

Genamplifikation in humanen Zellen: Untersuchungen an einem Leukämiefall und an HeLa-Zellen

Vom Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Diplom-Biologin
Petra Bruckert

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 23.01.2004

Vorsitzender der Promotionskommission: Prof. Dr. J. A. Cullum
Erster Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. H. Zankl
Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. M. Schwab

Kaiserslautern 2004

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Symbole und Abkürzungen	V
Einleitung	1
A) Genamplifikation: Definition.....	1
B) Formen und Vorkommen der Genamplifikation.....	1
B.1) Entwicklungsregulierte Genamplifikation.....	1
B.2) Spontane Genamplifikation.....	1
B.2.1) Nichtinduzierte Genamplifikation.....	2
B.2.2) Induzierte Genamplifikation.....	3
C) Manifestationsformen der Genamplifikation.....	6
C.1) Extrachromosomale Manifestation: Double Minutes.....	7
C.2) Intrachromosomale Manifestation: Homogeneously Staining Regions.....	8
C.3) Beziehungen zwischen extra- und intrachromosomaler Manifestation der Genamplifikation.....	10
D) Ziel der Arbeit.....	10
Methoden	11
A) Sterilarbeiten und Zellkultivierungsbedingungen	11
B) Zellkultivierung	11
B.1) Kurzzeitkultivierung von Knochenmark und Blut.....	11
B.2) Kultivierung und Selektion von HeLa-Zellen.....	12
B.2.1) Die HeLa-Zelllinie.....	12
B.2.2) Die Selektionssubstanz.....	12
B.2.3) Auftauen und Kultivierung der HeLa-Zellen.....	13
B.2.4) Subkultivierung und Selektion.....	14
B.2.5) Einfrieren von HeLa-Zellen.....	16
B.2.6) Bestimmung von Generationszeiten und -zahlen.....	16
C) Metaphasenpräparation	17
D) Färbungs- und Bänderungsmethoden	18
D.1) Giemsa-Färbung.....	18
D.2) G-Bänderung.....	18
D.3) C-Bänderung.....	19
D.4) Entfärben und Entölen.....	20
D.4.1) Entfärben von giemsa-gefärbten Präparaten.....	20
D.4.2) Entölen von giemsa-gefärbten Präparaten.....	20
E) Metaphasenauswertung	21
E.1) Aberrationsanalyse.....	21
E.2) Karyotypisierung.....	22
E.3) Bestimmung des 5q-Status bei HeLa-Zellen.....	22
E.4) Darstellung der Ergebnisse der cytogenetischen Auswertungen.....	23
E.5) Fotografische Aufnahmen von Metaphasenpräparaten.....	23
F) Induktion einer prämaternen Chromosomenkondensation	23
F.1) Kultivierung der Induktorzelllinie.....	24
F.2) Gewinnung und Einfrieren von mitotischen Induktorzellen.....	25
F.3) Zellfusion zur PCC-Induktion.....	25
F.3.1) Isolierung von mononukleären Zellen aus KM.....	26
F.3.2) Auftauen der mitotischen Induktorzellen.....	26
F.3.3) Zellfusion zur PCC-Induktion und Präparation der PCC-Zellen.....	26
G) Comparative Genomische Hybridisierung	27
G.1) Isolation von genomischer DNA.....	31
G.2) Agarose-Gelelektrophorese.....	32
G.3) Markierung von genomischer DNA.....	33
G.3.1) Haptenmarkierung.....	33

G.3.2)	Direktmarkierung.....	34
G.4)	Herstellung des CGH-Hybridisierungsmixes.....	35
G.5)	Metaphasenpräparation für CGH.....	36
G.6)	Denaturierung und Hybridisierung.....	36
G.7)	Stringenzwaschung und Detektion.....	37
G.7.1)	Stringenzwaschung.....	37
G.7.2)	Detektion von haptenmarkierter DNA.....	37
G.7.3)	Eindecken der Präparate.....	37
G.8)	Fluoreszenzmikroskopie und Aufnahmen.....	38
G.9)	Digitale Bildverarbeitung und Profilerstellung.....	38
G.10)	Visuelle und Profilauswertung.....	39
H)	Reverse In situ-Hybridisierung	40
I)	Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung	41
I.1)	Die FISH-Sonden.....	41
I.1.1)	Die humane <i>MYC</i> -Sonde.....	41
I.1.2)	Die humane <i>DHFR</i> -Sonde.....	41
I.1.3)	Die WCP-Sonden.....	42
I.2)	Ansetzen von Bakterienkulturen und Glycerinstocks.....	42
I.2.1)	Ansetzen von Vorkulturen zur Herstellung von Glycerinstocks.....	42
I.2.2)	Ansetzen von Flüssigkulturen zur Plasmidisolierung.....	42
I.2.3)	Einfrieren von Bakterien als Glycerinstocks.....	42
I.3)	Plasmidisolierung.....	43
I.3.1)	Plasmidisolierung durch alkalische Lyse.....	43
I.3.2)	Plasmidisolierung durch Boiling-Verfahren.....	43
I.4)	Markierung der FISH-Sonden.....	44
I.4.1)	Markierung der <i>MYC</i> - und der <i>DHFR</i> -Sonde.....	44
I.4.2)	Markierung der WCP-Sonden.....	44
I.5)	Herstellung der FISH-Hybridisierungsmixe.....	45
I.6)	Metaphasenpräparation, Denaturierung und Hybridisierung.....	45
I.7)	Stringenzwaschung und Detektion.....	45
I.8)	Fluoreszenzmikroskopie, Aufnahmen und Auswertung.....	46
J)	Statistische Methoden	46
Ergebnisse		48
A)	Analyse einer Genamplifikation in einem Leukämiefall	48
A.1)	Klinische Daten und Krankheitsverlauf.....	48
A.2)	Cytogenetische Analysen.....	49
A.2.1)	Karyotyp-Befunde im Krankheitsverlauf.....	49
A.2.2)	Double Minute-Anzahl pro Metaphase.....	52
A.3)	Chromosomale Herkunft der amplifizierten Gensequenzen.....	53
A.4)	Nachweis der amplifizierten Gensequenz.....	56
A.5)	Double Minute-Morphologie in der G1-Phase der Interphase.....	58
B)	Induktion einer Genamplifikation bei HeLa-Zellen	61
B.1)	Schema der Selektionen mit Methotrexat.....	61
B.2)	Generationszeiten und -zahlen der HeLa-MTX-Sublinien.....	62
B.3)	Chromosomenanzahl pro Metaphase in den HeLa-MTX-Sublinien.....	64
B.3.1)	Chromosomenanzahlklassen.....	64
B.3.2)	Verteilung auf die Chromosomenanzahlklassen in den HeLa-MTX-Sublinien.....	64
B.4)	Strukturelle Aberrationen in den HeLa-MTX-Sublinien.....	67
B.4.1)	Gaps.....	67
B.4.2)	Brüche (Breaks).....	68
B.4.3)	Azentrische Fragmente.....	69
B.4.4)	Pulverisiertes Chromatin.....	70
B.4.5)	Ringchromosomen.....	72
B.4.6)	Dizentrische Chromosomen.....	72
B.4.7)	Trizentrische Chromosomen.....	73
B.4.8)	Das derivative Chromosom 'Der(5)sp' ¹	75
B.4.9)	Double Minutes.....	78
B.4.10)	Double Minute-Anzahl pro Metaphase.....	79
B.5)	HeLa-Karyotypauswertung vor und nach Methotrexat-Selektion.....	82

B.5.1)	Beispielkaryogramme der HeLa-Parentallinie und der Sublinien HeLa-1-MTX-1.0, HeLa-2-MTX-1.0 und HeLa-2-MTX-10.0.....	82
B.5.2)	Kopienanzahlen der normalen Chromosomen in der HeLa-Parentallinie und den Sublinien HeLa-1-MTX-1.0, HeLa-2-MTX-1.0 und HeLa-2-MTX-10.0.....	85
B.5.2.1)	Kopienanzahlen der normalen Chromosomen in der HeLa-Parentallinie.....	85
B.5.2.2)	Kopienanzahlen der normalen Chromosomen in HeLa-1-MTX-1.0.....	86
B.5.2.3)	Kopienanzahlen der normalen Chromosomen in HeLa-2-MTX-1.0.....	87
B.5.2.4)	Kopienanzahlen der normalen Chromosomen in HeLa-2-MTX-10.0.....	88
B.5.3)	Modale Kopienanzahl der normalen Chromosomen bei der HeLa-Parentallinie und den Sublinien HeLa-1-MTX-1.0, HeLa-2-MTX-1.0 und HeLa-2-MTX-10.0.....	89
B.6)	5q-Status in den HeLa-MTX-Sublinien.....	90
B.6.1)	5q-Status in der HeLa-Parentallinie.....	90
B.6.2)	Gaps und Brüche in 5q.....	90
B.6.3)	5q-Anzahl pro Metaphase.....	91
B.6.4)	5q-Trägerchromosomen pro Metaphase.....	95
B.6.4.1)	5q-Trägerchromosomen in Metaphasen mit 3x5q.....	95
B.6.4.2)	5q-Trägerchromosomen in Metaphasen mit >3x5q.....	97
B.6.4.3)	5q-Trägerchromosomen in Metaphasen mit <3x5q.....	100
B.6.5)	5q-Status in Double Minute-haltigen Metaphasen.....	102
B.6.6)	Derivative 5q-haltige Chromosomen.....	104
B.6.6.1)	Metaphasen mit derivativen 5q-haltigen Chromosomen.....	104
B.6.6.2)	Typen der derivativen 5q-haltigen Chromosomen.....	106
B.6.6.3)	5q-Status in Metaphasen mit derivativen 5q-haltigen Chromosomen.....	106
B.7)	Lokalisation von #5-Sequenzen in den HeLa-MTX-Sublinien.....	107
B.7.1)	#5-Sequenzen in Metaphasen der Parentallinie und der MTX-0.12-Sublinien.....	107
B.7.2)	#5- und #2-Sequenzen in Metaphasen mit 'Der(5)sp'.....	108
B.7.3)	#5-Sequenzen in Metaphasen mit Double Minutes.....	110
B.8)	Chromosomale Herkunft der amplifizierten Gensequenzen.....	110
B.8.1)	CGH-Kontrollansätze mit hapten- und direktmarkierter DNA.....	110
B.8.2)	CGH-Ansätze der HeLa-MTX-Sublinien.....	111
B.9)	Nachweis der amplifizierten Gensequenz.....	118
B.10)	Lokalisation des Amplicons in den HeLa-MTX-Sublinien.....	120
B.10.1)	Lokalisation des Amplicons in Metaphasen mit Double Minutes.....	120
B.10.2)	Intrachromosomale Ampliconanzahl pro Metaphase.....	122
B.10.2.1)	Intrachromosomale Ampliconanzahl in der HeLa-Parentallinie.....	122
B.10.2.2)	Intrachromosomale Ampliconanzahl in den HeLa-1-MTX-Sublinien.....	123
B.10.2.3)	Intrachromosomale Ampliconanzahl in den HeLa-2-MTX-Sublinien.....	124
B.10.3)	Derivative Amplicon-haltige Chromosomen.....	127
B.10.3.1)	Metaphasen mit derivativen Amplicon-haltigen Chromosomen.....	127
B.10.3.2)	Typen der derivativen Amplicon-haltigen Chromosomen.....	129
B.10.3.3)	Lokalisation des Amplicons auf dem derivativen Chromosom 'Der(5)sp'.....	130
B.10.3.4)	5q-Status in Metaphasen mit derivativen Amplicon-haltigen Chromosomen.....	131
C)	Langzeitkultivierung von HeLa-Zellen ohne Selektion.....	132
C.1)	Schema der Subkultivierungen der Langzeitkultur.....	132
C.2)	Generationszeiten und -zahlen der HeLa-LZ-Sublinien.....	133
C.3)	Chromosomenanzahl pro Metaphase in den HeLa-LZ-Sublinien.....	133
C.4)	Strukturelle Aberrationen in den HeLa-LZ-Sublinien.....	134
C.4.1)	Gaps, Brüche (Breaks) und azentrische Fragmente.....	134
C.4.2)	Pulverisiertes Chromatin.....	135
C.4.3)	Ringchromosomen und dizentrische Chromosomen.....	135
C.4.4)	Trizentrische Chromosomen und das derivative Chromosom 'Der(5)sp'.....	135
C.4.5)	Double Minutes und Double Minute-Anzahl pro Metaphase	136
C.5)	HeLa-Karyotypauswertung vor und nach Langzeitkultivierung.....	137
C.5.1)	Beispielkaryogramme von HeLa-LZ-0 und HeLa-LZ-18.....	137
C.5.2)	Kopienanzahlen der normalen Chromosomen in HeLa-LZ-0 und HeLa-LZ-18.....	139
C.5.2.1)	Kopienanzahlen der normalen Chromosomen in HeLa-LZ-0.....	139
C.5.2.2)	Kopienanzahlen der normalen Chromosomen in HeLa-LZ-18.....	140
C.5.3)	Modale Kopienanzahl der normalen Chromosomen bei HeLa-LZ-0 und HeLa-LZ-18..	141
C.6)	5q-Status in HeLa-LZ-0 und HeLa-LZ-18.....	141
C.7)	CGH-Analyse von HeLa-LZ-18.....	142
C.8)	Lokalisation des <i>DHFR</i> -enthaltenden Amplicons in HeLa-LZ-0 und HeLa-LZ-18.....	142

Diskussion	145
A) Amplifikation eines Onkogens in einem Leukämiefall.....	145
A.1) Mögliche Entstehungsmechanismen einer Onkogenamplifikation.....	145
A.2) Eigenschaften und Onkogenwirkung von <i>MYC</i>	147
A.2.1) Das Protoonkogen <i>MYC</i>	147
A.2.2) Onkogenaktivierung bei <i>MYC</i>	150
B) Amplifikation eines Stoffwechselfgens in HeLa-Zellen nach MTX-Selektion.....	152
B.1) Methodische Modifikationen.....	152
B.2) Verlauf der Genamplifikationsentwicklung bei den HeLa-MTX-Sublinien.....	154
B.2.1) Frühe Stadien der <i>DHFR</i> -Amplifikationsentwicklung.....	156
B.2.2) Fortgeschrittene Stadien der <i>DHFR</i> -Amplifikationsentwicklung.....	159
Zusammenfassung	161
Veröffentlichungen	162
Literatur	163
Anhang	179
Chemikalien, Lösungen, Geräte und weiteres Material	179
1.) Chemikalien.....	179
2.) Lösungen.....	181
2a) Lösungen für Zellkultivierung, Metaphasenpräparation und Chromosomenbänderung.....	181
2b) Lösungen für CGH und FISH.....	183
3.) Geräte und weiteres Material.....	184
Erklärung	186
Danksagung	187
Lebenslauf	188

Symbole und Abkürzungen

Zytogenetische Symbole und Abkürzungen, die hier nicht aufgeführt werden, wurden entsprechend der ISCN (1995)-Nomenklatur (Mitelman 1995) verwendet.

α	alpha
β	beta
Σ	Summe
μ	mikro
#	Chromosom Nr.
%	Prozent
Abb.	Abbildung(en)
abr	abnormally staining region, abnormal anfärbende Region
abs.	absolut, rein
A. dest.	aqua destillata, destilliertes Wasser
AK	Antikörper
AMD	Actinomycin D
AML	akute myeloische Leukämie
A+T	Adenin und Thymin
BdU	5-Bromdesoxyuridin
BHK	baby hamster kidney, Baby Hamster-Nieren
bp	base pair(s), Basenpaar(e)
BSA	Bovine Serum Albumin, Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
CAD	Carbamoyl-P Synthetase, Aspartat-Transcarbamylase, Dihydroorotase
CBG	C-bands by barium hydroxide using Giemsa, C-Banden mit Bariumhydroxid und Giemsa
CCD	charge-coupled device
CGH	comparative genomic hybridization(s), komparative genomische Hybridisierung(en)
CHO	Chinese Hamster Ovary, Chinesischer Hamster-Eierstock
Chr	Chromosomen
CISS	chromosomal in situ suppression, chromosomale in situ Suppression
Cot	Produkt aus Ausgangskonzentration (c_0) einer bestimmten DNA-Sequenz und Reaktionszeit (t) bei der Messung der Reassoziationsgeschwindigkeit denaturierter komplementärer DNA-Stränge
Cot1	Cot = 1 Mol Nukleotide pro Liter und Sekunde
CR	complete remission, vollständige Remission
Cy	Cyan
d	day(s), Tag(e)
D	Direktpräparation
DAPI	4'-6'-Diamidino-2-phenylindol
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
Der(1xAmplicon)	derivative(s) Chromosom(en) mit einem Amplicon (s. Ergebnisse, B.10.2)
Der(2xAmplicon)	derivative(s) Chromosom(en) mit zwei Amplicons (s. Ergebnisse, B.10.2)
Der(3xAmplicon)	derivative(s) Chromosom(en) mit drei Amplicons (s. Ergebnisse, B.10.2)
Der(1-3xAmplicon)	derivative(s) Chromosom(en) mit 1, 2 oder 3 Amplicons (s. Ergebnisse, B.10.3.1)
Der(1x5q)	derivative(s) Chromosom(en) mit einem 5q (s. Ergebnisse, B.6.4)
Der(2x5q)	derivative(s) Chromosom(en) mit zwei 5q (s. Ergebnisse, B.6.4)
Der(5)sp	derivative(s) Chromosom(en) mit zwei 5q (s. Ergebnisse, B.4.8)

dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
d.h.	das heißt
DHFR	Dihydrofolatreduktase
<i>DHFR</i>	Dihydrofolatreduktase-Gen
Dig	Digoxigenin
Dmin, dmin	Double Minute(s)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
DNase	Desoxy-Ribonuklease
dNTP	Nukleosid-5'-triphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
evtl.	eventuell
Fab	Fragment eines Antikörpers, antigenbindend (oder haptinbindend)
FAB	French-American-British, Französisch-Amerikanisch-Britisch
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization(s), Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung(en)
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum (= FCS, fetal calf serum)
FPG	Fluoreszenz-plus-Giemsa
GM-CSF	granulocyte-macrophage - colony stimulating factor, Granulocyten-Makrophagenkoloniestimulierender Faktor
GTG	G-bands by trypsin using Giemsa, G-Banden mit Trypsin und Giemsa
h	hour(s), Stunde(n)
HBSS	Hank's buffered salt solution, Hank's gepufferte Salzlösung
HeLa	humane Cervixcarcinom-Zelllinie; benannt nach den Namensinitialen von Henrietta Lacks, der das Ausgangsgewebe für die Zelllinie entnommen wurde
HSR	Homogeneously Staining Region, homogen anfärbende Region
HSRs	Homogeneously Staining Regions, homogen anfärbende Regionen
ICE	Idarubicin, Cytosinarabinosid, Etoposid (Chemotherapieschema)
i.d.R.	in der Regel
int.	intrachromosomal
IRS	interspersed repetitive sequences, eingestreute repetitive Sequenzen
ISCN	International system for human cytogenetic nomenclature, Internationales System für die humancytogenetische Nomenklatur
I.U.	international units, internationale Einheiten (für Enzymaktivität)
kb	Kilo-Basen
kDa	Kilo-Dalton
KM	Knochenmark
LB	Luria-Bertani (Medium)
LD ₅₀	mittlere letale Dosis; Substanzkonzentration, bei der 50% der exponierten Zellen absterben
LZ	Langzeitkultivierung
M	molar, Konzentrationsangabe, 1 M = 1 mol/l
m5	derivative(s) Chromosom(en) mit einem 5q (s. Ergebnisse, B.6.1)
Mb	Megabasen
<i>MDR</i>	Multidrug resistance-Gen, Vielfachresistenz-Gen
Meta, Meta.	Metaphase(n)
MG	Molekulargewicht
min	Minute(n)
mRNA	messenger-RNA
MTX	Methotrexat, (+)Amethopterin

MYC MYC	MYC-Protein, Produkt von <i>MYC</i> (cellular) <i>MYC</i> , (zelluläres) <i>MYC</i> -Gen; bezeichnet nach dem Myelocytomatose-Virus von Hühnern, der das virale <i>MYC</i> -Gen v-myc trägt
N	bei HeLa-Zellen: 5q-Normalstatus (s. Ergebnisse, B.6.1); bei Lösungen: normal, Konzentrationsangabe, 1 N = 1 val/l (Äquivalent-Konzentration)
n.b.	nicht bestimmt
nd	nicht durchgeführt
Nr.	Nummer
o.a.	oder andere(s)
p.A.	pro analysi, zur Analyse
PALA	N-(Phosphonacetyl)-L-aspartat
Par	Parentallinie
PB	peripheral blood, peripheres Venenblut
PBS	phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-CMF	phosphate buffered saline - calcium-magnesium-free, phosphatgepufferte Salzlösung - Kalzium-Magnesium-frei
PC	Personal Computer, Personalcomputer
PCC	prematurely condensed chromosomes, vorzeitig kondensierte Chromosomen
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration bzw. genauer Wasserstoffionenaktivität
PHA	Phytohämagglutinin
pvz	pulverization, pulverisiertes Chromatinmaterial
rDNA	ribosomale DNA
REVISH	Reverse In Situ Hybridization(s), reverse In situ-Hybridisierung(en)
rh	recombinant human, rekombinant human
r.l.	random loss, zufälliger Verlust
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rotations per minute, Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Medium)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
S.	Seite
SCE	sister chromatid exchange, Schwesterchromatidaustausch
SDS	Sodium dodecyl sulfate, Dodecylhydrogensulfat-Natrium-Salz
Smin, smin	Single Minute(s)
s.o.	siehe oben
sp	speziell
SSC	sodium saline citrate
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TAD	6-Thioguanin, Alexan (Cytosinarabinosid), Daunorubicin (Chemotherapieschema)
TAE	Tris/Acetate/EDTA
TE	Tris/EDTA
TK	Thymidinkinase
TMP	Thymidinmonophosphat
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TS	Thymidylatsynthetase
TSE	Tris/Sucrose/EDTA
u.a.	und andere(s)
UMP	Uridinmonophosphat

URL	uniform resource locator
var.mar	variable Markerchromosomen
vgl.	vergleiche (mit)
v/v	Volumen pro Volumen
WCP	Whole Chromosome Paint(ing)(s), Ganz-Chromosomen-Färbung(en)
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
z.v.	zitiert von

Einleitung

A) Genamplifikation: Definition

Genamplifikation bezeichnet die Vervielfachung einer spezifischen DNA-Sequenz aus dem Genom einer Zelle. Die amplifizierte DNA-Sequenz enthält in den meisten Fällen mindestens ein Gen und wird als Amplicon bezeichnet (Von Hoff 1991; Nagl 1990). Der Begriff "Genamplifikation" beinhaltet jedoch nicht die Vervielfachung des gesamten Genoms (Polyploidisierung) oder eines ganzen Chromosoms (Polytänie) in einer Zelle (Stark 1986). Das Ergebnis einer Genamplifikation ist eine erhöhte Kopienanzahl des Amplicons im Genom bei unveränderter Kopienanzahl der übrigen Sequenzen. Dabei kann die Kopienanzahl eines amplifizierten Gens um das 2- bis über 2000fache ansteigen (Hamlin et al. 1984; Kellems 1993). Als Folge tritt eine Überexpression des amplifizierten Gens auf, die zur Erzeugung sehr großer Mengen der entsprechenden mRNA und des jeweiligen Genprodukts führt (Von Hoff 1991; Stark 1986). Da die Expressionsstärke pro einzelner Genkopie durch die Amplifikation eines Gens meist nicht verändert wird, ist die produzierte mRNA- und Genproduktmenge in etwa proportional zur Kopienanzahl des amplifizierten Gens (Stark 1986).

B) Formen und Vorkommen der Genamplifikation

Genamplifikation kann entwicklungsreguliert sein oder spontan auftreten.

B.1) Entwicklungsregulierte Genamplifikation

Eine entwicklungsregulierte Genamplifikation ist bei Säugetieren nicht bekannt, aber innerhalb des genetisch gesteuerten Entwicklungsprogramms von Amphibien und Insekten beobachtet worden. Beispiele dafür sind die Amplifikation der ribosomalen RNA (rRNA)-Gene in den Oocyten von *Xenopus laevis* (Kralenfrosch; Bird 1978), die Amplifikation von Choriongenen in den ovariellen Follikelzellen von *Drosophila melanogaster* (Frucht- oder Taufliege; de Cicco and Spradling 1984) und die Amplifikation von Genen für Kokonproteine in den Speicheldrüsen von *Rhynchosciara* (Trauermücke; Kellems 1993). Offenbar dient diese Form der Genamplifikation vor allem dazu, in einem bestimmten Entwicklungsstadium eines Organismus speziellen Zelltypen die Synthese einer großen Menge eines spezifischen Genprodukts in sehr kurzer Zeit zu ermöglichen (Kellems 1993).

B.2) Spontane Genamplifikation

Eine spontane Genamplifikation, die nicht Bestandteil eines genetisch regulierten Entwicklungsprogramms ist, ist bei sehr vielen Organismen beschrieben worden, z.B. bei Bakterien (*Escherichia coli*), Hefen, Insekten (*Drosophila*) und Säugetieren (Kellems 1993). Bei dieser Form der Genamplifikation lassen sich nichtinduzierte und induzierte Genamplifikation unterscheiden.

B.2.1) Nichtinduzierte Genamplifikation

Die nichtinduzierte Genamplifikation beschreibt eine spontan auftretende Genamplifikation, deren Auslöser nicht bekannt ist. In der Fachliteratur wird sie häufig auch als "spontane Genamplifikation" zur Unterscheidung von induzierter Genamplifikation bezeichnet. Sie tritt vor allem in Tumoren auf.

Die in Tumoren amplifizierten Gene sind häufig Protoonkogene, wie z.B. *MYC*, *MYCN*, *MYCL*, *MYB*, *ERBB1*, *ERBB2*, *HRAS1*, *KRAS2* und andere. Die meisten dieser Gene kodieren für Wachstumsfaktoren, Kinasen und Wachstumsfaktorrezeptoren (Knuutila et al. 1998) (s. Tab. 1).

Tabelle 1: Protoonkogene, die in Tumoren amplifiziert werden
(aus: Knuutila et al. 1998; deutsche Übersetzung)

Zelluläres Onkogen	chromosomale Lokalisation	Proteinfunktion	Tumorart
<i>ABL</i>	9q34.1	Protein-Tyrosinkinase	chronische myeloische Leukämie
<i>BCL1</i>	11q13.3	G1/S-spezifisches Cyclin D1	Brustkrebs, Kopf- und Halscarcinome, Blasenkrebs
<i>BCL2</i>	18q21.3	Apoptoseinhibitor	Non-Hodgkin-Lymphome
<i>CDK4</i>	12q14	Cyclin-abhängige Kinase	Sarkome
<i>EGFR/ERBB1</i>	7p12	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor	Glioblastoma multiforme, epidermoides Carcinom, Blasenkrebs, Brustkrebs
<i>ERBB2/NEU</i>	17q12-q21	Wachstumsfaktorrezeptor	Brustkrebs, Eierstockkrebs, Magenkrebs, renales Adenocarcinom, Adenocarcinom der Speicheldrüse, Dickdarmcarcinom
<i>HSTF1</i>	11q13.3	Fibroblasten-Wachstumsfaktor	Brustkrebs, Speiseröhrencarcinom
<i>INT1/WNT1</i>	12q13	wahrscheinlich Wachstumsfaktor	Retinoblastom
<i>INT2</i>	11q13.3	Fibroblasten-Wachstumsfaktor	Brustkrebs, Speiseröhrencarcinom, Melanom, Kopf- und Halscarcinome
<i>MDM2</i>	12q14.3-q15	p53-bindendes Protein	Sarkome
<i>MET</i>	7q31	Hepatocyten-Wachstumsfaktorrezeptor	amplifiziert in humanen Tumorzelllinien nichthämatopoetischen Ursprungs, besonders von gastrischen Tumoren
<i>MYB</i>	6q22-q23	DNA-bindendes Protein (wichtig für normale Hämatopoese)	Leukämien, Dickdarmcarcinom, Melanom
<i>MYC</i>	8q24.12-q24.13	DNA-bindendes Protein	kleinzelliger Lungenkrebs, riesenzelliges Lungenkarzinom, Brustkrebs, Dickdarmcarcinom, akute Promyelocytenleukämie, Gebärmutterhalskrebs, gastrisches Adenocarcinom, chronische Granulo-cytenleukämie
<i>MYCN</i>	2p24.3	DNA-bindendes Protein	Neuroblastom, kleinzelliger Lungenkrebs, Retinoblastom, Medulloblastom, Glioblastom, Rhabdomyosarkom, Adenocarcinom der Lunge, Astrocytom
<i>MYCL1</i>	1p34.3	DNA-bindendes Protein	kleinzelliger Lungenkrebs
<i>RAF1</i>	3p25	Serin/Threonin-Proteinkinase	nicht-kleinzelliger Lungenkrebs
<i>HRAS1</i>	11p15.5	GTPase	Blasenkrebs
<i>KRAS2</i>	12p12.1	GTPase	adrenocortikale Tumore, riesenzelliges Lungenkarzinom
<i>NRAS</i>	1p13	GTPase	Brustkrebs
<i>REL</i>	2p12-p13	DNA-bindendes Protein	Non-Hodgkin-Lymphome

Neben einzelnen Genen können in Tumoren auch ganze chromosomale Regionen amplifiziert vorliegen. So ist die Amplifikation der chromosomalen Bande 11q13 in vielen Tumorarten, darunter Brust-, Blasen-

und Speiseröhrenkrebs, häufig (Gaudray et al. 1992; Schwab 1998). In dieser Region sind einige Gene, z.B. *BCL1* und *INT2* (s. Tab. 1), lokalisiert, die mit der Entwicklung von Krebs in Zusammenhang gebracht werden können. Zusätzlich können neben 11q13 weitere Protoonkogene, die auf anderen Chromosomen lokalisiert sind, coamplifiziert werden. Bei Brustkrebs kann unter anderem eine Coamplifikation von 11q13 und *MYC* (8q24) oder *ERBB2* (17q12) auftreten (Gaudray et al. 1992).

Eine weitere, in verschiedenen Sarkomtypen amplifizierte Region ist 12q13q15. Sie enthält mehrere Gene, für die eine Amplifikation, i.d.R. zusammen mit weiteren Genen aus der Region, nachgewiesen werden konnte (z.B. *MDM2*, *SAS*, *CDK4*, *HMGIC*; Schwab 1998). Dabei zeigen verschiedene Sarkomtypen und auch einzelne Tumore des gleichen Typs ein individuelles Muster an amplifizierten und nichtamplifizierten Genen innerhalb von 12q13q15 (Schwab 1998; Gisselsson et al. 1998).

Das Auftreten von Genamplifikation scheint in Tumoren mit einem fortgeschrittenen Stadium der Tumorentwicklung assoziiert zu sein (Ried et al. 1999). Bei Neuroblastomen besteht eine direkte Korrelation zwischen dem Vorliegen einer Amplifikation des Onkogens *MYCN* und einer ungünstigen Prognose (Schwab 1995).

Die Amplifikation spezifischer Gene in Tumoren bleibt in den meisten Fällen auch in den davon abstammenden Tumorzelllinien erhalten, so dass diese zur genaueren Analyse der amplifizierten Onkogene und ihrer Produkte dienen können (George 1984). Die Stabilität, mit der eine einmal erfolgte Genamplifikation in Tumoren und Tumorzelllinien häufig bestehen bleibt, weist darauf hin, dass die Zellen durch diese Amplifikation offenbar einen besonderen Wachstumsvorteil in ihrer jeweiligen Umgebung erhalten (Stark 1986; George 1984).

Nichtinduzierte Genamplifikationen sind in seltenen Fällen auch in nichtcancerogenen Zellen beobachtet worden. Ein Beispiel dafür ist die 40-80fache Amplifikation der Cholinesterase-Gene *ACHE* (Acetylcholinesterase) und *BCHE* (Butyrylcholinesterase) in den peripheren Blutzellen einer Patientin mit der Autoimmunerkrankung Lupus erythematoses, die zusätzlich eine Amplifikation der Protoonkogene *SIS*, *RAF1* und *FES* aufwies (Zakut et al. 1992). In Amnionzellen, die zur Pränataldiagnostik kultiviert wurden, konnte in zwei Fällen eine Amplifikation von Centromersequenzen nachgewiesen werden, die in einem Fall von Chromosom 12 und im anderen Fall von den Chromosomen 13 oder 21 stammten. Eine genco-dierende Sequenz wurde dabei nicht amplifiziert (Rajcan-Separovic et al. 1995).

B.2.2) Induzierte Genamplifikation

Der nichtinduzierten Genamplifikation steht die induzierte Genamplifikation gegenüber, die unter Einwirkung eines nachweisbaren exogenen Einflusses in Zellen auftritt. Dieser exogene Einfluß stellt i.d.R. eine cytotoxische Substanz in einer Zellkultur oder in der Umgebung eines Organismus dar, gegen die sich die exponierten Zellen in unterschiedlicher Weise schützen bzw. gegen die sie Resistenz entwickeln können. Einer der häufigsten Mechanismen der Resistenzentwicklung ist die Amplifikation des Gens, das der Zelle Resistenz gegen die cytotoxische Substanz verleiht (Stark 1986). Diese Form der Resistenzentwicklung ist sowohl *in vitro* in Zellkulturen als auch *in vivo* in Organismen beobachtet worden.

In Zellkulturen wird Resistenz gegen eine bestimmte chemische Substanz durch einen Selektionsprozess erzielt, in dem die Zellen direkt einer hohen Substanzkonzentration (Ein-Schritt-Selektion; Meinkoth et al. 1987) oder einer in mehreren Schritten ansteigenden Substanzkonzentration (Mehrschrittselektion) ausgesetzt werden (Sharma and Schimke 1994). Dabei überleben nur die Zellen, die bereits Resistenz

gegen die zugesetzte Substanz besitzen oder diese entwickeln können. Die selektierten, resistenten Zellen zeigen sehr oft, aber nicht immer, eine Amplifikation des Resistenzverleihenden Gens, des sogenannten Zielgens (Sharma and Schimke 1994). Dies ermöglicht es, den Selektionsvorgang zur gezielten Induktion der Amplifikation eines spezifischen Gens zu nutzen. Die Amplifikationsinduktion ist am erfolgreichsten in immortalen Zelllinien (s. Tab. 2).

