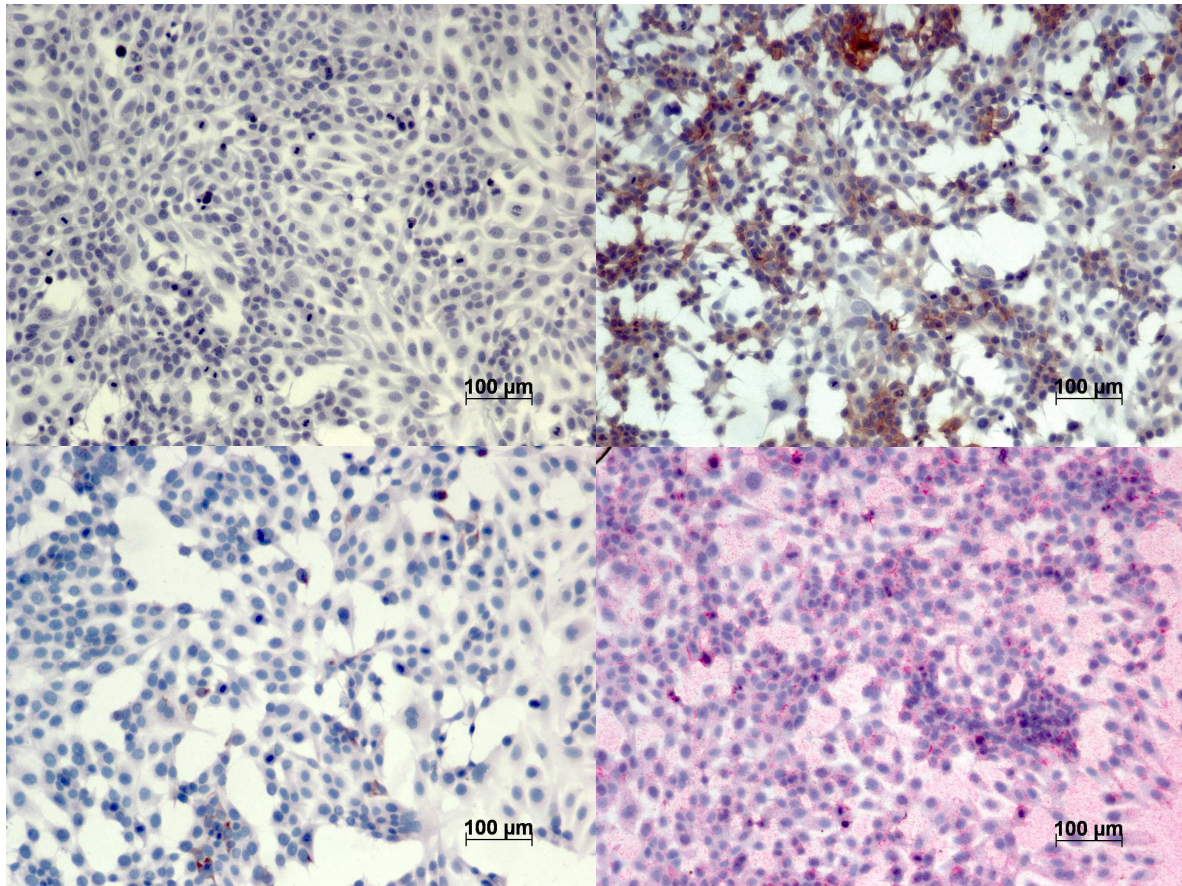


Abb. 5: Exemplarische Bilder für die verwendeten Antikörper an Zellen der Patientin 1 nach Mauspassage, Kultur 7:

oben links: mit dem Fibroblasten-Antikörper

oben rechts: mit dem Ep-Cam-Antikörper

unten links: mit dem Cytokeratin-Antikörper

unten rechts: mit dem Vimentin-Antikörper

Der eingezeichnete Maßstabsbalken entspricht 100µm.

4.2. Ergebnisse der Transmigrationsassays

Die Transmigrationsassays wurden mit den Kulturen K1 bis K12 durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten die Zelllinie OvCar8 und kultivierte Fibroblasten. Die Migrationsfähigkeit der Kulturen K1 bis K12 lag mit 53 bis 192 migrierten Zellen bei allen Kulturen zwischen der Anzahl der migrierten Fibroblasten (4 Zellen) und der Anzahl der migrierten Zellen der OvCar8 Zelllinie (320 Zellen). Es zeigte sich kein Einfluß der Mauspassage auf die Migrationsfähigkeit der Zellen.

Die folgende Abbildung zeigt eine Übersicht über die Anzahl der migrierten Zellen der einzelnen Kulturen (Abb. 6). Eine Tabelle mit den zugrundeliegenden Daten findet sich im Anhang (Tab. 6).

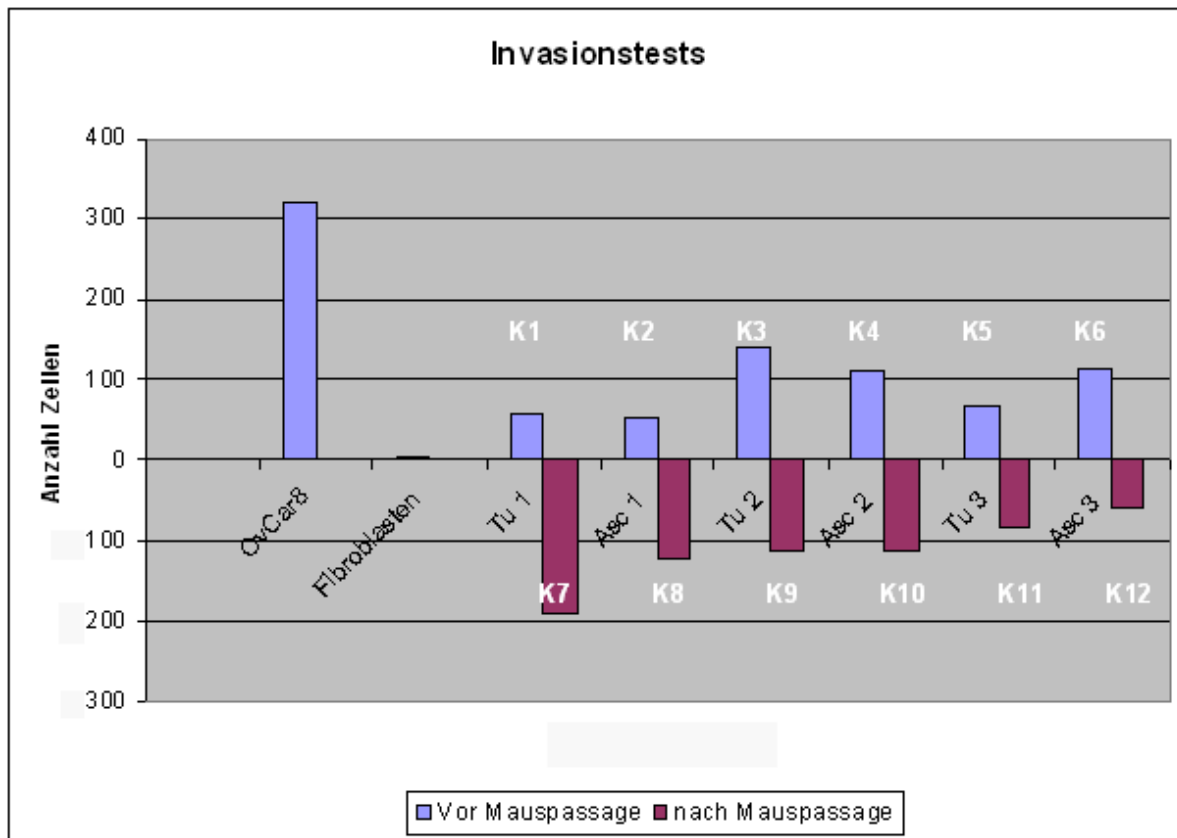


Abb. 6: Übersicht über die Ergebnisse der Transmigrationsassays

Auf der x-Achse sind die einzelnen Kulturen aufgetragen, auf der y-Achse die Anzahl der migrierten Zellen. Um die Kulturen, die sich vor und nach Maus entsprechen, übersichtlich darstellen zu können, wurde die Zellzahl der Kulturen vor Mauspassage nach oben, der Kulturen nach Mauspassage nach unten aufgetragen.

In Abbildung 7 sind unter dem Mikroskop aufgenommene Ausschnitte der Membranen der Transmigrationsassays zusehen.

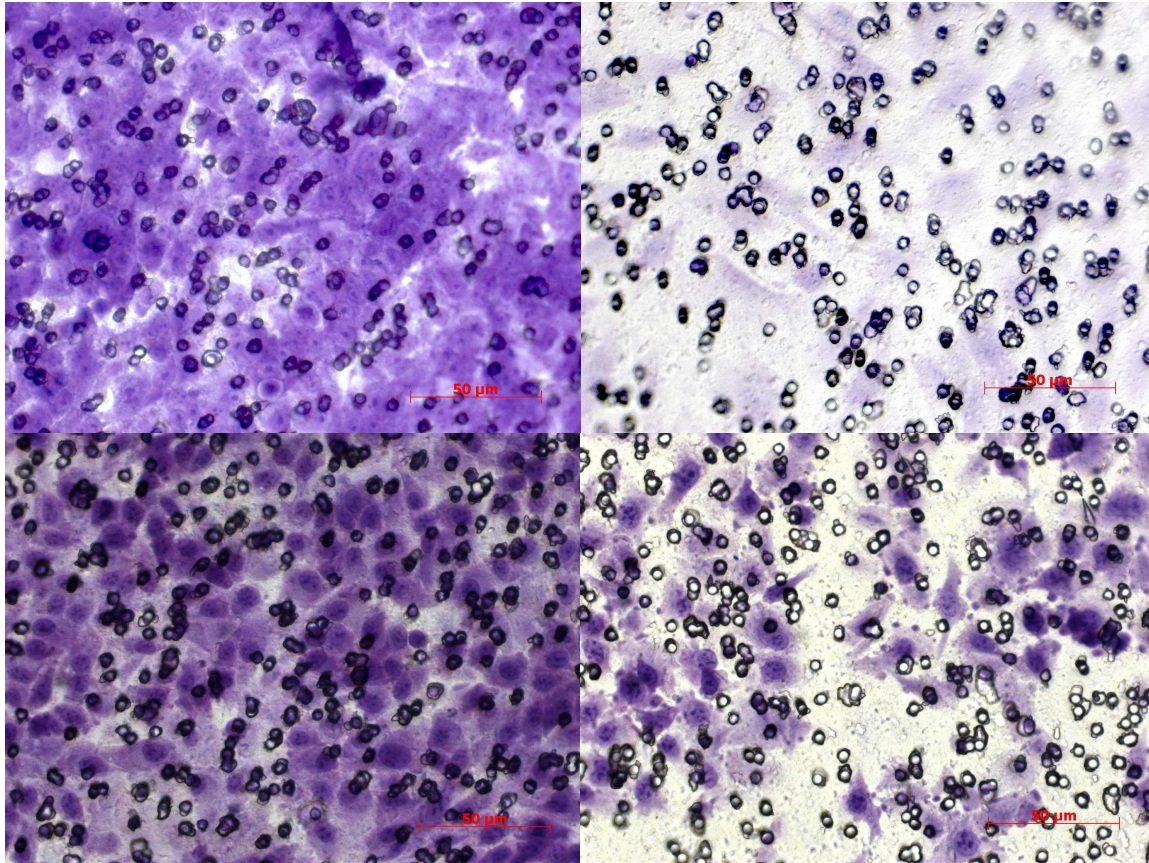


Abb 7: Exemplarische Bilder der Transmigrationsassays

Die Abbildung zeigt unter dem Mikroskop aufgenommene Ausschnitte der Transmigrationsassays folgender Kulturen:

- links oben: OvCar8
- rechts oben: Fibroblasten
- links unten: Kultur 3
- rechts unten: Kultur 11

Der eingezeichnete Maßstabsbalken entspricht 50µm.

4.3. Ergebnisse der CGH-Analyse

Abbildung 8 liefert einen Überblick über die Veränderungen, die in der CGH-Analyse festgestellt wurden, eine Zuordnung der Aberrationen zu den Kulturen ermöglicht die folgende Tabelle 3.

Abb. 8: Übersicht über die Abberationen in den CGH-Untersuchungen

Die Tumor-DNA wurde mit Biotin gelabelt (grün), die Kontroll-DNA mit Digoxigenin (rot). Zugewinne der Tumor-DNA sind mit einem grünen Strich (nach rechts) aufgetragen, Verluste mit einem roten Strich (nach links). Jeder Strich entspricht einem Fall.

Oben sind die Veränderungen der Kulturen vor der Mauspassage dargestellt,

in der Mitte die Veränderungen nach Mauspassage,

unten sind die Veränderungen aller Kulturen, vor und nach Mauspassage eingetragen.



	Patientin 1				Patientin 2				Patientin 3			
	vor Maus		nach Maus		vor Maus		nach Maus		vor Maus		nach Maus	
	Tu	Asc	Tu	Asc	Tu	Asc	Tu	Asc	Tu	Asc	Tu	Asc
	K1	K2	K7	K8	K3	K4	K9	K10	K5	K6	K11	K12
1p							+					-
1q		+					+			+		+
2p												
2q												
3p					-	-	-	-				
3q			+			+	+	+	+		+	+
4p												
4q												
5p												
5q						-						
6p												+
6q			+								+	+
7p												
7q												
8p												
8q			+				+					
9p						-	-	-		-		-
9q						+	+					+
10p												
10q				+			+		+			
11p												
11q												
12p												
12q	+	+	+			+	+			+	+	+
13q		-	-	-	-	-	-	-				-
14q						-	-					
15q												
16p										-		
16q						+						
17p		-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
17q						+	+				+	+
18p												
18q												
19p		+					+					
19q												
20p							+	+				
20q							+					+
21q			-	-								
22q	-	-	-	-								
Xp	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xq	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab 3: Zuordnung der Aberrationen zu den einzelnen Kulturen

In der Spalte ganz links sind die Arme der Chromosomen aufgelistet. Die Kulturen sind, nach den Patientinnen sortiert, auf die Spalten verteilt. Ein - (rotes Feld) entspricht einem Verlust, ein + (grünes Feld), einem Zugewinn

Eine Aufstellung der CGH-Abbildungen der einzelnen Fälle findet sich im Anhang (Abb. 15 bis 26).

Die Ergebnisse können auf verschiedene Aspekte untersucht werden. Es zeigen sich Übereinstimmungen der Abweichungen zwischen Tumorgewebe und dem dazugehörigen Ascites. Weiterhin gibt es Übereinstimmungen der Abweichungen zwischen den Zellen vor und nach Mauspassage. Der Zugewinn am x-Chromosom und der Verlust am y-Chromosom kommen durch die Verwendung einer männlichen Kontroll-DNA zustande und haben keinen Aussagewert.

Ein Vergleich der Aberrationen der Kulturen von Patientin 1 (K1, K2, K7, K8) zeigt einen Zugewinn an 12q in der Tumor- und Asciteskultur vor Mauspassage und an der Tumorkultur nach Mauspassage. Einen Verlust an 13q und 17p zeigen die Asciteskultur vor Mauspassage und die Tumor- und Asciteskultur nach Mauspassage. Die beiden Kulturen nach Mauspassage zeigen einen Verlust an 21q und alle vier Kulturen zeigen einen Verlust an 22q.

In den Kulturen der Patientin 2 (K3, K4, K9, K10) zeigt sich ein Verlust an 3p und 13q in allen vier Kulturen. In den beiden Asciteskulturen und der Tumorkultur nach Mauspassage ein Zugewinn an 3q, ein Verlust an 9q und an 17p. Beide Kulturen nach Mauspassage zeigen einen Zugewinn an 20p. Die Asciteskultur vor Mauspassage und die Tumorkultur nach Mauspassage zeigen beide einen Zugewinn an 9q, 12q und 17q und einen Verlust an 14q.

Bei den Kulturen der Patientin 3 (K5, K6, K11, K12) liegt in beiden Asciteskulturen ein Zugewinn an 1q vor, sowie ein Verlust an 9p. Ein Zugewinn an 12q liegt in beiden Asciteskulturen und an der Kultur aus Tumorgewebe nach Mauspassage vor. Ein Verlust an 17p zeigt sich an allen vier Kulturen. An den beiden Kulturen nach Mauspassage zeigt sich ein Zugewinn an 6q.

Betrachtet man nur die Kulturen nach Mauspassage, so zeigen sich in 5 der 6 Kulturen Zugewinne an 3q und Verluste an 13q sowie in allen 6 Kulturen Verluste an 17p.

4.4. Ergebnisse der FISH-Analyse

In dem Patientenkollektiv unseres Labors liegen in einer hohen Anzahl der untersuchten Ovarialkarzinome Translokationen der Chromosomen 11 und 19 vor. Zellen, die diese Veränderung zeigen, sind als Tumorzellen anzusehen. Lediglich in Kultur 4 lag die Anzahl der gezählten Fusionen mit 6% unter dem ermittelten cut-off, in allen anderen Kulturen lag die Anzahl der Zellen mit Fusionen mit 52 – 96% deutlich über dem ermittelten cut-off. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt, eine Tabelle mit den Daten befindet sich im Anhang (Tab. 7)

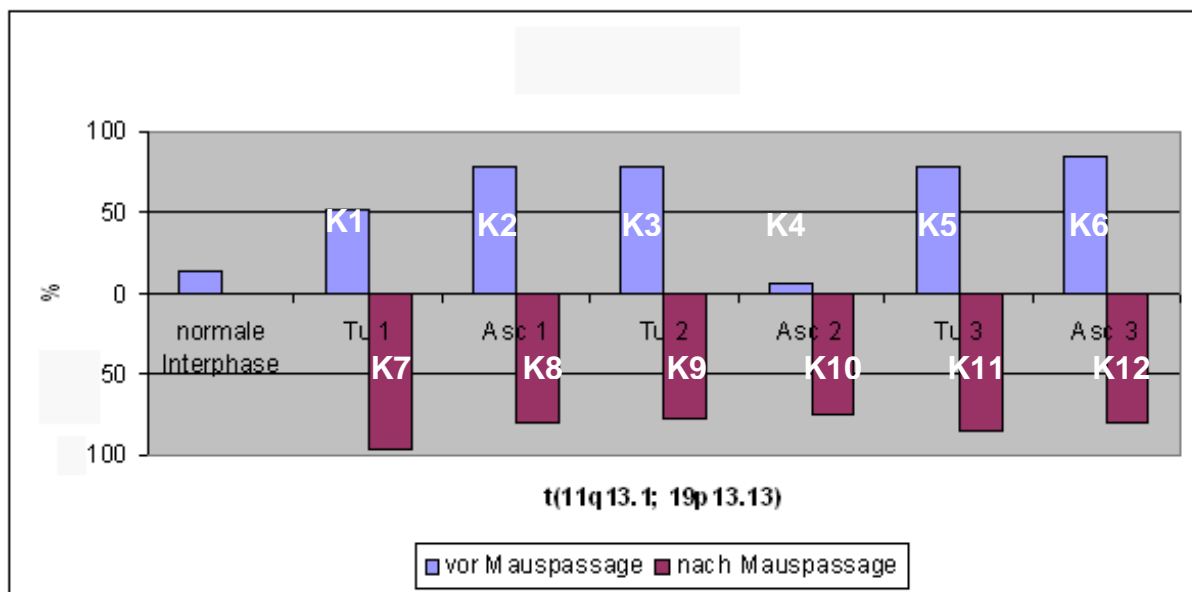


Abb. 9: Überblick über den Anteil der Zellen mit der Translokation t(11q13.1; 19p13.13)

Auf der x-Achse sind die Ergebnisse für normale Interphasen sowie die einzelnen Kulturen aufgetragen, auf der y-Achse der Anteil der Zellen mit t(11q13.1; 19p13.13) in Prozent. Um die Kulturen, die sich vor und nach Maus entsprechen, übersichtlich darstellen zu können, wurde die Prozentzahl der nach Mauspassage genetisch veränderten Zellen nach unten aufgetragen.

Die folgenden Abbildungen wurden unter dem Fluoreszenz-Mikroskop aufgenommen. Abbildung 10 zeigt zur Kontrolle die Hybridisierung der Sonde t(11q13.1; 19p13.13) auf einer normalen Metaphase. Die roten Signale liegen auf Chromosom 11, die grünen Signale auf Chromosom 19. In den Interphasezellkernen der Primärkulturen aus Tumor und Ascites weicht die Anzahl der Signale vom Normalbefund ab und es liegen Co-Lokalisationen vor. Mit Co-Lokalisation wird eine Signalkombination bezeichnet, wenn zwischen dem roten und dem grünen Signal weniger als ein Signaldurchmesser Abstand ist. Die Anzahl der Signale und der Co-Lokalisationen in den Asciteszellen variiert, dies zeigt die genetische Heterogenität der Zellen.

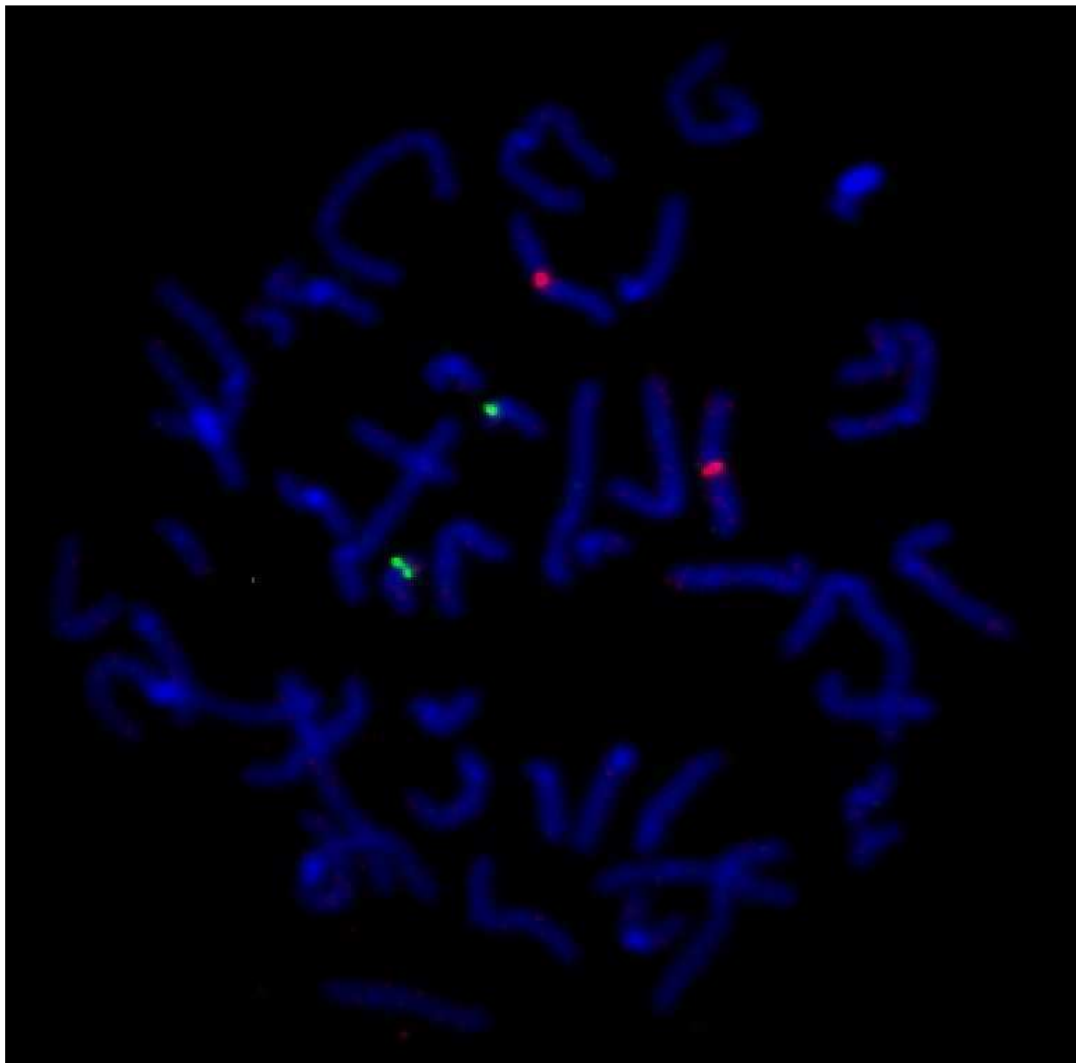


Abb. 10: Normale Metaphase mit Sonde t(11q13.1; 19p13.13)
Die Abbildung zeigt einen Normalbefund mit der Sonde t(11q13.1; 19p13.13) an einer Metaphase einer genetisch nicht veränderten Zelle mit je zwei grünen (Chromosom 19) und roten (Chromosom 11) Signalen.

Abbildung 11 zeigt eine Hybridisierung der Sonde t(11q13.1; 19p13.13) auf den Zellen (Interphase) der Kulturen K3 (Tumor) und K4 (Ascites).

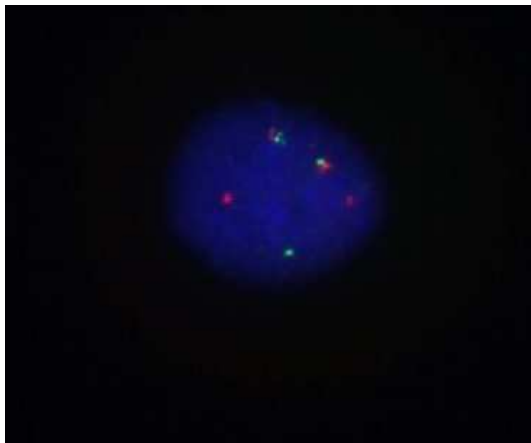
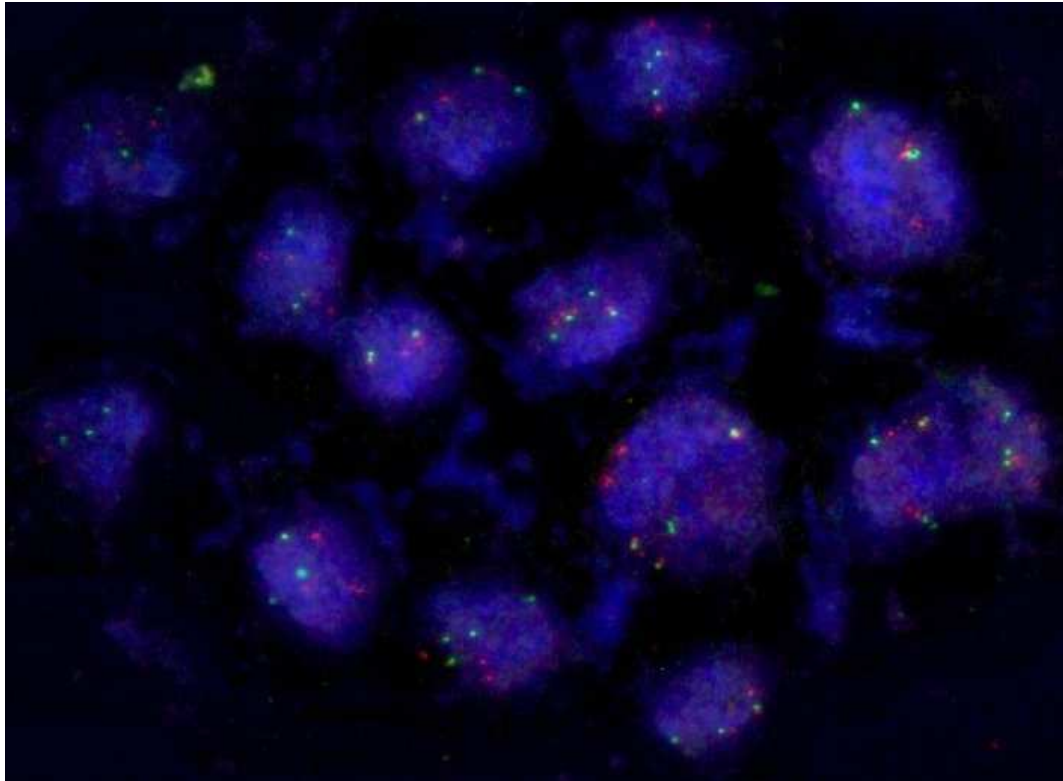


Abb. 11: Interphase-FISH mit der Sonde t(11q13.1; 19p13.13)
Die grünen Signale liegen auf Chromosom 19p13.13, die roten Signale auf Chromosom 11q13.1.

oben: Kultur 4, Ascites

unten: Kultur 3, Tumor

Die Co-Lokalisation dieser beiden BACs ist so zu interpretieren, dass sie in relativer Nähe zueinander fusionieren. Die Bruchpunkte dieser Fusion müssen sich nicht zwingend in gen-codierenden Region befinden. Andere Untersuchungen zeigen, dass diese Fusionsregionen kryptisch auftreten können und die Produkte nicht immer größere Chromosomenanteile umfassen.

Bei der FISH-Sonde (7cen, 3q26.2, 8q24.1) liegen die Sonden auf dem Zentromer des Chromosoms 7, auf den Banden 3q26.2 und 8q24.1. Genetische Imbalancen auf den Chromosomen 3q und 8q sind in der CGH-Analyse von Ovarialkarzinomen häufig festgestellte Veränderungen (Arnold et al. 1996; Kiechle et al. 2001).