Tabelle 2: Beispiele für induzierte Genamplifikationen mit Resistenzentwicklung in Säugetierzelllinien

Induzierende Substanz	amplifiziertes Gen	Zelllinie, Zelltyp, Species	Referenz
Adriamycin, Colchicin oder Vinblastin	<i>MDR1</i> Multidrug resistance-Gen	KB, Carcinom, human	Shen et al. 1986
Albiziin	Asparaginsynthetase	HT1080, Fibrosarkom, human	Andrulis et al. 1990
Borrelidin	<i>ThrRS</i> Threonyl-tRNA-Synthase	CHO, Chinese Hamster Ovary	Arfin et al. 1993
Cadmium	<i>MT</i> Metallothioneingene	CHO, Chinese Hamster Ovary; Erythroleukämie, Maus	Hildebrand et al. 1993
CNU 2-Chloro-ethyl-N-nitroso-urea	<i>Mgmt</i> O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase	NIH 3T3, Maus	Tano et al. 1997
Coformycin	<i>AMPD2</i> Adenylat-Deaminase 2	GMA32, Lungenfibroblasten, chinesischer Hamster	Toledo et al. 1992
Deoxycoformycin, Alanosin, Adenosin, Uridin	<i>ADA</i> Adenosin-Deaminase	Cl-1D, Fibroblasten, Maus	Kellems 1993
DFMO α-Difluoromethyl-ornithin	<i>ODC</i> Ornithin-Decarboxylase	S49, Lymphom, Maus	Coffino 1993
FdUrd 5-Fluorodeoxyuridin	<i>TS</i> Thymidylatsynthetase	3T6, Fibroblasten, Maus	Johnson 1993
Histidinol	<i>HRS</i> Histidyl-tRNA-Synthetase	CHO, Chinese Hamster Ovary	Tsui and Siminovitch 1993
Hydroxyurea	<i>Rrm2</i> Ribonukleotid-Reduktase, Protein M2	TC13K, Sublinie von SEWA Ascites-Tumor, Maus	Wettergren et al. 1994
Msx Methionin-Sulfoximin	<i>GS</i> Glutamin-Synthetase	C4MCHO, Chinese Hamster Ovary	Wilson 1993
MTX Methotrexat	<i>DHFR</i> Dihydrofolatreduktase	3T6, Fibroblasten, Maus	Haber and Schimke 1981 (1)
MPA Mycophenolsäure	<i>IMPDH</i> Inosin-5'-monophosphat-Dehydrogenase	V79, chinesischer Hamster	Collart and Huberman 1993
Ouabain	Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase Natrium, Kalium-aktivierte Adenosintriphosphatase	HeLa S3, Cervixcarcinom, human	Ash et al. 1984
PALA N-(Phosphon-acetyl)-L-aspartat	<i>CAD</i> Carbamoyl-P-Synthetase, Aspartat-Transcarbamylase, Dihydroorotase	BHK, Baby Hamster Kidney, syrischer Hamster	Smith et al. 1992
Pyrazofurin	UMP-Synthase	HeLa S3, Cervixcarcinom, human	Kanlas et al. 1985
Tunicamycin	N-Acetylglucosaminylphosphat-transferase	CHO, Chinese Hamster Ovary	Scocca and Krag 1993

Die Beispiele in Tabelle 2 zeigen, dass sich in Linien unterschiedlicher Species und verschiedener Zelltypen spezifische Genamplifikationen durch zahlreiche Substanzen erzielen lassen. Die amplifizierten Gene kodieren dabei in vielen Fällen für Enzyme, die durch die induzierende Substanz gehemmt werden, und viele dieser Enzyme sind Bestandteil des Nukleotidstoffwechsels (z.B. *DHFR*, *CAD*, *Rrm2*, *TS*).

Die Induktion von Genamplifikation durch eine Substanz ist meist unabhängig von der verwendeten Zelllinie oder der Species. Mit den häufig benutzten Substanzen Methotrexat (MTX) und N-(Phosphonacetyl)-L-aspartat (PALA) können z.B. sowohl in humanen als auch in Maus- und Hamsterzelllinien resistente Zellpopulationen mit Amplifikation der jeweiligen Zielgene, *DHFR* und *CAD*, selektioniert werden (Sharma and Schimke 1994; Riva et al. 1989; Meinkoth et al. 1987; Livingstone et al. 1992).

Auch wird nicht in allen Fällen durch eine Substanz ausschließlich die Amplifikation eines einzelnen Gens induziert, sondern es können Gene, die auf dem DNA-Strang benachbart liegen, coamplifiziert werden. Beispiele dafür sind die Amplifikation der *CAD*-Gene in syrischen Hamsterzellen nach Selektion mit PALA (Stark 1993) sowie die Amplifikation der Metallothioneingene I und II in chinesischen Hamsterzelllinien nach Selektion mit Cadmium (Hildebrand et al. 1993).

Umgekehrt können unterschiedliche Substanzen die Amplifikation des gleichen Gens auslösen. Zellen, die mit Colchicin, Vinblastin oder Adriamycin selektioniert werden, amplifizieren häufig das *MDR1*-Gen (s. Tab. 2). Dieses Gen kodiert für P-Glykoprotein, ein Transmembranprotein, das die Ausschleusung eines breiten Spektrums von Giftstoffen aus der Zelle übernimmt (Roninson 1992). Durch Überexpression dieses Proteins aufgrund einer *MDR1*-Amplifikation erwerben Zellen Resistenz gegen eine Vielzahl von unterschiedlichen cytotoxischen Substanzen, auch wenn die Selektion der Zellen mit nur einer einzigen Substanz erfolgte (Roninson 1992). P-Glykoprotein-Überexpression tritt auch in humanen Tumoren in vivo auf und wird als ein Mechanismus der Chemotherapieresistenz angesehen, ist jedoch in vivo nicht mit Genamplifikation assoziiert (Roninson 1992).

Die simultane Selektion von Zellen mit zwei verschiedenen Substanzen (Doppelselektion) kann zu Resistenzerwerb durch parallele Amplifizierung beider Zielgene führen. BHK (Baby Hamster Kidney)-Zellen, die nach simultaner Selektion mit MTX und PALA amplifizierte *DHFR*- und *CAD*-Gene aufwiesen, zeigten zudem erhöhte Amplifikationsraten für ein weiteres Gen, wenn sie mit einer dritten Substanz erneut selektioniert wurden (sogeannter Amplifikator-Phänotyp; Giulotto et al. 1987).

Beim UMP-Synthase-Gen lassen sich durch alternierende Selektion mit zwei unterschiedlichen Substanzen Amplifikation und nachfolgende Deamplifikation des Gens induzieren. Dies ist möglich, da Zellen mit Resistenz gegen Pyrazofurin (in Kombination mit 6-Azauridin) und UMP-Synthase-Genamplifikation gleichzeitig eine stark erhöhte Empfindlichkeit gegen 5-Fluorouracil entwickeln. Die Selektion der resistenten Zellen mit 5-Fluorouracil bewirkt einen raschen Verlust der amplifizierten UMP-Synthase-Genkopien und entsprechend eine Reduzierung der Resistenz gegen Pyrazofurin und 6-Azauridin. Eine spontane Reversion der UMP-Synthase-Genamplifikation ohne 5-Fluorouracil-Selektion ist dagegen nicht beobachtet worden. Die amplifizierten UMP-Synthase-Gene blieben in der verwendeten Zelllinie (V79, chinesische Hamsterzelllinie) auch ohne Selektionsdruck durch Pyrazofurin und 6-Azauridin stabil erhalten, so dass ein Verlust dieser Sequenzen nur durch Selektion in 5-Fluorouracil erzielt werden konnte (Suttle and Qumsiyeh 1993). Weitere Untersuchungen zeigten, dass Amplifikation und nachfolgende Deamplifikation des UMP-Synthase-Gens mehrfach hintereinander induziert werden können. Bei jedem neuen Zyklus wird das UMP-Synthase-Gen zunächst reamplifiziert und anschließend durch 5-Fluorouracil-Selektion

wieder auf die ursprüngliche Kopienanzahl der Ausgangszelllinie (oder Parentallinie) vor Amplifikationsinduktion reduziert (Suttle and Qumsiyeh 1993).

Wie die obigen Beispiele zeigen, lässt sich eine spezifische Genamplifikation relativ leicht in immortalen Zelllinien induzieren. Im Gegensatz dazu ergaben Selektionsversuche an Primärkulturen normaler diploider Zellen, die *in vitro* nur eine begrenzte Lebensdauer haben (mortale Zellen), dass in diesen Zellen keine Induktion einer Genamplifikation möglich ist. Selektionen von primären humanen Epithelzellen, Keratinocyten und Fibroblasten mit MTX, PALA oder Hydroxyurea erzielten keine nachweisbare Amplifikation der Zielgene (Wright et al. 1990; Tlsty 1990).

Auch die Art der Gene, deren Amplifikation induziert werden kann, ist nicht beliebig. Sie ist beschränkt auf Gene, deren Genprodukt durch eine spezifische Substanz so beeinflusst (z.B. gehemmt) werden kann, dass die Zelle nur durch eine Überexpression des Gens überleben kann (s. Tab. 2). Dementsprechend kann die Amplifikation von Onkogenen, die in Tumoren *in vivo* häufig amplifiziert werden (s. Tab. 1), *in vitro* nicht gezielt induziert werden.

In vivo-Genamplifikationen, die auf eine Exposition mit cytotoxischen Substanzen zurückgeführt werden können, sind bei gesunden Menschen nur in Ausnahmefällen beobachtet worden. Ein Beispiel ist die Amplifikation eines "silent" Gens für Serum-BCHE (Butyrylcholinesterase) in einer Farmerfamilie. Das "silent" BCHE-Gen weist eine Punktmutation auf und codiert für ein defektes Enzym, so dass die betroffenen Individuen eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Organophosphat-Insektiziden wie Parathion besitzen. Bei zwei Individuen der Farmerfamilie (Vater und Sohn) konnte eine mindestens 100fache Kopienanzahl des BCHE-Gens nachgewiesen werden, die wahrscheinlich in Zusammenhang mit einer langanhaltenden Parathion-Exposition der Familie steht. Eine Überexpression des BCHE-Gens wurde in den untersuchten peripheren Blutzellen jedoch nicht festgestellt (Prody et al. 1989).

Genamplifikation kann *in vivo* auch in Tumorzellen als ein Resistenzmechanismus gegen Chemotherapeutika auftreten. Dies wurde bei zwei Leukämiefällen, bei denen eine Chemotherapie mit MTX erfolgte, gezeigt. Leukämiezellen, die nach der MTX-Therapie wieder auftraten, wiesen eine 3-4fache Erhöhung der *DHFR*-Kopienanzahl und Resistenz gegen MTX auf (Horns et al. 1984; Carman et al. 1984).

C) Manifestationsformen der Genamplifikation

Eine spontane Genamplifikation kann sich, unabhängig vom amplifizierten Gen, vom Zelltyp und von der Species, cytogenetisch in zwei verschiedenen Formen manifestieren, die in Metaphasen sichtbar werden: extrachromosomal als Double Minutes (Dmin) oder intrachromosomal als Homogeneously Staining Region (HSR) oder Abnormally Banding Region (ABR) bzw. Abnormally Staining Region (ASR) (Cowell 1982; Biedler et al. 1980; Lewis et al. 1982; Kopnin et al. 1992). Die intrachromosomalen Manifestationsformen werden auch unter dem Begriff "Expanded Chromosomal Regions (ECRs)" zusammengefaßt (Windle and Wahl 1992).

Mit Hilfe von *In-situ*-Hybridisierungstechniken konnte in zahlreichen Untersuchungen an Tumorzellen und Tumorzelllinien mit nichtinduzierter und mit induzierter Genamplifikation nachgewiesen werden, dass die vorhandenen Dmin oder HSRs bzw. ABRs die jeweils amplifizierten Gensequenzen enthalten (Fugazza et al. 1997; Alitalo 1985; Corvi et al. 1994; Toledo et al. 1992; Smith et al. 1990; Lewis et al. 1982).

C.1) Extrachromosomale Manifestation: Double Minutes

Dmin erscheinen in Metaphasen als kugelförmige, gepaart auftretende, extrachromosomale Chromatinstrukturen (Cowell 1982; George 1984; Hahn 1993; s. Abb. 7 in Ergebnisse, A.2.2). Sie enthalten wahrscheinlich circuläre DNA, deren ultrastrukturelle Organisation der von Metaphasechromosomen gleicht (Barker and Stubblefield 1979; Hamkalo et al. 1985; van der Blik et al. 1988), und können in der Größe zwischen 250 kb und >7 Mb variieren (Hahn 1993). Ihre Anzahl und Größe können innerhalb einer Zellpopulation von Zelle zu Zelle unterschiedlich sein (Cowell 1982; George 1984).

Dmin besitzen im allgemeinen kein Centromer und werden daher bei der Mitose zufällig auf die Tochterzellen verteilt, wodurch wahrscheinlich die Heterogenität der Dmin-Anzahl pro Zelle innerhalb einer Zellpopulation bedingt ist (Haaf and Schmid 1988; Cowell 1982; Barker et al. 1980). In Metaphasenpräparaten zeigen Dmin häufig eine Assoziation mit den Telomerregionen der Chromosomen, so dass ein Dmin-Transport zusammen mit den assoziierten Chromatiden zu den jeweiligen Polen in der Anaphase denkbar ist (Hamkalo et al. 1985; Cowell 1982). Die Dmin bleiben dabei als gepaarte Strukturen erhalten (Cowell 1982; Barker et al. 1980). In einzelnen Fällen sind auch Dmin, die Centromer-assoziierte DNA (Hammond et al. 1994; Rajcan-Separovic et al. 1995) oder Kinetochorproteine (Wettergren et al. 1995) enthielten, beobachtet worden.

Dmin werden ausschließlich in der Synthese (S)-Phase des Zellzyklus und wie Chromosomen nur einmal repliziert (Barker et al. 1980; Tlsty and Adams 1990). Die Replikation der extrachromosomalen DNA-Sequenzen scheint jedoch anders reguliert zu sein als die intrachromosomaler Sequenzen. Untersuchungen der Replikation von amplifizierten DHFR-Genen in Dmin ergaben, dass die extrachromosomalen DHFR-Gene während der gesamten S-Phase repliziert werden (Tlsty and Adams 1990). Dagegen wird das intrachromosomal lokalisierte Single Copy-DHFR-Gen nur innerhalb der ersten zwei Stunden der S-Phase repliziert (Mariani and Schimke 1984).

Dmin enthalten ein oder mehrere Amplicons, die aus jeweils einer meist unveränderten Kopie des amplifizierten, funktionalen Gens und einem variablen Anteil an flankierenden chromosomalen Sequenzen des Gens bestehen (Hahn 1993; Rizwana and Hahn 1998; Toledo et al. 1992). Innerhalb eines Amplicons können die flankierenden Abschnitte des amplifizierten Gens weitere, benachbart liegende Gene umfassen, so dass eine Coamplifikation von zwei oder mehr Genen innerhalb der Dmin auftreten kann (Pandita et al. 1997). Daneben ist in Tumorzelllinien auch eine Coamplifikation von Genen von unterschiedlichen Chromosomen, die kolokalisiert in denselben Dmin vorlagen, beschrieben worden (Bar-Am et al. 1992).

Als cytogenetische Manifestation einer Genamplifikation sind Dmin sowohl in Tumorgewebe als auch in Tumorzelllinien beobachtet worden. In humanen Tumoren stellen sie offenbar sogar die am häufigsten auftretende Manifestationsform von amplifizierten Gensequenzen dar (Benner et al. 1991). Auch in etablierten humanen Tumorzelllinien scheinen nichtinduzierte Genamplifikationen bevorzugt in Form von Dmin aufzutreten. Im Vergleich zu Tumorgewebe ist bei Tumorzelllinien jedoch die Häufigkeit von intrachromosomal manifestierter Genamplifikation erhöht (Benner et al. 1991).

In Nichttumorzellen sind Dmin sehr selten. Sie wurden z.B. bei cytogenetischen Analysen der peripheren Blutlymphocyten von Patienten mit unterschiedlichen Tumorerkrankungen (Carcinome u.a. solide Tumoren) in 0.2 - 4% der Metaphasen vor der Therapie gefunden (Scappaticci et al. 1995; Madhavi et al. 1990). In der Pränataldiagnostik wurden ebenfalls einzelne Fälle beschrieben, in denen die Amnionzellkulturen einen Anteil an Metaphasen mit Dmin enthielten (Rajcan-Separovic et al. 1995).

Tumorzelllinien, in denen eine Genamplifikation durch Selektion mit einer spezifischen Substanz induziert wird, entwickeln im Verlauf der Selektion die gleichen cytogenetischen Manifestationsformen der Genamplifikation, die auch in Tumoren auftreten (Meyers et al. 1985; Biedler and Spengler 1976). Eine extrachromosomale Genamplifikation in Form von Dmin wird in den erzeugten resistenten Zellen jedoch nur unter Selektionsdruck aufrechterhalten. Bei Kultivierung dieser Zellen ohne die selektionierende Substanz tritt ein fortschreitender Verlust der Dmin und entsprechend auch der Resistenz gegen die selektionierende Substanz ein. Daher werden Dmin als eine instabile Form der Genamplifikation angesehen (Schimke et al. 1981; Masters et al. 1982; Baskin et al. 1981). Ein Grund für die Abnahme von Zellen mit extrachromosomaler Genamplifikation bei fehlendem Selektionsdruck liegt wahrscheinlich darin, dass Zellen ohne oder mit nur geringer Dmin-Anzahl eine schnellere Proliferation zeigen als Zellen mit hohem Dmin-Gehalt und deshalb bei längerfristiger Kultivierung ohne Selektion in der Zellpopulation dominierend werden (Schimke et al. 1981; Haber and Schimke 1981).

In einer selektionierten Zellpopulation kann der Verlust von Dmin nach Entzug des Selektionsdrucks durch die Anwesenheit von Hydroxyurea (Hydroxyharnstoff) in nichtletaler Konzentration im Kulturmedium stark beschleunigt werden (Snapka and Varshavsky 1983; Snapka 1992). Hydroxyurea ist ein Inhibitor des Enzyms Ribonukleotid-Reduktase, das die Reduktion von Ribonukleosiddiphosphaten zu Desoxyribonukleosiddiphosphaten und damit einen wichtigen Schritt bei der DNA-Synthese katalysiert (Stryer 1990). Die schnelle Elimination von Dmin unter Hydroxyurea-Einwirkung wurde in verschiedenen humanen und Nager-Zelllinien mit induzierter Amplifikation von unterschiedlichen Genen beobachtet (Von Hoff et al. 1991; Snapka 1992). Die gleiche Eliminationswirkung auf extrachromosomal amplifizierte Gensequenzen zeigte Hydroxyurea auch bei humanen Tumorzelllinien mit nichtinduzierter Amplifikation von Protoonkogenen wie z.B. *MYC* und *EGFR* (Von Hoff et al. 1992; Snapka 1992; Canute et al. 1996). In höheren als den zur Dmin-Elimination verwendeten Konzentrationen kann Hydroxyurea selbst als amplifikationsinduzierende Substanz wirken und eine extra- oder intrachromosomale Amplifikation des Ribonukleotid-Reduktase-Protein M2-Gens erzeugen (Wettergren et al. 1994; s. Tab. 2).

Eine extrachromosomale Genamplifikation kann sich nicht nur in Form von Dmin manifestieren, sondern auch in Form von submikroskopisch kleinen, circulären DNA-Molekülen, die als "Episomen" und "Amplisomen" bezeichnet worden sind (Carroll et al. 1988; Pauletti et al. 1990). Episomen mit einer Größe von 120 - >250 kb wurden in Zelllinien mit amplifiziertem *MYC* und mit induzierter Amplifikation der CAD-Gene gefunden und als Vorläufer von Dmin angesehen (Von Hoff et al. 1988; Carroll et al. 1988; Von Hoff 1991). Amplisome entsprechen in ihren Eigenschaften den Episomen, scheinen aber im Gegensatz zu Episomen nicht in Chromosomen integrieren zu können (Esnault et al. 1994).

C.2) Intrachromosomale Manifestation: Homogeneously Staining Regions

Eine HSR stellt ein ausgedehntes Chromosomensegment dar, dass in G-gebänderten Metaphasechromosomen eine homogene Färbung mittlerer Intensität ohne erkennbare Bänderung aufweist (s. Abb. 1; Biedler and Spengler 1976; Biedler et al. 1980). Ein vergleichbares Chromosomensegment mit abnormalem Bänderungsmuster wird als ABR bzw. ASR bezeichnet (Biedler et al. 1980; Lewis et al. 1982; Kopnin et al. 1992).

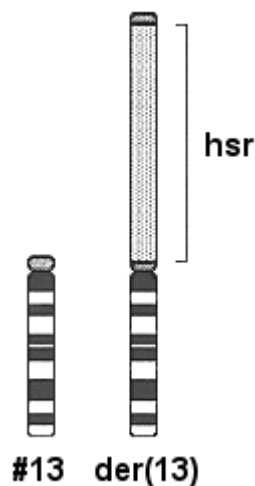


Abb. 1: Schema einer Homogeneously Staining Region (hsr), die im kurzen Arm eines Chromosoms 13 lokalisiert ist (rechtes Chromosom, der(13)). Links daneben ein normales Chromosom 13 (#13).

(Abbildung entnommen aus: Brodeur 1993, modifiziert)

HSRs können innerhalb eines Chromosoms interstitiell oder terminal lokalisiert sein (Biedler and Spengler 1976). Ihre Größe kann variieren und einen Anteil von bis zu 20% der Gesamtchromosomenlänge einer mitotischen Zelle einnehmen (Hamlin et al. 1984). Pro Zelle können ein oder mehrere HSRs vorliegen. Innerhalb einer Zellpopulation ist jedoch die Anzahl, Größe und chromosomale Position der HSRs in allen Zellen gleich. Da HSRs in Chromosomen integriert sind, werden sie bei der Mitose gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt (Hamlin et al. 1984).

HSRs werden überwiegend als frühreplizierend angesehen (Cowell 1982; Hamlin et al. 1984; Milbrandt et al. 1981; Kellems et al. 1982), obwohl es auch Untersuchungen gibt, die eine Replikation von amplifizierten Gensequenzen in HSRs über die gesamte S-Phase beschreiben (Caddle and Heintz 1990). Die Replikation wird innerhalb einer HSR synchron an den jeweiligen Replikationsursprüngen der einzelnen Amplicons gestartet (Milbrandt et al. 1981; Hamlin et al. 1984; Burhans et al. 1986).

Eine HSR enthält zahlreiche Amplicons, die in Form von direkten oder invertierten Repeats angeordnet sind. Ein Amplicon setzt sich meist aus einer unveränderten Kopie des amplifizierten, funktionalen Gens sowie aus flankierenden Sequenzen aus der Umgebung des ursprünglichen Genlocus zusammen (Windle and Wahl 1992; Amler et al. 1992; Ma et al. 1988; Ford and Fried 1986; Hyrien et al. 1988). Innerhalb einer HSR kann auch eine Coamplifikation von benachbart liegenden Genen oder von Genen, die ursprünglich von verschiedenen Chromosomen stammen, erfolgen (Pandita et al. 1997; Mäkelä et al. 1992; Gaudray et al. 1992).

Die chromosomale Lokalisation von HSRs ist in humanen Tumorzelllinien variabel und erscheint sowohl in Linien mit induzierter als auch mit nichtinduzierter Genamplifikation zufällig. HSRs befinden sich oft nicht auf dem Chromosom, das das originale Gen, das amplifiziert wurde, trägt (Amler et al. 1992; Corvi et al. 1994; Wolman et al. 1983; Srimatkandada et al. 1983). Bei chinesischen Hamsterzelllinien mit induzierter Genamplifikation sind HSRs dagegen häufig auf dem Chromosom mit dem parentalen Gen, jedoch in Distanz zu diesem, lokalisiert (Trask and Hamlin 1989).

In Tumoren treten HSRs im Vergleich zu Dmin seltener auf. Bei Tumorzelllinien ist die Häufigkeit von HSRs zwar höher als in Tumoren, aber hier scheinen Dmin ebenfalls die vorherrschende Manifestationsform einer Genamplifikation darzustellen (Benner et al. 1991). Während Dmin sporadisch auch in Nicht-tumorzellen gefunden wurden (Scappaticci et al. 1995; Rajcan-Separovic et al. 1995), ist dies für HSRs nicht beschrieben worden.

Nach induzierter Genamplifikation bleiben HSRs im Gegensatz zu Dmin nach Aufheben des Selektionsdrucks in den selektionierten Zellen meist bestehen und werden deshalb als stabile Manifestationsform einer Genamplifikation betrachtet (Schimke et al. 1981; Wolman et al. 1983; Domin et al. 1983). In Zelllinien des chinesischen Hamsters mit induzierter intrachromosomaler Genamplifikation wurde jedoch bei langfristiger Kultivierung (>1 Jahr) ohne die jeweilige Selektionssubstanz ein fortschreitender Abbau der HSRs beobachtet, der von einer Abnahme der Resistenz gegen die Selektionssubstanz begleitet war (Biedler et al. 1980; Meyers et al. 1985). Hydroxyurea, das in Zelllinien nach Entzug des Selektionsdrucks den Verlust von Dmin stark beschleunigt (s. C.1), zeigt unter gleichen Bedingungen keine Wirkung auf die Stabilität von HSRs (Von Hoff et al. 1991; Von Hoff et al. 1992; Snapka 1992).

Intrachromosomale Genamplifikation kann sich auch durch Anreicherung von Amplicons auf einem Chromosom ohne Ausbildung einer HSR manifestieren. Dies ist z.B. in den außergewöhnlich großen Marker- und Ringchromosomen, die in Sarkomen auftreten, der Fall (Gisselsson et al. 1998). Bei induzierter Genamplifikation scheinen Markerchromosomen mit erhöhter Kopienanzahl des amplifizierten Gens frühe Stadien der Amplifikationsentwicklung zu kennzeichnen (Smith et al. 1995; Smith et al. 1992; Smith et al. 1990).

C.3) Beziehungen zwischen extra- und intrachromosomaler Manifestation der Genamplifikation

Die Amplifikation einer Gensequenz manifestiert sich in einer Zelle entweder in Form von HSRs oder Dmin, während eine gleichzeitige intra- und extrachromosomale Amplifikation eines Gens nur in Ausnahmefällen auftritt (Cowell 1982; Toledo et al. 1992). Innerhalb einer Tumorzellpopulation können jedoch Subpopulationen mit jeweils intra- oder extrachromosomaler Amplifikation des gleichen Gens vorliegen (Fegan et al. 1995). Unterschiedliche Gensequenzen können in einer Zelle nebeneinander in extra- und intrachromosomaler Manifestation amplifiziert sein (Biedler and Spengler 1993). In einigen Tumorzelllinien sind auch Übergänge zwischen HSRs und Dmin beschrieben worden (Kopnin 1981; Levan et al. 1992).

D) Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war die Analyse von Genamplifikation in Tumorzellen, die durch Einsatz klassischer cytogenetischer Methoden und verschiedener Techniken der Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung, unter anderem der Comparativen Genomischen Hybridisierung, erfolgen sollte.

Zur Analyse einer nichtinduzierten Genamplifikation stand ein Leukämiefall zur Verfügung, der im Rahmen einer Leukämiediagnostik bearbeitet wurde. Darüber hinaus sollten durch Induktion einer Genamplifikation an der humanen Tumorzelllinie HeLa S3 weitere Erkenntnisse über die chromosomalen Veränderungen während der Entwicklung einer Genamplifikation gewonnen werden.

Methoden

Eine Auflistung der verwendeten Chemikalien, Geräte und weiteren Materialien mit den Herstellerfirmen sowie die Zusammensetzung der angesetzten Lösungen befinden sich im Anhang.

A) Sterilarbeiten und Zellkultivierungsbedingungen

Alle Sterilarbeiten, die bei der Kultivierung der eukaryontischen Zellkulturen und der Bakterienstämme zur Plasmidisolierung erforderlich waren, wurden in einer sterilen Werkbank durchgeführt.

Die Sterilisation von unsterilen Lösungen erfolgte im Dampfdrucktopf (30 min bei 100°C; Überprüfung mittels Autoklavierband) oder durch Sterilfiltrierung mittels Sterilfilter mit 0.22 µm Porengröße.

Zur Kultivierung der eukaryontischen Zellkulturen wurde ein Brutschrank mit 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit verwendet.

B) Zellkultivierung

B.1) Kurzzeitkultivierung von Knochenmark und Blut

Zur cytogenetischen Leukämiediagnostik wurde routinemässig heparinisiertes Knochenmark (KM) und, falls vorhanden, auch heparinisiertes peripheres Venenblut (PB) verwendet, das in speziellen, sterilen Transportröhrchen vom behandelnden Arzt zugesendet wurde.

In dem hier untersuchten Fall von akuter myeloischer Leukämie (AML) erfolgten nach der Erstdiagnose insgesamt fünf weitere Diagnosen aus KM und/oder PB, die im Verlauf der Erkrankung zur Kontrolle der chemotherapeutischen Behandlung oder zur Feststellung eines Rezidivs erforderlich waren. Für die cytogenetischen Analysen wurden Metaphasenpräparate aus KM und/oder PB nach Kurzzeitkultivierung und bei genügend Material auch durch Direktpräparation hergestellt.

Durchführung:

- 1) KM und/oder PB im Transportröhrchen 8 min bei 1200 rpm abzentrifugieren
- 2) Überstand entfernen, durch ein entsprechendes Volumen Medium für KM und PB ersetzen, Zellen resuspendieren = Originalsuspension; an einem Aliquot der Originalsuspension eine Erythrocytenlyse und Zellzahlbestimmung zur Einstellung der optimalen Zellzahl in den anzusetzenden Kulturen vornehmen:
- 3) 100 µl Originalsuspension mit 900 µl 1%iger Essigsäure zur Erythrocytenlyse ca. 1 min durchmischen = 1:10-Verdünnung
- 4) gegebenenfalls weitere Verdünnungen der 1:10-Verdünnung mit 1%iger Essigsäure vornehmen, bis eine Zellzählung möglich ist; Erfahrungswerte für Verdünnungen: leukämisches KM: 1:1000, PB: 1:10
- 5) die Zell-Essigsäure-Mischung in eine Neubauer Zählkammer füllen, am Lichtmikroskop im Phasenkontrast die Zellzahl in 4 großen Quadraten bestimmen

- 6) die Zellzahl/ml der Originalsuspension wie folgt berechnen:
 (Summe Zellen in 4 grossen Quadraten : 4) x 10^4 x Verdünnungsfaktor = Zellen/ml Originalsuspension;
 Verdünnungsfaktor = vorgenommene Verdünnung der Originalsuspension mit 1%iger Essigsäure
- 7) Zellsuspension mit 1×10^7 Zellen/ml aus Originalsuspension durch Verdünnen mit Medium herstellen
- 8) Kurzzeitsuspensionskulturen in Blutkulturtöpfen ansetzen aus:
 9 ml Medium für KM und PB + 1 ml Zellsuspension mit 1×10^7 Zellen/ml
 Dies ergibt die für KM- und PB-Kulturen optimale Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml Medium. Beim AML-Fall wurde je nach vorhandener Zellzahl mindestens eine Kurzzeitkultur und eine Kultur zur Direktpräparation angesetzt.
- 9) zur Proliferationsstimulation von bestimmten Zelltypen eines der folgenden Mitogene zugeben:
 a) Stimulation von Zellen der myeloischen Reihe in KM- und PB-Kulturen mit:
 20 µl Leucomax-Gebrauchslösung pro 10 ml-Kultur (= 10 ng Molgramostim (111 U)/ml Medium)
 b) Stimulation von T-Lymphocyten in PB-Kulturen mit:
 0.2 ml Phytohämagglutinin-Lösung pro 10 ml-Kultur
- 10) Leucomax-stimulierte Kulturen jeweils für 24 h und 48 h, Phytohämagglutinin-stimulierte Kulturen für 72 h im Brutschrank inkubieren
- 11) Kultur zur Direktpräparation: wie in Schritt 9) beschrieben ansetzen, ohne Mitogenzusatz, sofortige Weiterverarbeitung nach C) zur Metaphasenpräparation

B.2) Kultivierung und Selektion von HeLa-Zellen

Die Versuche zur Induktion von Genamplifikation durch Selektion mit einer spezifischen Substanz wurden an der humanen Zelllinie HeLa S3 durchgeführt.

B.2.1) Die HeLa-Zelllinie

Die HeLa-Zelllinie wurde 1952 aus einem Cervixcarcinom angelegt und seitdem weitgehend ununterbrochen in Zellkultur gehalten. Sie wurde nach den Namensinitialen der Afrikanerin Henrietta Lacks, der das Ausgangsgewebe für die Zelllinie entnommen wurde, benannt (Gey et al. 1952; Nagl 1980).

Die Linie HeLa S3 wurde als Klon aus einer einzelnen Zelle der originalen HeLa-Linie etabliert (Chen 1988, z.v. Puck et al. 1956). HeLa S3-Zellen wachsen adhärent und besitzen einen hypotriploiden Karyotyp mit zahlreichen chromosomalen Rearrangements (Chen 1988). In dieser Arbeit wurde HeLa S3 zur experimentellen Genamplifikationsinduktion eingesetzt, da sie ohne großen Aufwand kultivierbar war und erfolgreiche Induktionen von Genamplifikationen in dieser Zelllinie bereits beschrieben wurden (Ash et al. 1984; Kanalas et al. 1985; Sharma and Schimke 1994).

B.2.2) Die Selektionssubstanz

Zur Induktion einer Genamplifikation in HeLa S3-Zellen wurde Methotrexat (MTX) als selektionierende Substanz eingesetzt. MTX ist ein Dihydrofolatanalogon (s. Abb. 2) und damit ein kompetitiver Inhibitor der Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) (Williams et al. 1979).

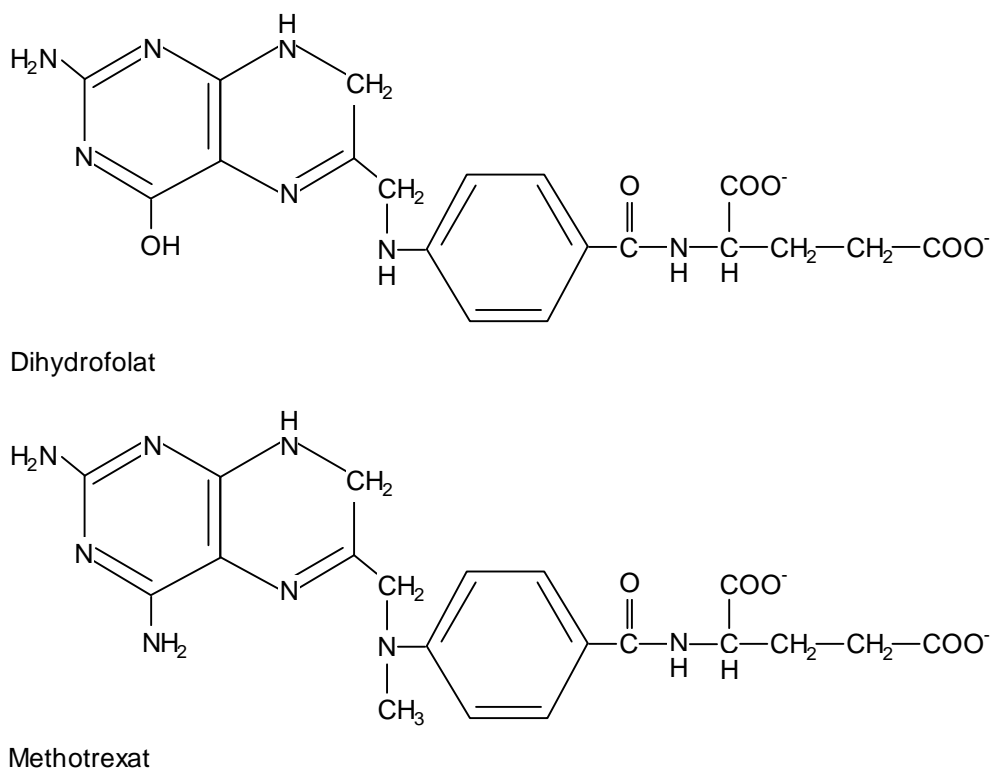
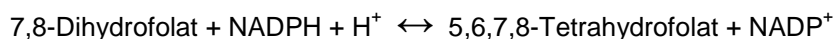
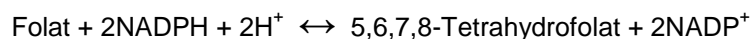


Abb. 2: Strukturformeln von Dihydrofolat und Methotrexat

Das Enzym DHFR katalysiert die Reduktion von Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat:



und zu einem geringeren Maß die Reduktion von Folat zu Tetrahydrofolat:



(Schweitzer et al. 1990).

Tetrahydrofolat wird für die Desoxythymidylatsynthese und Purinsynthese benötigt. Die Hemmung der Tetrahydrofolatregenerierung durch Dihydrofolatanaloga wie MTX bewirkt daher eine Hemmung der Nukleotidbiosynthese (Stryer 1990). MTX wird aufgrund seiner Wirkung zur chemotherapeutischen Behandlung von Tumorerkrankungen und daneben auch zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie z.B. rheumatische Arthritis eingesetzt (Schweitzer et al. 1990).

Tumorzellen können auf unterschiedlichen Wegen Resistenz gegen MTX entwickeln (Banerjee et al. 1995; Bertino et al. 1996). Einer der häufigsten Resistenzmechanismen ist die Amplifikation des Dihydrofolat-Reduktase-Gens (*DHFR*), die sich in Tumorzelllinien durch Selektion mit MTX gezielt und reproduzierbar induzieren lässt (Sharma and Schimke 1994). Dies ermöglicht es, die Induktion der *DHFR*-Amplifikation durch MTX als ein Modellsystem zur Untersuchung der zellulären Vorgänge während der Entwicklung einer Genamplifikation zu nutzen.

B.2.3) Auftauen und Kultivierung der HeLa-Zellen

Die HeLa S3-Zelllinie wurde im Labor bereits als eingefrorener Zellstock gelagert und zur Kultivierung aufgetaut. Die daraus entstandene HeLa-Zellkultur wurde subkultiviert und die Subkulturen zum Anlegen

eines Zellvorrats wieder eingefroren. Sie bildeten die Parentallinien, die für die einzelnen Selektionsversuche verwendet wurden.

Zum Schutz vor bakteriellen Infektionen wurde dem Zellkulturmedium Gentamycin zugesetzt, das sowohl gegen grampositive als auch gegen gramnegative Bakterien und gegen mehrere Mycoplasmen-Stämme wirksam ist. Es besitzt zudem eine höhere Stabilität bei der Zellkultivierungstemperatur von 37°C als die häufig verwendete Penicillin/Streptomycin-Mischung (Lindl und Bauer 1994).

Durchführung:

- 1) Cryotube mit eingefrorenem HeLa S3-Zellstock schnell bei 37°C auftauen
- 2) aufgetaute Zellsuspension in ein 15 ml-Röhrchen überführen
- 3) langsam tropfenweise 5 ml Medium für HeLa-Zellen zur Zellsuspension geben
- 4) mit Medium für HeLa-Zellen auf 10 ml auffüllen, leicht resuspendieren
- 5) 10 min bei 1000 rpm abzentrifugieren, Überstand entfernen, Zellen in 10 ml Medium für HeLa-Zellen resuspendieren; diesen Schritt 1x wiederholen
- 6) Zellsuspension in eine 75 cm²-Zellkulturflasche füllen und im Brutschrank inkubieren
- 7) Mediumwechsel nach 24 h durchführen:
altes Zellkulturmedium entfernen und pro 75 cm²-Zellkulturflasche 10 ml frisches Medium für HeLa-Zellen zugeben; HeLa-Kultur im Brutschrank inkubieren; Mediumwechsel alle 2-3 Tage wiederholen

B.2.4) Subkultivierung und Selektion

Vor Beginn einer Selektion wurden jeweils Zellen aus dem Zellvorrat der HeLa-Parentallinie aufgetaut und in Kultur gebracht (s. B.2.3). Die Parentallinienkultur wurde mit einem DAPI-Test, durchgeführt nach der Methode von Lindl und Bauer 1994, auf Mycoplasmenkontamination überprüft. Eine Kontamination konnte bei den verwendeten Parentallinienkulturen nicht festgestellt werden. Während der Selektionsversuche wurden aufgrund der zum Teil erheblich verlangsamten Zellproliferation keine weiteren Kontaminationstests vorgenommen.

HeLa-Zellkulturen wurden generell subkultiviert, wenn der Zellrasen ca. 75% der verfügbaren Oberfläche in der Zellkulturflasche bedeckte (ca. 75% Konfluenz). Die Subkultivierung erfolgte i.d.R. in Verbindung mit dem Start einer neuen Selektion oder eines neuen Selektionsschrittes.

Die Selektion der HeLa-Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Sharma and Schimke 1994 in Form von Mehrschrittselektionen, bei denen die jeweiligen Zellpopulationen schrittweise ansteigenden Konzentrationen der Selektionssubstanz ausgesetzt werden. Dieses Verfahren führt bei MTX häufig zur Resistenzentwicklung durch Amplifikation des DHFR-Gens (Schimke 1984, 1986; Sharma and Schimke 1994). Um selektive Bedingungen zu gewährleisten, wurde für jeden Selektionsschritt eine neue Subkultur mit einer niedrigen, konstanten Zellzahl aus der Kultur des vorangegangenen Selektionsschrittes bzw. bei Selektionsstart aus der Parentallinienkultur angelegt. Diese Subkultur wurde mit einer höheren (i.d.R. der doppelten) als der bisherigen Konzentration der Selektionssubstanz kultiviert.

Bei jeder Subkultivierung wurden die nicht für die neue Kultur benötigten Zellen aufgeteilt. Ein Teil dieser Zellen wurde zur Metaphasenpräparation verwendet und der restliche Teil eingefroren. Für die Metaphasenpräparation war es notwendig, die gesamte Zellkultur während der Subkultivierung zum Metaphasenarrest kurzzeitig mit Colcemid zu behandeln. Das Colcemid wurde von den zum Anlegen der Subkultur

vorgesehenen Zellen schnellstmöglichst wieder entfernt, um die Einwirkung auf die Zellen gering zu halten. Die eingefrorenen Zellen dienen während eines Selektionsversuchs als Reserve für den Fall, dass sich die für den neuen Selektionsschritt verwendete Substanzkonzentration als zu hoch erweisen und zum Absterben der Zellen führen würde. Dann wäre ein erneuter Selektionsschritt mit den Reservezellen möglich, ohne die gesamte Selektion neu beginnen zu müssen. Dieser Fall trat bei den durchgeführten Selektionen jedoch nicht ein. Die eingefrorene Zellreserve wurde nach Abschluss der Selektionen zum Teil zur DNA-Isolation für die CGH-Ansätze (s. G) verwendet.

Vor Beginn der Selektionen mit MTX war die Festlegung einer MTX-Startkonzentration notwendig. Dazu wird häufig die in Cytotoxizitätstests ermittelte LD₅₀ (mittlere letale Dosis), d.h. die Substanzkonzentration, bei der 50% der exponierten Zellen absterben, herangezogen, die jedoch innerhalb einer Zelllinie aufgrund der Heterogenität der Zellen stark schwanken kann (Sharma and Schimke 1994). Daher wurde auf einen Cytotoxizitätstest verzichtet und ein Vorversuch durchgeführt, in dem mehrere HeLa-Kulturen mit unterschiedlichen MTX-Konzentrationen (10, 20, 30, 50 und 70 nM) über einen Zeitraum von einer Woche kultiviert wurden. Grundlage für die Auswahl dieser Konzentrationen bildete ein in der Literatur für HeLa S3 angegebener LD₅₀-Wert für MTX von 15 nM (Sharma and Schimke 1994). Aufgrund des Wachstumsverhaltens der einzelnen Kulturen, das während der Kultivierung nach optischem Eindruck (Zunahme der Konfluenz, Auftreten von abgestorbenen Zellen im Medium) und im Vergleich zu einer Kontrollkultur ohne MTX beurteilt wurde, wurde die Startkonzentration für die MTX-Selektionen auf 30 nM MTX festgelegt. Bei dieser Konzentration zeigten die HeLa-Zellen bereits eine verlangsamte Proliferation, die auf die Wirkung eines Selektionsdrucks schließen ließ, aber es war noch kein massives Absterben von Zellen (d.h. $\geq 50\%$ der Zellpopulation) zu beobachten.

Durchführung:

- 1) 1% (v/v; 0.1 ml/10 ml Medium) steriles Colcemid ins Medium der zu ca. 75% konfluenten HeLa S3-Kultur geben
- 2) Kultur 20 min im Brutschrank inkubieren
- 3) Medium entfernen; 7 ml Versen+Colcemid zugeben und 5 min im Brutschrank inkubieren
- 4) Zellen durch leichtes Klopfen gegen die Seitenwände der Zellkulturflasche vom Boden ablösen; Ablösung der Zellen im Umkehrlichtmikroskop kontrollieren
- 5) Versen+Colcemid mit den abgelösten Zellen in ein 15 ml-Röhrchen überführen
- 6) Zellkulturflasche mit 7 ml Versen+Colcemid ausspülen, diese Lösung in das 15 ml-Röhrchen mit vorheriger Suspension (s. Schritt 5) überführen
- 7) Zellsuspension 8 min bei 1200 rpm abzentrifugieren; Überstand entfernen
- 8) Zellpellet in 10 ml Medium+Colcemid resuspendieren
- 9) 1 Tropfen der Zellsuspension in eine Neubauer Zählkammer geben und die Zellzahl bestimmen (s. B.1, Schritte 5 und 6)
- 10) aus der Zellsuspension ein Volumen mit 5×10^5 Zellen (für MTX-Selektionen) bzw. 1×10^6 Zellen (für Langzeitkultivierung) entnehmen und in ein 15 ml-Röhrchen überführen
- 11) mit Medium für HeLa-Zellen auf 10 ml auffüllen; bei MTX-Selektion die für den nächsten Selektionsschritt benötigte MTX-Konzentration durch Zugabe eines entsprechenden Volumens MTX-Stammlösung herstellen, bei Langzeitkultivierung nichts zugeben

- 12) Schritt 7) durchführen
- 13) Zellpellet in 10 ml Medium für HeLa-Zellen, bei MTX-Selektion mit der benötigten MTX-Konzentration, resuspendieren und in eine neue 75 cm²-Zellkulturflasche geben
- 14) HeLa-Subkultur im Brutschrank inkubieren und nach 24 h einen Mediumwechsel (s. B.2.3, Schritt 7), gegebenenfalls mit Zugabe der Selektionssubstanz, durchführen
- 15) nach Anlegen der Subkultur restliche Zellsuspension halbieren und eine Hälfte einfrieren (s. B.2.5), die andere Hälfte zur Metaphasenpräparation (s. C) verwenden

B.2.5) Einfrieren von HeLa-Zellen

Zur langfristigen Aufbewahrung (über Jahre) und als Zellreserve wurden HeLa-Zellen eingefroren und in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert. Eine kurzfristigere Lagerung bis zu 1 Jahr erfolgte bei -70°C.

Durchführung:

- 1) einzufrierende HeLa-Zellsuspension 8 min bei 1200 rpm abzentrifugieren; Überstand entfernen
- 2) Zellen in erforderlichem Volumen Einfrieremedium für HeLa-Zellen (1.5 ml pro Cryotube) resuspendieren
- 3) Zellsuspension in Cryotubes (auf 4°C vorgekühlt) einfüllen und Cryotubes schnell in -20°C bringen
- 4) Zellen 10-30 min bei -20°C einfrieren; Cryotubes in -70°C überführen
- 5) Cryotubes zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführen

B.2.6) Bestimmung von Generationszeiten und -zahlen

Die Generationszeit oder Populationsverdopplungszeit gibt die Zeit an, die eine Zellpopulation benötigt, um ihre Zellzahl zu verdoppeln (Lindl und Bauer 1994; McAteer and Davis 1994).

Die Generationszahl gibt die Anzahl der Zellgenerationen pro Zeiteinheit (Lindl und Bauer 1994; McAteer and Davis 1994), hier pro Dauer eines Selektionsschrittes, an.

Bei allen Selektionsversuchen an HeLa-Zellen wurden die Generationszeiten und -zahlen der jeweiligen Sublinien bestimmt, um Aufschluss über das Wachstumsverhalten der Zellen unter Selektionsdruck zu erhalten. Zur Berechnung dieser Parameter wurden jeweils die Zellzahlen zu Beginn und zum Ende eines Selektionsschrittes sowie die Dauer eines Selektionsschrittes verwendet (s. B.2.4). Die auf diese Weise ermittelte Generationszeit charakterisierte das Proliferationsverhalten der gesamten Zellpopulation einer Sublinie und entsprach nicht der Zellzyklusdauer individueller Zellen.

Die Berechnung von Generationszeit und -zahl erfolgte nach folgenden Formeln (Lindl und Bauer 1994):

- Generationszeit $t = [\log 2 \times dt] / [\log N - \log N_0]$
- Generationszahl $n = [\log N - \log N_0] / \log 2$

mit:

dt = Kultivierungszeit einer Sublinie (bzw. Subkultur) vom Anlegen bis zur nächsten Subkultivierung in h;

N = Endzellzahl, die beim Zeitpunkt der nächsten Subkultivierung (d.h. bei ca. 75% Konfluenz einer Kultur, s. B.2.4) vorliegt;

N₀ = Anfangszellzahl, mit der eine neue Sublinie bzw. Subkultur angelegt wird (s. B.2.4)

C) Metaphasenpräparation

Die Metaphasenpräparationen erfolgten unter unsterilen Bedingungen. Bei den KM- und PB-Kulturen wurden die Präparationen entsprechend den folgenden Angaben ab Schritt 1), bei den HeLa-Kulturen ab Schritt 3) durchgeführt. Während der Selektionsversuche an HeLa-Zellen wurde nach jeder Subkultivierung bzw. nach jedem Selektionsschritt eine Metaphasenpräparation vorgenommen, so dass eine cytogenetische Analyse der jeweils vorliegenden Zellpopulation möglich war.

Durchführung:

- 1) Metaphasenarrest mit Colcemid wie folgt durchführen:
 - a) bei KM- und PB-Kulturen für Direktpräparation und mit Leucomax-Stimulierung:
Zugabe von 0.1 ml Colcemid pro 10 ml-Kultur für 30 min vor Kulturabbruch
 - b) bei Phytohämagglutinin-stimulierten PB-Kulturen:
Zugabe von 0.1 ml Colcemid pro 10 ml-Kultur für 2 h vor Kulturabbruch
- 2) Zellsuspension aus dem Blutkulturtopf in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführen
- 3) Zellsuspension 8 min bei 1200 rpm abzentrifugieren; Überstand bis auf ca. 1 cm über dem Zellpellet entfernen
- 4) Hypotoniebehandlung: mit 0.56%iger KCl auf 10 ml auffüllen, Zellen resuspendieren, für 15 min bei 37°C inkubieren
- 5) Schritt 3) wiederholen, Zellen resuspendieren
- 6) Fixierung: 1 ml Fixans tropfenweise unter ständigem Durchmischen zur Zellsuspension geben, danach mit Fixans auf 10 ml auffüllen und durchmischen; für mindestens 30 min bei 4°C fixieren
- 7) Waschen der Zellsuspension: Zellsuspension 8 min bei 1200 rpm abzentrifugieren, Überstand soweit wie möglich entfernen, mit Fixans auf 10 ml auffüllen, Zellen resuspendieren
- 8) Schritt 7) 2x wiederholen; das Zellpellet sollte nach dem letzten Waschschrift nahezu weiß erscheinen, anderenfalls Schritt 7) wiederholen;
nach dem letzten Abzentrifugieren Überstand entfernen, ein kleines Volumen Fixans zugeben (Fixans-Volumen nach Größe des Pellets abschätzen) und resuspendieren, so dass eine leicht milchig-trübe Zellsuspension entsteht
- 9) Auftropfen der Zellsuspension zur Metaphasenpräparation:

Objektträger in A. dest. (RT) einstellen;
direkt vor dem Auftropfen einen Objektträger herausnehmen und kurz senkrecht stellen, bis nur noch ein dünner Flüssigkeitsfilm den Objektträger bedeckt;
auf diesen Flüssigkeitsfilm aus ca. 8 cm Höhe mehrere Tropfen der Zellsuspension nebeneinander auftropfen und den Objektträger zum Abfließen der überschüssigen Flüssigkeit kurz senkrecht stellen;
Objektträger zum Trocknen auf eine 56°C warme Heizplatte legen
- 10) nach Trocknung der Präparate Metaphasenqualität im Lichtmikroskop unter Phasenkontrast begutachten:

Eine gute Metaphasenqualität lag vor, wenn die Metaphasen auf dem Präparat ausreichenden Abstand voneinander hatten und nicht zerrissen erschienen und die Chromosomen homogen dunkel und frei von Cytoplasmaresten waren. Dies war Voraussetzung für die weitere Verarbeitung der Präparate (Bänderungen, Fluoreszenz-in situ-Hybridisierungen).

11) Metaphasenpräparation über Wasserdampf:

In Fällen, in denen mit der in Schritt 9) beschriebenen Methode keine guten Metaphasenpräparate hergestellt werden konnten, wurde die Metaphasenpräparation wie folgt modifiziert:

Schritte 1) - 8) wie oben beschrieben durchführen;

Wasser in einem Wasserbad soweit erhitzen, dass leichter Wasserdampf aufsteigt; zwei Glas- oder Metallstäbe als Träger für die Metaphasenpräparate quer über das Wasserbad legen;

trockene Objektträger kurz anhauchen, so dass die Oberfläche leicht beschlägt;

auf die beschlagene Oberfläche des Objektträgers wie in Schritt 9) mehrere Tropfen der Zellsuspension nebeneinander auftropfen und den Objektträger sofort auf die Träger über dem Wasserbad legen;

Objektträger solange über Wasserdampf belassen, bis die Oberfläche mit der aufgetropften Zellsuspension vollständig trocken ist; Schritt 10) durchführen

12) Zellsuspension zur langfristigen Lagerung (ein bis mehrere Jahre) bis zum Rand des Röhrchens mit Fixans auffüllen, Röhrchen fest verschliessen und bei -20°C aufbewahren

D) Färbungs- und Bänderungsmethoden

D.1) Giemsa-Färbung

Giemsa bezeichnet ein Gemisch aus verschiedenen Thiazinfarbstoffen (Oxidationsprodukte von Methylen Blau, z.B. Azur B) und Eosin Y. Diese Kombination färbt Chromatin rot-violett an (Sharma and Sharma 1980; Sumner 1982; Sumner 1990). Die Anfärbung beruht wahrscheinlich auf der Bindung von Molekülen des Farbstoffgemisches an die DNA und nachfolgender Ausbildung eines Farbstoffniederschlags, der durch eine hydrophobe Umgebung (hydrophobe chromosomale Proteine) begünstigt wird (Sumner 1982; Sumner 1990). Durch Giemsa werden humane Chromosomen einheitlich im Ganzen gefärbt. Dies ermöglicht eine numerische Auswertung der Chromosomenanzahl pro Metaphase sowie das Erkennen von einigen strukturellen Aberrationen wie z.B. Gaps und Brüchen.

Die Giemsa-Färbung wurde zur Ermittlung der Dmin-Anzahl pro Metaphase sowie bei den Selektionsversuchen an HeLa-Zellen zusätzlich zur Bestimmung der Chromosomenanzahl pro Metaphase und zur Analyse von verschiedenen strukturellen Aberrationen verwendet (s. E.1).

Durchführung:

- 1) Metaphasenpräparate 10 min in der Giemsa-Gebrauchslösung für G-Bänderung färben
- 2) Präparate in A. dest. spülen und lufttrocknen

D.2) G-Bänderung

Die G-Bänderung ist eine Methode zur Erzeugung eines Querbandenmusters auf Metaphasechromosomen. Dieses Bandenmuster ist für jedes Chromosom spezifisch und ermöglicht so eine individuelle Identifizierung der einzelnen Chromosomen. Daher wird diese Bänderungsmethode standardmäßig zur Karyotypisierung insbesondere von humanen Chromosomensätzen und zur detaillierten Analyse numerischer und struktureller Chromosomenaberrationen wie z.B. Translokationen angewendet.

Zur G-Bänderung von Metaphasenpräparaten wurde die GTG-Technik, d.h. G-Bänderung mit Trypsin und Giemsa-Färbung, eingesetzt. Diese erfordert eine Vorbehandlung der Metaphasenpräparate in Form einer 'Alterung' und eine anschließende Trypsinbehandlung. Nach Giemsa-Färbung zeigen die so behandelten Chromosomen eine differentielle Anfärbung bzw. Bänderung mit dunklen (positive G-Banden) und hellen (negative G-Banden) Abschnitten. Durch die Trypsineinwirkung werden wahrscheinlich Proteine aus bestimmten Chromosomenabschnitten extrahiert und die dadurch veränderte Zusammensetzung des Chromatins resultiert in einer unterschiedlichen Anfärbbarkeit von Chromosomenabschnitten mit dem Giemsa-Färbestoffgemisch. Positive G-Banden zeigen A+T-reiche DNA-Regionen an (Sumner 1982; Sumner 1990).

Eine G-Bänderung wurde zur cytogenetischen Leukämiediagnostik an Metaphasenpräparaten aus KM- und PB-Kulturen sowie zur Karyotypisierung und Analyse von bestimmten Chromosomen und Markerchromosomen an HeLa-Metaphasenpräparaten vorgenommen (s. E.2 und E.3).

Durchführung:

1) Metaphasenpräparate zur Alterung 3 Tage bei RT lagern oder über Nacht auf eine 56°C warme Heizplatte legen

2) Austesten der Trypsinierungszeit:

Da die Dauer der zur G-Bänderung erforderlichen Trypsinbehandlung (Trypsinierungszeit) sowohl zwischen Präparaten verschiedenener Zelltypen als auch bei unterschiedlichen Alterungsmethoden variiert, wird zunächst ein gealtertes Präparat testweise mit einer aus früheren Bänderungen bekannten Trypsinierungszeit trypsiniert (s.u.), weiterverarbeitet und die erzielte Bänderung im Hellfeldmikroskop begutachtet. Je nach Bänderungsqualität wird die getestete Trypsinierungszeit beibehalten oder korrigiert, bis ein optimaler Wert ermittelt ist. Die optimale Trypsinierungszeit kann auf die verbliebenen Präparate einer Serie übertragen werden.

Die Trypsinierungszeiten betragen erfahrungsgemäß bei Präparaten aus:

Leucomax-stimulierten KM-Kulturen: 14 s, Leucomax-stimulierten PB-Kulturen: 20 s, Phytohämagglutinin-stimulierten PB-Kulturen: 33 s, HeLa-Kulturen: 60 s.

Trypsinierung: ein gealtertes Metaphasenpräparat für einen genau festgelegten Zeitraum (Trypsinierungszeit) in der Trypsinierungslösung bei 37°C schwenken

3) Metaphasenpräparat aus der Trypsinierungslösung nehmen und sofort 2x mit 0.9% NaCl abspülen, um die Trypsineinwirkung zu stoppen

4) Metaphasenpräparat 7 min in der Giemsa-Gebrauchslösung für G-Bänderung färben

5) Präparat in A. dest. spülen und lufttrocknen

6) Bänderungsqualität im Lichtmikroskop begutachten; bei zu schwacher Bänderung Präparat entfärben (s. D.4.1) und Schritte 2) - 5) wiederholen, bis eine gute Bänderungsqualität erzielt ist

7) nach Ermittlung der optimalen Trypsinierungszeit alle weiteren Präparate der gleichen Serie mit dieser Zeit nach Schritt 2) trypsinieren und Schritte 3) - 5) durchführen

D.3) C-Bänderung

Die C-Bänderung ermöglicht die Darstellung von konstitutivem Heterochromatin, erlaubt jedoch keine individuelle Identifizierung der humanen Chromosomen. C-Band-positive Regionen liegen in den perizentri-

schen Regionen aller humanen Chromosomen vor. Zusätzlich weisen die Chromosomen 1, 9, 16 und Y subcentromerische, heterochromatische Blöcke in den langen Chromosomenarmen auf (Traut 1991). Die C-Bänderung erfolgte nach der CBG-Methode (C-Banden mit Bariumhydroxid und Giemsa-Färbung). Sie wurde zur eindeutigen Identifizierung und Auszählung von di- und trizentrischen Chromosomen an HeLa-Metaphasenpräparaten vorgenommen (s. E.1).

Durchführung:

- 1) Metaphasenpräparate zur Alterung über Nacht auf eine 60°C warme Heizplatte legen oder 3 - 10 Tage bei RT lagern
- 2) Präparate 30 min in 0.2 N HCl inkubieren
- 3) Präparate in A. dest. spülen und lufttrocknen
- 4) Präparate 15 min in 5% Ba(OH)₂-Lösung inkubieren
- 5) Präparate in 0.2 N HCl schwenken, bis Ba(OH)₂-Niederschlag entfernt ist; lufttrocknen
- 6) Präparate 30 min bei 60°C in 2xSSC inkubieren
- 7) Präparate in A. dest. spülen und zum Abfließen der Flüssigkeit senkrecht stellen
- 8) Präparate 60 min in Giemsa-Gebrauchslösung für C-Bänderung färben; Färbungsintensität bei einem Präparat im Lichtmikroskop ohne Ölimmersion überprüfen, bei Bedarf Färbezeit verlängern
- 9) Präparate in A. dest. spülen und lufttrocknen

D.4) Entfärben und Entölen

D.4.1) Entfärben von giemsaefärbten Präparaten

Giemsaefärbte HeLa-Präparate wurden nach der Aberrationsanalyse (s. E.1) durch Inkubation in Ethanol entfärbt und gleichzeitig von dem zur mikroskopischen Auswertung eingesetzten Immersionsöl befreit. Nach der Entfärbung wurden die HeLa-Präparate nach D.2) G-gebändert.

Durchführung:

- 1) Präparate 2x für jeweils 10 min in frischen 70%igen Ethanol einstellen
- 2) Präparate lufttrocknen

D.4.2) Entölen von giemsaefärbten Präparaten

Zur längerfristigen Lagerung von ausgewerteten Metaphasenpräparaten (z.B. für spätere Fotoaufnahmen) wurde das beim Mikroskopieren verwendete Immersionsöl von den Präparaten entfernt. Dies erfolgte durch Xylol, da die Präparate dadurch nicht entfärbt wurden. Xylol-behandelte Präparate waren nicht mehr für eine nachträgliche G-Bänderung verwendbar.

Durchführung:

- 1) Präparate für mindestens 15 min in Xylol einstellen
- 2) Präparate lufttrocknen

E) Metaphasenauswertung

Die cytogenetische Auswertung der Metaphasenpräparate erfolgte im Hellfeldlichtmikroskop mit Grünfilter zur Kontrastverstärkung. Objektive mit 63facher und 100facher Vergrößerung wurden mit Immersionsöl benutzt.

E.1) Aberrationsanalyse

Die Auswertung von Aberrationen erfolgte auf giemsaengefärbten Präparaten.

Bei dem AML-Fall wurde eine Bestimmung der Dmin-Anzahl pro Metaphase auf den Präparaten der KM-Direktpräparation der Erstdiagnose und der 24h-KM-Kultur des zweiten Rezidivs vorgenommen. Dazu wurden an einem Hellfeldlichtmikroskop mit Thermoprintsystem jeweils ≥ 50 Metaphasen der Erstdiagnose und des zweiten Rezidivs mit vollständiger Chromosomenanzahl (entsprechend dem Karyotyp der Leukämiezellen) nach dem Zufallsprinzip ausgedruckt und die Anzahl der Dmin pro Metaphase auf den Ausdrucken ermittelt.

Die Aberrationsanalyse der HeLa-Präparate erfolgte an einem Hellfeldlichtmikroskop mit Fotoaufsatz und diente der Erfassung von numerischen und strukturellen Aberrationen (s.u.) sowie von cytogenetischen Manifestationsformen der Genamplifikation in den selektionierten Sublinien. Dazu wurde nach jedem Selektionsschritt eine Stichprobe von 100 zufällig ausgewählten Metaphasen der jeweils erzeugten Sublinie auf zwei oder mehr Präparaten ausgewertet. Der Schwerpunkt der Auswertungen lag auf der Ermittlung des Metaphasenanteils mit einer bestimmten Aberration oder Veränderung innerhalb der Gesamtanzahl der ausgewerteten Metaphasen, um Rückschlüsse auf die Menge der betroffenen Zellen innerhalb der Zellpopulation der jeweiligen Sublinie zu erhalten. Auf diese Weise konnte nach jedem Selektionsschritt der zu diesem Zeitpunkt vorhandene Anteil an Zellen mit den untersuchten chromosomalen Veränderungen bestimmt werden. Der Vergleich der Aberrationsanalyseergebnisse von der HeLa-Parentallinie und den selektionierten Sublinien ermöglichte die Feststellung von Typ und Häufigkeit neu auftretender Aberrationen in den selektionierten Zellpopulationen.

Die bei den HeLa-Zellen erfassten Aberrationen waren Chromatid- und Chromosomengaps, Chromatid- und Chromosomenbrüche, azentrische Fragmente, pulverisiertes Chromatin, Ring-, di- und trizentrische Chromosomen, in Form oder Größe auffallende Markerchromosomen und Dmin. Die Definition der einzelnen Aberrationstypen erfolgte nach der ISCN (1995)-Nomenklatur (Mitelman 1995). Für jeden Aberrationstyp wurde der Anteil an Metaphasen, der diesen Aberrationstyp aufwies, unabhängig von den anderen Aberrationstypen ermittelt. Daher wurden Metaphasen, die mehrere Aberrationstypen enthielten (z.B. Gaps und Brüche), auch mehrfach gezählt, indem sie jeweils zu den Metaphasenanteilen aller enthaltenen Aberrationstypen addiert wurden. Zusätzlich wurden die Chromosomenanzahl und die Dmin-Anzahl pro Metaphase bestimmt. Die Auszählung des Metaphasenanteils mit di- und trizentrischen Chromosomen erfolgte anstatt auf giemsaengefärbten auf C-gebänderten Präparaten (s. D.3). Metaphasen mit ungewöhnlichen Markerchromosomen wurden nach der Aberrationsauswertung entfärbt und G-gebändert (s. D.4.1 und D.2), um die Zusammensetzung dieser Markerchromosomen und den Metaphasenanteil mit einem bestimmten Markerchromosomentyp bestimmen zu können.

Bei der Ermittlung der Anzahl von HeLa-Metaphasen mit einer der untersuchten strukturellen Aberrationen wurde die Chromosomenanzahl der Metaphasen nicht berücksichtigt, da eine zusätzliche Einteilung

der Metaphasen mit Aberrationen nach ihrer Chromosomenanzahl aufgrund ihrer meist geringen Häufigkeiten nicht sinnvoll erschien.

Besonderheiten bei der Auswertung einzelner Aberrationstypen werden in den Ergebnissen in B.3) und B.4) bei den jeweiligen Aberrationstypen aufgeführt.

E.2) Karyotypisierung

Zur Aufnahme, Digitalisierung und Karyotypisierung von G-gebänderten Metaphasen wurde ein Karyotypisierungssystem aus Lichtmikroskop, CCD-Kamera und PC mit Karyotypisierungsprogramm eingesetzt. Die Karyotypbeschreibung und Definition des Vorliegens von aberranten Zellklonen erfolgten nach der ISCN (1995)-Nomenklatur (Mitelman 1995).

Bei dem AML-Fall wurden für jede Diagnose mindestens 30 Metaphasen, nach Möglichkeit aus zwei verschiedenen Kulturen von KM und/oder PB, karyotypisiert. Die Phytohämagglutinin-stimulierte PB-Kultur, die bei der Erstdiagnose angelegt wurde, diente zur Ermittlung des konstitutionellen Karyotyps. Aufgrund des Vorliegens unterschiedlicher Zellklone in dieser Kultur wurde eine höhere Metaphasenanzahl karyotypisiert. Da die Metaphasen aus dieser Kultur jedoch nicht als repräsentativ für die Leukämiezellen angesehen werden konnten, wurden sie nicht in die Erstellung des Karyotypbefundes der Leukämiezellen miteinbezogen.