Bei einer genetisch nicht veränderten Zelle sollten 2 blaue, 2 grüne und 2 rote Signale zusehen sein. In dem Diagramm ist die Anzahl der Zellen aufgeführt, in denen eine andere Signalanzahl vorlag, die Zellen also genetisch verändert sind. Die Ergebnisse lagen zwischen 74% und 100%. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt, eine Tabelle mit den Daten befindet sich im Anhang (Tab. 8).

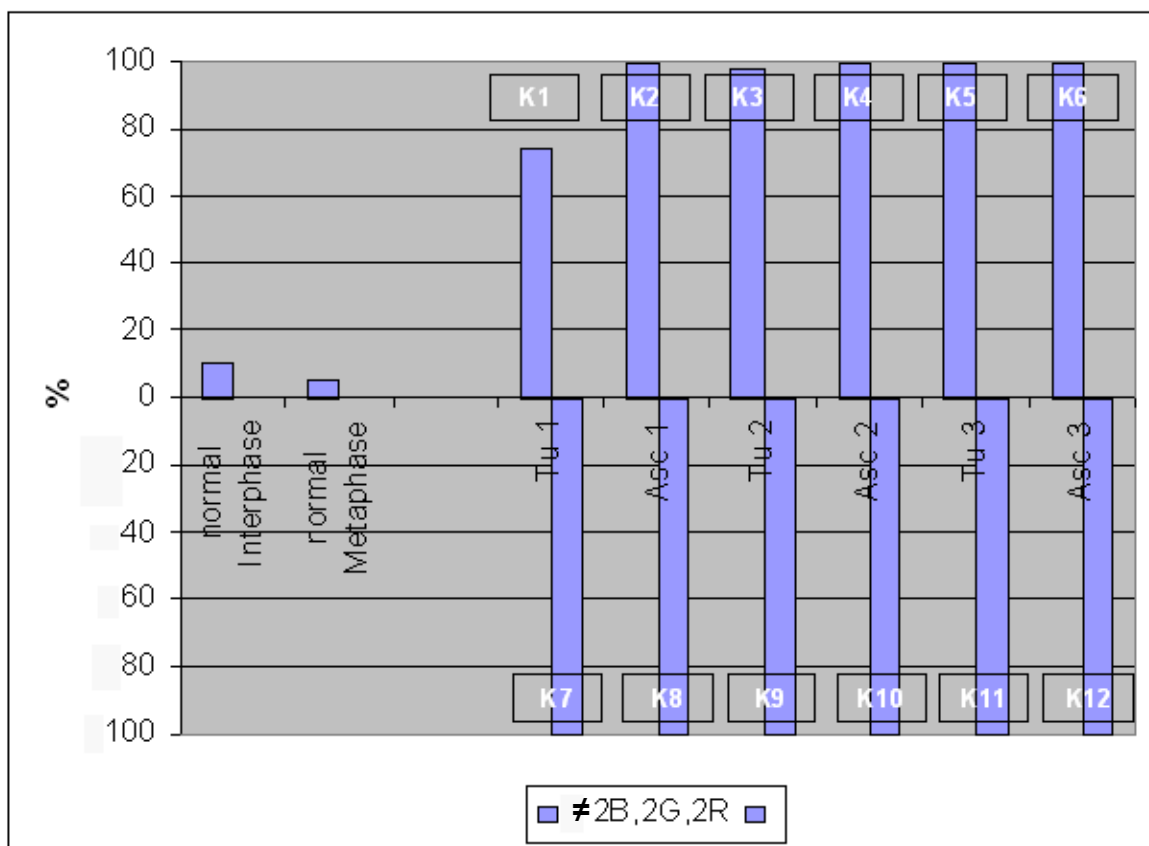


Abb. 12: Überblick über den Anteil der genetisch veränderten Zellen bei Untersuchung mit der Sonde (7cen, 3q26.2, 8q24.1).

Auf der x-Achse sind die Ergebnisse für normale Interphasen und normale Metaphasen und die einzelnen Kulturen aufgetragen, auf der y-Achse der Anteil der genetisch veränderten Zellen in Prozent. Um die Kulturen, die sich vor und nach Maus entsprechen, übersichtlich darstellen zu können, wurde die Prozentzahl der nach Mauspassage genetisch veränderten Zellen nach unten aufgetragen.

Die Anzahl der Zellen mit mehr als zwei Signalen beträgt für 8q24.1 zwischen 66 und 100%, für 3q26.2 zwischen 70 und 100% und für 7cen zwischen 54 und 94%. Eine Aufschlüsselung nach den einzelnen Kulturen befindet sich in Tabelle 4.

Tab. 4: Ergebnisse der FISH-Experimente mit der Sonde (7cen, 3q26.2, 8q24.1). Der Anteil der Zellen mit mehr als 2 Signalen je Chromosom, aufgeschlüsselt nach den einzelnen untersuchten Chromosomen, ist den jeweiligen Kulturen zugeordnet

	Anzahl der Zellen mit mehr als 2 Signalen		
	8q	3q	7cen
Kultur	Prozent	Prozent	Prozent
K1	74	70	70
K2	92	100	86
K3	90	86	82
K4	66	82	54
K5	100	100	92
K6	98	94	88
K7	98	98	76
K8	100	100	88
K9	90	98	94
K10	96	98	92
K11	96	100	94
K12	98	90	80

Abbildung 13 auf der nächsten Seite zeigt eine Metaphase und Interphasen mit der Sonde (7cen, 3q26.2, 8q24.1) an genetisch unveränderten Ovarzellen und genetisch veränderten Asciteszellen (Kultur 6). In der Metaphase sind je ein rotes Signal auf den Chromosomen 3, je ein blaues Signal auf den Chromosomen 7 und je ein grünes Signal auf den Chromosomen 8 zu sehen. In der angrenzenden Interphase liegt ein Normalbefund vor (2 rote, 2 blaue und 2 grüne Signale). Die Signale in der Interphase am Bildrand sind nur unvollständig abgebildet, dies liegt an der dreidimensionalen Struktur der Zellkerne. In den Interphasen der Asciteszellen sind in der Abbildung in allen Zellen multiple Signale zu sehen, die von dem Normalbefund abweichen. Die Anzahl der Signale ist nicht einheitlich, so dass von einer genetisch heterogenen Zellpopulation ausgegangen werden kann. Die blauen Signale präsentieren das Zentromer von Chromosom 7, welches in der Tumorzytogenetik des Ovarialkarzinoms relativ wenig Veränderungen erfährt und somit den Ploidiegrad anzeigt. Das grüne Signal repräsentiert den Gen-Lokus *c-MYC* und das rote den Gen-Lokus *hTERC*. Beide Gen-Loci erfahren in Ovarialkarzinomzellen häufig Überrepräsentationen (Arnold et al., 1996, Kiechle et al., 2001).

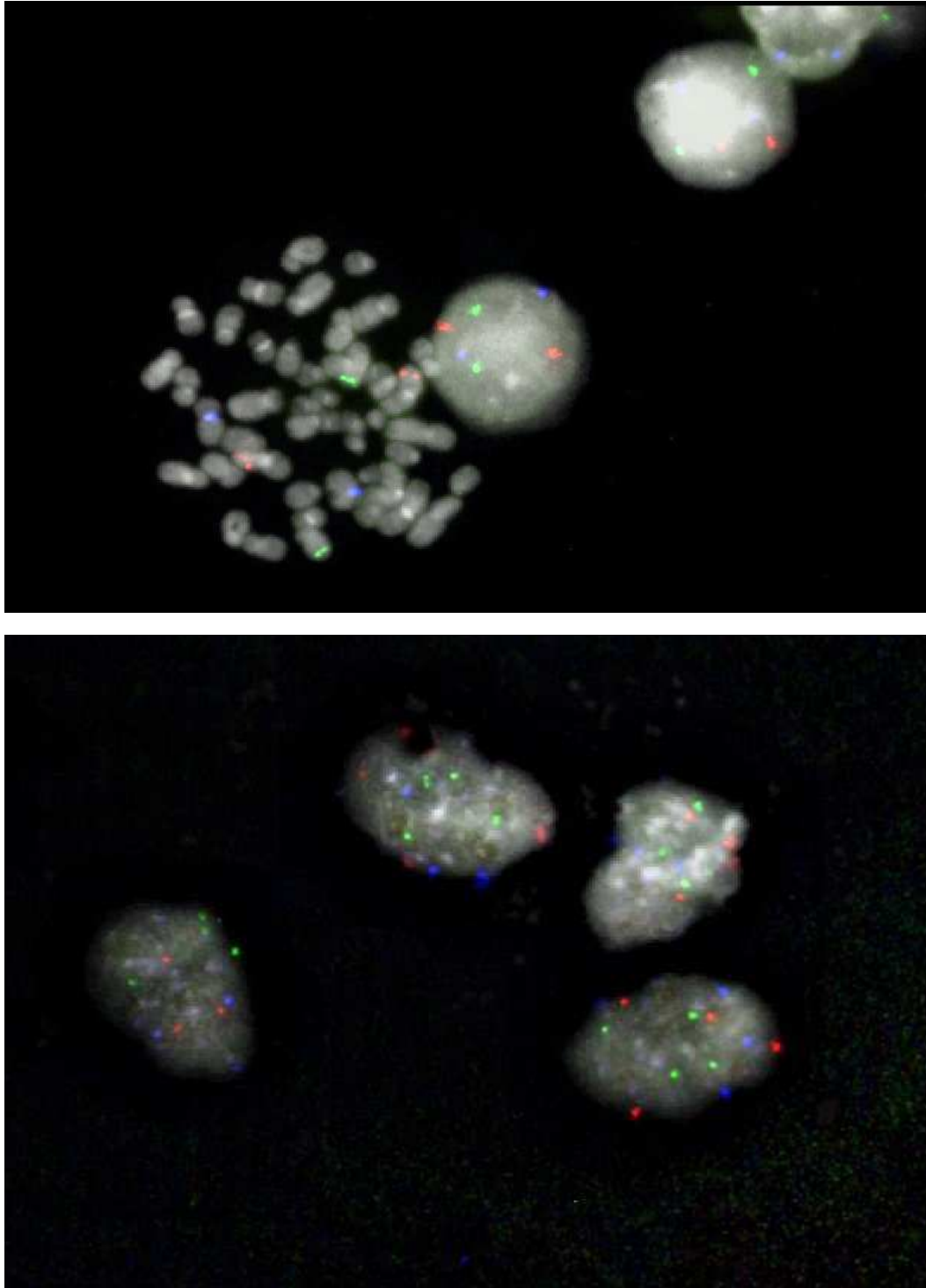


Abb. 13: Metaphase und Interphase mit Sonde (7cen, 3q26.2, 8q24.1)
Die roten Signale liegen auf Chromosom 3q26, die blauen Signale auf Chromosom 7cen und die grünen Signale auf Chromosom 8q24.
oben: Metaphase und Interphasen genetisch nicht veränderter Ovarzellen
unten: Interphase der Kultur 6, Ascites

4.5. Ergebnisse der FICTION-Experimente

Die Untersuchung mit der FICTION-Technik wurde exemplarisch an Kultur 3 durchgeführt. Diese Kultur wurde ausgewählt, da in der Immunhistochemie nur 15% der Zellen Ep-Cam-positiv waren und der Anteil genetisch veränderter Zellen in der FISH-Untersuchung mit der Sonde (7cen, 3q26.2, 8q24.1) bei 98% lag. In dem Experiment konnte gezeigt werden, dass auch Zellen, die nicht Ep-Cam-positiv sind, genetisch verändert sind.

Die folgenden Abbildungen zeigen 9 Zellen, die genetisch verändert sind, wie sich an der Anzahl der FISH-Signale erkennen lässt, jedoch sind nur 2 der Zellen Ep-Cam-positiv (Abb. 14).

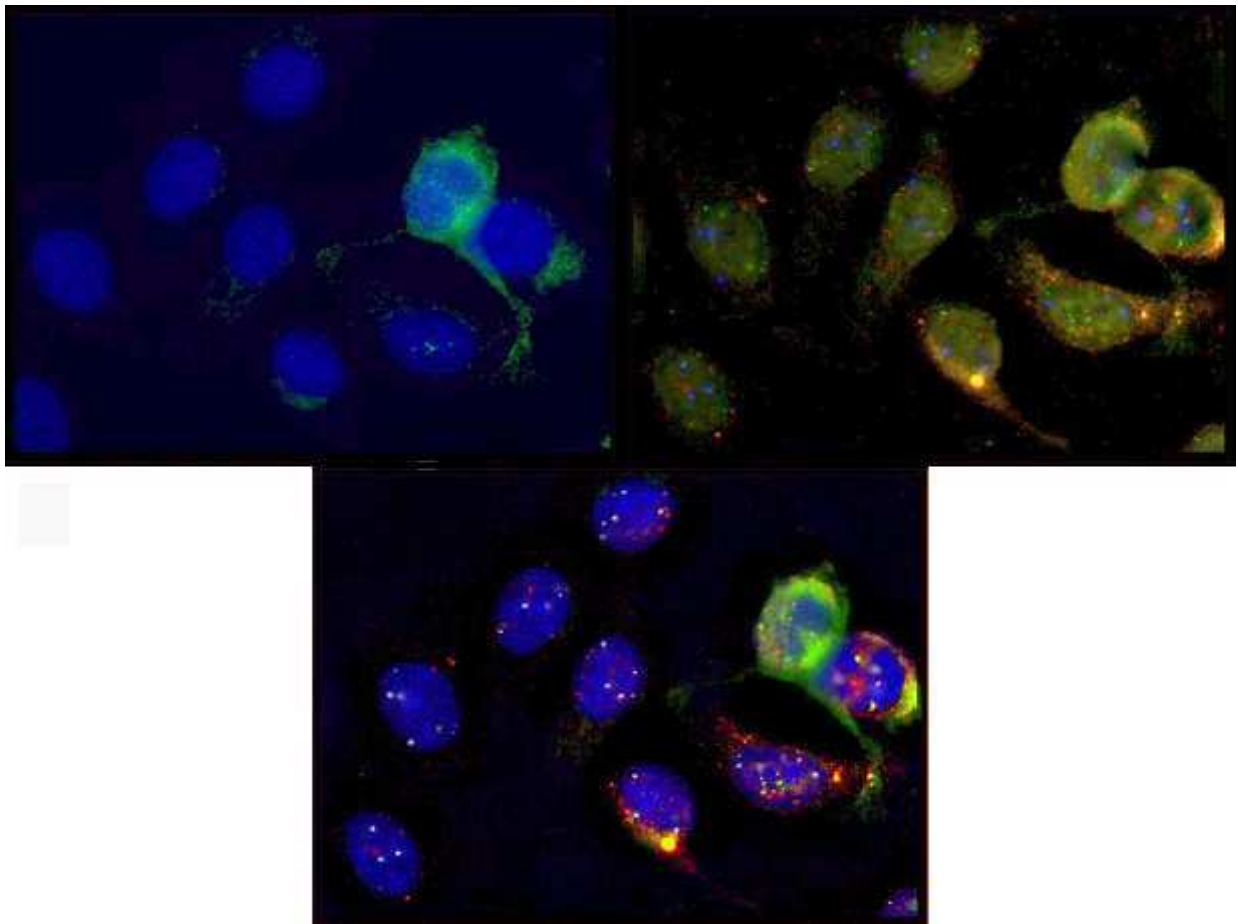


Abb. 14: Exemplarische Darstellung eines FICTION-Experiments

Das Bild links oben zeigt eine Aufnahme nach der immunhistochemischen Färbung mit dem Antikörper Ep-Cam und dem fluoreszenz-markiertem sekundärem Antikörper.