Aus den Selektionsversuchen mit HeLa-Zellen wurden jeweils mindestens 20 Metaphasen der Parentallinie und der Sublinie aus dem jeweils letzten Selektionsschritt karyotypisiert und auf das Auftreten von HSRs als Manifestation einer Genamplifikation (s. Einleitung, C.2) untersucht. Die Karyogramme wurden weiterhin zur Bestimmung der modalen Kopienanzahl der normalen Chromosomen bei den untersuchten HeLa-Linien verwendet (nähere Angaben dazu in den Ergebnissen in B.5).

E.3) Bestimmung des 5q-Status bei HeLa-Zellen

Da das humane DHFR-Gen, dessen Amplifikation durch die MTX-Selektionen in den HeLa-Zellen induziert werden sollte, auf dem langen Arm von Chromosom 5 (5q), genau in 5q11.2q13.2 (UniGene 1999), lokalisiert ist, wurden die Metaphasen der HeLa-MTX-Sublinien besonders auf das Auftreten von numerischen und strukturellen Veränderungen an diesem Chromosomenarm untersucht. Die Anzahl der vollständigen 5q und die vorliegende Kombination der 5q-Trägerchromosomen (Chromosom 5, derivative Chromosomen mit transloziertem 5q) pro Metaphase wurden als '5q-Status' bezeichnet.

Die Bestimmung des 5q-Status erfolgte auf den HeLa-Metaphasenpräparaten nach Abschluss der Aberrationsanalyse (s. E.1). Dazu wurden die Metaphasenpräparate entfärbt und G-gebändert (s. D.4.1 und D.2). Die mikroskopischen Positionen aller auf Aberrationen ausgewerteten Metaphasen wurden erneut aufgesucht und dieselben Metaphasen bezüglich ihres 5q-Status analysiert. Die Anzahl und Lokalisation der kurzen Arme von Chromosom 5 (5p) wurden dabei nicht berücksichtigt. Voraussetzung für die 5q-Status-Bestimmung war eine gute G-Bandenqualität der Metaphasen. Daher wurden Metaphasen, in denen die 5q nicht eindeutig identifiziert werden konnten, von der Auswertung ausgeschlossen.

Bei jeder HeLa-MTX-Sublinie wurden die auftretenden 5q-Status charakterisiert und ihre Häufigkeit in der Gesamtanzahl der ausgewerteten Metaphasen ermittelt. Zur Berechnung von prozentualen Metaphasenanteilen mit einem bestimmten 5q-Status wurde die Gesamtanzahl der bei einer HeLa-Linie ausgewerte-

ten Metaphasen gleich 100% gesetzt. Als Vergleichswerte zur Detektion von 5q-Statusveränderungen in den selektionierten Sublinien dienten die bei der HeLa-Parentallinie ermittelten 5q-Status-Verhältnisse.

E.4) Darstellung der Ergebnisse der cytogenetischen Auswertungen

Zur besseren Übersicht wurden die Ergebnisse der cytogenetischen Auswertungen, soweit möglich, in Form von Diagrammen dargestellt. Dazu erfolgte bei den Ergebnissen der HeLa-Versuche eine Umrechnung der absoluten Zahlenwerte der Auszählungen in Prozentwerte, um einen direkten Vergleich der Werte von verschiedenen Sublinien zu ermöglichen. Die Ergebnisse von statistischen Vergleichen wurden in Form von Symbolen in die Diagramme eingetragen (s. J). Zur grafischen Darstellung der Ergebnisse der Dmin-Auszählung wurde eine Einteilung der auftretenden Dmin-Anzahlen in Klassen, die jeweils einen definierten Dmin-Anzahl-Bereich umfaßten (z.B. 1-9 Dmin), vorgenommen, die Anzahl der Metaphasen pro Klasse festgestellt und in Prozentwerte umgerechnet.

E.5) Fotografische Aufnahmen von Metaphasenpräparaten

Zur Dokumentation wurden Metaphasen des AML-Falls sowie HeLa-Metaphasen mit Dmin oder mit ungewöhnlichen chromosomalen Aberrationen an einem Hellfeldlichtmikroskop mit Fotoaufsatz fotografiert. Alle Aufnahmen erfolgten bei 1000facher mikroskopischer Vergrößerung unter Verwendung eines feinkörnigen Schwarz-Weiß-Films. Die Filmentwicklung wurde durch ein professionelles Fotolabor vorgenommen. Papierabzüge von ausgewählten Negativen wurden im Schwarz-Weiß-Fotolabor der Abteilung im Format 10x15 cm nach Angaben des Herstellers der Fotochemikalien erstellt und bei Bedarf durch Einscannen auf einem Flachbettscanner digitalisiert. Die endgültige Vergrößerung der fotografischen Abbildungen lässt sich aufgrund des Einscannens und der nachfolgenden Weiterbearbeitung der digitalisierten Bilder am PC nicht genau ermitteln. Als Größenmaßstab können jedoch die abgebildeten Metaphasechromosomen herangezogen werden. Das größte Chromosom des humanen Chromosomensatzes, #1, weist in einer mitotischen Metaphase im Durchschnitt eine Länge von 10 μM und das kleinste humane Chromosom, #21, eine durchschnittliche Länge von 2 μM auf (Strachan and Read 1996). Demgegenüber ist der mittlere Durchmesser von Dmin auf 0.3 - 0.5 μM geschätzt worden (Barker and Stubblefield 1979; George 1984).

F) Induktion einer prämaternen Chromosomenkondensation

Die induzierte prämatere Chromosomenkondensation (premature chromosome condensation) ermöglicht eine Visualisierung von Chromosomen in der Interphase. Dies ist normalerweise nicht möglich, da in der Interphase das gesamte Chromatin einer Zelle in weitgehend decondensierter Form in den Zellkern eingeschlossen ist, so dass die Chromosomen nicht erkennbar sind. Bei der induzierten prämaternen Chromosomenkondensation werden Interphasezellen mit mitotischen Zellen fusioniert. In einer so entstandenen Hybridzelle bewirkt der Einfluß von sogenannten mitotischen Faktoren der Mitosezelle eine Auflösung der Kernmembran des Interphasekerns und eine Kondensation des Interphasechromatins zu einzelnen Einheiten, die als vorzeitig kondensierte Chromosomen bzw. Prematurely Condensed Chromosomes (PCC) bezeichnet werden. Die PCC zeigen entsprechend dem Stadium innerhalb der Interphase (G1-, S-

oder G2-Phase), in dem sie sich zum Zeitpunkt der Fusion befanden, eine unterschiedliche Morphologie, so dass eine Unterscheidung zwischen G1-, S- und G2-Phase-PCC möglich ist (Hittelman 1986). Die induzierte prämaturne Chromosomenkondensation wurde bei dem AML-Fall eingesetzt, um Aufschluss über die Morphologie der Dmin in den Interphasezellen des KMs der Erstdiagnose zu gewinnen.

F.1) Kultivierung der Induktorzelllinie

Als Induktorzellen, d.h. Zellen, die die zur prämaturnen Chromosomenkondensation benötigten mitotischen Faktoren liefern, wurden Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zellen verwendet. Die CHO-Zelllinie ist eine adhären wachsende, aneuploide Zelllinie, die aus Ovarialzellen eines chinesischen Hamsters angelegt wurde (Deaven and Petersen 1973).

Die verwendete CHO-Zelllinie wurde im Labor bereits über einen längeren Zeitraum kultiviert. Die Subkultivierung der CHO-Kulturen erfolgte jeweils bei Erreichen von ca. 75% Konfluenz. Für den Einsatz zur induzierten prämaturnen Chromosomenkondensation wurden die CHO-Zellen routinemäßig für mindestens zwei Tage vor der Induktion in Bromdesoxyuridin (BdU)-haltigem Medium kultiviert. Dies erlaubt bei Anwendung einer Fluoreszenz-plus-Giemsa (FPG)-Färbung eine differentielle Anfärbung von mitotischen, BdU-haltigen CHO-Chromosomen und PCC in den Hybridzellen und damit eine bessere Unterscheidung zwischen mitotischen Chromosomen und PCC (Cornforth and Bedford 1983).

Durchführung:

1) Mediumwechsel bei CHO-Kulturen:

altes Zellkulturmedium entfernen und pro 175 cm²-Zellkulturflasche 20 ml frisches Medium für CHO-Zellen zugeben; bei Kultivierung mit BdU 1% (v/v) BdU-Stammlösung zusetzen (BdU-Endkonzentration im Medium: 1x10⁻⁶ M); CHO-Kulturen im Brutschrank inkubieren; Mediumwechsel alle 3 Tage durchführen

2) Subkultivierung von CHO-Kulturen:

- a) Medium der zu ca. 75% konfluenten CHO-Kultur entfernen, Zellrasen 1x mit 10 ml HBSS oder PBS (37°C) abspülen
- b) 5 ml Trypsin-Versen-Gebrauchslösung zugeben und 60 s bei RT stehen lassen
- c) CHO-Zellen durch leichtes Klopfen mit dem Handballen gegen die Seitenwände der Zellkulturflasche vom Boden ablösen; Ablösung der Zellen im Umkehrlichtmikroskop kontrollieren
- d) 9 ml Medium für CHO-Zellen zum Abstoppen der Trypsinwirkung zugeben, Zellsuspension zur Trennung von Zellaggregaten mehrmals durch Pipettieren mischen
- e) Zellsuspension in ein 15 ml-Röhrchen überführen
- f) 10 min bei 1000 rpm abzentrifugieren, Überstand entfernen, Zellen in 13 ml Medium für CHO-Zellen resuspendieren; diesen Schritt 1x wiederholen
- g) 1 Tropfen der Zellsuspension in eine Neubauer Zählkammer geben und die Zellzahl bestimmen (s. B.1, Schritte 5 und 6)
- h) Subkulturen mit 1x10⁶ Zellen in 20 ml Medium für CHO-Zellen pro 175 cm²-Zellkulturflasche anlegen; bei Kultivierung mit BdU 1% (v/v) BdU-Stammlösung pro Subkultur zusetzen
- i) CHO-Subkulturen im Brutschrank inkubieren und nach 24 h einen Mediumwechsel (s. Schritt 1) durchführen

F.2) Gewinnung und Einfrieren von mitotischen Induktorzellen

Für die PCC-Induktion war die Gewinnung einer möglichst reinen mitotischen Zellpopulation der Induktorzellen notwendig. Dazu wurden CHO-Kulturen verwendet, die für mindestens zwei Tage in BdU-haltigem Medium kultiviert worden waren und ca. 75% Konfluenz erreicht hatten. Die Anreicherung von mitotischen Zellen erfolgte durch eine mehrstündige Colcemidbehandlung. Durch selektives Ablösen der mitotischen Zellen konnten CHO-Zellsuspensionen mit >95% Mitosezellen erzeugt werden. Diese wurden bis zur Zellfusion eingefroren, um bei Bedarf einen ausreichend großen Vorrat an mitotischen Zellen für die PCC-Induktion zur Verfügung zu haben. Zum Einfrieren der mitotischen Zellen wurde eine speziell zusammengesetzte Lösung (Tittelbach 1992; Raabe-Meyer 1990) verwendet, um einen möglichst hohen Anteil an vitalen Zellen nach dem Auftauen zu erhalten.

Durchführung:

- 1) Medium der vorgesehenen CHO-Kultur entfernen, 20 ml Medium für CHO-Zellen mit 1% (v/v) BdU-Stammlösung und 1% (v/v) Colcemid zugeben
- 2) CHO-Kultur 6 h im Brutschrank inkubieren
- 3) die abgerundeten, nur locker haftenden Mitosezellen durch leichtes Klopfen gegen die Seitenwände der Zellkulturflasche vom Boden ablösen; Ablösung der Zellen im Umkehrlichtmikroskop kontrollieren
- 4) Medium mit den abgelösten Mitosezellen in ein 50 ml-Röhrchen überführen
- 5) 1 Tropfen der Zellsuspension in eine Neubauer Zählkammer geben und die Zellzahl bestimmen (s. B.1, Schritte 5 und 6)
- 6) Einfrierlösungen vorbereiten: zu Einfrierlösung A und B jeweils 10% (v/v) FKS (4°C) geben; für eine CHO-Kultur erwies sich bei beiden Einfrierlösungen ein Gesamtvolumen von je 10 ml als ausreichend
- 7) Zellsuspension 10 min bei 1000 rpm abzentrifugieren; Überstand entfernen
- 8) Zellpellet in 1 ml Einfrierlösung A pro 1×10^6 Mitosezellen resuspendieren
- 9) Zellsuspension zur "Inaktivierung" der Mitosezellen für 10 min bei -20°C in einer Plastikbox inkubieren
- 10) Zellsuspension aus -20°C entnehmen, 1 ml Einfrierlösung B pro 1×10^6 Mitosezellen zugeben und mischen
- 11) Zellsuspension in Cryotubes (auf 4°C vorgekühlt) einfüllen (1.5 ml pro Cryotube) und Cryotubes schnell in -20°C bringen; Mitosezellen 2 h bei -20°C einfrieren
- 12) Cryotubes in -70°C überführen (maximal 1 Jahr verwendbar)
- 13) in der Zellkulturflasche verbliebene Interphasezellen bei Bedarf nach Zugabe von 20 ml Medium für CHO-Zellen weiterkultivieren

F.3) Zellfusion zur PCC-Induktion

Für die Zellfusion zur PCC-Induktion wurden mononukleäre Zellen aus dem KM der Erstdiagnose des AML-Falls mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert und mit kurz zuvor aufgetauten CHO-Mitosezellen im Verhältnis 5:1 gemischt. Als chemischer Fusionsvermittler diente Polyethylenglykol (PEG). Nach der PEG-induzierten Zellfusion wurden die entstandenen Hybridzellen sofort zur Darstellung der PCC präpariert.

F.3.1) Isolierung von mononukleären Zellen aus KM

- 1) nicht benötigte KM-Zellsuspension aus B.1) mit einem gleichen Volumen zusatzfreiem Medium für KM verdünnen (1:2)
- 2) in 15 ml-Röhrchen (Anzahl nach Bedarf) 1 Volumen Histopaque-1077 (RT) vorlegen und vorsichtig mit dem gleichen Volumen verdünnter KM-Zellsuspension überschichten
- 3) 20 min bei 2000 rpm zentrifugieren (bei verwendeter Zentrifuge mit abgeschalteter Bremse)
- 4) nach der Zentrifugation die weiße, undurchsichtige Interbande mit den abgetrennten mononukleären Zellen (Blasten, Lymphocyten, Monocyten) absaugen und in je ein neues 15 ml-Röhrchen geben
- 5) mononukleäre Zellen pro 15 ml-Röhrchen mit zusatzfreiem Medium für KM auf 10 ml auffüllen und mischen
- 6) Zellsuspensionen 10 min bei 1500 rpm abzentrifugieren; Überstand entfernen
- 7) Zellpellet pro 15 ml-Röhrchen in 10 ml zusatzfreiem Medium für KM resuspendieren
- 8) Zellsuspensionen 10 min bei 1000 rpm abzentrifugieren; Überstand entfernen
- 9) Zellpellet pro 15 ml-Röhrchen in 5 ml zusatzfreiem Medium für KM resuspendieren; 50% der Zellsuspensionen nach F.3.3) weiterverarbeiten, 50% für G.1) verwenden

F.3.2) Auftauen der mitotischen Induktorzellen

- 1) Cryotubes mit der zur Fusion benötigten Anzahl an eingefrorenen CHO-Mitosezellen schnell bei 37°C auftauen
- 2) aufgetaute Zellsuspension in ein 50 ml-Röhrchen überführen
- 3) Zellsuspension mit dem gleichen Volumen zusatzfreiem Medium+Colcemid verdünnen, mischen
- 4) 8 min bei 1000 rpm abzentrifugieren; Überstand entfernen
- 5) Zellpellet in 10 ml zusatzfreiem Medium+Colcemid resuspendieren
- 6) Zellsuspension in 15 ml-Röhrchen überführen und Schritt 4) wiederholen
- 7) Zellpellet in 5 ml zusatzfreiem Medium+Colcemid resuspendieren
- 8) Zellsuspension zur "Reaktivierung" 10 min im Brutschrank inkubieren, Weiterverarbeitung nach F.3.3)

F.3.3) Zellfusion zur PCC-Induktion und Präparation der PCC-Zellen

- 1) Zellzahlen der mononukleären KM-Zellsuspension aus F.3.1) und der CHO-Mitosezellsuspension aus F.3.2) nach B.1), Schritte 5) und 6), bestimmen
- 2) beide Zellsuspensionen in einem 15 ml-Röhrchen so zusammenmischen, dass KM- und CHO-Zellen im Verhältnis 5:1 vorliegen; Gesamtvolumen der Mischsuspension mit zusatzfreiem Medium+Colcemid auf 5 ml auffüllen, mischen
- 3) Mischsuspension 8 min bei 1000 rpm abzentrifugieren; Überstand bis auf 0.5 ml entfernen
- 4) mit zusatzfreiem Medium+Colcemid auf 2 ml auffüllen und Zellpellet resuspendieren
- 5) Mischsuspension 5 min bei 800 rpm abzentrifugieren; Überstand vollständig entfernen
- 6) Zellpellet durch vorsichtiges Schütteln des Röhrchens auflockern
- 7) 0.3 ml PEG 1500 (RT) aus einer Spritze langsam und unter leichtem Schwenken des Röhrchens über 1 min zu Zellpellet tropfen; Zellpellet durch vorsichtiges Schütteln des Röhrchens resuspendieren
- 8) Zellen unter leichtem Schwenken des Röhrchens 1 min bei RT in PEG 1500 inkubieren

- 9) 3 ml zusatzfreies Medium+Colcemid innerhalb von 4 min unter leichtem Schwenken des Röhrchens wie folgt zugeben:
 1. min: alle 15 s 1 Tropfen zugeben; 2. min: alle 10 s 1 Tropfen zugeben;
 3. min: alle 3 s 1 Tropfen zugeben; 4. min: restliches Volumen zügig zutropfen, vorsichtig mischen
- 10) Zellsuspension sofort 4 min bei 800 rpm abzentrifugieren; Überstand vollständig entfernen
- 11) 0.5 ml zusatzfreies Medium+Colcemid langsam zu Zellpellet geben
- 12) Zellpellet durch vorsichtiges Schütteln des Röhrchens resuspendieren
- 13) Zellsuspension zur PCC-Induktion 60 min bei 37°C im Brutschrank inkubieren
- 14) 1 ml 0.56% KCl zur Zellsuspension geben und vorsichtig mischen, um die Hybridzellen nicht zu zerstören; anschliessend weitere 7 ml 0.56% KCl zugeben und vorsichtig mischen
- 15) Zellsuspension 17 min bei 37°C inkubieren
- 16) Zellsuspension 5 min bei 800 rpm abzentrifugieren; Überstand bis auf 0.5 ml entfernen
- 17) Zellpellet vorsichtig resuspendieren
- 18) 1 ml Fixans (-20°C) unter Schütteln des Röhrchens langsam zutropfen; vorsichtig mischen
- 19) mit Fixans (-20°C) unter Schütteln des Röhrchens langsam auf 10 ml auffüllen; vorsichtig mischen
- 20) Schritt 16) wiederholen; mit Fixans (-20°C) auf 10 ml auffüllen, Zellpellet vorsichtig resuspendieren
- 21) Zellsuspension 30 min bei 4°C inkubieren
- 22) Zellsuspension 10 min bei 1000 rpm abzentrifugieren; Überstand bis auf 0.5 ml entfernen
- 23) mit Fixans (-20°C) auf 10 ml auffüllen, Zellpellet vorsichtig resuspendieren
- 24) Schritte 22) und 23) 2x wiederholen
- 25) Schritt 22) wiederholen, Zellpellet vorsichtig resuspendieren und soviel Fixans (-20°C) zugeben, dass eine leicht milchig-trübe Zellsuspension entsteht
- 26) PCC-Präparate nach C), Schritte 9) - 12), herstellen

G) Comparative Genomische Hybridisierung

Die Comparative Genomische Hybridisierung (CGH) stellt eine spezielle Methode der Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH; s. I) dar. Sie ermöglicht die Detektion von Veränderungen in der Kopienanzahl genetischer Sequenzen in einem Genom. Dazu wird die Kopienanzahl der genetischen Sequenzen des zu untersuchenden Genoms mit derjenigen des als Referenz dienenden Genoms verglichen (Kallioniemi et al. 1992).

Die CGH wird in Form einer kompetitiven Hybridisierung von gleichen Anteilen zweier unterschiedlich markierter Sonden aus genomischer DNA durchgeführt. Jede Sonde repräsentiert dabei jeweils das vollständige Genom einer spezifischen Zellpopulation. Die zu untersuchende Sonde stellt die Test-DNA und das durch sie repräsentierte Genom das Testzellgenom (z.B. von Tumorzellen) dar. Sie wird mit einer als Referenz dienenden Sonde, der Referenz-DNA, cohybridisiert. Die Referenz-DNA repräsentiert das Referenzzellgenom (z.B. von Nichttumorzellen) und enthält die als unverändert oder normal angesehene Kopienanzahl aller genetischen Sequenzen (Kallioniemi et al. 1992).

Die Hybridisierung erfolgt als chromosomale In Situ-Suppressions-Hybridisierung (CISS-Hybridisierung) auf normale humane Metaphasechromosomen. Bei der CISS-Hybridisierung wird die Hybridisierung von markierten repetitiven Sequenzen durch Zugabe eines Überschusses an unmarkierten repetitiven Se-

quenzen unterdrückt. Dies ist bei der Verwendung von genomischen DNA-Sonden generell notwendig, da diese Sonden ubiquitär vorkommende, eingestreute repetitive Sequenzen (interspersed repetitive sequences, IRS) enthalten. IRS erzeugen bei einer Hybridisierung ohne Suppression eine unerwünschte Hintergrundmarkierung aller Chromosomen (Lichter et al. 1988; Lichter and Ried 1994). Zur Supprimierung der IRS wird unmarkierte humane Cot1-DNA verwendet. Der Cot-Wert ist eine Größe zur Beschreibung der Reassoziationsgeschwindigkeit denaturierter komplementärer DNA-Stränge und entspricht dem Produkt aus Ausgangskonzentration (c_0) einer bestimmten DNA-Sequenz und Reaktionszeit (t). Cot1-DNA ist eine stark mit hochrepetitiven Sequenzen angereicherte Fraktion der genomischen DNA mit einem Cot-Wert von etwa 1 Mol Nukleotide pro Liter und Sekunde (Strachan and Read 1996). Für die CISS-Hybridisierung werden die markierten Sonden mit einem Überschuss an unmarkierter Cot1-DNA zusammengemischt, denaturiert und für eine definierte Zeit prähybridisiert. Während dieses Zeitraums erfolgt die Reassoziationsgeschwindigkeit der komplementären Sequenzen der DNAs, die bei hochrepetitiven Sequenzen erheblich schneller als bei in Einzelkopie vorliegenden Sequenzen (Single Copy-Sequenzen) verläuft. Der Überschuss an unmarkierter Cot1-DNA bewirkt dabei eine Absättigung der markierten IRS in den Sonden, so dass ihre Hybridisierung mit komplementären Sequenzen auf den Metaphasechromosomen blockiert wird. Dadurch stehen für die Hybridisierung nur die in den Sonden enthaltenen, sehr langsam reassoziierenden Single Copy-Sequenzen, zu denen die Mehrzahl der Gene gehören, zur Verfügung (Du Manoir et al. 1993; Strachan and Read 1996; Lottspeich und Zorbas 1998).

Bei der Hybridisierung konkurrieren die beiden Sonden, Test- und Referenz-DNA, um die komplementären Bindungsstellen auf den Metaphasechromosomen. Die relative Menge von Test- und Referenz-DNA, die an einem chromosomalen Ort gebunden wird, hängt von der in der jeweiligen DNA vorliegenden relativen Kopienanzahl an komplementären Sequenzen ab und kann durch Messung der Fluoreszenzintensitäten von Test- und Referenz-DNA mit Hilfe eines digitalen Bildanalyse-Systems ermittelt werden (Kallioniemi et al. 1992).

In der Regel werden die Test-DNA mit einem grünen und die Referenz-DNA mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff direktmarkiert oder bei Haptenmarkierung detektiert, so dass durch das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten dieser beiden Farbstoffe (Grün/Rot-Fluoreszenz-Quotient oder -Ratio) die relative Kopienanzahl von genetischen Sequenzen in der Test-DNA im Vergleich zur Referenz-DNA angezeigt wird. In Regionen mit gleichen Kopienanzahlen in beiden DNAs zeigen beide Fluoreszenzfarbstoffe gleiche Intensität, so dass der Fluoreszenz-Quotient den Wert 1 annimmt. Bei unterschiedlicher Kopienanzahl erreicht der Fluoreszenz-Quotient entweder einen höheren Wert (Kopienanzahlzugewinn in der Test-DNA) oder er sinkt unter 1 (Kopienanzahlverlust in der Test-DNA). Durch Analyse der Fluoreszenz-Quotienten entlang der Chromosomenlängsachsen kann für jedes Chromosom ein Fluoreszenz-Quotienten- oder Ratio-Profil erstellt werden, durch das die Regionen mit Kopienanzahländerungen in der Test-DNA chromosomal lokalisiert werden können (Kallioniemi et al. 1992; Cremer et al. 1995). Die Unterscheidung zwischen zufälligen Profilschwankungen und Ausschlägen aufgrund von Kopienanzahlunterschieden erfolgt bei den Ratio-Profilen mit Hilfe von Schwellenwerten, die im Fall einer Kopienanzahländerung in der Test-DNA von der Ratio-Profillinie über- oder unterschritten werden (Du Manoir et al. 1995; s. Abb. 3).

Die CGH wird häufig zur Analyse von Kopienanzahländerungen in Tumoren angewendet (Knuutila et al. 1998, 1999), da sie auch dann einsetzbar ist, wenn keine Präparation von Metaphasechromosomen aus Tumormaterial möglich ist (Du Manoir et al. 1993). Dadurch können bislang unbekannte chromosomale

Regionen mit Amplifikation oder Deletion von genetischen Sequenzen in Tumorzellgenomen identifiziert werden (Kallioniemi et al. 1993).

Mit CGH lassen sich jedoch nur Kopienanzahländerungen, die in mehr als 50% der Testzellpopulation vorliegen, detektieren (Kallioniemi et al. 1994). Das CGH-Ergebnis entspricht dabei einem Gesamtbild aller detektierbaren Kopienanzahlunterschiede und erlaubt keinen Rückschluss auf die Homogenität der untersuchten Zellpopulation. Eine Unterscheidung zwischen unterschiedlichen Zellklonen mit jeweils variierenden Kopienanzahländerungen ist nicht möglich. Ebenfalls können balancierte Aberrationen, die nicht mit einer Kopienanzahländerung einhergehen, wie z.B. balancierte Translokationen und Inversionen, sowie reine Polyploidien nicht mit CGH detektiert werden (Du Manoir et al. 1993; Kallioniemi et al. 1994).

Die CGH wurde bei dem AML-Fall zur Ermittlung der chromosomalen Herkunft von amplifizierten Sequenzen eingesetzt. Als Test-DNA wurde DNA aus den mononukleären KM-Zellen der Erstdiagnose isoliert und mit Referenz-DNA von Leukocyten, die aus dem PB einer gesunden Spenderin stammten, unter Suppression der repetitiven Sequenzen cohybridisiert. Zur Überprüfung der Methode wurde ein CGH-Kontrollansatz mit der zur Analyse des AML-Falls verwendeten Referenz-DNA, die dabei als Test- und als Referenz-DNA eingesetzt wurde, in gleicher Weise durchgeführt.

Für die Analyse der HeLa-Linien wurde die CGH in einigen Punkten modifiziert. Ziel der CGH-Untersuchungen bei den HeLa-Linien war die Detektion und chromosomale Lokalisation von Kopienanzahlunterschieden, die nach Abschluss der Selektionen mit MTX zwischen der Parentallinie und der jeweils letzten selektionierten MTX-Sublinie vorlagen. Daher diente in den HeLa-CGH-Ansätzen die DNA der HeLa-Parentallinie als Referenz-DNA und die DNA der zu analysierenden MTX-Sublinie als Test-DNA. Für CGH-Kontrollansätze wurde die DNA der Parentallinie sowohl als Test- als auch als Referenz-DNA eingesetzt.

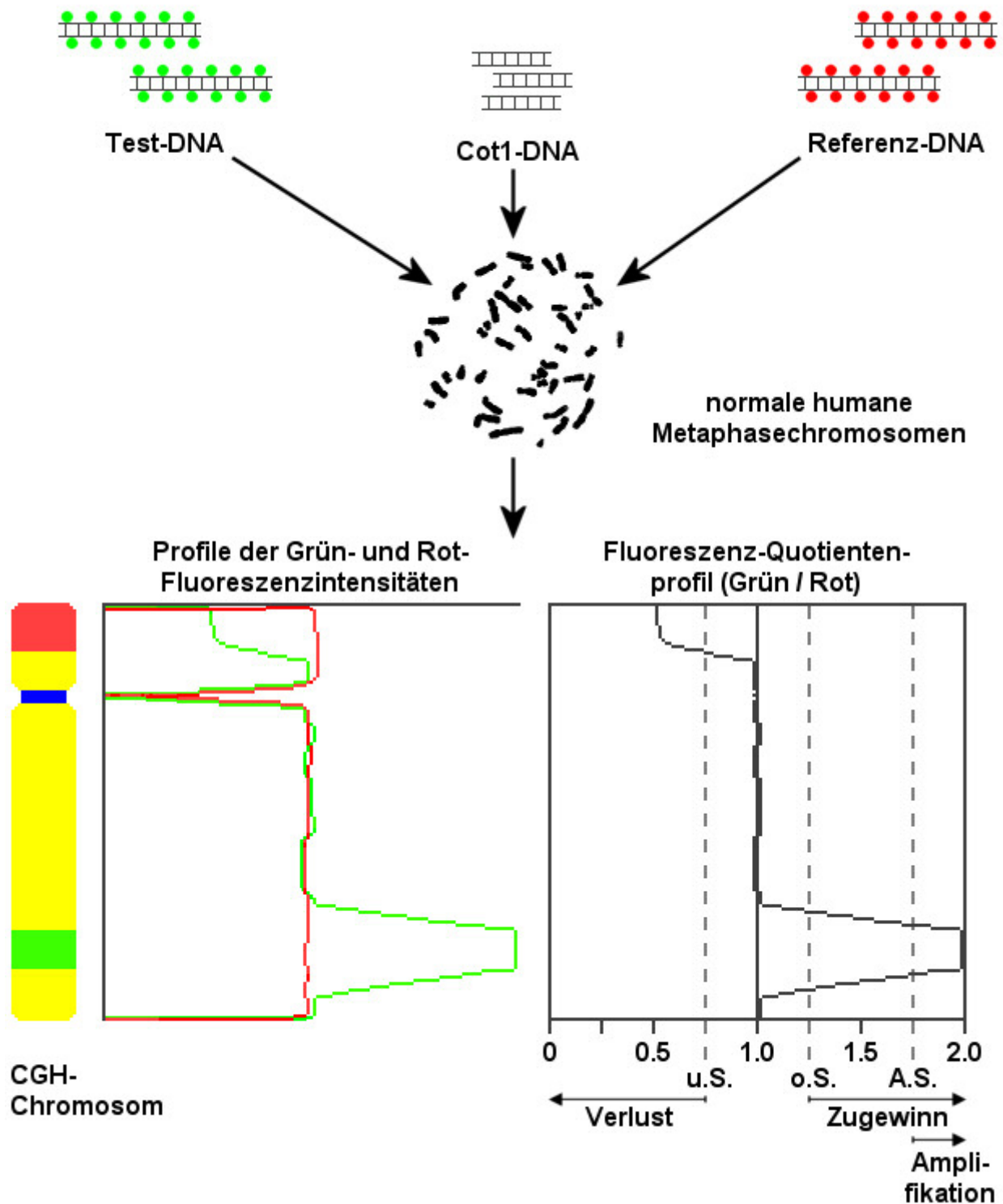


Abb. 3: Allgemeines Schema der CGH:

Test- und Referenz-DNA werden mit einem grünen bzw. roten Fluoreszenzfarbstoff markiert (alternativ mit Haptene zur späteren Detektion mit Fluoreszenzfarbstoffen). Beide DNAs werden 1:1 zusammen mit unmarkierter humaner Cot1-DNA (zur Suppression repetitiver Sequenzen) auf normale Metaphasechromosomen cohybridisiert. Dabei konkurrieren Test- und Referenz-DNA um die komplementären Bindungsstellen auf den Metaphasechromosomen. Grün- und Rotfluoreszenzintensitäten werden mit Hilfe eines digitalen Bildanalyse-systems entlang der Chromosomenlängsachsen gemessen und zueinander ins Verhältnis gesetzt (Fluoreszenz-Quotienten-Profil). Regionen mit veränderter Kopienanzahl im Testzellgenom zeigen eine entsprechende Abweichung der Grünfluoreszenzintensität, die im Fluoreszenz-Quotienten- oder Ratio-Profil als Ausschlag der Profillinie erscheint. Zur Unterscheidung von zufälligen Schwankungen dienen Schwellenwerte, die bei Vorliegen eines tatsächlichen Kopienanzahlunterschiedes von der Ratio-Profillinie unter- oder überschritten werden müssen: u.S. = untere Schwelle (Kopienanzahlverlust), o.S. = obere Schwelle (Kopienanzahlzugewinn), A.S. = Schwelle für Amplifikation im Testzellgenom

G.1) Isolation von genomischer DNA

Die Isolation von genomischer DNA für die CGH erfolgte durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion (Maniatis et al. 1982). DNA-Isolationen wurden aus der mononukleären KM-Zellsuspension aus F.3.1), PB-Leukocyten und HeLa-Zellen vorgenommen. Bei PB wurden die Leukocyten vor der DNA-Isolation mit Hilfe eines hypotonischen Puffers isoliert. Für die HeLa-CGH-Ansätze wurden eingefrorene Zellen der benötigten HeLa-Linien nach B.2.3), Schritte 1) - 4), aufgetaut, anstatt in Medium in HBSS oder PBS (RT) aufgenommen und entsprechend den folgenden Angaben ab Schritt 2) weiterverarbeitet.

Durchführung:

- 1) Leukocytenisolation aus PB:
 - a) PB mit hypotonischem Puffer im Verhältnis 1:5 mischen
 - b) Zellsuspension 8 min bei 1200 rpm abzentrifugieren
 - c) Überstand bis auf 3 ml entfernen; Zellpellet in gleichem Volumen hypotonischem Puffer wie in Schritt a) resuspendieren und Schritt b) wiederholen
 - d) Überstand vollständig entfernen, Zellpellet nach Schritt c) in hypotonischem Puffer resuspendieren
 - e) Schritte b) und d) wiederholen, bis Zellpellet weiß ist
 - f) nach letztem Abzentrifugieren Überstand entfernen, Zellpellet in 10 ml HBSS oder PBS (RT) resuspendieren und zur DNA-Isolation verwenden
- 2) Zellsuspension 8 min bei 1200 rpm abzentrifugieren; Überstand entfernen, Zellpellet in 10 ml HBSS oder PBS (RT) resuspendieren; diesen Schritt 2x wiederholen
- 3) nach letztem Abzentrifugieren Überstand entfernen, Zellpellet in 5 ml SE-Puffer resuspendieren
- 4) 250 µl 20% SDS und 100 µl Proteinase K-Stammlösung zugeben, durch Umschwenken des Röhrchens mischen und über Nacht bei 55°C inkubieren; auf RT abkühlen lassen
- 5) 1 Volumen Phenol zugeben
- 6) 10 min durch Umschwenken des Röhrchens mischen; 10 min bei 3000 rpm abzentrifugieren
- 7) obere Phase (enthält extrahierte DNA) mit Transferpipette (weite Öffnung zur Vermeidung von Scherkräften) in neues 15 ml-Röhrchen überführen
- 8) Schritte 5) - 7) wiederholen
- 9) 1 Volumen Chloroform zugeben
- 10) Schritte 6) und 7) durchführen
- 11) Schritte 9) und 10) wiederholen
- 12) 0.1 Volumen 3 M Natriumacetat zugeben und durch Umschwenken des Röhrchens mischen
- 13) 2.5 Volumen 100% Ethanol abs. langsam zugeben
- 14) DNA durch vorsichtiges Umschwenken des Röhrchens präzipitieren
- 15) präzipitierte DNA mit Transferpipette ansaugen und in Eppendorftube mit 1 ml 70% Ethanol überführen, mehrmals umschwenken
- 16) DNA 1 min bei 12000 rpm abzentrifugieren, Überstand entfernen
- 17) 1 ml 70% Ethanol zugeben, mehrmals umschwenken, Schritt 16) wiederholen
- 18) DNA im offenen Eppendorftube bei 60°C trocknen
- 19) DNA-Pellet in einem der Pelletgröße entsprechenden Volumen TE-Puffer ca. 1 - 2 h bei 60°C lösen
- 20) zum RNase-Verdau 1/100 Volumen RNase-Stammlösung zugeben, mischen durch Umschwenken

- 21) 1 h bei 37°C inkubieren
- 22) DNA-Präzipitation zur Abtrennung der RNase nach Schritten 12) - 14) durchführen
- 23) präzipitierte DNA nach Schritt 16) behandeln, Schritt 17) 2x durchführen
- 24) Schritte 18) und 19) durchführen; DNA-Lösung bei 4°C lagern
- 25) Qualität, Reinheit und Konzentration der isolierten genomischen DNA durch Agarose-Gelelektrophorese (s. G.2) mit 1 µl der DNA-Lösung bestimmen

G.2) Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von Nukleinsäuren im elektrischen Feld. Aufgrund der negativen Ladungen der Phosphatgruppen ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats wandern Nukleinsäuren im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle im Agarose-Gel wird dabei, neben anderen Faktoren, von ihrer Größe und ihrer Konformation (circulär superhelikal oder offen, doppelsträngig-linear, einzelsträngig) bestimmt. Bei doppelsträngigen, linearen DNA-Fragmenten liegt über einen weiten Größenbereich eine lineare Abhängigkeit zwischen dem Logarithmus der Fragmentlänge und der relativen Wanderungsdistanz im Agarose-Gel vor, die zur Größenbestimmung dieser DNA-Fragmente genutzt werden kann. Die optimale Auftrennung von verschiedenen DNA-Fragmentgrößen ist dabei abhängig von der Agarosekonzentration im Gel (Lottspeich und Zorbas 1998).

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Bestimmung von Qualität (d.h. keine DNA-Degradation), Reinheit (d.h. keine RNA-Verunreinigung) und Konzentration von isolierter genomischer DNA (s. G.1) und isolierter Plasmid-DNA (s. I.3) sowie zur Fragmentlängenbestimmung bei markierter DNA nach Nick-Translation (s. G.3; I.4) eingesetzt. Sie erfolgte in Form einer Flachbett-Elektrophorese unter Verwendung von 1%igen Agarose-Minigelen. Diese Agarosekonzentration erlaubt eine optimale Auftrennung von linearen, doppelsträngigen DNA-Fragmenten mit 0.5 - 7 kb Länge (Lottspeich und Zorbas 1998). Die Gele wurden nach der Elektrophorese zur Färbung der DNA mit Ethidiumbromid, einem organischen, in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, behandelt. Ethidiumbromid kann durch UV-Licht angeregt werden und zeigt dann eine Lichtemission im orange-roten Bereich des sichtbaren Spektrums (Lottspeich und Zorbas 1998). Dabei ist die Intensität der UV-induzierten Ethidiumbromid-Fluoreszenz proportional zur Menge der vorhandenen DNA, so dass die Mengenbestimmung einer DNA-Probe durch Vergleich mit der Fluoreszenz einer bekannten DNA-Standardlösung auf einem Agarosegel möglich ist (Maniatis et al. 1982).

Die DNA-Konzentration wurde bei isolierter DNA im Vergleich zur Konzentration des verwendeten Lambda-Markers geschätzt. Bei genomischer DNA erfolgte die Schätzung bei Bedarf zusätzlich durch Vergleich mit einer genomischen DNA-Probe bekannter Konzentration. Für CGH-Ansätze wurde außerdem eine Überprüfung der Mengen der vorgesehenen markierten Test- und Referenz-DNAs vorgenommen.

Durchführung:

- 1) 1%iges Agarose-Minigel mit 1x TAE-Puffer herstellen (Maniatis et al. 1982)
- 2) 1 Volumen DNA-Probe mit 1 Volumen 2x Loading-Puffer mischen und in eine Geltasche pipettieren
- 3) 1 µl Lambda-Marker in eine Geltasche pipettieren, bei DNA-Konzentrationsabschätzung zusätzlich 2 µl Lambda-Marker in eine weitere Geltasche pipettieren

- 4) Spannung von 100 V für 30 min anlegen
- 5) Gel nach Abschluss der Elektrophorese für 15 min in Ethidiumbromid-Färbelösung färben
- 6) Gel mit Leitungswasser abspülen
- 7) Gel auf Transilluminator legen und im UV-Licht auswerten:
Qualität, Reinheit und Fragmentlänge der DNA-Probe feststellen; Konzentration der DNA-Probe durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von DNA-Probe und Lambda-Marker abschätzen
- 8) Thermoprint des Gels zur Dokumentation und evtl. nachträglicher Auswertung anfertigen

G.3) Markierung von genomischer DNA

Die Markierung von Test- und Referenz-DNA erfolgte durch Nick-Translation, die eine genaue Einstellung der Fragmentlänge erlaubte (Lichter et al. 1995). Dies ist bei der CGH wichtig, da hierfür eine höhere Fragmentlänge von 500 - 2000 bp als für die FISH mit kleineren Sonden (s. I.4) notwendig ist (Kallioniemi et al. 1994; Lichter et al. 1995). Zur DNA-Markierung wurden entweder haptengekoppelte Nukleotide (Haptenmarkierung) oder Fluorochrom-konjugierte Nukleotide (Direktmarkierung) verwendet. Test- und Referenz-DNA für einen CGH-Ansatz wurden in simultanen Ansätzen markiert.

Für die Haptenmarkierung wurden standardmäßig Biotin-14-dATP zur Markierung der Test-DNA und Digoxigenin-11-dUTP zur Markierung der Referenz-DNA eingesetzt. Die Nick-Translationen erfolgten mit kommerziell erhältlichen Nick-Translationssystemen. Dabei wurde die bei diesen Systemen vorgegebene Reaktionszeit zur Anpassung an die für die CGH erforderliche Fragmentlänge (s.o.) nach einer im Labor etablierten Methode (Kappler 1998) verkürzt.

Die Direktmarkierung von DNA mit Fluorochrom-konjugierten Nukleotiden wurde bei einigen HeLa-CGH-Ansätzen eingesetzt, nachdem der zur Haptenmarkierung verwendete Biotin-Markierungskit (s. G.3.1) nicht mehr verfügbar war und Markierungsversuche mit dem neuen Biotin-Markierungskit derselben Firma für CGH nicht erfolgreich waren. Zudem kann durch die Direktmarkierung eine Verbesserung der CGH durch Erhöhung der Homogenität der Fluoreszenzsignale erzielt werden (James and Varley 1996). Für diese Markierungsmethode wurde kein Nick-Translationskit verwendet, sondern die benötigten Enzyme und Nukleotide wurden bei jedem Ansatz einzeln zugegeben. Standardmäßig wurden die Test-DNA mit Fluorescein-11-dUTP (grüne Fluoreszenz) und die Referenz-DNA mit Rhodamin-4-dUTP (rote Fluoreszenz) markiert. Die Überprüfung der Markierungseffizienz dieses neu eingesetzten Nick-Translationssystems erfolgte durch einen Dot Blot (s. G.3.2, Schritt 7).

G.3.1) Haptenmarkierung

- 1) Markierungsansätze für Test- und Referenz-DNA wie folgt herstellen:

Lösung	Biotin-Markierung	Digoxigenin-Markierung
DNA (in TE-Puffer)	500 ng Test-DNA	500 ng Referenz-DNA
A. dest.	Ansatz auf 20 µl auffüllen	Ansatz auf 8 µl auffüllen
10x dNTP-Mix aus BioNick Labelling System	2.5 µl	—
10x Enzym-Mix aus BioNick Labelling System	2.5 µl	—
Dig-Nick Translation Mix	—	2 µl
Gesamtvolumen	25 µl	10 µl

- 2) Ansätze mischen, 1 min bei 12000 rpm abzentrifugieren und 75 min bei 16°C inkubieren

- 3) Ansätze bei 4°C zwischenlagern; DNA-Fragmentlänge in den Markierungsansätzen mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. G.2) mit jeweils 10% des Ansatz-Gesamtvolumens überprüfen; zusätzlich die Menge der für einen CGH-Ansatz vorgesehenen Test- und Referenz-DNA überprüfen
- 4) bei richtiger Fragmentlänge (500 - 2000 bp):
 Markierungsreaktion durch Stopp-Puffer (300 mM EDTA; aus BioNick Labelling System) beenden:
 2.5 µl Stopp-Puffer zum Biotin-Markierungsansatz zugeben;
 1 µl Stopp-Puffer zum Digoxigenin-Markierungsansatz zugeben;
 bei zu hoher Fragmentlänge:
 betroffenen Ansatz ca. 30 min bei 16°C nachinkubieren, Schritte 3) und 4) durchführen
- 5) abgestoppte Ansätze bis zur Verwendung bei -20°C lagern

G.3.2) Direktmarkierung

- 1) Markierungsansätze für Test- und Referenz-DNA wie folgt herstellen (Enzyme zuletzt zugeben):

Lösung	Volumen (µl)
10x Nick-Puffer + BSA	2.5
0.1 M β-Mercaptoethanol	2.5
10x dNTP-Mix	3.13
0.2 mM dTTP	0.63
Fluorescein-11-dUTP oder Rhodamin-4-dUTP	0.5
DNA (Test- oder Referenz-, in TE-Puffer)	500 ng
DNase I	ausgetestetes Volumen, s. Schritt 6)
DNA-Polymerase I	1
A. dest.	Ansatz auf 25 µl auffüllen
Gesamtvolumen	25

- 2) Ansätze mischen, 1 min bei 12000 rpm abzentrifugieren und 2 h bei 15°C inkubieren
- 3) Zwischenlagerung der Ansätze und Fragmentlängenbestimmung nach G.3.1), Schritt 3), durchführen
- 4) bei richtiger Fragmentlänge (500 - 2000 bp):
 Markierungsreaktion durch 10 min Inkubation bei 70°C beenden;
 bei zu hoher Fragmentlänge:
 betroffenen Ansatz ca. 30 min bei 15°C nachinkubieren und evtl. zusätzlich DNase I zugeben; Schritte 3) und 4) durchführen
- 5) abgestoppte Ansätze bis zur Verwendung bei -20°C lagern

- 6) Austesten des benötigten DNase I-Volumens:

Das für einen Markierungsansatz benötigte DNase I-Volumen muss für jede neue Enzymcharge ausgetestet werden, da die Enzymaktivität bei verschiedenen Chargen variieren kann.

Bei der hier verwendeten DNase I wurde zur Austestung eine 1:10000-Verdünnung des Enzyms in A. dest. (4°C) hergestellt und in unterschiedlichen Volumina (2, 4, 6, 8 µl) in Test-Markierungsansätzen eingesetzt. Die Test-Markierungsansätze wurden wie in Schritt 1) angesetzt, jedoch wurden die Nukleotide und die DNA-Polymerase I durch ein entsprechendes Volumen A. dest. ersetzt (Lichter and Cremer 1992). Die DNase I-Originallösung wurde erst direkt vor Gebrauch verdünnt und sofort verwendet. Nach Ablauf der Reaktionszeit (Schritt 2) erfolgte eine Fragmentlängenbestimmung der Testansatz-DNAs mittels Agarose-Gelelektrophorese nach G.3.1), Schritt 3). Die DNase I-Verdünnung, mit der die erforder-

liche Fragmentlänge (s. Schritt 4) in der Reaktionszeit erzielt wurde, konnte für alle nachfolgenden Markierungsansätze mit dieser DNase I-Originallösung verwendet werden.

In den durchgeführten Markierungsansätzen erwies sich der Einsatz von 2 Milliunits DNase I pro 25 µl Gesamtvolumen bzw. 500 ng DNA als optimal.

7) Überprüfung der Markierungseffizienz mittels Dot Blot:

Durch die Dot Blot-Technik kann die Effizienz des Einbaus von haptengekoppelten Nukleotiden in die DNA nach der Markierung überprüft werden. Der Dot Blot wurde angewendet, um die Markierungseffizienz des neuen Nick-Translationssystems, das zur Direktmarkierung der HeLa-DNAs eingesetzt wurde, zu ermitteln. Dazu wurde DNA aus PB entsprechend den Angaben in G.3.2) mit Biotin-11-dUTP markiert. Der Einsatz von Biotin-11-dUTP anstelle eines Fluorochrom-konjugierten Nukleotids war notwendig, um eine Detektion der markierten DNA auf dem Dot Blot-Filter zu gewährleisten. Biotin-11-dUTP wurde im Markierungsansatz in gleicher Konzentration wie die Fluorochrom-konjugierten Nukleotide verwendet.

Für den Blot wurde mit der Biotin-markierten DNA-Probe eine Verdünnungsreihe (mit 0.01 pg DNA/µl bis 10 ng DNA/µl) hergestellt, die auf eine Nylonmembran aufgebracht und durch eine enzymgekoppelte Farbreaktion detektiert wurde. Die Durchführung des Dot Blots erfolgte nach Fröncke 1993.

Die Markierungseffizienz kann auf dem Dot Blot-Filter durch die Färbungsintensität der detektierten DNA-Spots, insbesondere anhand des letzten noch sichtbaren DNA-Spots und seines DNA-Gehalts, abgeschätzt werden. Bei der überprüften DNA-Probe ließ sich noch 0.01 pg markierte DNA nachweisen, so dass auf eine gute Markierungseffizienz des neuen Nick-Translationssystems geschlossen werden konnte.

G.4) Herstellung des CGH-Hybridisierungsmixes

Für den CGH-Hybridisierungsmix (CGH-Hybmix) wurden markierte Test- und markierte Referenz-DNA in gleichen Anteilen zusammengemischt und ein Überschuss an unmarkierter humaner Cot1-DNA zur Suppression der ubiquitär vorliegenden IRS (s. Einleitung unter G) zugegeben. Die DNA-Mischung wurde ethanolpräzipitiert und in Hybridisierungslösung (Master Mix) aufgenommen. Aufgrund eines neuen Protokolls wurde die DNA-Präzipitation bei den Ansätzen mit direktmarkierter DNA gegenüber den Ansätzen mit haptenmarkierter DNA leicht modifiziert.

Durchführung:

1) DNA-Mischung für CGH herstellen aus:

500 ng markierte Test-DNA + 500 ng markierte Referenz-DNA + 20 µg humane Cot1-DNA

2.1) DNA-Präzipitation, Methode 1 (bei haptenmarkierter DNA durchgeführt):

- a) 3 Volumen Ethanol abs. zugeben, mischen und mindestens 30 min bei -20°C inkubieren
- b) 30 min bei 12000 rpm und 4°C zentrifugieren

2.2) DNA-Präzipitation, Methode 2 (bei direktmarkierter DNA durchgeführt):

- a) 0.1 Volumen 3 M Natriumacetat zugeben, mischen
- b) 2.5 Volumen Ethanol abs. zugeben, mischen und mindestens 2 h bei -20°C inkubieren
- c) 30 min bei 14000 rpm zentrifugieren

- 3) Überstand entfernen; DNA-Pellet 1x mit 500 µl 70% Ethanol waschen (Ethanol zugeben, mehrmals umschwenken, 10 min bei 14000 rpm abzentrifugieren und Überstand entfernen)
- 4) DNA-Pellet im offenen Eppendorftube bei 60°C trocknen
- 5) DNA-Pellet in 5 µl Master Mix aufnehmen und für 30 min bei 60°C lösen
- 6) fertigen CGH-Hybmix bis zur Verwendung bei -20°C lagern

G.5) Metaphasenpräparation für CGH

Metaphasenpräparate für die CGH wurden aus Phytohämagglutinin-stimulierten PB-Kulturen (Ansatz nach B.1 mit PB von gesunden Spendern) entsprechend den Angaben in C) hergestellt. Die Metaphasenpräparation erfolgte über Wasserdampf, da sich damit die beste Präparatequalität erzielen ließ.

Für die Analyse des AML-Falls wurden Metaphasen mit einem normalen weiblichen Karyotyp (46,XX) zur CGH verwendet. Die HeLa-CGH-Ansätze wurden je nach Verfügbarkeit auf Metaphasen mit normalem weiblichen oder männlichen Karyotyp (46,XX oder 46,XY) durchgeführt.

Das für einen CGH-Ansatz benötigte Metaphasenpräparat wurde jeweils am Tag des Ansatzes frisch hergestellt. Da keine Hybridisierung über das ganze Präparat vorgesehen war, wurde eine geeignete Hybridisierungsstelle mit guter Metaphasenqualität und -dichte auf dem Präparat im Lichtmikroskop mit Phasenkontrast gesucht und mit einem Glasschreiber (Diamantschreiber) auf der Präparatunterseite markiert. Das Präparat wurde anschliessend zur Alterung für 60 min auf eine Heizplatte mit 95°C gelegt.

G.6) Denaturierung und Hybridisierung

Vor dem CGH-Ansatz wurden das Metaphasenpräparat und der CGH-Hybmix getrennt voneinander denaturiert. Der CGH-Hybmix wurde danach prähybridisiert, um die Reassoziations- und Cot1-DNA, s. Einleitung unter G) zu unterstützen. Dies verhindert ihre Hybridisierung mit der chromosomalen DNA auf dem Metaphasenpräparat. Anschliessend erfolgte der CGH-Ansatz.

Durchführung:

- 1) Denaturierung und Prähybridisierung des CGH-Hybmixes:
 - a) CGH-Hybmix bei Lagerung in -20°C auf RT erwärmen
 - b) CGH-Hybmix 5 min bei 95°C denaturieren und zur Prähybridisierung 30 min bei 37°C inkubieren
- 2) Denaturierung des Metaphasenpräparates (vorbereitet nach G.5):
 - a) 100 µl Denaturierungslösung auf das Präparat geben und mit einem langen Deckglas luftblasenfrei abdecken
 - b) Präparat für 2 min bei 70°C auf Heizblock oder Heizplatte denaturieren
 - c) Deckglas abschütteln, Präparat mit A. dest. (RT) abspülen und lufttrocknen lassen
- 3) CGH-Ansatz:
 - a) prähybridisierten CGH-Hybmix auf markierte Hybridisierungsstelle des denaturierten Metaphasenpräparates auftragen und mit einem kleinen Deckglas luftblasenfrei abdecken
 - b) Deckglasränder mit Fixogum versiegeln
 - c) Präparat in eine Metall- oder Plastikbox legen, zur Hybridisierung für 3 - 4 Tage bei 37°C inkubieren

G.7) Stringenzwaschung und Detektion

Nach der Hybridisierung wurden die CGH-Präparate zur Entfernung von Nukleinsäurehybriden mit geringer Homologie unter stringenten Bedingungen gewaschen.

Bei den CGH-Ansätzen mit haptenmarkierter DNA folgte eine immunocytochemische Detektion von Test- und Referenz-DNA mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern. Dazu wurden zunächst unspezifische Antikörper-Bindungsstellen auf den hybridisierten Präparaten mit Hilfe von Rinderserumalbumin (BSA) blockiert. Anschliessend wurden Test- und Referenz-DNA simultan und ohne Signalamplifikation detektiert. Standardgemäß erfolgte die Detektion der Biotin-markierten Test-DNA mit Avidin-FITC (grüne Fluoreszenz) und der Digoxigenin-markierten Referenz-DNA mit Anti-Digoxigenin-Rhodamin-Fab-Antikörperfragmenten (rote Fluoreszenz).

Nach Abschluss der Detektion wurden die hybridisierten Präparate eingedeckt und gleichzeitig die Chromosomen mit DAPI (blaue Fluoreszenz) und Actinomycin D (AMD) gegengefärbt (Methode nach Arens 1993). Die simultane Färbung von Chromosomen mit DAPI und dem nichtfluoreszierenden AMD erzeugt ein Q-Bandenmuster mit zusätzlicher Verstärkung von A+T-reichen Regionen in 1qh, 3cen, 16qh und im distalen Y-Abschnitt sowie einiger Satelliten der D- und G-Gruppen-Chromosomen (Schweizer and Ambros 1994). Die Verwendung von AMD erleichtert durch eine Verstärkung des DAPI-Bandenmusters die Identifizierung und Karyotypisierung der Chromosomen, stört jedoch die weitere CGH-Auswertung nicht.

Bei den CGH-Ansätzen mit direktmarkierter Test- und Referenz-DNA entfiel die Detektion mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern, so dass die hybridisierten Präparate nach Stringenzwaschung und Trocknung sofort eingedeckt werden konnten. Dies wurde unter lichtgeschützten Bedingungen durchgeführt, um ein vorzeitiges Ausbleichen der Fluoreszenz zu vermeiden.

G.7.1) Stringenzwaschung

- 1) Fixogumversiegelung und Deckglas vom hybridisierten Präparat entfernen
- 2) hybridisiertes Präparat 3x 5 min bei 42°C in 0.05x SSC inkubieren;
nur bei Präparaten mit Direktmarkierung: Präparate lufttrocknen und Eindecken nach G.7.3)

G.7.2) Detektion von haptenmarkierter DNA

- 1) hybridisiertes Präparat 5 min bei 37°C in Blocking-Lösung inkubieren
- 2) 100 µl Detektionslösung 1 auf das Präparat auftragen, mit einem langen Deckglas luftblasenfrei abdecken und 60 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubieren
- 3) Deckglas abschütteln und Präparat 3x 3 min bei 37°C in Waschpuffer inkubieren
- 4) Präparat zum Abfließen der überschüssigen Flüssigkeit kurz senkrecht stellen, Eindecken nach G.7.3)

G.7.3) Eindecken der Präparate

- 1) 30 µl Eindecklösung auftragen, mit einem langen Deckglas luftblasenfrei abdecken
- 2) überschüssige Eindecklösung mit Hilfe eines Filterpapierblocks entfernen
- 8) eingedecktes Präparat bis zur Auswertung bei 4°C im Dunkeln lagern

G.8) Fluoreszenzmikroskopie und Aufnahmen

Zur Fluoreszenzmikroskopie, Aufnahme und Digitalisierung der hybridisierten Metaphasen von CGH-Präparaten wurde ein Fluoreszenzmikroskop mit angeschlossenem Bildanalyseprogramm, bestehend aus einer gekühlten CCD-Kamera und PC mit Bildanalyseprogramm für FISH und CGH, eingesetzt. Bei der Aufnahme einer CGH-Metaphase wurde für jede der drei Fluoreszenzfarben (grün, rot und blau) ein digitales Graustufenbild erzeugt. Die Graustufenbilder einer Metaphase wurden durch das Bildanalyseprogramm zur Darstellung eines farbigen Rot-Grün-Blau (RGB)-Bildes der Fluoreszenzsignale der Metaphase verarbeitet und überlagert. Die aufgenommenen RGB-Bilder wurden zur Erstellung der CGH-Profile (s. G.9) im spezifischen Format des Bildanalyseprogramms gespeichert.

Zur CGH-Profilberechnung wurden mindestens 5 geeignete Metaphasen mit einem Objektiv mit 63facher Vergrößerung und Immersionsöl aufgenommen. Metaphasen wurden als geeignet angesehen, wenn sie folgende Merkmale aufwiesen (Kallioniemi et al. 1994; Du Manoir et al. 1993, 1995):

- eine intensive, nichtgranuläre Grün-, Rot- und Blau-Fluoreszenz auf den Chromosomen bei niedriger Hintergrundfluoreszenz;
- in den Centromerregionen der Chromosomen und in den Heterochromatinblockregionen von 1q, 9q, 16q und Yq ist nur die blaue Fluoreszenz der DAPI-Gegenfärbung sichtbar (dies lässt auf eine optimale Suppression der repetitiven Sequenzen schließen);
- die Schwesterchromatiden eines Chromosoms, die beiden homologen Chromosomen in einer Metaphase und die gleichen Chromosomen in verschiedenen Metaphasen eines CGH-Ansatzes zeigen das gleiche Grünfluoreszenz-Intensitätsmuster und das gleiche Rotfluoreszenz-Intensitätsmuster;
- keine stark fluoreszierenden Hintergrundspots oder Zellkerne im aufzunehmenden Bildbereich;
- keine oder nur wenige sich überschneidende oder stark gekrümmte Chromosomen;
- eine vollständige Chromosomenanzahl, die sich im aufzunehmenden Bildbereich abbilden lässt.

G.9) Digitale Bildverarbeitung und Profilerstellung

Die weitere Bildverarbeitung und CGH-Profilerstellung erfolgte mit Hilfe des Bildanalyseprogramms (s. G.8) und dem darin enthaltenen CGH-Modul. Die Bearbeitung der gespeicherten RGB-Bilder der CGH-Metaphasen wurde nach der Anleitung für Farbkaryotypisierung/CGH im Handbuch des Bildanalyseprogramms durchgeführt. Dazu wurden die RGB-Bilder der Metaphasen eines CGH-Ansatzes nacheinander in das Programm geladen und einzeln bearbeitet. Dies umfaßte für jedes Metaphasenbild eine Hintergrundkorrektur, das Ausschließen aller nichtchromosomalen Partikel und die automatische Einstellung der unteren und oberen Schwelle für die niedrigsten und höchsten Fluoreszenzintensitäten. Alle sich berührenden Chromosomen wurden durch eine Markierungslinie getrennt, damit sie als einzelne Objekte erkannt wurden. Die Karyotypisierung der Chromosomen erfolgte anhand ihres digital in ein Schwarz-Weiß-Muster invertierten DAPI-Bandenmusters. Dabei wurden Chromosomen mit Überschneidungen oder starken Krümmungen sowie nicht eindeutig identifizierbare Chromosomen aus der Auswertung ausgeschlossen. Nach Begradigung der Chromosomen sowie Überprüfung und gegebenenfalls Korrektur der automatisch bestimmten Centromerposition wurde das fertige Karyogramm gespeichert. Die CGH-Profile der Chromosomen wurden dabei automatisch berechnet und mit abgespeichert.

Nach Abschluss der Karyotypisierung erfolgte für jedes Chromosom die Berechnung eines gemittelten Profils (Mittelprofil) aus allen Karyogrammen eines CGH-Ansatzes durch Mittelung der jeweiligen Ratio-Werte. Die berechneten Mittelprofile wurden entlang von G-Banden-Ideogrammen der entsprechenden Chromosomen mit linearer Skalierung der Ratio-Werte (Wertebereich 0 bis 2) und mit Angabe der gewählten Profilschwellenwerte dargestellt und abgespeichert.

Die Profilschwellenwerte ermöglichten bei der Auswertung der CGH-Profile (s. G.10) eine Unterscheidung zwischen zufälligen Schwankungen der Profillinie und Ausschlägen aufgrund von Kopienanzahlunterschieden im Testzellgenom (s. Abb. 3).

Bei der AML-Fallstudie wurden die Werte 0.75 für die untere Schwelle und 1.25 für die obere Schwelle als feste Profilschwellenwerte verwendet. Diese Schwellenwerte wurden aufgrund der theoretisch zu erwartenden Fluoreszenzintensitätsunterschiede bei Verlust oder Zugewinn von einer Kopie eines Chromosoms in einer diploiden Testzellpopulation festgelegt (Du Manoir et al. 1993, 1995). Zusätzlich wurde der Wert 1.75 als Schwellenwert für die Amplifikation von Sequenzen eingesetzt.

Zur Auswertung der HeLa-CGH-Ansätze wurden die Profilschwellenwerte an den vorherrschenden Ploidiegrad der als Test- und Referenzzellgenome verwendeten HeLa-Linien angepaßt. Auf diese Weise konnte eine höhere Detektionssensitivität für Kopienanzahlunterschiede erzielt werden als mit der Verwendung von Schwellenwerten für diploide Genome (s.o.) (Du Manoir et al. 1995). Die für die CGH eingesetzten HeLa-Linien waren durch einen hypotriploiden Karyotyp mit zahlreichen chromosomalen Rearrangements gekennzeichnet (s. B.2.1 und Ergebnisse, B.3 und B.5). Daher wurde für die Anpassung der Profilschwellenwerte ein Ploidiegrad von $3n$ (Triploidie) zugrundegelegt und die Werte für die untere und obere Schwelle nach folgenden Formeln berechnet (Du Manoir et al. 1995):

Untere Schwelle = $(\text{Ploidiegrad} - 0.5) / \text{Ploidiegrad}$; Obere Schwelle = $(\text{Ploidiegrad} + 0.5) / \text{Ploidiegrad}$.

Analog dazu ließ sich ein Schwellenwert für die Amplifikation von Sequenzen im HeLa-Testzellgenom berechnen nach: Schwelle für Amplifikation = $(\text{Ploidiegrad} + 1.5) / \text{Ploidiegrad}$.

Für die HeLa-CGH-Ansätze ergaben sich dadurch die Werte 0.83 für die untere und 1.17 für die obere Schwelle sowie 1.50 als Schwelle für Amplifikation. Diese Werte wurden als feste Profilschwellenwerte verwendet. Die Auswertung und Interpretation der HeLa-CGH-Profile (s. G.10) erfolgte damit in Relation zu einem triploiden Karyotyp.

Die festgelegten Profilschwellenwerte wurden jeweils durch CGH-Kontrollansätze auf ihre Eignung zur Detektion von spezifischen Kopienanzahlunterschieden überprüft.

G.10) Visuelle und Profilauswertung

Die über- und unterrepräsentierten Chromosomenregionen in einem Testzellgenom wurden sowohl durch Auswertung der berechneten CGH-Mittelprofile als auch durch visuelle Inspektion der CGH-Metaphasen ermittelt.

Die Auswertung der CGH-Mittelprofile erfolgte nach folgenden Gesichtspunkten:

- Eine Überschreitung der oberen Schwelle durch die CGH-Profillinie wurde als Kopienanzahlzugewinn und eine Unterschreitung der unteren Schwelle als Kopienanzahlverlust in der entsprechenden chromosomalen Region des Testzellgenoms gewertet.
- Chromosomenregionen mit einem Profilausschlag über die Schwelle für Amplifikation wurden als im Testzellgenom amplifizierte Regionen angesehen.

- Chromosomenregionen mit einem Profilverlauf innerhalb der Schwellen entsprachen Regionen mit gleicher Kopienanzahl in Test- und Referenzzellgenom bzw. ohne Kopienanzahländerung im Testzellgenom.
- Die genaue Bandenbezeichnung der über- und unterrepräsentierten Regionen wurde aus den Ideogrammen der CGH-Mittelprofile ermittelt. Die Beschreibung der CGH-Ergebnisse erfolgte nach der ISCN (1995)-Nomenklatur (Mitelman 1995).
- Nicht gewertet wurden Schwellenüberschreitungen des Mittelprofils in den von der Auswertung ausgeschlossenen Regionen. Dazu gehörten alle Centromer- und Telomerregionen, die Heterochromatinblockregionen in 1q, 9q, 16q und Yq sowie die Satellitenregionen der akrozentrischen Chromosomen.
- Die Chromosomenregionen 1p32→pter und 16p sowie die Chromosomen 19 und 22 können in der CGH ein unspezifisch erniedrigtes Profil zeigen (Kallioniemi et al. 1994). Zur Vermeidung von Fehlinterpretationen erfolgte daher eine Überprüfung der Profilauswertung dieser Regionen durch visuelle Auswertung.

Die Ergebnisse der Profilauswertung wurden bei allen CGH-Ansätzen durch eine zusätzliche visuelle Inspektion der CGH-Metaphasen überprüft. Dabei zeigte sich besonders in amplifizierten Regionen, dass der schwellenüberschreitende Ausschlag der Profillinie über einen größeren chromosomalen Abschnitt verlief als der visuell erkennbaren Größe der veränderten Region entsprach. Die genauen Grenzen eines chromosomalen Abschnitts mit veränderter Kopienanzahl wurden daher im Zweifelsfall nach dem visuellen Bild festgelegt und benachbarte Regionen, die noch eine Schwellenüberschreitung der Profillinie aufwiesen, aber keine visuell erkennbare Veränderung der Test-DNA-Fluoreszenzintensität mehr zeigten, ausgeschlossen.