Das Bild rechts oben zeigt das gleiche Areal nach durchgeführter FISH mit der Sonde (7cen, 3q26.2, 8q24.1).

Das untere Bild ist eine Überlagerung der beiden oberen Bilder.

5. Diskussion

5.1. Interpretation der immunhistochemischen Färbungen

Die Färbungen mit dem DIA 100-Antikörper zeigten lediglich in einer der Kulturen (K1) positive Zellen, hier kann von einer Mitkultivierung von Fibroblasten ausgegangen werden. In dieser Kultur lag auch der Anteil unveränderter Zellen mit der FISH-Sonde (7cen, 3q26.2, 8q24.1) bei 26%. Bei 48% der Zellen lag keine Translokation an t(11q13.1; 19p13.13) vor. Dies unterstützt die Interpretation, dass hier genetisch unauffällige Fibroblasten gemeinsam mit Tumorzellen in einer Kultur versiedelt sind.

Die Anzahl der vimentin-positiven Zellen variiert vor und nach Mauspassage sehr stark. In fünf der sechs Fälle kommt es durch die Mauspassage zu einer geringfügig bis stark ausgeprägten Abnahme der vimentin-positiven Zellen. Lediglich in einem der Fälle (Kultur 3) kommt es über die Mauspassage zu einer deutlichen Zunahme. Beim Vergleich zwischen den Tumor- und den korrespondierenden Asciteskulturen ist nur bei einem der Paare vor Mauspassage ein höherer Anteil vimentin-positiver Zellen im Ascites vorhanden. Bei einem anderen Paar liegt der Anteil vimentin-positiver Zellen in der Asciteskultur unter dem Anteil in der Tumorkultur. Ein einheitlicher Trend liegt nicht vor.

Vimentin dient zur Identifizierung mesenchymaler Zellen, jedoch wurde die Co-Expression von Vimentin und Cytokeratin in 10 – 57% der Karzinome, auch an Ovarialkarzinomen, nachgewiesen (Azumi and Battifora, 1987, Osborn et al., 1984). Aufgrund der in der FISH-Untersuchung gezeigten hohen Tumorzellanteile kann angenommen werden, dass es sich bei den vimentin-positiven Zellen auch um Tumorzellen handeln kann. Der Nachweis mesenchymaler Marker kann durch die Kultur der Zellen außerhalb ihres Ursprungsgewebes bedingt sein. Ebenso ist eine mesenchymale-epitheliale Transition denkbar (s. u.).

Die Färbung mit dem Anti-Cytokeratin-Antikörper dient zum Nachweis der epithelialen Herkunft der Karzinomzellen. Dies ließ sich nur in bis zu 24% der Zellen vor Mauspassage zeigen, nach Mauspassage war dieser nur in Kultur 1 in 5% der Zellen nachweisbar. Der Anteil cytotkeratin-positiver Zellen ist generell gering ausgeprägt, insgesamt in den Asciteskulturen geringer als in den Tumorkulturen und nach Mauspassage geringer als in den Kulturen vor Mauspassage. Dies deutet auf einen Verlust des epithelialen Phänotyps der Karzinomzellen hin, sofern man die

Zellen über ihren genetischen Status in den FISH-Experimenten als Tumorzellen definiert.

Die Färbung mit dem Antikörper Ep-Cam dient zum Nachweis entarteter Epithelzellen. Vor Mauspassage ließen sich 0 bis 47% der Zellen anfärben, wobei der geringe Anteil in Kultur 1 auch auf das Vorhandensein von Fibroblasten zurückzuführen ist. Nach der Mauspassage zeigt sich in allen Kulturen eine Zunahme des Anteils an Ep-Cam-positiven Zellen in geringer bis starker Ausprägung auf Werte von 33 bis zu 86%. Der Vergleich zwischen den Tumor- und Asciteskulturen zeigt keinen einheitlichen Trend. Bei Ovarialkarzinomen zeigt sich kein Unterschied in der Ep-Cam-Expression abhängig vom histologischen Typ oder des Differenzierungsgrades (Heinzelmann-Schwarz et al., 2004, Kim et al., 2003), in Tumorstadium III und IV wurden niedrigere Ep-Cam-Expressionen beobachtet als in Stadium I (Kim et al., 2003). Ep-Cam negative Tumorzellen könnten eine reduzierte Zell-Zell-Adhäsion aufweisen (Tai et al., 2007), bei Kopf-Hals-Tumoren wurde gezeigt, dass Metastasen eine geringere Ep-Cam-Expression aufwiesen als der korrespondierende Primärtumor (Takes et al., 2001). Unterschiede in der Expression epithelialer Marker können, ebenso wie das Auftreten mesenchymaler Marker, sowohl zellkulturbedingt auftreten, als auch im Rahmen einer epithelial-mesenchymalen Transition.

5.2. Epithelial-Mesenchymale-Transition (EMT)

Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Immunhistochemie und den FISH-Ergebnissen erlaubt ein Modell, das diesen Unterschied durch eine Entdifferenzierung der Tumorzellen erklärt.

Dieser kann eine Epithelial-Mesenchymale-Transition (EMT) der Tumorzellen zugrunde liegen. Die EMT ist ein bereits aus der Entwicklungsbiologie bekannter Prozess. Die zuerst gebildeten Epithelzellen liegen einer Basalmembran auf und migrieren in den sogenannten Primitivstreifen (Zvaifler, 2006). Karzinome bestehen aus epithelialen Zellen die durch Zell-Zell-Kontakte miteinander verbunden sind und durch die Basalmembran vom Stroma getrennt sind. Bei einer EMT gehen epitheliale Charakteristika z.B. die Expression von Cytokeratinen verloren und die Zellen nehmen mesenchymale Charakteristika an. Proteine wie N-Cadherin und Vimentin werden hochreguliert. Diese Zellen entwickeln die Fähigkeit, durch die Basalmembran zu migrieren (Acloque et al., 2008, Guarino, 2007, Hugo et al., 2007).

Dies konnte auch experimentell an Ovarialkarzinomzelllinien gezeigt werden (Colomiere et al., 2009). In einem Modell zur Progression des Ovarialkarzinoms wird die Absiedelung von Zellen aus dem Primärtumor nach durchlaufen einer EMT und die Ansiedelung von solchen Zellklonen als Metastasen propagiert (Ahmed et al., 2007).

5.3. Interpretation der Mauspassage und der Transmigrationsassays

Alle untersuchten Kulturen waren in der Lage in Mäusen Tumore zu bilden, das tumorigene Potential der Primärkulturen wurde nachgewiesen.

Um die Fähigkeit zur Gewebeinvasion der Zellen unserer Primärkulturen beurteilen zu können, wurden die Transmigrationsassays durchgeführt. Die Fähigkeit zur Gewebeinvasion ist eine der Fähigkeiten, die eine Zelle bei der Entwicklung zu einer Tumorzelle erlangen muss (Hanahan and Weinberg, 2000). Bei allen Kulturen zeigten sich migrierte Zellen in deutlich höherer Anzahl als bei den als Negativkontrolle verwendeten Fibroblasten. Es ließ sich jedoch kein einheitlicher Trend beim Vergleich zwischen den korrespondierenden Tumor- und Asciteskulturen oder beim Vergleich der korrespondierenden Kulturen vor und nach Mauspassage zeigen.

An Kopf-Hals-Tumoren wurde eine reduzierte Ep-Cam-Expression bei Metastasen im Vergleich zum Primärtumor beschrieben (Takes et al., 2001). Überträgt man diese Beobachtung auf unsere Kulturen, könnte angenommen werden, dass ein geringer Anteil Ep-Cam-positiver Zellen mit einer hohen Motilität korreliert. Dieser Zusammenhang lässt sich aber nicht zeigen. Auch ein Zusammenhang zwischen dem Anteil der vimentin-positiven Zellen und dem Grad der Motilität lässt sich nicht darstellen. Zusammenfassend lässt sich aber feststellen, dass die Kulturen nicht den für Karzinomzellen zu erwartenden epithelialen Charakter zeigen, sondern epitheliale Marker reduziert sind. Eine Zunahme mesenchymaler Marker hat stattgefunden und eine erhöhte Motilität der Zellen besteht. Um die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen oder Unterschiede zwischen Primärkulturen aus Tumor oder Ascites statistisch miteinander vergleichen zu können wäre eine größere Fallzahl notwendig.

5.4. Interpretation der CGH

Die in den Kulturen gefundenen Aberrationen passen zu den an Ovarialkarzinomen häufig beschriebenen Veränderungen, z.B. der Zugewinn an 3q (Arnold et al., 1996) und der Verlust an 13q (Kiechle et al., 2001).

Die häufigen Übereinstimmungen der Aberrationen zwischen den Tumor- und Asciteskulturen vor und nach Mauspassage deuten daraufhin, dass diese Veränderungen im Rahmen der Tumorgenese entstehen und es sich bei allen Kulturen um vergleichbare Tumorzellpopulationen handelt. Dies scheint sowohl für Tumorzellen und Asciteszellen der jeweiligen Patienten als auch für die Zellpopulationen vor und nach der Mauspassage zu gelten. Da ein Zugewinn an 3q sowie Verluste an 13q und 17p in 5 der 6 Kulturen nach Mauspassage vorliegen, könnten dies typische Aberrationen für fortgeschrittene Ovarialkarzinome sein. Aufgrund der geringen Fallzahl ist dies nur als Einzelfallbeobachtung zu bewerten. Ursache könnte auch ein Selektionsvorteil der Zellen mit diesen Aberrationen in dem Mausmodell sein. Verluste an 13q sind als typische Veränderungen an undifferenzierten Ovarialkarzinomen beschrieben worden (Kiechle et al., 2001). Die Ergebnisse der FISH-Experimente zeigen Zugewinne an den Chromosomen 3q26.2 und 8q24.1 in allen Kulturen (Abb. 13). In der CGH sind keine Zugewinne an Chromosom 3q in den Kulturen K1, K2, K3, K6 und K8 detektierbar, Zugewinne an Chromosom 8q lassen sich nur an Kultur K7 und K9 zeigen. In allen Kulturen lassen sich Fusionen der Bereiche 19p13.13 und 11q13.1 nachweisen. Korrespondierende Überrepräsentationen zeigen die CGH-Ergebnisse jedoch nicht auf. Die CGH vermag nur Imbalancen nachzuweisen, die mindestens 5-10 MB groß sind. Zudem ist auch eine das gesamte Genom umfassende Polyploidie mit CGH kaum nachweisbar. Mit den FISH-Experimenten kann aber nur eine Aussage über die Präsenz des der FISH-Sonde homologen Bereichs getroffen werden. Deren erhöhte Präsenz im Rahmen einer das gesamte Genom umfassende Polyploidie ist jedoch dann erkennbar.

5.5. Interpretation der FISH und FICTION

Bei der Etablierung der FISH-Sonden wurde der cut-off an Nicht-Tumorzellen ermittelt, um zu zeigen, dass die Sonde verlässlich zur Unterscheidung von Tumor und Nicht-Tumorzellen tauglich ist (siehe Material und Methoden). Die FISH-Experimente mit der Sonde (7cen, 3q26.2, 8q24.1) dienen zur Kontrolle des Ploidiegrades und auf Amplifikationen oder Deletionen an 3q und 8q. Zugewinne an den Chromosomen 3q und 8q sind häufig an Ovarialkarzinomen in der CGH festgestellte Veränderungen (Arnold et al. 1996, Kiechle et al. 2001). Tumorzellen, die nur andere genetische Veränderungen aufweisen, mit diploiden Chromosomensatz, lassen sich mit dieser Sonde nicht als Tumorzellen identifizieren. Eine genetisch nicht veränderte Zelle zeigt je 2 Signale für 7cen, 3q und 8q. In Kultur 1 zeigen 26% der Zellen dieses Signalmuster. Dies passt zu den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbungen, durch die die Mitkultivierung von Fibroblasten in dieser Kultur gezeigt werden konnte. Bei 74% der Zellen liegt eine andere Signalkombination als 2 Signale für 7cen, 3q und 8q vor, sie sind also genetisch verändert. In alle weiteren Kulturen sind sowohl vor als auch nach Mauspassage nahezu 100% der Zellen genetisch verändert.

Die Sonde t(11q13.1; 19p13.13) dient zur Untersuchung der Zellen auf Translokationen der Chromosomen 11 und 19, eine in unserem Tumormaterial häufig gefundene Translokation (persönliche Mitteilung durch Dr. Jörg Weimer). In Kultur 1 liegt die Anzahl bei 52% der Zellen. Nach Mauspassage liegt die Anzahl bei 96%. Dies lässt sich durch die in Kultur 1 beobachtete Mitkultivierung von Fibroblasten erklären. In Ascites 2 (Kultur 4) liegt die Anzahl vor Mauspassage unter dem ermittelten cut-off (26%), nach Mauspassage bei 76%. Hier scheint eine Selektion hin zu den Zellen mit Translokation vorzuliegen. Die Anzahl der Zellen mit Translokation liegt bei den anderen Kulturen vor und nach Mauspassage bei ca. 80%. Die Untersuchungen mit dieser Sonde deuten also auch auf einen sehr hohen Anteil an Ovarialkarzinomzellen hin. Da es sich bei den Kulturen um heterogene Zellgemische handelt, bedeutet das Nichtvorhandensein der Translokation in einer Zelle im Umkehrschluss nicht, dass es sich bei der Zelle nicht auch um eine Tumorzelle handeln kann. Dies lässt sich dadurch erklären, dass in der FISH nur gezielt sehr kleine Bereiche der DNA untersucht werden. Isolierte Amplifikationen dieser Areale sind aufgrund der geringen Größe nicht in der CGH detektierbar.

Die Ergebnisse der FISH-Experimente legen einen Tumorzellanteil in den Kulturen von nahezu 100% nahe (bis auf Kultur 1, s. o.). Bei den immunhistochemischen Untersuchungen liegt der anzunehmende Tumorzellanteil, wenn man die Färbung mit Ep-Cam zugrunde legt, zwischen 0 und 86%, in den meisten Kulturen zwischen 15 und 52%. Insgesamt also deutlich niedriger als nach den FISH-Experimenten anzunehmen. Um diesen Unterschied näher zu betrachten wurde das FICTION-Experiment durchgeführt. So konnten Phänotyp und Genotyp der gleichen Zellen untersucht werden. Kultur 3 wurde ausgewählt, da nur ein geringer Anteil der Zellen Ep-Cam-positiv war. Auch in diesem Experiment war erwartungsgemäß nur ein geringer Anteil der Zellen Ep-Cam-positiv. Es konnte gezeigt werden, dass auch in den Ep-Cam-negativen Zellen genetische Veränderungen vorliegen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es sich um Tumorzellen handelt.

5.6. Beurteilung der Primärkulturen

Die gezeigten genetischen Untersuchungen mit den verschiedenen Verfahren legen nahe, dass es sich in den untersuchten Primärkulturen um Tumorzellen handelt.

In der Mauspassage wurde das tumorigene Potential der Kulturen gezeigt.

Die Fähigkeit der Zellen zur Invasion konnte in den Transmigrationsassay gezeigt werden. In der CGH wurden ovarialkarzinomtypische Aberrationen und in der FISH-Analyse mit zwei verschiedenen Sonden für ovarialkarzinomtypische Veränderungen ein sehr hoher Tumorzellanteil nachgewiesen.

Die immunhistochemische Analyse zeigte in einer der Kulturen mitkultivierte Fibroblasten. In allen Kulturen war ein Nachweis der Tumorzellen nur teilweise möglich, dies kann auf einen Verlust der epithelialen Marker zurückgeführt werden. Diese Diskrepanz zu den Ergebnissen der FISH-Untersuchungen wurde mit dem FICTION-Experiment untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass auch Zellen die immunhistochemisch nicht als Tumorzellen identifiziert werden können, die tumorspezifischen genetischen Veränderungen aufweisen können und damit als Tumorzellen anzusehen sind.

Zur eindeutigen Klassifikation der Zellen einer Primärkultur ist eine genetische Analyse der Zellen notwendig, eine rein immunhistochemische Klassifikation mit einzelnen Antikörpern ist nicht ausreichend. Die möglichen Veränderungen des Phänotyps müssen bei der Klassifikation berücksichtigt werden. Ob es sich bei diesen Veränderungen an den untersuchten Primärkulturen um Zellkulturartefakte

oder um einen der epithelial-mesenchymalen Transition ähnlichen Prozess oder um eine echte epithelial-mesenchymale Transition handelt kann nicht abschließend beurteilt werden.

Die Möglichkeit einer epithelial-mesenchymalen Transition sollte auch bei weiterführenden Untersuchungen in-vivo berücksichtigt werden. Bei der Suche nach disseminierten Tumorzellen z.B. in Blut oder Ascites, nach Metastasen oder nach Tumorrezidiven sollten die möglichen Veränderungen des Phänotyps in Betracht gezogen werden. Eine Charakterisierung der Kulturen ist vor der Durchführung nachfolgender Experimente, wie z.B. Wirksamkeitsstudien neuer Arzneimittelstoffe, notwendig.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung von Primärkulturen aus Ovarialkarzinomen und Ascites von Patientinnen mit Ovarialkarzinomen auf ihren Tumorzellgehalt und der Vergleich verschiedener Methoden zur Charakterisierung der Zellen. Hierzu wurden aus dem Ovarialkarzinomgewebe und dem Ascites von drei Patientinnen Primärkulturen angelegt. Diese Kulturen wurden mit immunhistochemischen Färbungen, genetischer Analyse mit „Comparative Genomic Hybridisation“ (CGH) und „Fluorescence-in-situ-Hybridisation“ (FISH), einem „fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics as a tool for investigating neoplasms“-Experiment (FICTION) und Transmigrationsassays untersucht. Das tumorigene Potential wurde durch Injektion von Zellen aus den Primärkulturen in Mäuse, mit Tumorentstehung in den Mäusen, nachgewiesen. Aus den in den Mäusen entstandenen Tumoren wurden erneut Primärkulturen angelegt und die Experimente an diesen Kulturen wiederholt.

In den immunhistochemischen Färbungen zeigte sich ein Rückgang der epithelialen Charakteristika und eine Zunahme mesenchymaler Eigenschaften der Zellen der Primärkulturen. In einer der Kulturen konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten mitkultiviert wurden. Über die Mauspassage wurden die Fibroblasten eliminiert.

In der genetischen Analyse mit „Comparative Genomic Hybridisation“ (CGH) wurden die Kulturen auf Verluste und Zugewinne auf chromosomaler Ebene untersucht. Es konnten für Ovarialkarzinome typische Aberrationen nachgewiesen werden. Die Primärkulturen aus Ovarialkarzinomgewebe und Ascites vor und nach Mauspassage der jeweiligen Patientinnen entsprechen sich weitgehend in den nachgewiesenen Aberrationen. Hier kann von dem Ursprung aus demselben Tumor ausgegangen werden. Mit der „Fluorescence-in-situ-Hybridisation“ (FISH) wurden die Zellen einzeln auf das Vorliegen ovarialkarzinomtypischer genetischer Veränderungen untersucht. In allen Kulturen (bis auf in Kultur 1 mit mitkultivierten Fibroblasten) lag der Anteil genetisch veränderter Zellen bei nahezu 100 Prozent.

Mit dem „fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics as a tool for investigating neoplasms“-Experiment (FICTION) konnte gezeigt werden, dass auch an den Zellen, bei denen der epitheliale Phänotyp, der bei Karzinomen zu erwarten wäre, nicht vorliegt, genetische Veränderungen vorhanden sind und es sich somit um Tumorzellen handelt. Als Ursache hierfür kommen kulturbedingte Veränderungen des Phänotyps oder eine sogenannte epithelial-mesenchymale Transition in

Betracht. Letztere ist aus der Entwicklungsbiologie bekannt und wird bei der Entstehung von Metastasen auch bei Ovarialkarzinomen propagiert (Colomiere et al., 2009). Diese Veränderungen gehen mit einem Wechsel des Phänotyps und der Fähigkeit der Zellen, die Basalmembran zu durchdringen, einher. Diese Fähigkeit wurde mit den Transmigrationsassays untersucht. Hierbei müssen die Zellen eine künstliche Basalmembran überwinden. An den Zellen aller Primärkulturen konnte diese Fähigkeit gezeigt werden.

Die genetische Analyse und die Fähigkeit zur Bildung von Tumoren in Mäusen untermauern die Annahme, dass es sich bei den Primärkulturen um Tumorzellen handelt. Die verwendeten immunhistochemischen Färbungen sind zum Nachweis von Tumorzellen nicht ausreichend. Sie sind aber gut geeignet um die Kulturen auf die Mitkultivierung von Fibroblasten zu untersuchen. Mit der „Comparative Genomic Hybridisation“ (CGH) können die Kulturen ohne Kenntnis der vorliegenden Veränderungen auf chromosomaler Ebene auf genetische Veränderungen gescreent werden. Mit der „Fluorescence-in-situ-Hybridisation“ (FISH) können die Zellen dann gezielt auf bestimmte Veränderungen untersucht und der Anteil an Tumorzellen bestimmt werden.

Eine Charakterisierung von Primärkulturen ist vor der Durchführung nachfolgender Experimente, wie z.B. Wirksamkeitsstudien neuer Medikamente, mit den verwendeten Methoden möglich.

Immunhistochemische Verfahren eignen sich zum Screening nach Tumorzellen in klinischem Untersuchungsmaterial und Primärkulturen, können aber aufgrund möglicher Veränderungen des Phänotyps der Zellen keinen sicheren Ausschluss von Tumorzellen liefern. Um den Tumorzellanteil zu bestimmen bietet sich die Diagnostik mit etablierten FISH-Sonden an. Lassen sich so keine Tumorzellen zeigen, sollte immunhistochemisch der Fibroblastenanteil untersucht werden. Bei niedrigem Fibroblastenanteil können die Zellen mittels CGH auf nicht bekannte genetische Veränderungen untersucht werden. Die daraus gewonnenen Informationen können zur Herstellung einer neuen FISH-Sonde genutzt werden, um so den Tumorzellanteil quantitativ bestimmen zu können.

7. Literaturverzeichnis

- Acloque, H., Thiery, J. P. & Nieto, M. A. (2008) The physiology and pathology of the EMT. Meeting on the epithelial-mesenchymal transition. *EMBO Rep*, 9, 322-6.
- AGO (2009) S2k-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren Stand Juni 2009. *Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie*
- Ahmed, N., Thompson, E. W. & Quinn, M. A. (2007) Epithelial-mesenchymal interconversions in normal ovarian surface epithelium and ovarian carcinomas: an exception to the norm. *J Cell Physiol*, 213, 581-8.
- Albini, A., Benelli, R., Noonan, D. M. & Brigati, C. (2004) The "chemoinvasion assay": a tool to study tumor and endothelial cell invasion of basement membranes. *Int J Dev Biol*, 48, 563-71.
- Arnold, N., Hagele, L., Walz, L., Schempp, W., Pfisterer, J., Bauknecht, T. & Kiechle, M. (1996) Overrepresentation of 3q and 8q material and loss of 18q material are recurrent findings in advanced human ovarian cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 16, 46-54.
- Azumi, N. & Battifora, H. (1987) The distribution of vimentin and keratin in epithelial and nonepithelial neoplasms. A comprehensive immunohistochemical study on formalin- and alcohol-fixed tumors. *Am J Clin Pathol*, 88, 286-96.
- Baguley, B. C. & Marshall, E. S. (2004) In vitro modelling of human tumour behaviour in drug discovery programmes. *Eur J Cancer*, 40, 794-801.
- Colomiere, M., Findlay, J., Ackland, L. & Ahmed, N. (2009) Epidermal growth factor-induced ovarian carcinoma cell migration is associated with JAK2/STAT3 signals and changes in the abundance and localization of alpha6beta1 integrin. *Int J Biochem Cell Biol*, 41, 1034-45.
- FIGO (2009) Current FIGO staging for cancer of the vagina, fallopian tube, ovary, and gestational trophoblastic neoplasia. *Int J Gynaecol Obstet*, 105, 3-4.
- Guarino, M. (2007) Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 2153-60.
- Hamilton, T. C., Young, R. C., McKoy, W. M., Grotzinger, K. R., Green, J. A., Chu, E. W., Whang-Peng, J., Rogan, A. M., Green, W. R. & Ozols, R. F. (1983) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Res*, 43, 5379-89.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- Heinzelmann-Schwarz, V. A., Gardiner-Garden, M., Henshall, S. M., Scurry, J., Scolyer, R. A., Davies, M. J., Heinzelmann, M., Kalish, L. H., Bali, A., Kench, J. G., Edwards, L. S., Vanden Bergh, P. M., Hacker, N. F., Sutherland, R. L. & O'Brien, P. M. (2004) Overexpression of the cell adhesion molecules DDR1, Claudin 3, and Ep-CAM in metaplastic ovarian epithelium and ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 10, 4427-36.
- Holbeck, S. L. (2004) Update on NCI in vitro drug screen utilities. *Eur J Cancer*, 40, 785-93.
- Hugo, H., Ackland, M. L., Blick, T., Lawrence, M. G., Clements, J. A., Williams, E. D. & Thompson, E. W. (2007) Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol*, 213, 374-83.
- Kiechle, M., Jacobsen, A., Schwarz-Boeger, U., Hedderich, J., Pfisterer, J. & Arnold, N. (2001) Comparative genomic hybridization detects genetic imbalances in primary ovarian carcinomas as correlated with grade of differentiation. *Cancer*, 91, 534-40.

- Kim, J. H., Herlyn, D., Wong, K. K., Park, D. C., Schorge, J. O., Lu, K. H., Skates, S. J., Cramer, D. W., Berkowitz, R. S. & Mok, S. C. (2003) Identification of epithelial cell adhesion molecule autoantibody in patients with ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 9, 4782-91.
- Kleinman, H. K. & Martin, G. R. (2005) Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol*, 15, 378-86.
- Lacroix, M. (2008) Persistent use of "false" cell lines. *Int J Cancer*, 122, 1-4.
- Lux, M. P., Fasching, P. A. & Beckmann, M. W. (2006) Hereditary breast and ovarian cancer: review and future perspectives. *J Mol Med*, 84, 16-28.
- Martin-Subero, J. I., Chudoba, I., Harder, L., Gesk, S., Grote, W., Novo, F. J., Calasanz, M. J. & Siebert, R. (2002) Multicolor-FICTION: expanding the possibilities of combined morphologic, immunophenotypic, and genetic single cell analyses. *Am J Pathol*, 161, 413-20.
- Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B. & Krepler, R. (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 31, 11-24.
- Momburg, F., Moldenhauer, G., Hammerling, G. J. & Moller, P. (1987) Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues. *Cancer Res*, 47, 2883-91.
- Montag, A. G., Pinkus, G. S. & Corson, J. M. (1988) Keratin protein immunoreactivity of sarcomatoid and mixed types of diffuse malignant mesothelioma: an immunoperoxidase study of 30 cases. *Hum Pathol*, 19, 336-42.
- Olson, P. & Hanahan, D. (2009) Cancer. Breaching the cancer fortress. *Science*, 324, 1400-1.
- Osborn, M., Debus, E. & Weber, K. (1984) Monoclonal antibodies specific for vimentin. *Eur J Cell Biol*, 34, 137-43.
- Palayekar, M. J. & Herzog, T. J. (2008) The emerging role of epidermal growth factor receptor inhibitors in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 18, 879-90.
- Pecorelli, S., Benedet, J. L., Creasman, W. T. & Shepherd, J. H. (1999) FIGO staging of gynecologic cancer. 1994-1997 FIGO Committee on Gynecologic Oncology. International Federation of Gynecology and Obstetrics. *Int J Gynaecol Obstet*, 64, 5-10.
- Robert-Koch-Institut, G. d. e. K. i. D. e. V. (2008) Krebs in Deutschland 203 - 2004. Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Auflage.
- Saalbach, A., Aneregg, U., Bruns, M., Schnabel, E., Herrmann, K. & Haustein, U. F. (1996) Novel fibroblast-specific monoclonal antibodies: properties and specificities. *J Invest Dermatol*, 106, 1314-9.
- Schmalfeldt, B., du Bois, A., Burges, A., Emons, G., Fink, D., Gropp, M., Hasenburg, A., Jager, W., Kimmig, R., Kiechle, M., Kommoss, F., Kreienberg, R., Kuhn, W., Luck, H. J., Meier, W., Munstedt, K., Ortmann, O., Pfisterer, J., Richter, B., Runnebaum, I., Schroder, W., Sehouli, J., Tanner, B., Wagner, U. & Weis, J. (2006) [Diagnosis and treatment of malignant ovarian tumors 2005: recommendations of the Kommission Ovar of the AGO]. *Zentralbl Gynakol*, 128, 11-7.
- Tai, K. Y., Shiah, S. G., Shieh, Y. S., Kao, Y. R., Chi, C. Y., Huang, E., Lee, H. S., Chang, L. C., Yang, P. C. & Wu, C. W. (2007) DNA methylation and histone modification regulate silencing of epithelial cell adhesion molecule for tumor invasion and progression. *Oncogene*, 26, 3989-97.