H) Reverse In situ-Hybridisierung

Reverse In situ-Hybridisierungen (REVISH) wurden als CGH-Ansätze mit direktmarkierter Test- und Referenz-DNA nach den Angaben in G) durchgeführt, jedoch anstatt auf Metaphasen mit normalem Karyotyp auf HeLa-Metaphasen hybridisiert. Die REVISH-Ansätze dienen zur Lokalisation der unter MTX-Selektion amplifizierten Sequenz in den Metaphasen der erzeugten HeLa-MTX-Sublinien. Die für diese Hybridisierungen geeignete Test-DNA mit Amplifikation der zu visualisierenden Sequenz wurde aufgrund der Ergebnisse der HeLa-CGH-Ansätze ausgewählt.

Am Fluoreszenzmikroskop mit angeschlossenem Bildanalysesystem (s. G.8) wurden pro REVISH-Ansatz mindestens 25 digitalisierte Fluoreszenzbilder von hybridisierten HeLa-Metaphasen mit intensiver Fluoreszenz der verwendeten Fluorochrome und vollständiger Chromosomenanzahl erstellt. Die Auswertung der Fluoreszenzbilder erfolgte visuell, indem Anzahl und Lokalisation der Signale der amplifizierten Sequenz pro Metaphase bestimmt wurden. Zur Signallokalisation wurden Fluoreszenz bzw. Bandenmuster der DAPI-AMD-Gegenfärbung verwendet. Die Spezifität des Signals der amplifizierten Sequenz, das in den REVISH-Ansätzen durch die Test-DNA generiert wurde, wurde durch Vergleich mit der Fluoreszenzintensität der Referenz-DNA, die keine Amplifikation der zu visualisierenden Sequenz aufwies, an demselben Ort überprüft.

I) Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung

Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) bezeichnet allgemein die Hybridisierung von Nukleinsäure-Sonden, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert oder detektiert werden, mit den Nukleinsäuren (Hybridisierungszielen) in intakten zellulären Strukturen ('in situ'). Diese Strukturen können z.B. Chromosomen (z.B. Whole Chromosome Painting), DNA-Fasern (Fiber-FISH) oder Interphasezellkerne (Interphase-FISH) sein. Die FISH ermöglicht eine direkte Visualisierung und Lokalisation der als Sonde verwendeten Nukleinsäuren auf der zu untersuchenden zellulären Struktur (Cremer et al. 1995; Heiskanen et al. 1996). Die mittlerweile verfügbare Vielfalt an Sonden, u.a. für Single Copy-Gensequenzen, repetitive Sequenzen (z.B. Centromersequenzen), Chromosomenarme und ganze Chromosomen (Hori et al. 1990; Weier et al. 1991; Guan et al. 1996; Lichter et al. 1988) wird sowohl in der Forschung als auch im diagnostischen Bereich eingesetzt (Cremer et al. 1995; Bentz et al. 1994). Durch Kombination von unterschiedlich markierten Sonden für verschiedene Zielsequenzen in einem FISH-Ansatz sind diese simultan visualisierbar, so dass dadurch auch komplex aberrante Karyotypen von Tumorzellen analysiert werden können (z.B. durch Vielfarben-FISH mit bis zu 27 unterschiedlichen Sonden; Speicher et al. 1996).

Die FISH wurde zum Nachweis und zur Lokalisation der humanen Gene *MYC* und *DHFR* mit Hilfe von genspezifischen Sonden sowie zur Markierung von ausgewählten Chromosomen durch Whole Chromosome Painting (WCP) eingesetzt. Das WCP ermöglicht eine eindeutige Bestimmung der Kopienanzahl und die Detektion von Rearrangements der markierten Chromosomen (Lichter et al. 1988; Cremer et al. 1988). Diese Technik wurde zur Markierung von ein oder zwei Chromosomen (Ein- oder Zwei-Farben-Painting) in HeLa-Metaphasen angewendet. Alle Hybridisierungen erfolgten unter Suppression der repetitiven Sequenzen der jeweiligen Sonden-DNA (CISS-Hybridisierung, s. G; Cremer et al. 1995). Die Spezifität der verwendeten Sonden unter den vorgegebenen Hybridisierungsbedingungen wurde jeweils durch eine FISH auf Metaphasen mit normalem Karyotyp überprüft.

I.1) Die FISH-Sonden

I.1.1) Die humane *MYC*-Sonde

Die *MYC*-Sonde wurde als P1-Escherichia coli (*E. coli*)-Klon, Bezeichnung: RMC08P001, von Resource for Molecular Cytogenetics (RMC, San Francisco, CA, USA; URL: <http://rmc-www.lbl.gov/rmc/OUTSIDE.html>) bezogen. Die Größe des *MYC*-P1-Vektors beträgt ca. 23 kb (Greulich 1997). Er enthält ein Insert mit humaner genomischer DNA, die das *MYC*-Gen umfaßt, und ist cytogenetisch auf 8q23-q24 lokalisiert worden (RMC-Angabe 1999). Der *MYC*-*E. coli*-Klon wurde in Form einer Agarstichkultur geliefert, die bei Lagerung im Dunkeln bei RT ca. 2 Jahre haltbar ist (Maniatis et al. 1982).

I.1.2) Die humane *DHFR*-Sonde

Der verwendete *DHFR*-*E. coli*-Klon (*E. coli* HB101), Nr. 57068 (Bezeichnung: CHB203[pCS806]), wurde von der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA; URL: <http://www.atcc.org>) bezogen. Er enthält ein Plasmid (pBR322) mit einem 8.6 kb großen genomischen Insert des humanen *DHFR*-Gens inklusive des Exons 6 (Chen et al. 1982; Anagnou et al. 1984). Der chromosomale Locus ist 5q11.2-q13.2 (ATCC-Angabe 1999). Der *DHFR*-*E. coli*-Klon wurde in gefriergetrockneter Form geliefert.

I.1.3) Die WCP-Sonden

Für das WCP wurden spezifische DNA-Bibliotheken für die humanen Chromosomen 2 und 5 verwendet, die von Dr. H. Scherthan zur Verfügung gestellt worden waren. Die chromosomenspezifischen Bibliotheken lagen in Form von Plasmidgenbanken (Bluescript-Plasmid, pBS) in *E. coli* (*E. coli* DH5 α) vor (WCP-*E. coli*-Klone). Sie wurden im Labor eingefroren bei -70°C gelagert.

I.2) Ansetzen von Bakterienkulturen und Glycerinstocks

Zur Herstellung der benötigten gen- und chromosomenspezifischen Sonden wurden die *E. coli*-Klone kurzzeitig kultiviert und anschliessend zur Plasmidisolierung verwendet. Die Kultivierung der *E. coli*-Klone erfolgte unter selektiven Bedingungen, die durch Zusatz eines Antibiotikums, gegen das die plasmidhaltigen *E. coli*-Klone durch ein entsprechendes Resistenzgen geschützt waren, hergestellt wurden. Bei dem *MYC-E. coli*-Klon wurde dazu Kanamycin und beim *DHFR-E. coli*-Klon sowie den WCP-*E. coli*-Klonen Ampicillin eingesetzt. Zur langfristigen Aufbewahrung (mehrere Jahre) der *E. coli*-Klone wurde ein Teil der Bakterienkulturen in Glycerin-haltigem Medium eingefroren (Glycerinstock) und bei -70°C gelagert.

Von den *MYC*- und *DHFR-E. coli*-Klonen wurden nach der Lieferung zuerst Vorkulturen angelegt, die zur Herstellung von Glycerinstocks dieser Klone verwendet wurden. Die WCP-*E. coli*-Klone lagen im Labor bereits als Glycerinstocks vor. Aus den Glycerinstocks wurden nach Bedarf Flüssigkulturen zur Plasmidisolierung angesetzt.

I.2.1) Ansetzen von Vorkulturen zur Herstellung von Glycerinstocks

1) Ansatz der Vorkultur des *MYC-E. coli*-Klons:

Agarstichkultur öffnen, mit steriler Impföse Zellmaterial aus dem Stichkanal entnehmen und in 10 ml LB-Medium mit Kanamycin suspendieren = Vorkultur; Agarstichkultur verschliessen, bei RT dunkel lagern

2) Ansatz der Vorkultur des *DHFR-E. coli*-Klons:

a) Glasampulle mit gefriergetrockneten Bakterien nach ATCC-Anleitung öffnen

b) gefriergetrocknetes Bakterienpellet mit 0.4 ml LB-Medium mit Ampicillin rehydratisieren, resuspendieren und Bakteriensuspension in 6 ml LB-Medium mit Ampicillin transferieren = Vorkultur

3) Vorkultur über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubieren

4) Glycerinstocks nach I.2.3) anlegen

I.2.2) Ansetzen von Flüssigkulturen zur Plasmidisolierung

1) *E. coli*-Glycerinstock aus -70°C entnehmen, bei RT auftauen

2) 100 μ l des Glycerinstocks in 100 ml LB-Medium mit Kanamycin (*MYC-E. coli*-Klon) oder Ampicillin (*DHFR-E. coli*-Klon; WCP-*E. coli*-Klone) geben = Flüssigkultur; Glycerinstock wieder in -70°C einlagern

3) Flüssigkultur über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubieren

I.2.3) Einfrieren von Bakterien als Glycerinstocks

1) 0.15 ml (15%) steriles Glycerin pro Cryotube einfüllen

2) 0.85 ml Bakteriensuspension aus Vor- oder Flüssigkultur pro Cryotube zum Glycerin geben, mischen

3) Cryotubes mit Bakterien-Glycerin-Mischung in -70°C einfrieren und lagern = Glycerinstocks

I.3) Plasmidisolierung

Zur Plasmidisolierung aus den Flüssigkulturen der *E. coli*-Klone wurden zwei verschiedene Methoden eingesetzt. Bei den WCP-Sonden wurde das im Labor etablierte Boiling-Verfahren von Kaul and Scherthan 1990 mit einigen Modifikationen durchgeführt. Die Plasmidisolierung aus dem *MYC*- und dem *DHFR*-*E. coli*-Klon erfolgte durch alkalische Lyse nach Birnboim 1983 und Pierce and Sternberg 1992, in modifizierter Form. Im Gegensatz zum Boiling-Verfahren ist diese Methode weniger stör anfällig und auch zur Isolierung größerer Plasmide (*MYC*-P1-Vektor) geeignet (Dillon et al. 1985).

I.3.1) Plasmidisolierung durch alkalische Lyse

- 1) Bakterien-Flüssigkultur 15 min bei 4000 rpm abzentrifugieren; Überstand entfernen
- 2) Bakterien in 750 µl Lysozymlösung für alkalische Lyse pro 50 ml Flüssigkultur-Pellet resuspendieren
- 3) 10 min bei RT inkubieren
- 4) 2 Volumen Alkali-SDS-Lösung zugeben, mischen und 10 min auf Eis inkubieren
- 5) 0.52 Volumen Kalium-Acetat-Lösung zugeben, mischen und 10 min auf Eis inkubieren
- 6) 5 min bei 14000 rpm abzentrifugieren
- 7) plasmidhaltigen Überstand in Eppendorftubes überführen, Pellet verwerfen
- 8) 1 Volumen Isopropanol abs. (RT) zugeben, mischen und zur Fällung 2 h bei -20°C inkubieren
- 9) 15 min bei 14000 rpm abzentrifugieren; Überstand entfernen
- 10) Plasmid-DNA-Pellet 1x mit 500 µl 70% Ethanol waschen (Ethanol zugeben, mehrmals umschwenken, 5 min bei 14000 rpm abzentrifugieren und Überstand entfernen)
- 11) DNA-Pellet im offenen Eppendorftube bei 60°C trocknen
- 12) DNA-Pellet in einem der Pelletgröße entsprechenden Volumen TE-Puffer ca. 2 h bei 60°C lösen
- 13) RNase-Verdau: 1/100 Volumen RNase-Stammlösung zugeben, mischen, 1 h bei 37°C inkubieren
- 14) auf RT abkühlen lassen, 1 Volumen Phenol zugeben und 5 min durch Umschwenken mischen
- 15) 5 min bei 14000 rpm zentrifugieren
- 16) obere Phase mit extrahierter Plasmid-DNA in neue Eppendorftubes überführen
- 17) 1 Volumen Chloroform zugeben und 5 min durch Umschwenken mischen
- 18) Schritte 15) und 16) durchführen
- 19) 0.1 Volumen 3 M Natriumacetat zugeben, mischen
- 20) 2 Volumen 100% Ethanol abs. (RT) zugeben und DNA durch Umschwenken präzipitieren
- 21) 3 min bei 14000 rpm abzentrifugieren; Überstand entfernen
- 22) Plasmid-DNA-Pellet 1x mit 1 ml 70% Ethanol waschen (s. Schritt 10)
- 23) Schritte 11) und 12) durchführen, DNA-Pellet aber nur ca. 30 min bei 60°C lösen
- 24) DNA-Lösung bei 4°C lagern
- 25) Qualität, Reinheit und Konzentration der isolierten Plasmid-DNA durch Agarose-Gelelektrophorese (s. G.2) mit 2 µl der DNA-Lösung bestimmen

I.3.2) Plasmidisolierung durch Boiling-Verfahren

- 1) Bakterien-Flüssigkultur 15 min bei 4000 rpm abzentrifugieren; Überstand entfernen
- 2) Bakterien in 2 ml TSE-Puffer pro 50 ml Flüssigkultur-Pellet resuspendieren

- 3) 200 µl Lysozymlösung für Boiling-Verfahren pro 1 ml Suspension zugeben, mischen
- 4) 5 min auf Eis inkubieren
- 5) 60 s bei 98°C denaturieren und 60 s auf Eis abkühlen
- 6) 30 min bei 12000 rpm und 4°C abzentrifugieren
- 7) plasmidhaltigen Überstand in Eppendorftubes überführen, Pellet verwerfen
- 8) RNase-Verdau: 1/100 Volumen RNase-Stammlösung zugeben, mischen, 1 h bei 50°C inkubieren
- 9) auf RT abkühlen lassen, 1 Volumen Phenol zugeben und 3 min durch Umschwenken mischen
- 10) 3 min bei 12000 rpm und 4°C abzentrifugieren
- 11) obere Phase mit extrahierter Plasmid-DNA in neue Eppendorftubes überführen
- 12) 1/20 Volumen 5 M NaCl und 1 Volumen Chloroform zugeben, 3 min durch Umschwenken mischen
- 13) Schritte 10) und 11) durchführen
- 14) 1 Volumen Isopropanol abs. (RT) zugeben, mischen, zur Fällung mindestens 1 h bei -20°C inkubieren
- 15) 30 min bei 12000 rpm und 4°C zentrifugieren; Überstand entfernen
- 16) Plasmid-DNA-Pellet 2x mit je 1 ml 70% Ethanol waschen (s. I.3.1, Schritt 10)
- 17) DNA-Pellet im offenen Eppendorftube bei 60°C trocknen
- 18) DNA-Pellet in einem der Pelletgröße entsprechenden Volumen TE-Puffer ca. 30 min bei 60°C lösen
- 19) DNA-Lösung bei 4°C lagern
- 20) Qualität, Reinheit und Konzentration der isolierten Plasmid-DNA durch Agarose-Gelelektrophorese (s. G.2) mit 1 µl der DNA-Lösung bestimmen

I.4) Markierung der FISH-Sonden

I.4.1) Markierung der *MYC*- und der *DHFR*-Sonde

Die Markierung der *MYC*- und der *DHFR*-Sonde erfolgte durch Nick-Translation von jeweils 500 ng Plasmid-DNA nach der Methode in G.3.2). Die Plasmid-DNA wurde anstatt mit einem Fluorochrom-konjugierten Nukleotid mit Digoxigenin-11-dUTP markiert. Dazu wurde die Markierungsreaktion wie folgt modifiziert:

- 1) Anstelle eines Fluorochrom-konjugierten Nukleotids wurde Digoxigenin-11-dUTP in einer Konzentration von 8.76 µM eingesetzt.
- 2) Die dTTP-Konzentration im Markierungsansatz wurde auf 16.24 µM erhöht.
- 3) Der Markierungsansatz wurde für 3 h bei 15°C inkubiert, um die für die FISH optimale Fragmentlänge von 100 - 500 bp (Lichter and Ried 1994) zu erzielen.

I.4.2) Markierung der WCP-Sonden

Die Markierung der WCP-Sonden für die Chromosomen 2 und 5 wurde nach der Nick-Translations-Methode in G.3.1) durchgeführt. Zum Ein-Farben-Painting von Chromosom 5 wurde die #5-WCP-Sonde mit Digoxigenin-11-dUTP markiert. Bei Zwei-Farben-Paintings erfolgte die Markierung der #5-WCP-Sonde mit Biotin-14-dATP und die Markierung der #2-WCP-Sonde mit Digoxigenin-11-dUTP. Zur Nick-Translation wurden pro WCP-Sonde jeweils 500 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Die bei den verwendeten Nick-Translationssystemen vorgegebene Reaktionszeit von 90 min wurde nicht verändert.

I.5) Herstellung der FISH-Hybridisierungsmixe

Die Herstellung der FISH-Hybridisierungsmixe (FISH-Hybmixe) erfolgte mit einigen Modifikationen nach den Angaben in G.4). Zur Suppression der in den FISH-Sonden enthaltenen repetitiven Sequenzen (Inserts mit humaner genomischer DNA) wurde den FISH-Hybmixen pro 500 ng markierter Plasmid-DNA die 20 - 60fache Menge an unmarkierter humaner Cot1-DNA zugegeben (CISS-Hybridisierung; Lichter and Ried 1994). Die Hybmix-Herstellung wurde bei der *MYC*- und der *DHFR*-Sonde entsprechend den Angaben für direktmarkierte DNA in G.4) durchgeführt und jeweils 500 ng markierte Sonden-DNA in 50 µl Master Mix gelöst. Die WCP-Sonden wurden nach den Angaben für haptenmarkierte DNA in G.4) weiterverarbeitet und in 10 µl Master Mix pro 500 ng WCP-Sonde gelöst.

I.6) Metaphasenpräparation, Denaturierung und Hybridisierung

Für die FISH wurden Metaphasenpräparate nach G.5) hergestellt und gealtert. Die Metaphasenpräparation erfolgte aus Phytohämagglutinin-stimulierten PB-Kulturen mit PB von gesunden Spendern, aus KM- und PB-Kulturen des AML-Falls sowie aus ausgewählten HeLa-Linien. Weiterhin wurden auch PCC-Präparate aus F.3.3) zur FISH eingesetzt.

Die getrennte Denaturierung von Metaphasen- bzw. PCC-Präparaten und FISH-Hybmixen sowie die Prähybridisierung der FISH-Hybmixe wurde nach den Angaben in G.6) durchgeführt. Die Hybridisierungszeit betrug bei den FISH-Präparaten 2 - 3 Tage.

I.7) Stringenzwaschung und Detektion

Bei den FISH-Ansätzen erfolgten Stringenzwaschung und die Blockierung der unspezifischen Antikörper-Bindungsstellen nach G.7.1) und G.7.2), Schritt 1). Die haptenmarkierten FISH-Sonden wurden anschliessend mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern detektiert.

Die Detektion der *MYC*- und der *DHFR*-Sonde mit Digoxigenin-11-dUTP-Markierung wurde zur Erzielung eines stärkeren Fluoreszenzsignals mit einmaliger Signalamplifikation nach der unten angegebenen Methode durchgeführt. Dazu wurden in erster Schicht ein Cyan-Fluorochrom-konjugierter Anti-Digoxigenin-Antikörper, Mouse-Anti-Digoxigenin-Cy2-AK, und in zweiter Schicht ein FITC-konjugierter Anti-Maus-Antikörper, Anti-Mouse-FITC-AK, beide mit grüner Fluoreszenzfarbe, verwendet. Diese Detektionsmethode wurde auch beim Ein-Farben-Painting eingesetzt. Die Detektion der Zwei-Farben-Paintings erfolgte entsprechend den Angaben in G.7.2) ohne Signalamplifikation. Die detektierten FISH-Präparate wurden nach G.7.3) eingedeckt und gegengefärbt.

Detektion von haptenmarkierten FISH-Sonden mit Signalamplifikation:

- 1) 100 µl Detektionslösung 2 auf das Präparat auftragen, mit einem langen Deckglas luftblasenfrei abdecken und 60 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubieren
- 2) Deckglas abschütteln und Präparat 3x 3 min bei 37°C in Waschpuffer inkubieren
- 3) 100 µl Detektionslösung 3 auf das Präparat auftragen, mit einem langen Deckglas luftblasenfrei abdecken und 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubieren
- 4) Schritt 2) durchführen
- 5) Präparat zum Abfließen der überschüssigen Flüssigkeit kurz senkrecht stellen, Eindecken nach G.7.3)

I.8) Fluoreszenzmikroskopie, Aufnahmen und Auswertung

Fluoreszenzmikroskopie, Aufnahme und Digitalisierung von Fluoreszenzbildern der FISH-Ansätze erfolgten am Fluoreszenzmikroskop mit angeschlossenem Bildanalysesystem (s. G.8). Zur Auswertung wurden pro FISH-Ansatz mindestens 10 Metaphasen bzw. PCC-Zellen mit guter Signalintensität der verwendeten Sonde und vollständiger Chromosomenanzahl aufgenommen und abgespeichert. Auf den digitalisierten Fluoreszenzbildern wurden Anzahl und Lokalisation der sondenspezifischen Signale pro Metaphase ermittelt. Die Signallokalisation erfolgte anhand der Fluoreszenz bzw. des Bandenmusters der DAPI-AMD-Gegenfärbung.

Bei der Auszählung der extrachromosomalen Chromatinelemente, Single Minutes (Smin) und Dmin, in den PCC-Zellen wurde die Unterscheidung zwischen Smin und Dmin anhand des Abstandes der einzelnen Minutes voneinander getroffen. Als Dmin wurden extrachromosomale Elemente angesehen, deren einzelne Minutes einen Abstand von weniger als den doppelten Durchmesser einer Minute aufwiesen. Smin entsprachen Minute-Elementen, deren Abstand voneinander größer als der Durchmesser der vorhandenen Dmin war.

J) Statistische Methoden

Die zur weiteren Auswertung der Daten verwendeten statistischen Verfahren wurden nach den Angaben in Clauß und Ebner 1985 durchgeführt. Alle Berechnungen erfolgten mit den in den Auswertungen ermittelten absoluten Zahlenwerten.

Beim AML-Fall wurde der χ^2 -Test zur Prüfung der Signifikanz der Differenz zwischen den Metaphasenhäufigkeiten mit einer bestimmten Dmin-Anzahl bei Erstdiagnose und zweitem Rezidiv herangezogen. Die Signifikanzniveaus wurden nach der Irrtumswahrscheinlichkeit α wie folgt festgelegt:

χ^2 -errechnet > χ^2 -Tabellenwert bei:	$\alpha \leq 5\%$:	Häufigkeitsdifferenz ist schwach signifikant
	$\alpha \leq 1\%$:	Häufigkeitsdifferenz ist signifikant
	$\alpha \leq 0.1\%$:	Häufigkeitsdifferenz ist hochsignifikant
χ^2 -errechnet < χ^2 -Tabellenwert bei:	$\alpha \leq 5\%$:	Häufigkeitsdifferenz ist nicht signifikant

Grad und Richtung des statistischen Zusammenhangs zwischen der Anzahl an Dmin und Smin in den PCC-Zellen wurden durch die Berechnung des Pearson-Bravaischen Maßkorrelationskoeffizienten bestimmt. Der Maßkorrelationskoeffizient wurde auf Signifikanz bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit α von 5%, 1% und 0.1% geprüft.

Die Prüfung der statistischen Signifikanz der beobachteten Differenzen zwischen Dmin- und Smin-Anzahl in den PCC-Zellen erfolgte mit Hilfe eines t-Tests für korrelierende Stichproben. Die Signifikanzniveaus bei Vergleich von t-errechnet mit t-Tabellenwert wurden nach der Irrtumswahrscheinlichkeit α entsprechend wie für den χ^2 -Test (s.o.) festgelegt.

Bei den HeLa-Linien wurden statistisch signifikante Unterschiede, die zwischen den Häufigkeiten von Metaphasen mit einem bestimmten Merkmal bei der HeLa-Parentallinie und der jeweils verglichenen HeLa-Sublinie auftraten, mit Hilfe des χ^2 -Vierfelder-Tests ermittelt. Dabei wurde bei Stichprobenumfängen von <40 und/oder bei Vorliegen eines erwarteten Häufigkeitswertes von <5 eine Kontinuitäts- oder

Yates-Korrektur nach Angaben in Clauß und Ebner 1985 durchgeführt. Die Signifikanzgrade bei Vergleich von χ^2 -errechnet mit χ^2 -Tabellenwert wurden nach der Irrtumswahrscheinlichkeit α wie für den χ^2 -Test (s.o.) festgelegt.

In den zur grafischen Ergebnisdarstellung verwendeten Histogrammen erfolgte die Kennzeichnung von statistisch signifikanten Unterschieden durch sternförmige Symbole (*) rechts neben bzw. über den jeweiligen Histogrammsäulen. Die Symbole markieren jeweils die Metaphasenhäufigkeiten, die im Vergleich zur entsprechenden Häufigkeit der HeLa-Parentallinie (0 μ M MTX) signifikant erhöht oder erniedrigt waren. Die einzelnen Signifikanzgrade wurden dabei wie folgt dargestellt:

Symbol	Signifikanzgrad der Abweichung von dem entsprechenden Wert der Parentallinie
*	schwach signifikant
**	signifikant
***	hochsignifikant

Ergebnisse

A) Analyse einer Genamplifikation in einem Leukämiefall

Der dargestellte Leukämiefall wurde im Rahmen einer cytogenetischen Leukämiediagnostik bearbeitet und aufgrund des ungewöhnlichen Ergebnisses weiter untersucht. Das Untersuchungsmaterial sowie die Patientendaten wurden freundlicherweise von den behandelnden Ärzten des Westpfalz Klinikums Kaiserslautern zur Verfügung gestellt.

A.1) Klinische Daten und Krankheitsverlauf

Die Patientin wurde erstmalig im Oktober 1996 untersucht. Sie litt an einer Harnwegsinfektion, einem Oberkiefergeschwür, sowie an Hämatomen, Nasenbluten, Anämie, Thrombopenie und einer allgemeinen Abgeschlagenheit. Eine Exposition gegenüber ionisierenden Strahlen oder giftigen Chemikalien verneinte sie. Die Blutuntersuchung ergab eine stark erhöhte Leukocytenzahl von 18500/ μ l mit 20% Blasten, 25% Promyelozyten, 10% Myelozyten, 11% Metamyelozyten, 19% polymorphkernige Neutrophile, 4% Monozyten und 8% Lymphozyten. Das Knochenmark zeigte einen gesteigerten Zellgehalt mit >95% Blasten, die zum Teil Auer-Stäbchen (nadelförmige azurophile Granulationen) aufwiesen. Zytochemisch waren die Blasten Peroxydase-positiv und daher der myeloischen Zellreihe zuzuordnen (Frick 1995). Die unspezifische α -Naphthyl-Butyrat-Esterase, die charakteristisch für monozytäre Zelltypen ist (Frick 1995), ließ sich in den Blasten nicht nachweisen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Diagnose einer akuten myeloischen Leukämie (AML), Subtyp M2 (nach FAB-Klassifikation; Clare and Hansen 1994), gestellt. Die Patientin wurde mit einer Induktionschemotherapie (TAD9-Schema; Büchner et al. 1990) behandelt, die zu einer starken Reduktion der Leukocytenzahl in Blut (6700/ μ l) und Knochenmark führte. Eine Konsolidierungstherapie nach dem gleichen Schema folgte. Im März 1997 wurde eine vollständige Remission festgestellt. Die zweite Konsolidierung erfolgte mit einer Chemotherapie nach S-HAM-Schema (Büchner et al. 1990). Das erste Rezidiv der Patientin wurde im Oktober 1997 diagnostiziert. Durch eine erneute chemotherapeutische Behandlung (ICE-Schema; Heil et al. 1992) konnte wiederum eine vollständige Remission erzielt werden. Das zweite Rezidiv erfolgte im Mai 1998. Eine Chemotherapie (MAMAC-Schema; Freund et al. 1991) führte zu einer partiellen Remission bis zum November 1998, als das dritte Rezidiv diagnostiziert wurde. Die Patientin wurde chemotherapeutisch (MAMAC-Schema; Freund et al. 1991) behandelt, jedoch konnte keine Remission mehr erreicht werden. Sie starb im Dezember 1998 aufgrund von Infektionen und der anhaltenden Leukämie.

A.2) Cytogenetische Analysen

A.2.1) Karyotyp-Befunde im Krankheitsverlauf

Die aberranten Metaphasen, die bei der Erstdiagnose in Knochenmark (KM) und peripherem Blut (PB) der Patientin auftraten, wiesen zahlreiche Double Minutes (Dmin) und den Verlust eines X-Chromosoms (#X) auf. Der Karyotyp dieser Metaphasen wurde beschrieben mit: 45,X,-X,dmin (s. Abb. 4). Dieser Befund bestätigte den Verdacht auf eine maligne Erkrankung der Patientin.

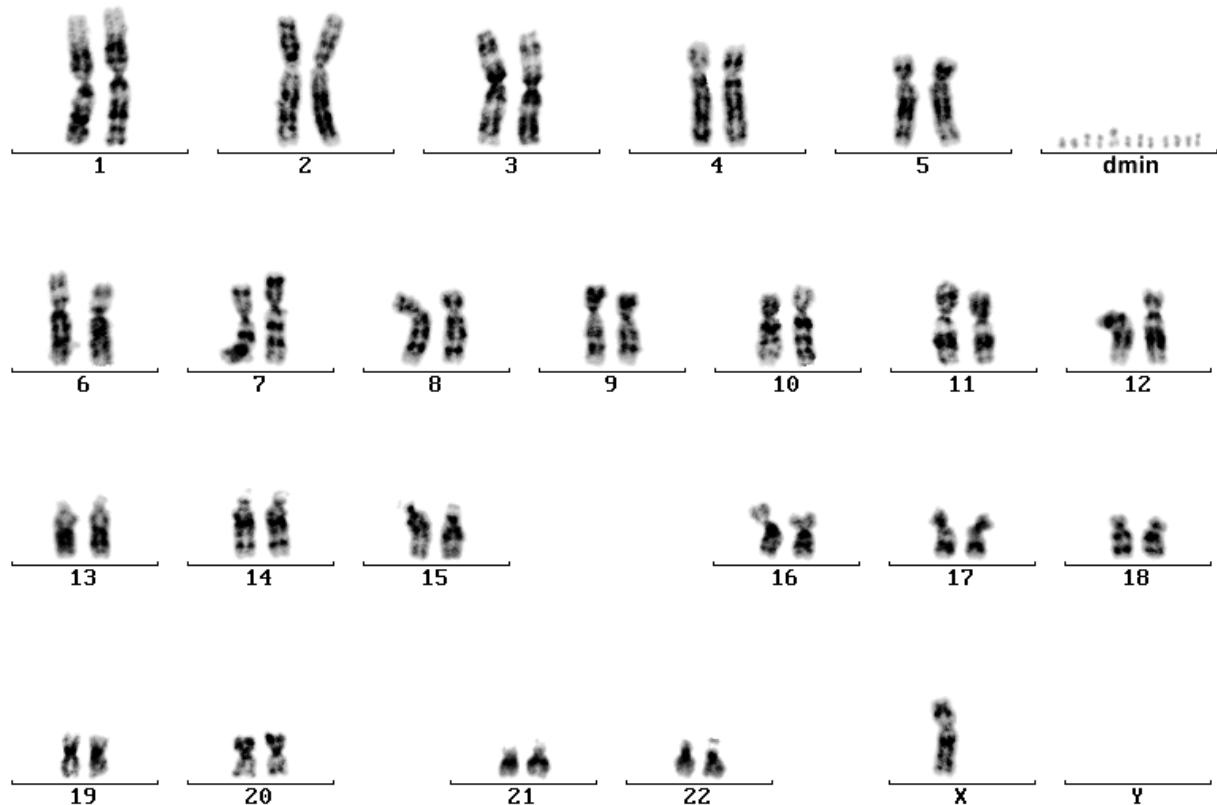


Abb. 4: Karyogramm einer Metaphase aus dem KM der Erstdiagnose (G-Bänderung).

Karyotyp: 45,X,-X,dmin

Neben aberranten Metaphasen wurden bei der Erstdiagnose in KM und PB nach Direktpräparation auch Metaphasen mit normalem Karyotyp (46,XX) gefunden (s. Tab.3). Ihr Anteil war im KM sehr gering (3 von 56 Metaphasen), erreichte aber im PB fast 50% (11 von 24 Metaphasen). Das Auftreten von Metaphasen mit normalem Karyotyp neben aberranten Metaphasen bei der Erstdiagnose hat Bedeutung für die Prognose des Krankheitsverlaufs, der bei Vorliegen von normalen und aberranten Metaphasen im KM meist günstiger als bei Vorliegen ausschließlich aberranter Metaphasen ist (Clare and Hansen 1994). In den 24h- und 48h-Kulturen von KM und PB traten nur noch aberrante Metaphasen auf. In der Phytohämagglutinin-stimulierten PB-Kultur, die bei der Erstdiagnose zur Ermittlung von eventuell vorliegenden konstitutionellen Aberrationen angesetzt wurde, überwogen die aberranten Metaphasen (54%). Zusätzlich lag eine hyperdiploide Metaphase mit einem deletierten Chromosom 4 und 6 Ringchromosomen von

unbekannter Zusammensetzung vor (s. Abb. 5), die weder Dmin noch einen #X-Verlust enthielt und daher nicht dem dominierenden aberranten Zellklon zuzurechnen war.

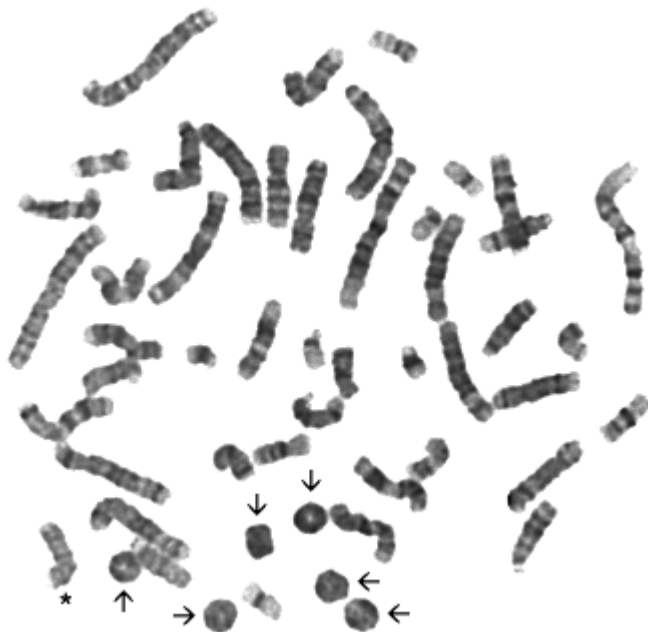


Abb. 5: Hyperdiploide Metaphase mit einem deletierten Chromosom 4 (*) und 6 Ringchromosomen (Pfeile) aus einer Phytohämagglutinin-stimulierten PB-Kultur der Erstdiagnose (G-Bänderung). Im Gegensatz zu den übrigen aberranten Metaphasen weist diese Metaphase keine Dmin auf.

Karyotyp: 52,XX,del(4)(q?),-18,+20,+6r

Bei der zweiten und dritten Verlaufskontrolle (nach Induktions- und nach erster Konsolidierungstherapie) waren keine aberranten Metaphasen mehr nachweisbar. Die Patientin befand sich nach der ersten Konsolidierungstherapie in vollständiger Remission. Beim ersten Rezidiv, das die Patientin nach sieben Monaten in Remission erlitt, war kein Untersuchungsmaterial für eine cytogenetische Analyse verfügbar, so dass keine Aussage über den Karyotyp der Leukämiezellen zu diesem Zeitpunkt möglich war. Eine weitere Verlaufskontrolle wurde nach erneuter Chemotherapie und in zweiter vollständiger Remission durchgeführt. Aufgrund einer KM-Aplasie war der Zellgehalt im Untersuchungsmaterial so niedrig, dass keine zuverlässige cytogenetische Analyse vorgenommen werden konnte. Die wenigen ausgewerteten Metaphasen zeigten keine Aberrationen. Ein zweites Rezidiv trat sechs Monate später auf. Die cytogenetische Untersuchung ergab ein Wiederauftreten des schon bei der Erstdiagnose beobachteten malignen Zellklons mit Dmin und #X-Verlust. Zusätzliche Aberrationen waren nicht vorhanden.

Bei der Analyse des dritten Rezidivs, das nach weiteren sechs Monaten eintrat, wurde im PB der Patientin der gleiche aberrante Zellklon wie beim ersten und zweiten Rezidiv, mit Dmin und #X-Verlust, gefunden. Daneben lagen in 8 (22%) von 37 karyotypisierten Metaphasen unterschiedliche Markerchromosomen vor (s. Tab. 4 und Abb. 6). Ein neuer Zellklon war jedoch nicht nachweisbar. Das Auftreten der Markerchromosomen in Metaphasen mit Dmin und #X-Verlust ließ darauf schließen, dass diese Metaphasen aus dem ursprünglichen aberranten Zellklon stammten. Die Markerchromosomen entsprachen nach ihrem Erscheinungsbild den Produkten von Bruchereignissen in den pericentrischen Regionen unterschiedlicher Chromosomen sowie von Fusionsereignissen zwischen Chromosomen unter Bildung dizentrischer Chromosomen.

Tabelle 3: Ergebnisse der cytogenetischen Analysen des AML-Falls

Befund	Datum	Gewebe/ Kultur	Karyotyp [Anzahl Metaphasen]	Σ Meta.+dmin / Σ Zellen (%Meta.+dmin)
Erst- diagnose	10/96	KM/D KM/24h, 48h PB/D	45,X,-X,6~266dmin[53]/46,XX[3] 45,X,-X,dmin[39]/44,X,-X,-22,dmin[1] 45,X,-X,dmin[12]/29,X,-X,-r.l.,dmin[1]/46,XX [11]	53/56 (95%) 40/40 (100%) 13/24 (54%)
		PB/24h, 48h PB/ 72h+PHA	45,X,-X,dmin[45] 45,X,-X,dmin[66]/52,XX,del(4)(q?),-18,+20,+6r [1]/46,XX[56]	45/45 (100%) 66/123 (54%)
Kontrolle nach TAD/ Induktion	12/96	KM/D KM/24h, 48h PB/24h, 48h	45,XX,-r.l.[2]/42,XX,-r.l.[2]/46,XX[16] 45,XX,-13[1]/46,XX[39] 45,XX,-19[1]/46,XX[10]	0/20 (0%) 0/40 (0%) 0/11 (0%)
		KM/D KM/24h, 48h	45,XX,-19[1]/44,XX,-14,-15[1]/46,XX[18] 45,XX,-r.l.[2]/46,XX[38]	0/20 (0%) 0/40 (0%)
1. Rezidiv	10/97	—	Kein Material verfügbar	—
Kontrolle nach ICE; CR	11/97	KM/24h, 48h	44,X,-X,-12[1]/46,XX[7] ^a	0/8 (0%)
2. Rezidiv	05/98	KM/24h, 48h	45,X,-X,6~174dmin[48]/44,X,-X,-r.l.,dmin[2]	50/50 (100%)
3. Rezidiv	11/98	PB/24h, 72h	45,X,-X,dmin[26]/44,X,-X,-r.l.,dmin [3]/ 45-46,X,-X,var.mar,dmin[5] ^b / 42-43,X,-X,-r.l.,var.mar,dmin[3] ^b	37/37 (100%)

Abkürzungen: s. Abkürzungsverzeichnis

^a aufgrund einer KM-Aplasie waren nicht mehr Metaphasen verfügbar

^b Karyotyp der Metaphasen mit Markerchromosomen s. Tabelle 4

Tabelle 4: Karyotypen der Metaphasen mit Markerchromosomen beim 3. Rezidiv

Metaphase Nr.	Karyotyp
1	46,X,-X,del(11)(p?11.1),add(21)(p?11.1),+mar,dmin
2	43,X,-X,dic(3;8)(p?26;q24.3),-11,dmin
3	43,X,-X,dic(6;11)(p25;p11.1),-17,dmin
4	45,X,-X,der(1)t(1;14)(p11;q11.1),dic(3;9)(p11;q?),-14,+2mar,dmin
5	45,X,-X,t(7;11)(p15;q23),dmin
6	45,X,-X,t(9;9)(q22;q34),dmin
7	45,X,-X,-15,+mar,dmin
8	42,X,-X,-6,der(7)t(7;13)(p22;q11),del(12)(p11.1),-20,-22,dmin

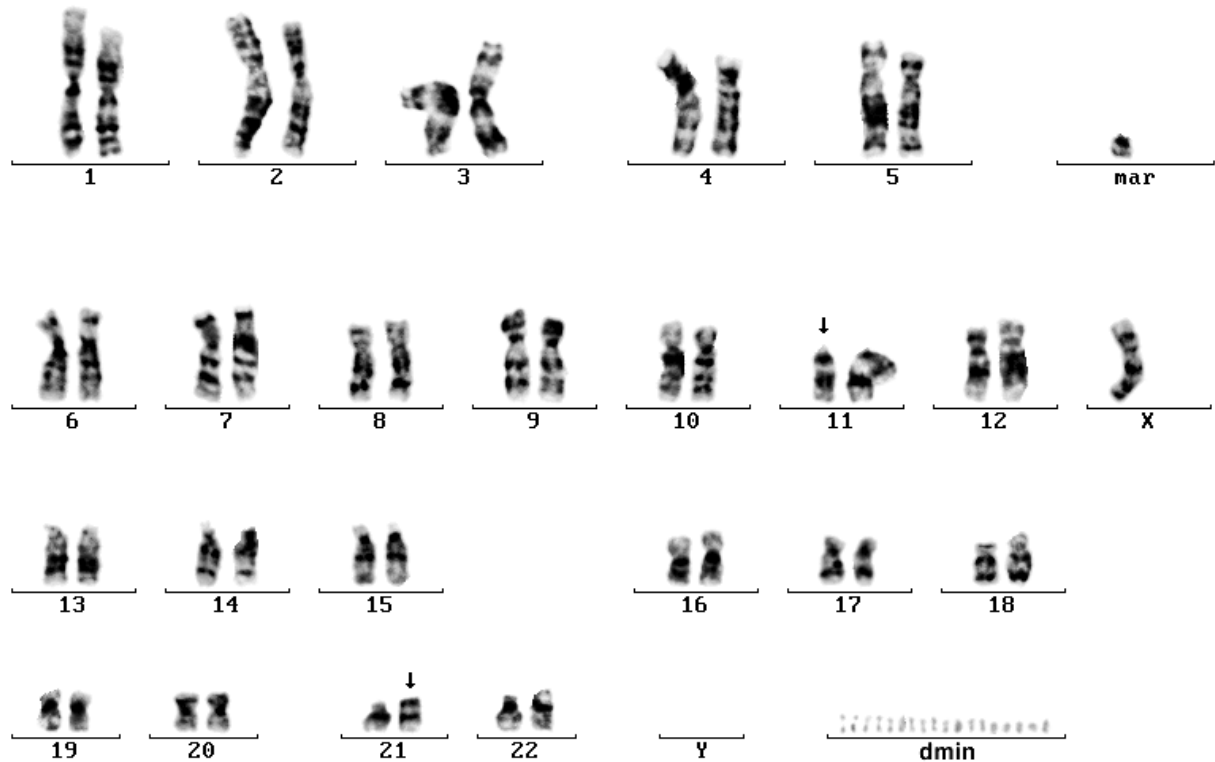


Abb. 6: Karyogramm einer Metaphase mit Markerchromosomen aus dem PB des dritten Rezidivs (G-Bänderung). Karyotyp: 46,X,-X,del(11)(p?11.1),add(21)(p?11.1),+mar,dmin. Die aberranten Chromosomen 11 und 21 sind im Karyogramm mit Pfeilen gekennzeichnet.

A.2.2) Double Minute-Anzahl pro Metaphase

Die Dmin-Anzahl wurde in Metaphasen aus dem KM der Erstdiagnose und des zweiten Rezidivs bestimmt. Form und Größe der Dmin waren in den meisten ausgewerteten Metaphasen homogen. Einzelne Zellen wiesen jedoch Dmin von unterschiedlicher Größe auf (s. Abb. 7).



Abb. 7: Hypodiploide Metaphase aus dem KM der Erstdiagnose (Giemsa-Färbung). Zwischen den Chromosomen liegen zahlreiche Dmin von unterschiedlicher Größe.

In 52 KM-Metaphasen aus der Direktpräparation der Erstdiagnose lag die Dmin-Anzahl zwischen 6 und 266. 50% der Metaphasen enthielten 10-39 Dmin. Die übrigen Metaphasen wiesen überwiegend eine höhere Dmin-Anzahl auf, die in 11.5% der Metaphasen >100 erreichte (s. Abb. 8). Vergleichbare Dmin-Anzahlen traten auch in 50 KM-Metaphasen des zweiten Rezidivs auf. Die Dmin-Anzahl schwankte in diesen Metaphasen zwischen 6 und 284. 46% der Metaphasen enthielten 10-39 Dmin und 14% wiesen >100 Dmin auf (s. Abb. 8). Die Häufigkeiten der Metaphasen mit einer bestimmten Dmin-Anzahl zeigten bei Erstdiagnose und zweitem Rezidiv keinen statistisch signifikanten Unterschied.

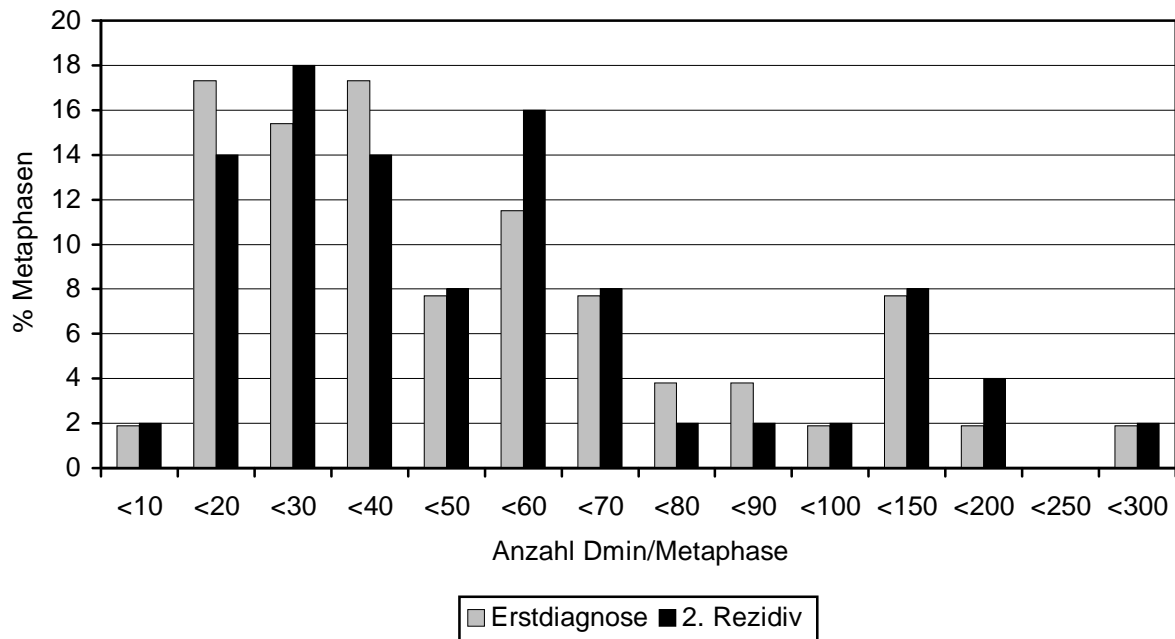


Abb. 8: Dmin-Anzahl in KM-Metaphasen der Erstdiagnose und des zweiten Rezidivs.

A.3) Chromosomale Herkunft der amplifizierten Gensequenzen

Die Ermittlung der chromosomalen Herkunft der in den Dmin amplifizierten Sequenzen erfolgte durch Comparative Genomische Hybridisierung (CGH). Als Test-DNA wurde DNA aus den mononukleären KM-Zellen der Erstdiagnose und als Referenz-DNA DNA aus den mononukleären PB-Zellen eines gesunden weiblichen Spenders eingesetzt. Die Verwendung von weiblicher Referenz-DNA in der CGH ermöglichte aufgrund des #X-Verlustes in den Leukämiezellen (s. A.2.1) eine zusätzliche Hybridisierungskontrolle. Zur Überprüfung der Methode wurde ein CGH-Kontrollansatz mit der Referenz-DNA durchgeführt.

Sowohl Profilauswertung als auch visuelle Inspektion der CGH-Metaphasen ergaben eine starke Überrepräsentation von Sequenzen aus 8q24 im Genom der Leukämiezellen (s. Abb. 9 und 10). Dies ließ auf eine Amplifikation dieser Sequenzen in Form der Dmin in den Leukämiezellen schließen. Der cytogenetisch ermittelte #X-Verlust der Leukämiezellen wurde durch die CGH ebenfalls detektiert.

Der CGH-Kontrollansatz zeigte dagegen keine Kopienanzahlzugewinne oder -verluste an. Die Profillinien der einzelnen Chromosomen verliefen alle innerhalb der Profilschwellen (s. Abb. 11). Dies wies auf eine homogene Hybridisierung von Test- und Referenz-DNA und eine gleichmäßige Fluoreszenzintensität der verwendeten roten und grünen Fluoreszenzfarbstoffe hin.

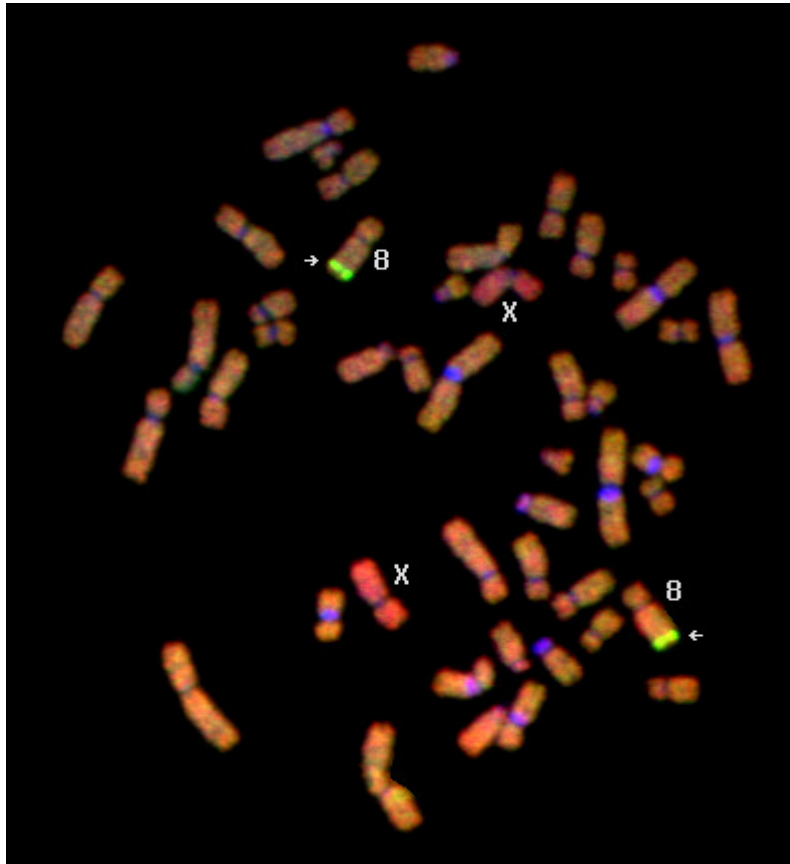


Abb. 9: Metaphase nach CGH mit Test-DNA aus dem KM der Erstdiagnose und Referenz-DNA aus dem PB eines gesunden weiblichen Spenders. Ein hoher Kopienanzahlzugewinn ist anhand der nach Grün verschobenen Fluoreszenz in der Bande 8q24 (Pfeil) erkennbar. Der #X-Verlust der Leukämiezellen wird durch eine nach Rot verschobene Fluoreszenzfarbe dieses Chromosoms sichtbar. Die chromosomalen Regionen mit gleicher Kopienanzahl in Test- und Referenz-DNA zeigen eine Mischfarbe aus grüner und roter Fluoreszenz. In den Regionen mit einem hohen Anteil an repetitiven Sequenzen (Centromerregionen und Heterochromatinblöcke in 1q, 9q und 16q) ist die Hybridisierung aufgrund der zugesetzten unmarkierten Cot1-DNA blockiert, so dass nur die DAPI-Fluoreszenz der Gegenfärbung (blau) sichtbar ist.

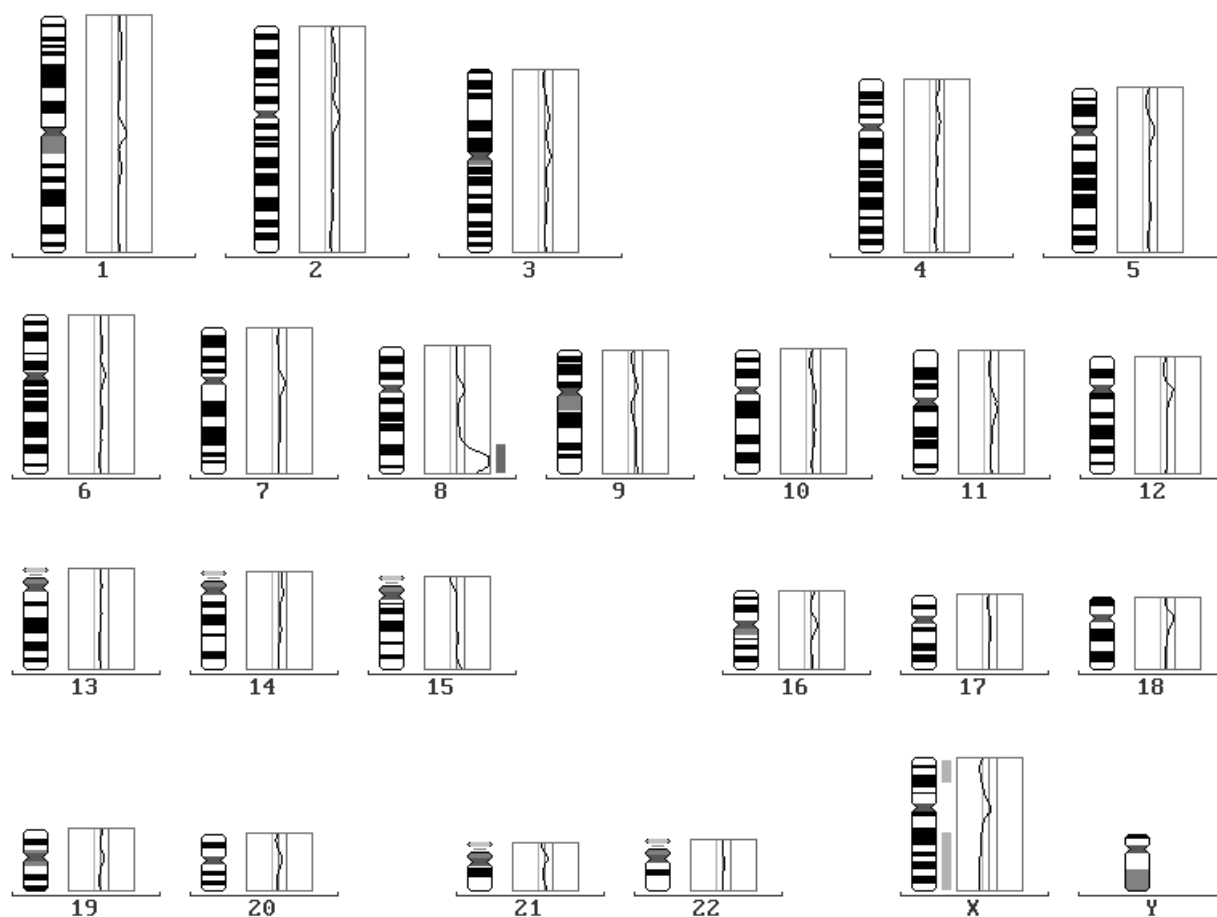


Abb. 10: CGH-Mittelprofil von 6 ausgewerteten Metaphasen des CGH-Ansatzes des AML-Falls mit Haptenmarkierung. Als Schwellenwerte wurden 0.75 für die untere und 1.25 für die obere Schwelle verwendet. Die Profilauswertung zeigt eine Sequenzamplifikation in 8q24 (Balken auf rechter Seite des Chromosomenprofils) und einen Kopienanzahlverlust von #X (Balken auf linker Seite des Chromosomenprofils) im Genom der Leukämiezellen an.

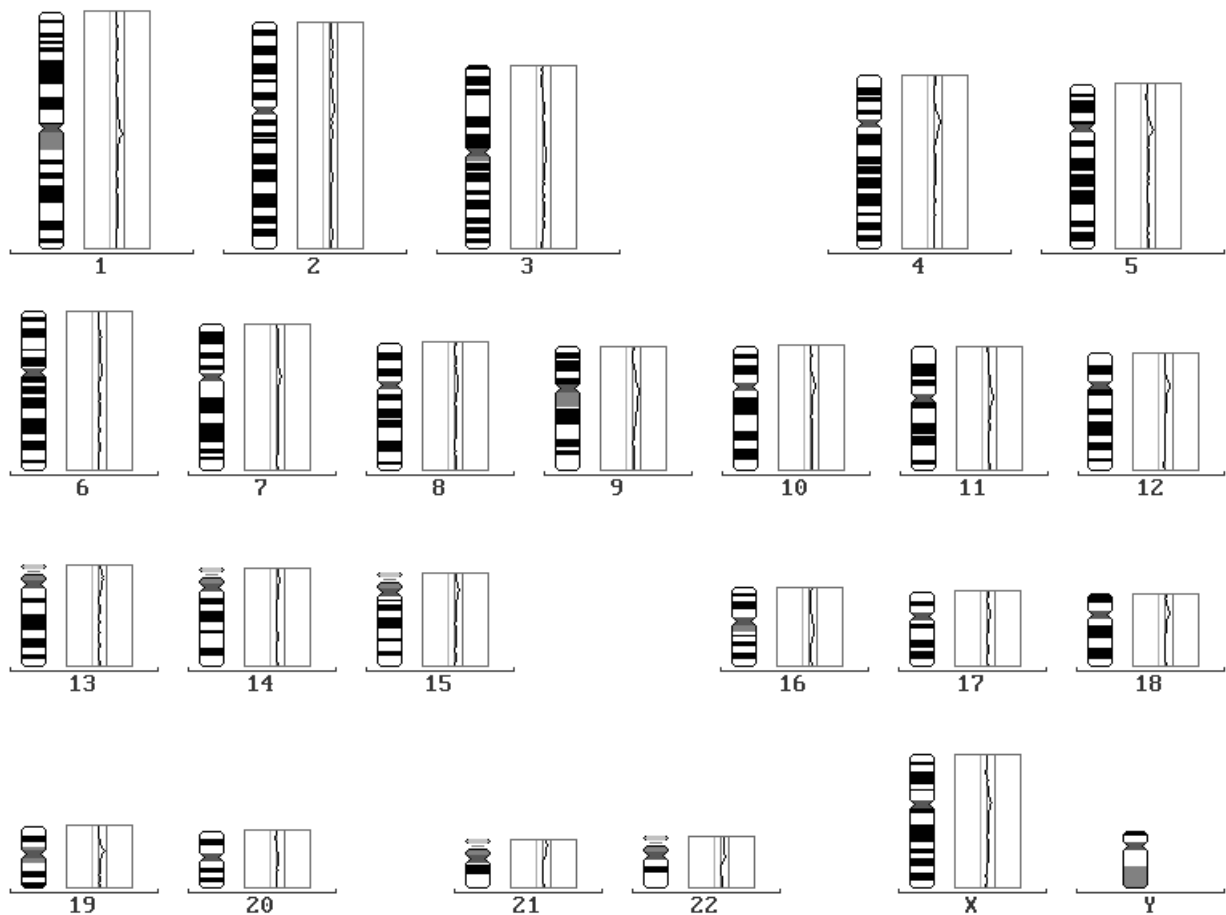


Abb. 11: CGH-Mittelprofil von 13 ausgewerteten Metaphasen des CGH-Kontrollansatzes mit der haptenmarkierten Referenz-DNA aus dem CGH-Ansatz des AML-Falls. Als Schwellenwerte wurden 0.75 für die untere und 1.25 für die obere Schwelle verwendet. Die Profillinien der Chromosomen überschreiten die Schwellen nicht und zeigen damit eine balancierte Kopienanzahl der genetischen Sequenzen an. Die verwendeten Schwellenwerte können daher als geeignet zur Detektion spezifischer Kopienanzahlunterschiede angesehen werden.

A.4) Nachweis der amplifizierten Gensequenz

Der durch CGH ermittelte starke Zugewinn von Sequenzen aus 8q24 im Leukämiezellgenom wies auf eine Amplifikation des in dieser Region lokalisierten Protoonkogens *MYC* (Neel et al. 1982; Dalla-Favera et al. 1982) hin. Daher wurde eine Fluoreszenz-in situ Hybridisierung (FISH) mit einer für das humane *MYC* spezifischen Sonde auf die Metaphasen der Leukämiezellen durchgeführt.

Die Spezifität der *MYC*-Sonde wurde zunächst durch FISH auf Metaphasen mit normalem Karyotyp (46,XY) überprüft. In allen 18 ausgewerteten Metaphasen lagen jeweils zwei Chromosomen vor, die ein Signal der *MYC*-Sonde auf beiden Chromatiden aufwiesen und anhand ihres DAPI-Bandenmusters als #8 identifiziert wurden (s. Tab. 5 und Abb. 12). Die *MYC*-Sonde zeigte auf den 36 untersuchten #8 eine Lokalisation in 8q24 und wurde daher unter den vorliegenden Hybridisierungsbedingungen als spezifisch für den *MYC*-Locus angesehen.

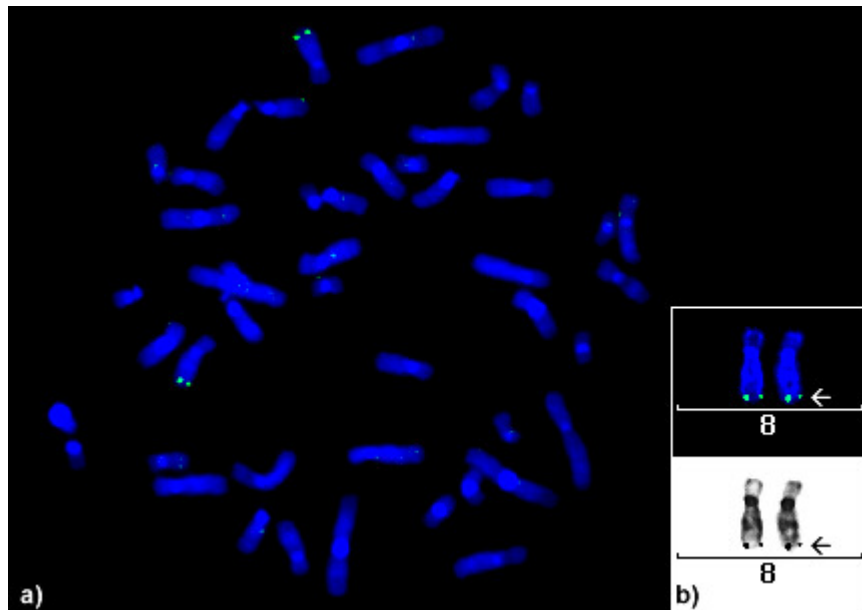


Abb. 12: FISH mit einer humanen *MYC*-Sonde auf eine Metaphase mit normalem männlichen Karyotyp (46,XY) (a). Zwei Chromosomen mit Signal (grün) können anhand des Bandenmusters der DAPI-AMG-Gegenfärbung als #8 identifiziert und die Sondenbindungsstelle auf 8q24 (Pfeil) lokalisiert werden (b).

Nach FISH mit der *MYC*-Sonde auf Metaphasen aus KM und PB der Erstdiagnose waren alle enthaltenen Dmin durch ein Fluoreszenzsignal der *MYC*-Sonde markiert (s. Tab. 5 und Abb. 13). Dies bestätigte, dass eine extrachromosomale Amplifikation dieses Protoonkogens in den Leukämiezellen vorlag. Die Auswertung der intrachromosomal lokalisierten Signale der *MYC*-Sonde erfolgte in Metaphasen, in denen die Chromosomen nicht durch Dmin verdeckt wurden. In den 21 ausgewerteten KM-Metaphasen der Erstdiagnose (Karyotyp: 45,X,-X,dmin) zeigte jeweils nur eines der beiden vorliegenden #8 ein Signal der *MYC*-Sonde (s. Tab. 5 und Abb. 13). Da bei FISH mit der *MYC*-Sonde auf Metaphasen mit normalem Karyotyp jeweils zwei #8 ein Signal aufwiesen (s.o.), war ein falsch negatives FISH-Ergebnis auf einem der beiden #8 in den Leukämiezellmetaphasen unwahrscheinlich. Das Hybridisierungsergebnis ließ daher auf einen Verlust der *MYC*-Sequenz aus einem #8 in den Leukämiezellen schließen. Der Karyotyp der Leukämiezellen konnte aufgrund des FISH-Ergebnisses ergänzt werden zu:

45,X,-X,dmin.ish del(8)(q24)(MYC-),dmin(MYC+).

Die FISH mit der *MYC*-Sonde auf KM-Metaphasen des zweiten Rezidivs (Karyotyp: 45,X,-X,dmin) ergab, dass die Leukämiezellen die gleichen chromosomalen Veränderungen wie bei der Erstdiagnose zeigten.

Tabelle 5: Lokalisation der *MYC*-Sonde in Metaphasen der Leukämiezellen und Metaphasen mit normalem Karyotyp

Gewebe	Σ ausgewertete Meta.	Σ Meta. mit dmin(MYC+)	Σ Meta. mit 2x #8(MYC+)	Σ Meta. mit 1x #8(MYC+) + 1x #8(MYC-)
KM / Erstdiagnose	21	21	0	21
PB / Erstdiagnose	4	4	0	4
KM / 2. Rezidiv	7	7	0	7
Metaphasen mit normalem Karyotyp (46,XY)	18	0	18	0

Meta. = Metaphasen

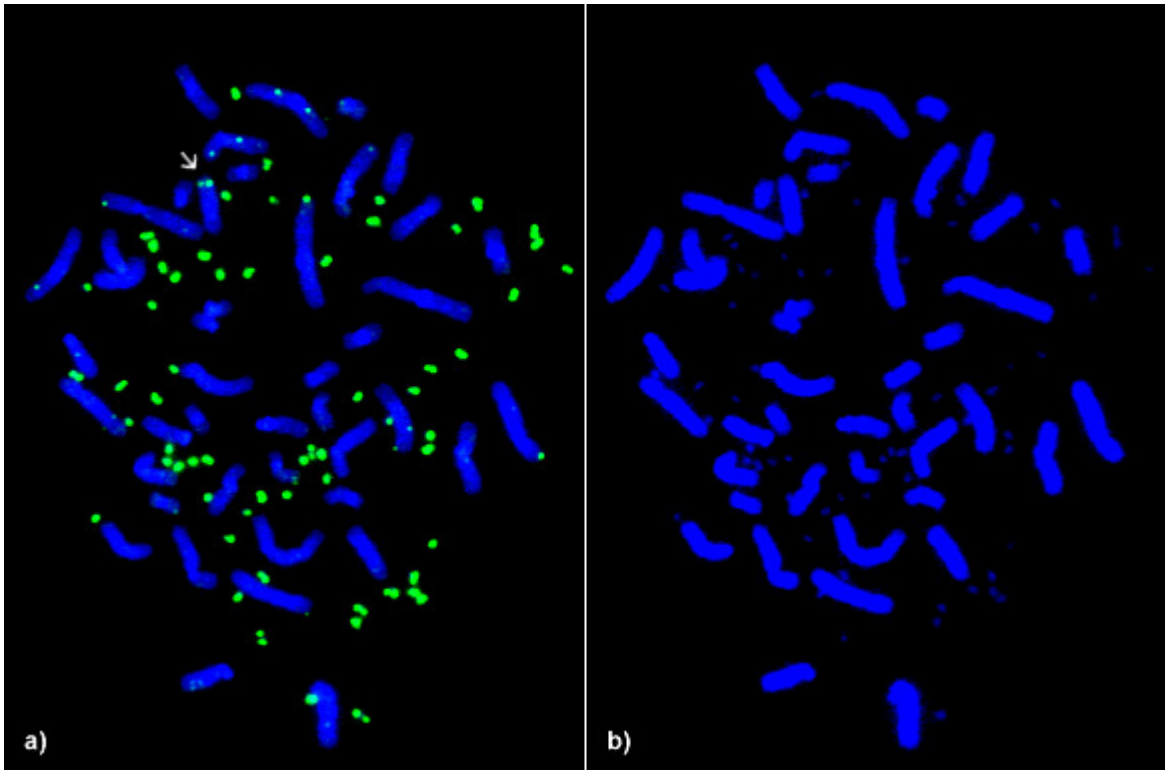


Abb. 13: FISH mit einer humanen *MYC*-Sonde auf eine KM-Metaphase der Erstdiagnose des AML-Falls (a). Alle Dmin und ein #8 (Pfeil) zeigen *MYC*-Signale (grün). Die im Vergleich zum chromosomalen Signal intensiveren Dmin-Signale deuten auf das Vorliegen von mehr als einer Kopie der *MYC*-Sequenz in den Dmin hin. b) zeigt dieselbe Metaphase in DAPI-Färbung.