- Takes, R. P., Baatenburg de Jong, R. J., Wijffels, K., Schuurin, E., Litvinov, S. V., Hermans, J. & van Krieken, J. H. (2001) Expression of genetic markers in lymph node metastases compared with their primary tumours in head and neck cancer. *J Pathol*, 194, 298-302.
- Telenius, H., Carter, N. P., Bebb, C. E., Nordenskjold, M., Ponder, B. A. & Tunnacliffe, A. (1992) Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*, 13, 718-25.
- Weber-Matthiesen, K., Winkemann, M., Muller-Hermelink, A., Schlegelberger, B. & Grote, W. (1992) Simultaneous fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics: a contribution to the characterization of tumor cells. *J Histochem Cytochem*, 40, 171-5.
- Weimer, J., Kiechle, M., Senger, G., Wiedemann, U., Ovens-Raeder, A., Schuierer, S., Kautza, M., Siebert, R. & Arnold, N. (1999) An easy and reliable procedure of microdissection technique for the analysis of chromosomal breakpoints and marker chromosomes. *Chromosome Res*, 7, 355-62.
- Weimer, J., Koehler, M. R., Wiedemann, U., Attermeyer, P., Jacobsen, A., Karow, D., Kiechl, M., Jonat, W. & Arnold, N. (2001) Highly comprehensive karyotype analysis by a combination of spectral karyotyping (SKY), microdissection, and reverse painting (SKY-MD). *Chromosome Res*, 9, 395-402.
- Whittemore, A. S., Harris, R. & Itnyre, J. (1992) Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. II. Invasive epithelial ovarian cancers in white women. Collaborative Ovarian Cancer Group. *Am J Epidemiol*, 136, 1184-203.
- Zvaifler, N. J. (2006) Relevance of the stroma and epithelial-mesenchymal transition (EMT) for the rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*, 8, 210.

9. **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1:	Erworbene Fähigkeiten von Krebszellen modifiziert nach (Hanahan and Weinberg, 2000).....	3
Abb. 2:	Exemplarische Bilder für ungefärbte Primärkulturen.....	27
Abb. 3:	Übersicht über die Ergebnisse der IHC-Färbungen.....	28
Abb. 4:	Exemplarische Bilder für die verwendeten Antikörper an Zellen der Patientin 1 vor Mauspassage, Kultur 1.....	29
Abb. 5:	Exemplarische Bilder für die verwendeten Antikörper an Zellen der Patientin 1 nach Mauspassage, Kultur 7.....	30
Abb. 6:	Übersicht über die Ergebnisse der Transmigrationsassays.....	31
Abb. 7:	Exemplarische Bilder der Transmigrationsassays.....	32
Abb. 8:	Übersicht über die Abberationen in den CGH-Untersuchungen....	33
Abb. 9:	Überblick über den Anteil der Zellen mit Translokation t(11q13.1; 19p13.13).....	36
Abb. 10:	Normale Metaphase mit Sonde t(11q13.1; 19p13.13).....	37
Abb. 11:	Interphase-FISH mit der Sonde t(11;19).....	38
Abb. 12:	Überblick über den Anteil der genetisch veränderten Zellen bei Untersuchung mit der Sonde (7cen, 3q26.2, 8q24.1).....	39
Abb. 13:	Metaphase und Interphase mit Sonde (7cen, 3q26.2, 8q24.1).....	41
Abb. 14:	Exemplarische Darstellung eines FICTION-Experiments.....	42
Abb. 15:	Original CGH-Daten Kultur 1.....	59
Abb. 16:	Original CGH-Daten Kultur 2.....	59
Abb. 17:	Original CGH-Daten Kultur 3.....	60
Abb. 18:	Original CGH-Daten Kultur 4.....	60
Abb. 19:	Original CGH-Daten Kultur 5.....	61
Abb. 20:	Original CGH-Daten Kultur 6.....	61
Abb. 21:	Original CGH-Daten Kultur 7.....	62
Abb. 22:	Original CGH-Daten Kultur 8.....	62
Abb. 23:	Original CGH-Daten Kultur 9.....	63
Abb. 24:	Original CGH-Daten Kultur 10.....	63
Abb. 25:	Original CGH-Daten Kultur 11.....	64
Abb. 26:	Original CGH-Daten Kultur 12.....	64

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Staging des Ovarialkarzinoms (modifiziert nach (FIGO, 2009)).....	2
Tab. 2: Übersicht über die Primärkulturen.....	9
Tab. 3: Zuordnung der Aberrationen zu den einzelnen Kulturen.....	34
Tab. 4: Ergebnisse der FISH-Experimente mit der Sonde (7cen, 3q26.2, 8q24.1).....	40
Tab. 5: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen.....	57
Tab. 6: Ergebnisse der Transmigrationsassays.....	58
Tab. 7: Ergebnisse der FISH-Experimente mit der Sonde t(11;19).....	58
Tab. 8: Ergebnisse der FISH-Experimente mit der Sonde (7cen, 3q26.2, 8q24.1).....	58

10. Anhang

Tabelle 5:

Kultur	Anzahl positiver Zellen	Antikörper
	in %	
K1	33	CD90
	47	Ep-Cam
	24	Cytok
	69	Vim

Kultur	Anzahl positiver Zellen	Antikörper
	in %	
K7	0	CD90
	49	Ep-Cam
	5	Cytok
	37	Vim

K2	0	CD90
	0	Ep-Cam
	0	Cytok
	48	Vim

K8	0	CD90
	40	Ep-Cam
	0	Cytok
	29	Vim

K3	0	CD90
	15	Ep-Cam
	10	Cytok
	10	Vim

K9	0	CD90
	33	Ep-Cam
	0	Cytok
	54	Vim

K4	0	CD90
	18	Ep-Cam
	0	Cytok
	52	Vim

K10	0	CD90
	52	Ep-Cam
	0	Cytok
	40	Vim

K5	0	CD90
	26	Ep-Cam
	22	Cytok
	100	Vim

K11	0	CD90
	86	Ep-Cam
	0	Cytok
	77	Vim

K6	0	CD90
	35	Ep-Cam
	5	Cytok
	100	Vim

K12	0	CD90
	37	Ep-Cam
	0	Cytok
	96	Vim

Tab. 5: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen
Für jede Kultur ist die Anzahl der positiv gefärbten Zellen für den jeweils verwendeten Antikörper angegeben.

Kultur	Anzahl migrierter Zellen	Kultur	Anzahl migrierter Zellen
	K1		59
K2	53	K8	123
K3	139	K9	114
K4	112	K10	113
K5	66	K11	82
K6	114	K12	61
Kontrollzellen			
OvCar8	320		
Fibroblasten	4		

Tab. 6: Ergebnisse der Transmigrationsassays

Zu den jeweiligen Kulturen ist die Anzahl der migrierten Zellen eingetragen.

Kulturen vor Mauspassage	Anzahl Zellen mit Fusion t(11;19) in %	Kulturen nach Mauspassage	Anzahl Zellen mit Fusion t(11;19) in %
K1	52	K7	96
K2	78	K8	80
K3	78	K9	78
K4	6	K10	76
K5	78	K11	86
K6	84	K12	80

Tab 7: Ergebnisse der FISH-Experimente mit der Sonde t(11;19)

Den Kulturnummern ist die Anzahl der Zellen mit Fusion t(11;19) in % zugeordnet.

Kulturen vor Mauspassage	Anzahl genetisch veränderter Zellen in %	Kulturen nach Mauspassage	Anzahl genetisch veränderter Zellen in %
K1	52	K7	96
K2	78	K8	80
K3	78	K9	78
K4	6	K10	76
K5	78	K11	86
K6	84	K12	80

Tab 8: Ergebnisse der FISH-Experimente mit der Sonde (7cen, 3q26.2, 8q24.1)

Eine genetisch nicht veränderte Zellen weist 2 rote, 2 grüne und 2 blaue Signale auf. Genetisch veränderte Zellen sind alle Zellen mit einem Signalmuster \neq 2 blaue, 2 grüne, 2 rote Signale.

Abb. 15: CGH Kultur 1

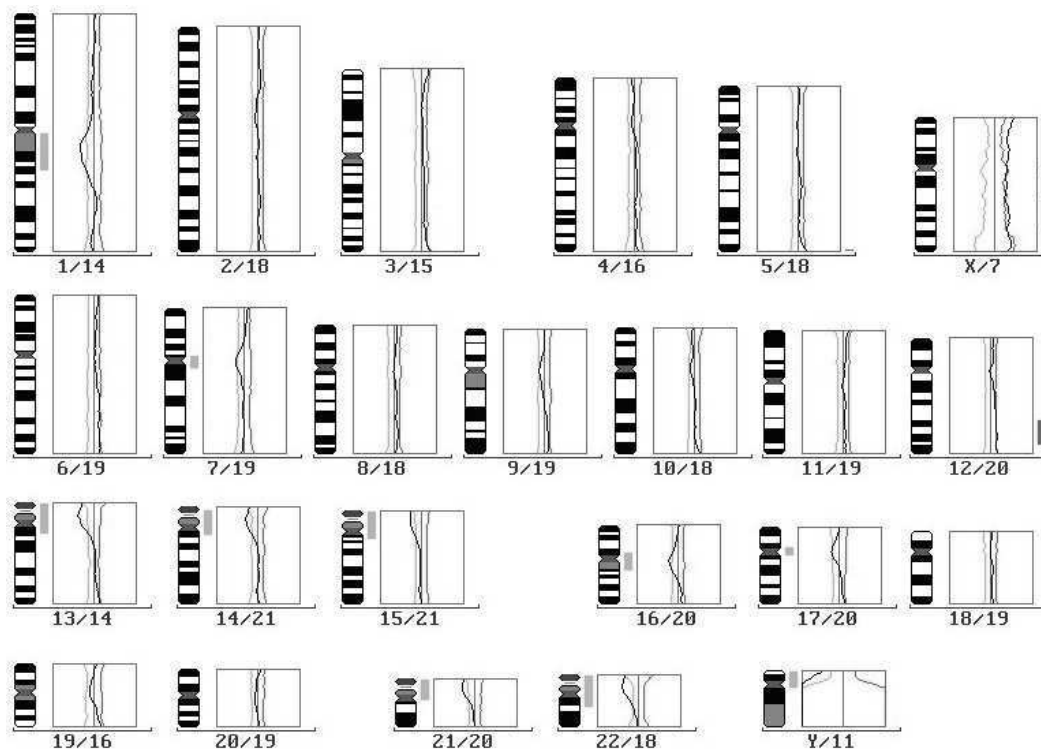


Abb.16: CGH Kultur 2

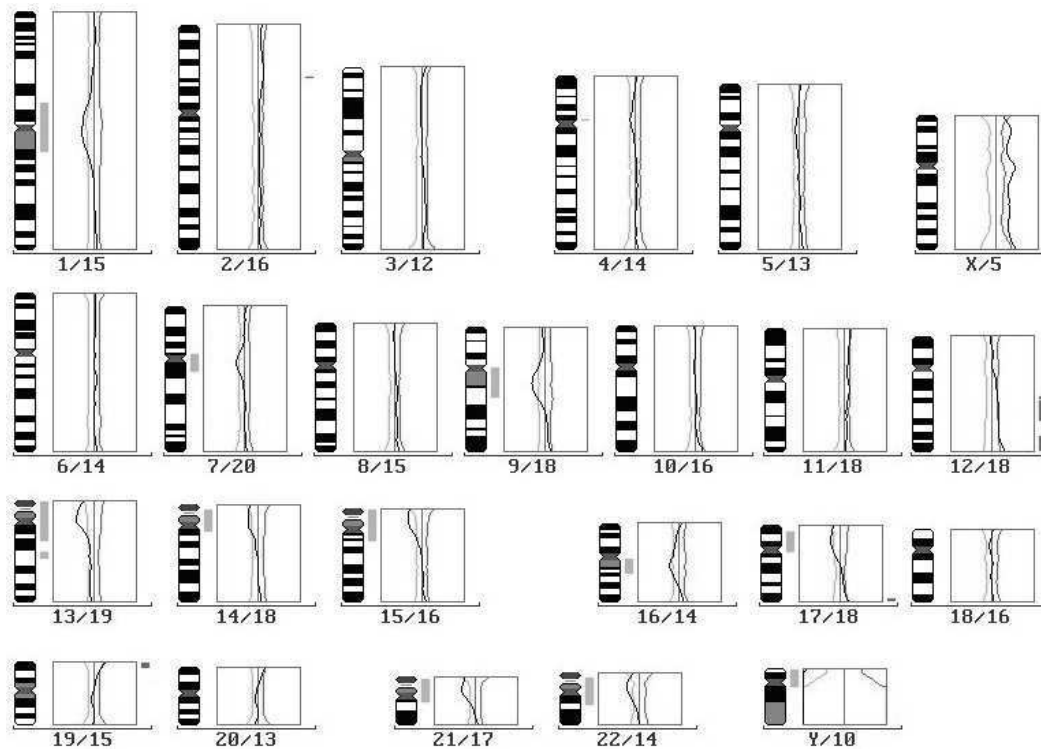


Abb. 15 und Abb. 16: Original CGH-Daten der einzelnen Kulturen. Die DNA der Primärkulturen wurde gegen männliche Kontroll-DNA aufgetragen. Verluste sind nach links aufgetragen, Zugewinne nach rechts.

Abb. 17: CGH Kultur 3

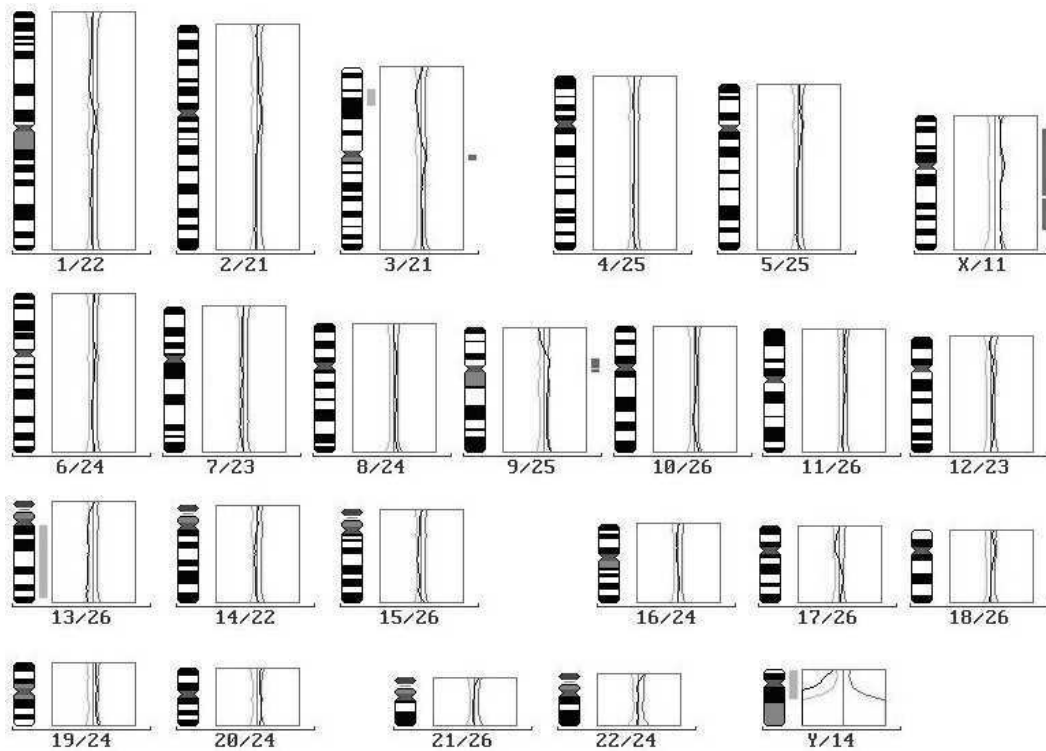


Abb. 18: CGH Kultur 4

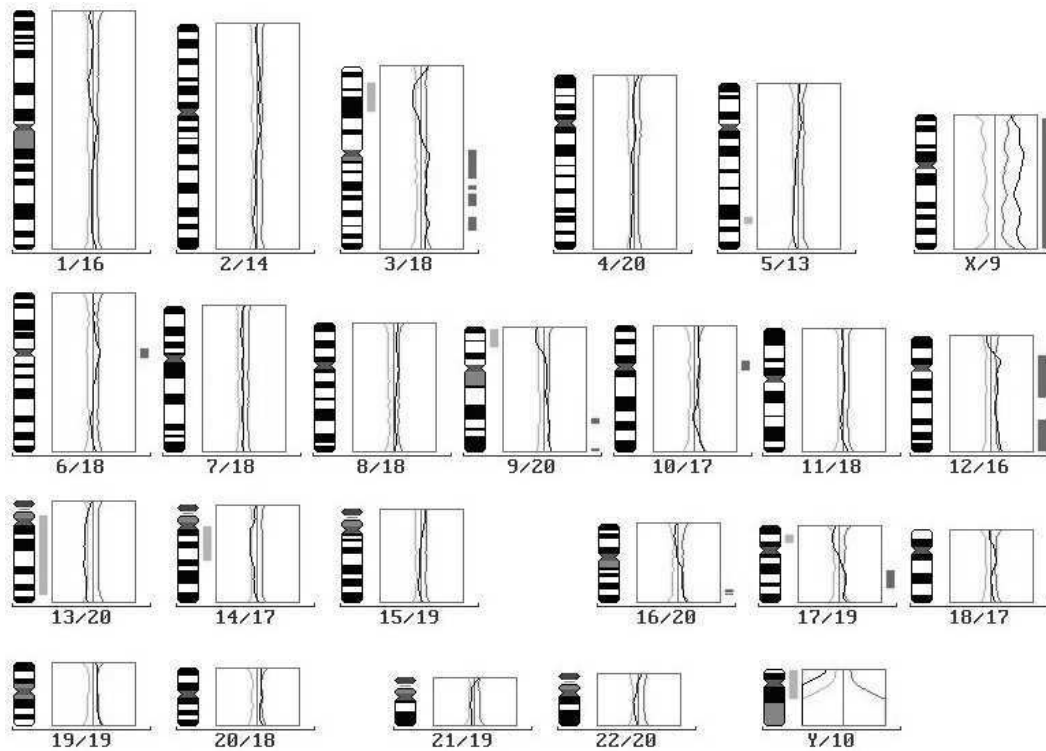


Abb. 17 und Abb. 18: Original CGH-Daten der einzelnen Kulturen. Die DNA der Primärkulturen wurde gegen männliche Kontroll-DNA aufgetragen. Verluste sind nach links aufgetragen, Zugewinne nach rechts.

Abb. 19: CGH Kultur 5

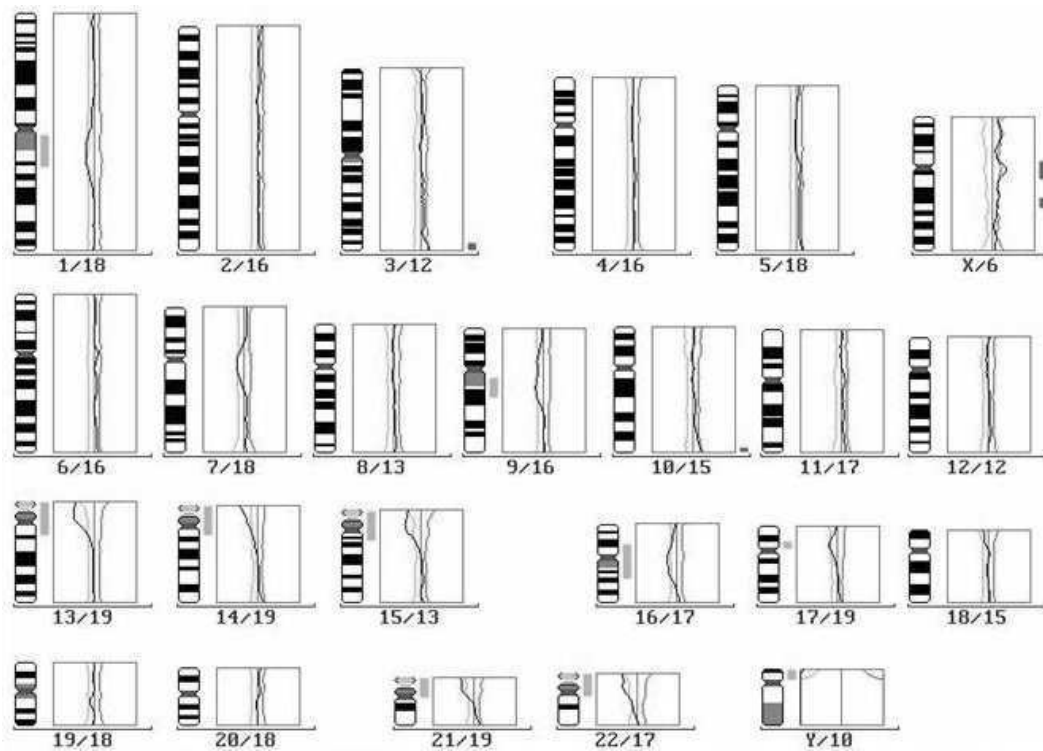


Abb. 20: CGH Kultur 6

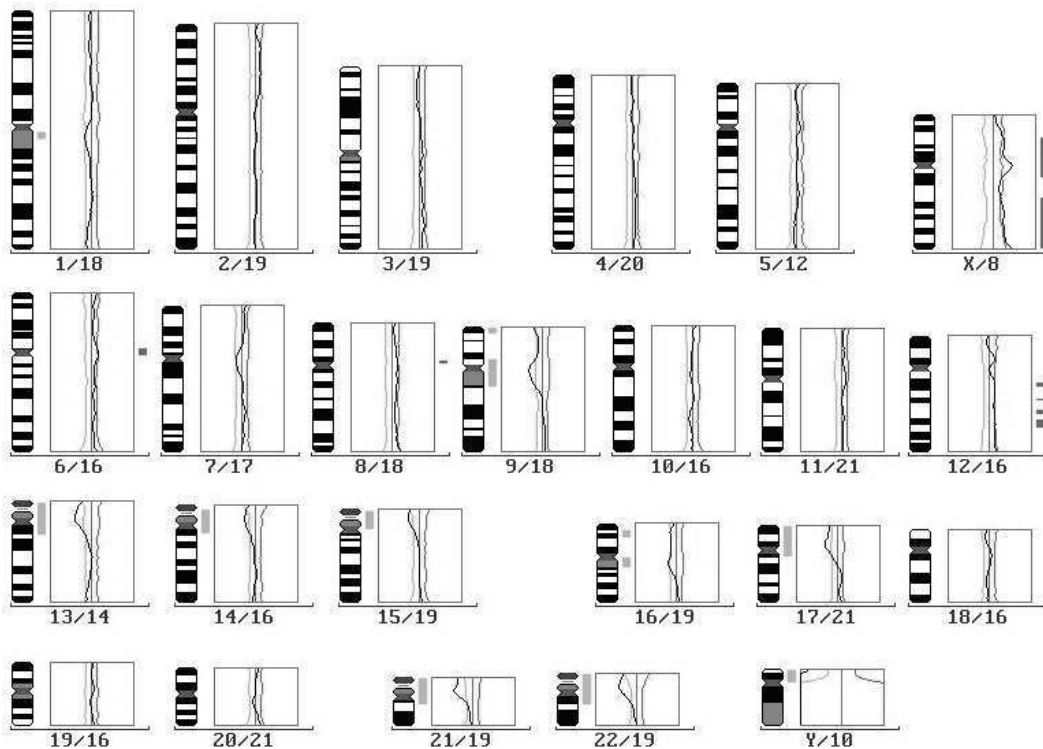


Abb. 19 und Abb. 20: Original CGH-Daten der einzelnen Kulturen. Die DNA der Primärkulturen wurde gegen männliche Kontroll-DNA aufgetragen. Verluste sind nach links aufgetragen, Zugewinne nach rechts.

Abb. 21: CGH Kultur 7

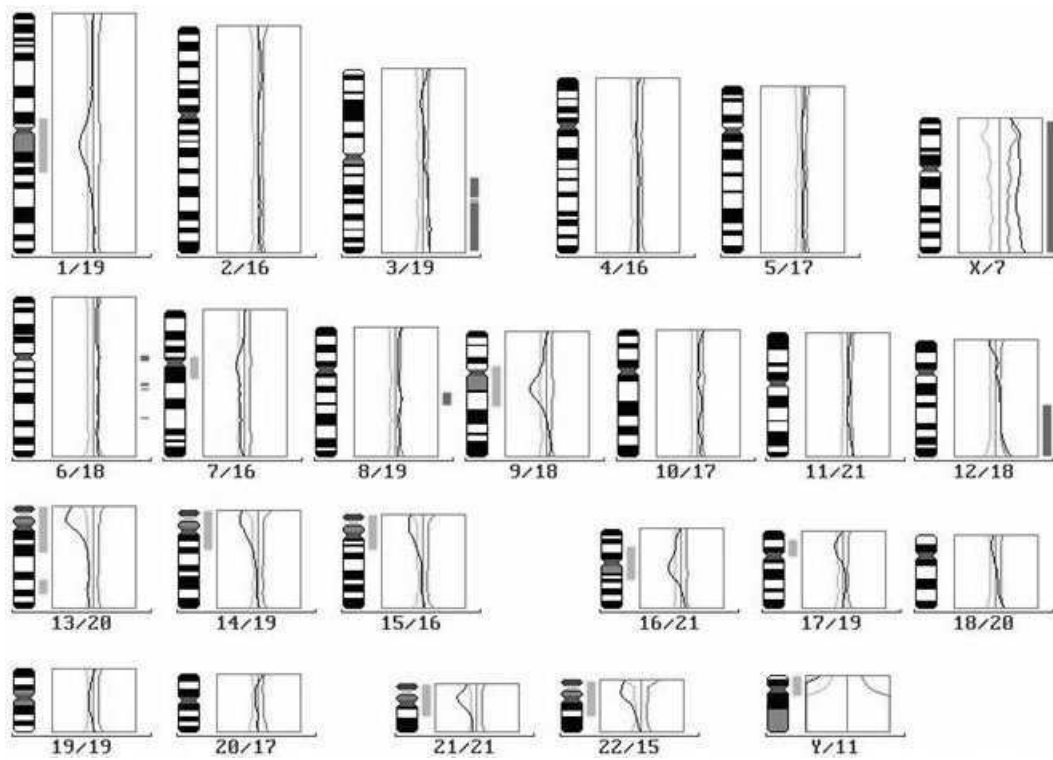


Abb 22: CGH Kultur 8

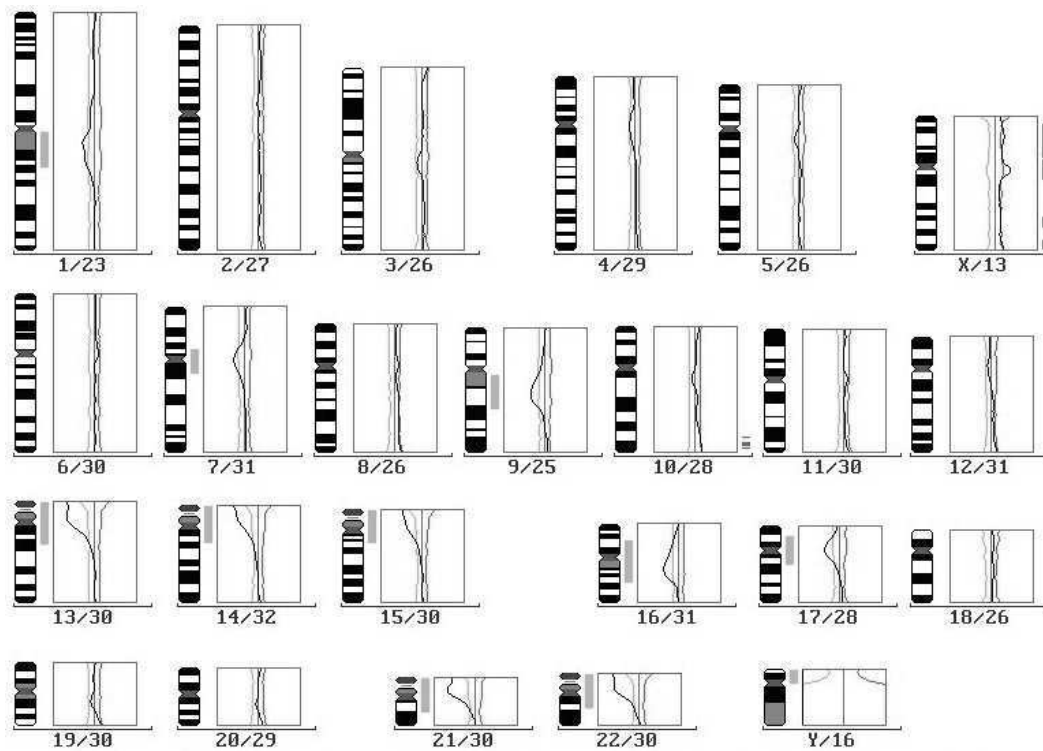


Abb. 21 und Abb. 22: Original CGH-Daten der einzelnen Kulturen. Die DNA der Primärkulturen wurde gegen männliche Kontroll-DNA aufgetragen. Verluste sind nach links aufgetragen, Zugewinne nach rechts.

Abb 23: CGH Kultur 9

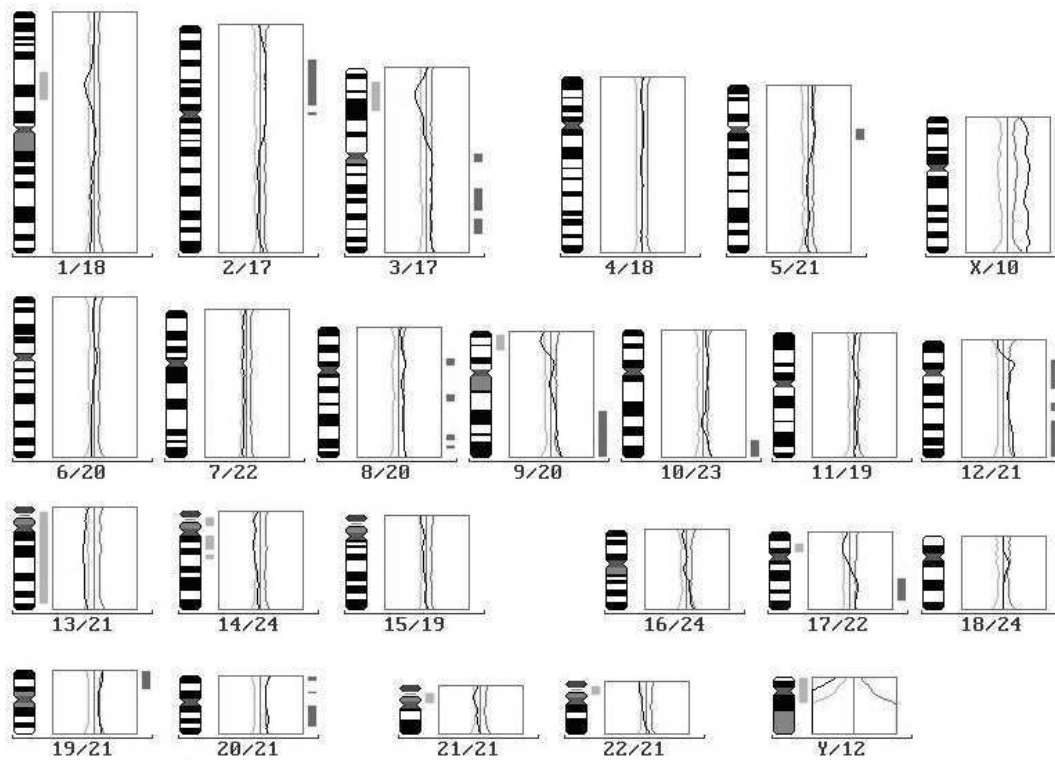


Abb 24: CGH Kultur 10

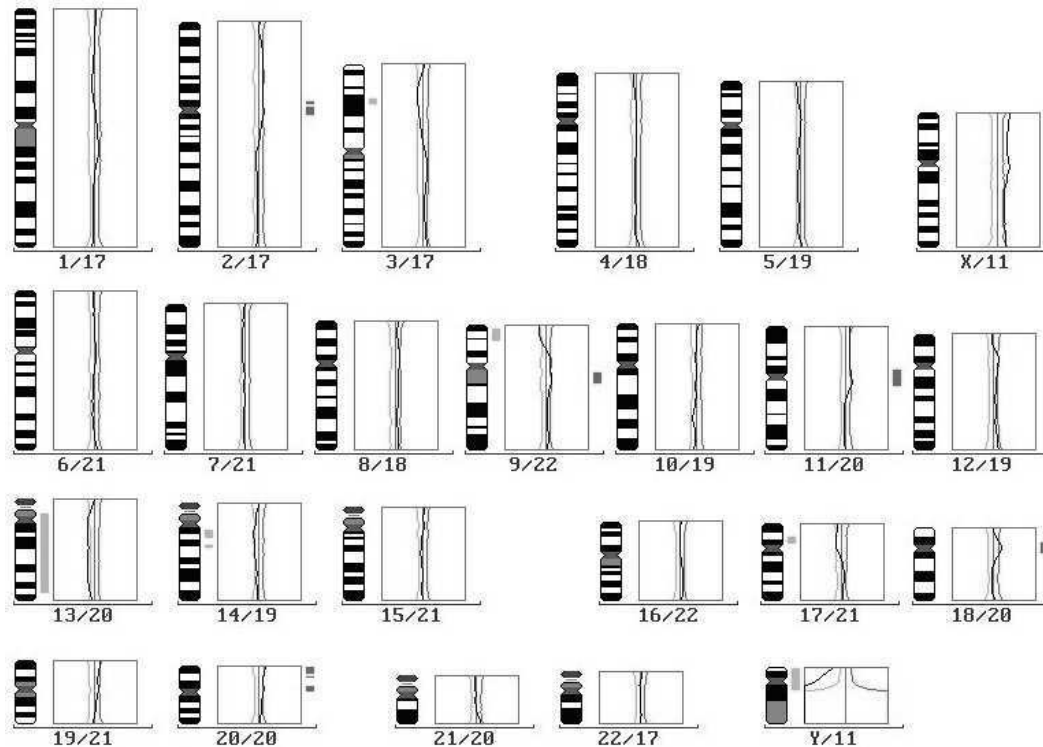


Abb. 23 und Abb. 24: Original CGH-Daten der einzelnen Kulturen. Die DNA der Primärkulturen wurde gegen männliche Kontroll-DNA aufgetragen. Verluste sind nach links aufgetragen, Zugewinne nach rechts.

Abb 25: CGH Kultur 11

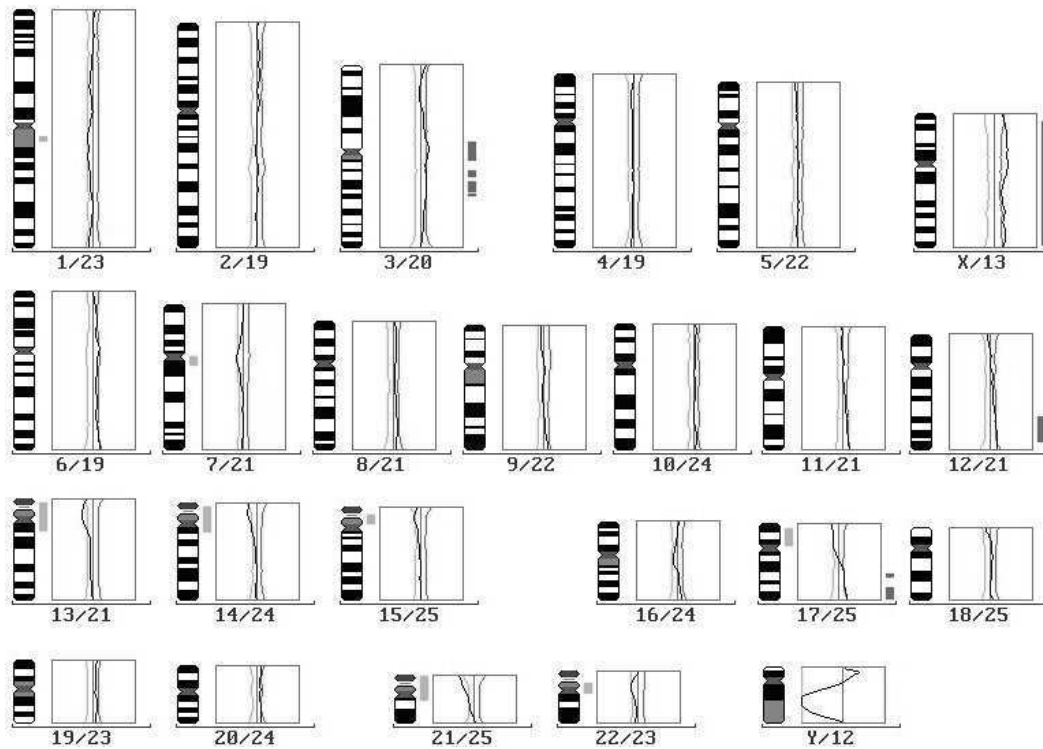


Abb 26: CGH Kultur 12

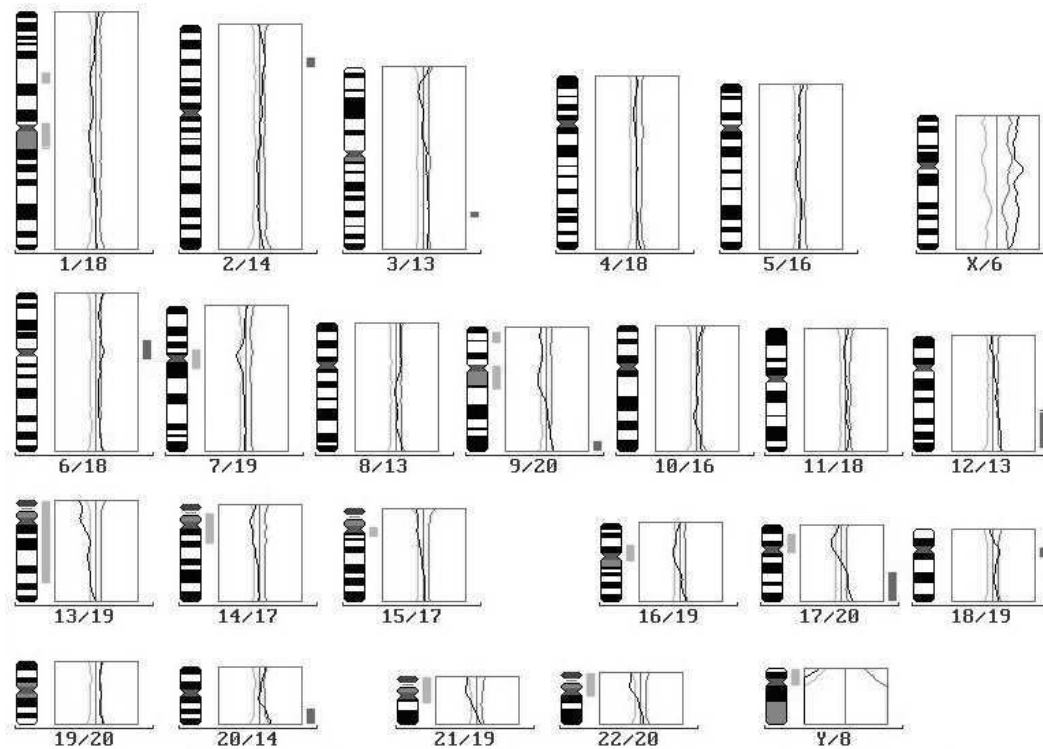


Abb. 25 und Abb. 26: Original CGH-Daten der einzelnen Kulturen. Die DNA der Primärkulturen wurde gegen männliche Kontroll-DNA aufgetragen. Verluste sind nach links aufgetragen, Zugewinne nach rechts.

11. Danksagung

Mein Dank gilt

Prof. Dr. Dr. h.c. W. Jonat für die Möglichkeit zur Erstellung dieser Arbeit in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, UK-SH, Campus Kiel,

Prof. Dr. N. Arnold für die Überlassung der Fragestellung, die Möglichkeit zum wissenschaftlichen Arbeiten und das Vertrauen,

Dr. J. Weimer für die fachliche und freundschaftliche Unterstützung,

den medizinisch-technischen Assistentinnen und Assistenten Regina Grunewald, Doris Karow und Frank Rösel für die umfangreiche Anleitung und Unterstützung bei der experimentellen Durchführung der Arbeit und die immer angenehme Arbeitsatmosphäre,

M. Bahr und M. Leidecker der Firma Bayer-Schering Pharma AG, Berlin für die Durchführung der tierexperimentellen Arbeiten.

12. Lebenslauf

Geburtsdatum und -ort: 6. Oktober 1977 in Hamburg

Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung:

08/84 – 05/86 Grundschule Wallrabenstein, Hünstetten, Hessen
05/86 – 08/88 Grundschule Bollenberg, Haan, NRW
08/88 – 09/94 Städtisches Gymnasium, Haan, NRW
09/94 – 07/95 Mojave Highschool, California City, CA, USA
07/95 – 06/97 Städtisches Gymnasium, Haan. NRW

Zivildienst:

07/97 – 07/98 Labor für molekulare Therapieforschung
Universitätsklinik Bonn

Universitätsstudium:

10/98 – 10/01 Studium der Humanmedizin, Universität Ulm
10/01 – 10/04 Studium der Humanmedizin, Universität Kiel
09/00 Ärztliche Vorprüfung Humanmedizin
09/01 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Humanmedizin
09/03 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Humanmedizin
10/04 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Humanmedizin

10/03 – 09/07: Studium der Zahnmedizin, Universität Kiel
09/07 Staatsexamen Zahnmedizin

Ärztliche Tätigkeit:

seit 10/07 Assistenzarzt in der Abteilung für Mund-, Kiefer- und
Gesichtschirurgie des UKSH, Campus Kiel

Wissenschaftliche Tätigkeit:

04/04 – 04/07 Durchführung der experimentellen Arbeiten im
Onkologischen Labor der Klinik für Gynäkologie und
Geburtshilfe bei Prof. Dr. Arnold
05/07: Wissenschaftlicher Vortrag auf dem Symposium der
Kommission Translationale Forschung der
Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie mit dem
Titel „Epithelial mesenchymal transition requires immune
histochemistry as well as cytogenetics for cell
characterisation of primary tumour cell culture“.

Publikation:

Purcz NM, Bahr M, Leidecker M, Grunewald R, Hamann S, Rösel F, Maas N, Arnold N, Weimer J (2007) Epithelial mesenchymal transition requires immune histochemistry as well as cytogenetics for cell characterization of primary tumour cell culture. in: 2nd wissenschaftliches Symposium der Kommission Translationale Forschung S.27; AVISO Verlagsgesellschaft Weimar; ISBN:978-3-938669-03-7.