A.5) Double Minute-Morphologie in der G1-Phase der Interphase

Zur Visualisierung der Dmin in der Interphase wurde eine prämaturre Chromosomenkondensation in den KM-Zellen der Erstdiagnose durch Fusion mit mitotischen Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zellen induziert. Die Identifizierung der Dmin in den entstandenen Hybridzellen erfolgte durch FISH mit einer humanen *MYC*-Sonde (s. A.4).

Alle 36 ausgewerteten Hybridzellen zeigten vorzeitig kondensierte Chromosomen (Prematurely Condensed Chromosomes, PCC) mit nur einer Chromatide, die daher der G1-Phase zugeordnet werden konnten. Die PCC zeigten unterschiedliche Kondensationsgrade und waren in den meisten Hybridzellen so eng zusammengelagert, dass ihre Anzahl nicht bestimmt werden konnte.

In 11 Hybridzellen war auf jeweils einem der vorliegenden PCC ein einzelnes, terminal gelegenes Fluoreszenzsignal der *MYC*-Sonde erkennbar (s. Abb. 15). Dies bestätigte das Vorliegen von Ein-Chromatid-PCC und stimmte mit der in den Leukämiezellen detektierten Deletion einer *MYC*-Kopie aus einem #8 (s. A.4) überein. In den übrigen Hybridzellen konnte die *MYC*-Sonde nicht eindeutig auf den PCC lokalisiert werden. Die CHO-Chromosomen zeigten keine Signale der *MYC*-Sonde und bestätigten damit die Spezifität der verwendeten Sonde für humane Sequenzen.

Extrachromosomale Elemente traten in den Hybridzellen in Form von Single oder Double Minutes (Smin oder Dmin) auf. Da diese Minutes immer ein Signal der *MYC*-Sonde aufwiesen (s. Abb. 15), dienten sie bei der PCC-Analyse als Marker für Hybridzellen, die durch Fusion der Leukämiezellen mit mitotischen

CHO-Zellen entstanden waren. Eine Verwechslung mit Hybridzellen aus der Fusion zweier CHO-Zellen konnte dadurch ausgeschlossen werden.

Die Auszählung der Smin und Dmin in den 36 ausgewerteten Hybridzellen ergab, dass bis auf eine Ausnahme alle Hybridzellen wesentlich mehr Smin als Dmin enthielten. Pro Hybridzelle wurden zwischen 7 und 143 Smin und zwischen 0 und 39 Dmin gezählt (s. Abb. 14).

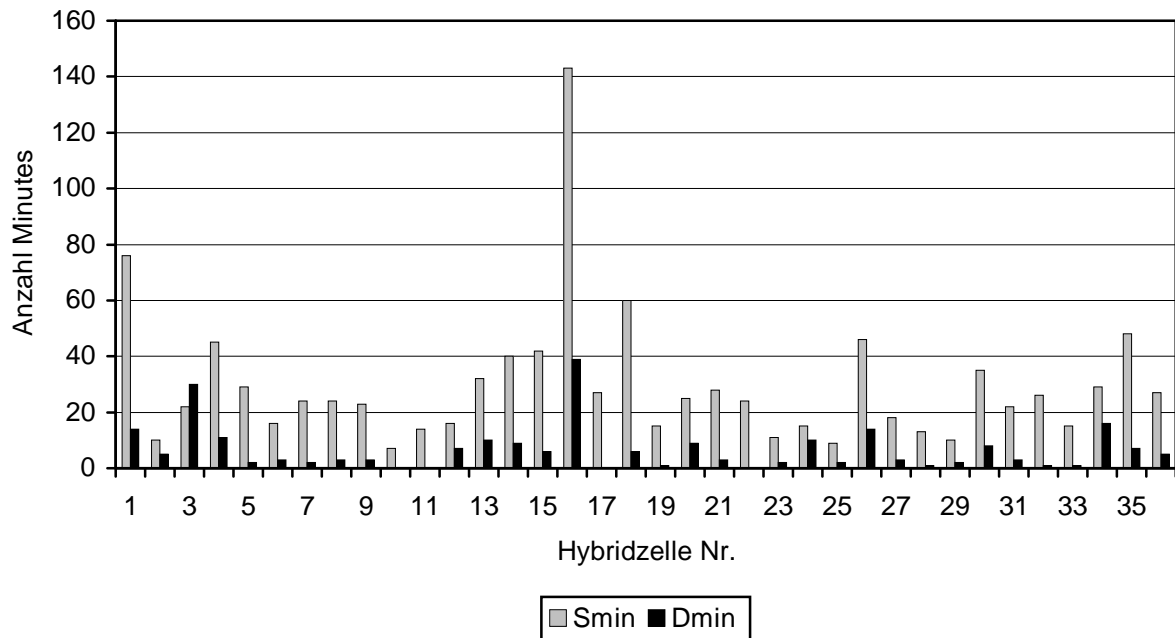


Abb. 14: Anzahl an Single und Double Minutes (Smin und Dmin) in Hybridzellen, die durch Fusion von KM-Zellen der Erstdiagnose mit mitotischen CHO-Zellen entstanden sind. Smin und Dmin waren in den Hybridzellen durch das Fluoreszenzsignal einer humanen *MYC*-Sonde markiert.

Die Smin- und Dmin-Anzahlen der Hybridzellen zeigten eine positive Korrelation ($r=0.74$; r ist signifikant mit $\alpha=0.1\%$), d.h. Hybridzellen mit hoher Smin-Anzahl enthielten auch eine hohe Dmin-Anzahl. Dabei war die Anzahl der Smin hochsignifikant höher als die der Dmin.

Der prozentuale Anteil der Smin an der Gesamtanzahl aller extrachromosomalen Elemente der Hybridzellen betrug 82% gegenüber 18% Dmin. Dies entsprach einem Verhältnis von Smin zu Dmin von 4.5 :1 (s. Tab. 6). Auch unter Berücksichtigung von präparationsbedingten Artefakten war ein Dominieren von Smin in den Hybridzellen festzustellen. Dies wies darauf hin, dass in den untersuchten Leukämiezellen offensichtlich nur ein Teil der Dmin während des gesamten Zellzyklus in gepaarter Form erhalten blieb und der restliche Teil zumindest während einzelner Zellzyklusphasen als Smin vorlag.

Tabelle 6: Single und Double Minutes in den Hybridzellen aus der Fusion von KM-Zellen der Erstdiagnose mit mitotischen CHO-Zellen

PCC-Phase	Σ Zellen	Σ Zellen +Smin +Dmin	Σ Zellen +Smin	Σ Zellen +Dmin	Σ Smin gesamt	Σ Dmin gesamt	Σ Smin+ Σ Dmin	Σ Smin/ Σ Dmin
G1	36	32	4	0	1066 82%	238 18%	1304 100%	4.5

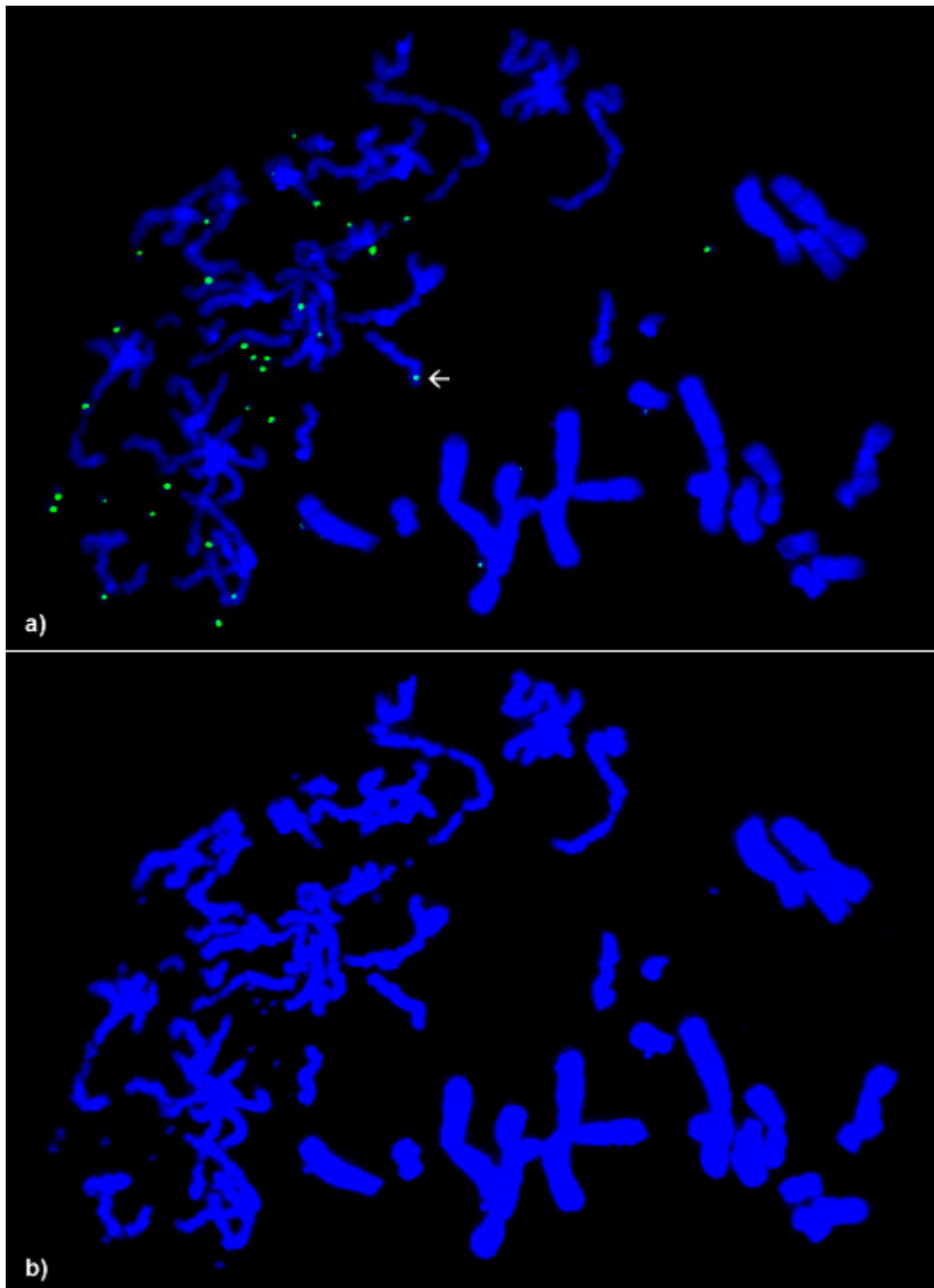


Abb. 15: FISH mit einer humanen *MYC*-Sonde auf eine Hybridzelle, die durch Fusion einer KM-Zelle der Erstdiagnose mit einer mitotischen CHO-Zelle entstanden ist (a). Die fadenförmig erscheinenden PCC der KM-Zelle (links oben) bestehen aus jeweils einer Chromatide und können daher der G1-Phase der Interphase zugeordnet werden. Eines der PCC zeigt ein Signal der *MYC*-Sonde im terminalen Bereich (grün; Pfeil). Die extrachromosomalen Elemente der KM-Zelle liegen überwiegend als Smin vor und weisen alle ein Signal der *MYC*-Sonde (grün) auf. Die größeren mitotischen CHO-Chromosomen (rechts unten) zeigen keine Hybridisierung mit der *MYC*-Sonde. b) zeigt dieselbe Zelle in DAPI-Färbung.

B) Induktion einer Genamplifikation bei HeLa-Zellen

Die experimentelle Induktion einer Genamplifikation erfolgt durch Selektion einer Tumorzelllinie mit einer spezifischen Substanz unter definierten Bedingungen (s. Einleitung, B.2.2). Dies ermöglicht es, den gesamten Entwicklungsprozess einer Genamplifikation bis zur cytogenetischen Manifestation in Form von Dmin oder HSRs zu verfolgen. Im Gegensatz dazu kann in Tumorzellgewebe nur eine bereits bestehende Genamplifikation untersucht werden (s. A), so dass Rückschlüsse über die Prozesse, die zur Entstehung der Genamplifikation geführt haben, i.d.R. nicht möglich sind. Da die frühen Stadien der Amplifikationsentwicklung jedoch für die Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen von besonderer Bedeutung sind, wird die experimentelle Genamplifikationsinduktion häufig als ein Modellsystem zum Studium der Entwicklung von Genamplifikationen in Tumorzellen eingesetzt (Coquelle et al. 1997; Ma et al. 1993; Windle et al. 1991).

In dieser Arbeit wurden die Veränderungen auf chromosomaler Ebene, die im Verlauf einer Methotrexat (MTX)-induzierten Amplifikation des DHFR-Gens in der humanen Cervixcarcinomzelllinie HeLa S3 auftraten, untersucht.

B.1) Schema der Selektionen mit Methotrexat

Zwei Mehrschrittselektionen mit MTX (Selektion 1 und Selektion 2) wurden parallel nebeneinander an zwei HeLa-Zellkulturen, die beide aus der gleichen Kultur der Parentallinie angelegt wurden, durchgeführt. Die einzelnen Selektionsschritte erfolgten bei beiden Selektionen mit den gleichen MTX-Konzentrationen (s. Abb. 16). Dabei konnte die Substanzkonzentration unter Berücksichtigung des Wachstumsverhaltens der vorliegenden Zellpopulation bei einem neuen Selektionsschritt i.d.R. verdoppelt werden. Durch jeden Selektionsschritt wurde eine neue Sublinie (MTX-Sublinie) erzeugt, die bei der jeweils verwendeten MTX-Konzentration proliferationsfähig war und die Ausgangszellen für den nächsten Selektionsschritt lieferte. Alle Selektionsschritte wurden an Subkulturen aus Zellen des vorangegangenen Selektionsschrittes mit einer konstanten Zellzahl von 5×10^5 Zellen gestartet.

Die im Verlauf von Selektion 1 erzeugten Sublinien wurden zusammenfassend als HeLa-1-MTX-Sublinien und die Sublinien aus Selektion 2 als HeLa-2-MTX-Sublinien bezeichnet.

Die Bezeichnung der einzelnen MTX-Sublinien erfolgte nach folgendem Schema:

[HeLa] - [Nr. Selektion] - [MTX] - [Substanzkonzentration, mit der die Sublinie selektioniert wurde].

So bezeichnet z.B. HeLa-1-MTX-0.25 eine Sublinie aus Selektion 1, die durch Selektion mit $0.25 \mu\text{M}$ MTX erzeugt wurde.

Während der beiden Selektionen war die Dauer eines Selektionsschrittes mit einer bestimmten MTX-Konzentration von dem Wachstumsverhalten der jeweils MTX-exponierten HeLa-Kultur abhängig. Bei den ersten vier Selektionsschritten unterschieden sich die HeLa-1- und HeLa-2-MTX-Sublinien in der pro Schritt benötigten Selektionsdauer nicht (s. Abb. 16). Danach erforderten die Selektionen in 0.25 und $0.50 \mu\text{M}$ MTX bei den HeLa-2-MTX-Sublinien einen längeren Zeitraum als bei den HeLa-1-MTX-Sublinien. Der Selektionsschritt in $1.0 \mu\text{M}$ MTX verlief dagegen bei Selektion 2 schneller als bei Selektion 1. Beide Selektionen wurden zunächst bei $1.0 \mu\text{M}$ MTX beendet. In einer später durchgeführten, zusätzlichen Selektion

tion wurde aus der Sublinie HeLa-2-MTX-0.50 zu Vergleichszwecken eine weitere Sublinie, HeLa-2-MTX-10.0, erzeugt. Die Sublinien, die dabei aus den Selektionsschritten zwischen 0.50 und 10.0 μM MTX resultierten, wurden cytogenetisch nicht untersucht und sind daher in Abb. 16 nicht näher bezeichnet. Die HeLa-1- und HeLa-2-MTX-Sublinien sowie die zusätzlich erzeugte Sublinie HeLa-2-MTX-10.0 werden nachfolgend unter der Bezeichnung 'HeLa-MTX-Sublinien' zusammengefasst.

Selektion 1	MTX-Selektionsschritte	Selektion 2
HeLa-Parentallinie	0 μM	HeLa-Parentallinie
↓ 6d	Selektionsstart: 0.03 μM /1	↓ 6d
HeLa-1-MTX-0.03/1		HeLa-2-MTX-0.03/1
↓ 8d	0.03 μM /2	↓ 8d
HeLa-1-MTX-0.03/2		HeLa-2-MTX-0.03/2
↓ 13d	0.06 μM	↓ 13d
HeLa-1-MTX-0.06		HeLa-2-MTX-0.06
↓ 16d	0.12 μM	↓ 16d
HeLa-1-MTX-0.12		HeLa-2-MTX-0.12
↓ 19d	0.25 μM	↓ 29d
HeLa-1-MTX-0.25		HeLa-2-MTX-0.25
↓ 14d	0.50 μM	↓ 18d
HeLa-1-MTX-0.50		HeLa-2-MTX-0.50
↓ 22d	1.0 μM	↓ 13d
HeLa-1-MTX-1.0 (Σ 99d)	Selektionsende	HeLa-2-MTX-1.0 (Σ 104d)
		zusätzliche Selektion
		HeLa-2-MTX-0.50
	Selektionsstart: 0.50 μM	↓ 7d
	1.0 μM	↓ 8d
	2.0 μM	↓ 7d
	10.0 μM	↓ 39d
	Selektionsende	HeLa-2-MTX-10.0 (Σ 61d)

Abb. 16: Abfolge der Selektionsschritte bei den MTX-Selektionen an HeLa-Zellen. Für jeden Selektionsschritt sind die eingesetzte MTX-Konzentration, die Dauer in Tagen (d) sowie der Name der jeweils erzeugten Sublinie angegeben. Die Sublinien aus den Selektionen 1 und 2 wurden entsprechend der Selektionsnummer als HeLa-1-MTX-Sublinien bzw. HeLa-2-MTX-Sublinien bezeichnet. Zusammen mit der zusätzlich selektierten Sublinie HeLa-2-MTX-10.0 bildeten sie die HeLa-MTX-Sublinien.

B.2) Generationszeiten und -zahlen der HeLa-MTX-Sublinien

Der Gesamtverlauf der MTX-Selektionen zeigt, dass die Generationszeiten sowohl bei den HeLa-1- als auch bei den HeLa-2-MTX-Sublinien mit ansteigenden Substanzkonzentrationen zunehmen (s. Abb. 17). Während der einzelnen Selektionsschritte war bei den jeweiligen HeLa-1- und HeLa-2-MTX-Sublinien nach MTX-Zugabe meist eine verzögert einsetzende Proliferation zu beobachten. Mit steigenden MTX-Konzentrationen benötigten die Zellpopulationen eine zunehmend längere Zeit bis zum Erreichen der für

die nächste Subkultivierung bzw. den nächsten Selektionsschritt notwendigen Konfluenz. Der Anteil an abgestorbenen Zellen nahm jedoch auch bei den letzten Selektionsschritten in höheren MTX-Konzentrationen nicht auffällig zu.

Im Vergleich zur Parentallinie mit einer durchschnittlichen Generationszeit von 30 h (in Vorversuchen ermittelt) wiesen die HeLa-1- und HeLa-2-MTX-Sublinien aus den ersten beiden Selektionsschritten nur leicht erhöhte Generationszeiten auf (s. Abb. 17). Ab dem dritten Selektionsschritt in 0.06 μM MTX stiegen die Generationszeiten bei allen selektionierten Sublinien auf mindestens den doppelten Wert der Parentallinie an. Der Maximalwert wurde sowohl bei den HeLa-1- als auch bei den HeLa-2-MTX-Sublinien bei dem Selektionsschritt in 0.25 μM MTX erreicht (HeLa-1-MTX-0.25: 91 h; HeLa-2-MTX-0.25: 180 h). Bei der nachfolgenden Selektion in 0.50 μM MTX sanken die Generationszeiten der entsprechenden MTX-Sublinien trotz höherer Substanzkonzentration wieder ab. Die MTX-Sublinien aus dem letzten Selektionsschritt in 1.0 μM MTX zeigten dennoch Generationszeiten, die gegenüber dem Wert der Parentallinie um etwa das Dreifache erhöht waren (HeLa-1-MTX-1.0: 92 h; HeLa-2-MTX-1.0: 81 h).

Diese Beobachtungen weisen auf einen proliferationshemmenden Effekt von MTX auf die HeLa-Zellen hin, der durch eine Verlangsamung des Zellzyklus der Zellen oder durch eine Abnahme des Anteils der teilungsaktiven Zellen in den HeLa-Kulturen bedingt sein kann.

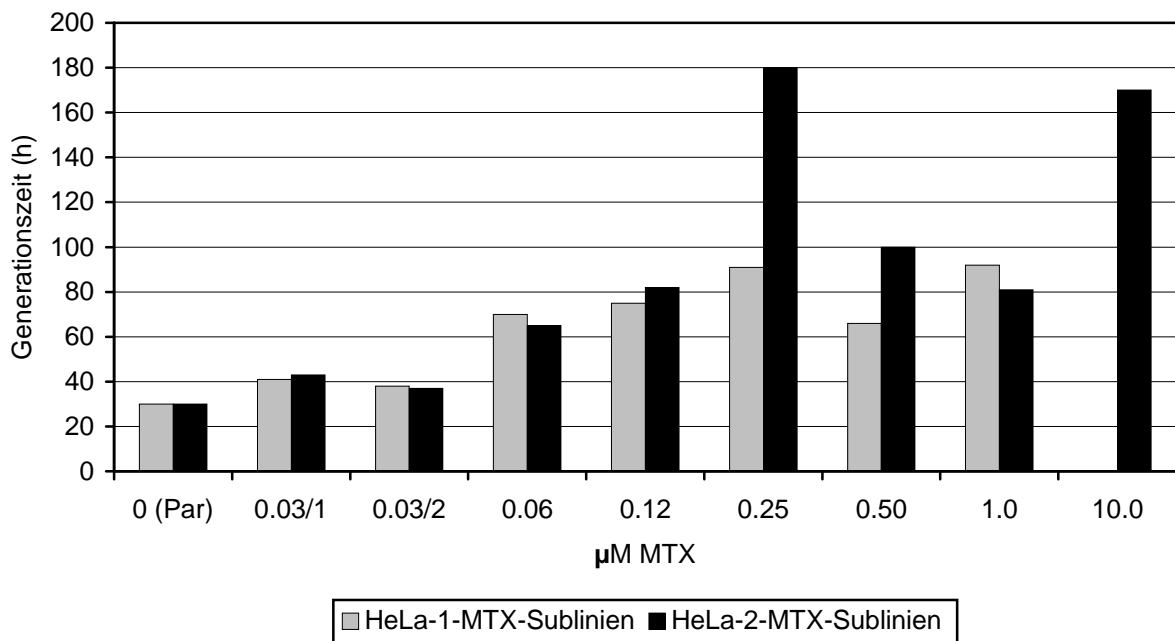


Abb. 17: Generationszeiten der HeLa-MTX-Sublinien nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen. Par = Parentallinie

Die Generationszahl lag bei den HeLa-1- und HeLa-2-MTX-Sublinien bei allen Selektionsschritten im Durchschnitt zwischen 4 und 5 Zellgenerationen (Minimalwert = 3.9 bei den Sublinien HeLa-2-MTX-0.25 und HeLa-2-MTX-1.0; Maximalwert = 5.7 bei Sublinie HeLa-1-MTX-1.0), so dass auf eine Zellproliferation während jedes Selektionsschrittes geschlossen werden kann. Die Zeit, in der diese Generationszahl erreicht wurde, nahm mit ansteigender MTX-Konzentration bei den HeLa-1- und HeLa-2-MTX-Sublinien, entsprechend der Entwicklung der Generationszeit, zu.

B.3) Chromosomenanzahl pro Metaphase in den HeLa-MTX-Sublinien

B.3.1) Chromosomenanzahlklassen

Die Chromosomenanzahl/Metaphase wurde bei den HeLa-MTX-Sublinien zur Erfassung von numerischen Chromosomenveränderungen bestimmt. Als Vergleichswerte dienten dabei die Chromosomenanzahlwerte, die bei der HeLa-Parentallinie durch Auszählung von 100 Metaphasen ermittelt wurden.

Die HeLa-Parentallinie enthielt in 97% der ausgewerteten Metaphasen eine variable, hypotriploide Chromosomenanzahl von 63-67 Chromosomen/Metaphase. Daneben lagen je 1% Metaphasen mit 72, 115 und 183 Chromosomen vor (s. Abb. 18, Werte bei 0 μ M MTX). Der Modalwert betrug 66 Chromosomen pro Metaphase (in 58% der Metaphasen). Da die Chromosomenanzahl in den untersuchten Metaphasen der Parentallinie über einen großen Bereich schwankte, wurde eine Einteilung der Chromosomenanzahlen in folgende Klassen vorgenommen (s. Tabelle 7):

Tabelle 7: Chromosomenanzahlklassen und Klassengrenzen

Klasse Nr.	Chromosomenanzahl/Metaphase
1	55 - 62
2	63 - 69 (3n)
3	70 - 138 (6n)
4	139 - 207 (9n)
5	>207

Die Festlegung der Klassengrenzen erfolgte anhand der Chromosomenanzahlen bei der Parentallinie und auf der Basis der triploiden Chromosomenanzahl des humanen Karyotyps mit $3n = 69$ Chromosomen, die der modalen Chromosomenanzahl der HeLa-Zellen am ehesten entspricht. Da im Verlauf der Auswertungen weder bei der Parentallinie noch bei den HeLa-MTX-Sublinien Metaphasen mit weniger als 55 Chromosomen auftraten, wurde diese Chromosomenanzahl als unterste Klassengrenze verwendet.

Chromosomenanzahlveränderungen wurden bei den HeLa-MTX-Sublinien durch eine veränderte Häufigkeitsverteilung der Metaphasen auf die einzelnen Chromosomenanzahlklassen im Vergleich zur Parentallinie erkennbar.

B.3.2) Verteilung auf die Chromosomenanzahlklassen in den HeLa-MTX-Sublinien

Bei Selektion 1 zeigten drei MTX-Sublinien signifikante Unterschiede gegenüber der Parentallinie in der Häufigkeitsverteilung der Metaphasen auf die Chromosomenanzahlklassen (s. Abb. 18). Als erste wies HeLa-1-MTX-0.12 einen leicht erhöhten Anteil von 8% Metaphasen mit 55-62 Chromosomen auf. In der nachfolgenden Sublinie HeLa-1-MTX-0.25 erreichte dieser Metaphasenanteil 18% bei gleichzeitiger Abnahme der Metaphasen mit 63-69 Chromosomen auf 80%. Bei HeLa-1-MTX-0.50 blieb die Metaphasenhäufigkeit in der Klasse mit 63-69 Chromosomen erniedrigt (84%). Parallel dazu lag eine Anteilserhöhung bei den Metaphasen mit 70-138 Chromosomen (auf 10%), jedoch nicht mehr bei den Metaphasen mit 55-62 Chromosomen (4%) vor. Die Häufigkeitsverteilung der letzten selektionierten Sublinie HeLa-1-MTX-1.0 entsprach wieder derjenigen der Parentallinie, so dass die in den vorherigen Sublinien beobachteten Häufigkeitsverschiebungen in den Chromosomenanzahlklassen nicht mehr erkennbar waren.

Die beiden höchsten Chromosomenanzahlklassen mit 139-207 und >207 Chromosomen/Metaphase enthielten bei allen HeLa-1-MTX-Sublinien nur maximal 2% der ausgewerteten Metaphasen und zeigten keine Häufigkeitsunterschiede im Vergleich zur Parentallinie.

Wie bei den HeLa-1-MTX-Sublinien (s.o.) traten auch bei den HeLa-2-MTX-Sublinien signifikante Veränderungen in der Häufigkeitsverteilung der Metaphasen auf die Chromosomenanzahlklassen erstmalig nach dem Selektionsschritt in 0.12 μ M MTX auf (s. Abb. 19). Jedoch lag bei Sublinie HeLa-2-MTX-0.12 im Gegensatz zu HeLa-1-MTX-0.12 ein erhöhter Anteil an Metaphasen mit 70-138 Chromosomen (11%) vor. Gleichzeitig war der Metaphasenanteil mit 63-39 Chromosomen im Vergleich zur Parentallinie um 13% erniedrigt. In den nachfolgenden Sublinien HeLa-2-MTX-0.25 und HeLa-2-MTX-0.50 blieb die Häufigkeit von Metaphasen mit 70-138 Chromosomen unverändert erhöht und sank erst bei HeLa-2-MTX-1.0 und HeLa-2-MTX-10.0 auf einen Wert ab, der sich nicht mehr signifikant von dem der Parentallinie unterschied. Dagegen stieg der Anteil an Metaphasen mit 55-62 Chromosomen in den Sublinien HeLa-2-MTX-0.25 und HeLa-2-MTX-0.50 stark an und erreichte bei HeLa-2-MTX-0.50 einen Maximalwert von 70%. Parallel dazu konnte eine starke Reduktion des Metaphasenanteils mit 63-39 Chromosomen bis auf ein Minimum von 16% bei HeLa-2-MTX-0.50 beobachtet werden. Diese Tendenzen setzten sich bei HeLa-2-MTX-1.0 nicht fort. In dieser Sublinie lag die Metaphasenhäufigkeit in der Klasse mit 55-62 Chromosomen nur noch bei 58% bei gleichzeitiger Zunahme der Metaphasen mit 63-39 Chromosomen auf 34%. Dennoch blieb bei HeLa-2-MTX-1.0, im Gegensatz zur Sublinie HeLa-1-MTX-1.0 aus Selektion 1, ein erheblicher Unterschied in der Häufigkeitsverteilung der Metaphasen gegenüber der Parentallinie bestehen. In der durch eine zusätzliche Selektion (s. B.1) erzeugten Sublinie HeLa-2-MTX-10.0 dominierten die Metaphasen mit 55-62 Chromosomen mit einem Anteil von 88%. Metaphasen mit 63-69 sowie mit 70-138 Chromosomen erreichten nur noch Anteile von jeweils 6%.

Auf die beiden höchsten Chromosomenanzahlklassen mit 139-207 und >207 Chromosomen/Metaphase entfielen maximal 1% der ausgewerteten Metaphasen pro Sublinie, so dass hier bei keiner HeLa-2-MTX-Sublinie ein Häufigkeitsunterschied zur Parentallinie vorlag.

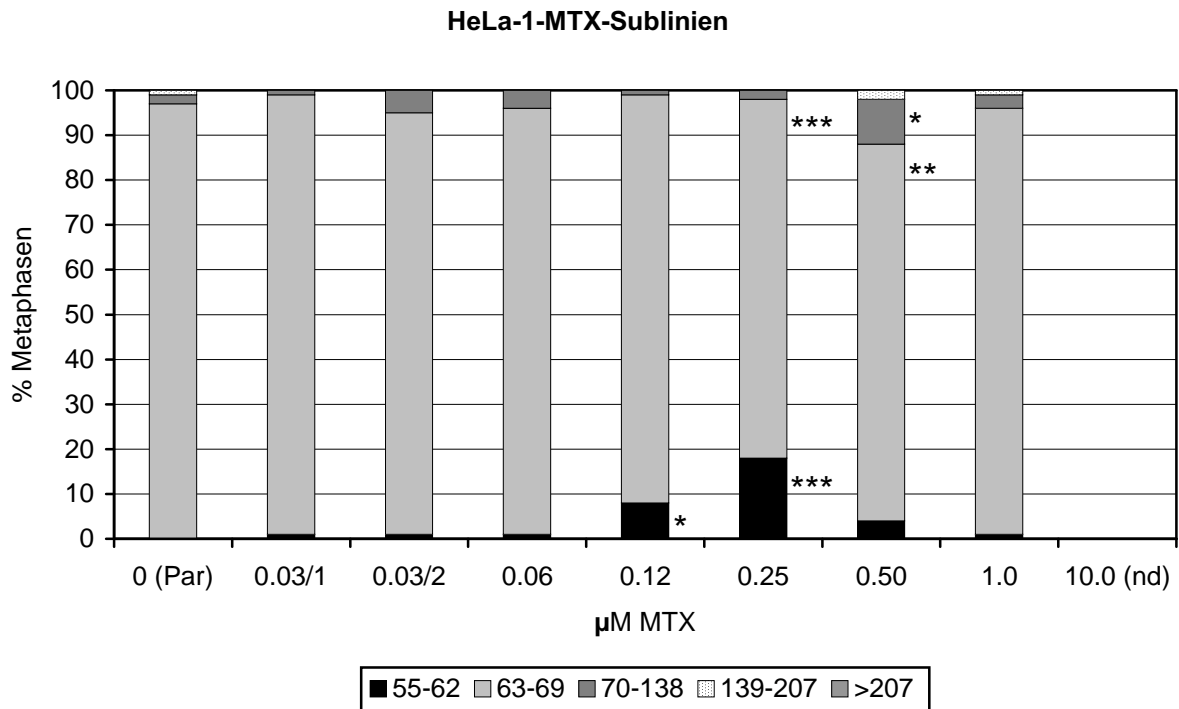


Abb. 18: Häufigkeit von Metaphasen der HeLa-1-MTX-Sublinien in den einzelnen Chromosomenanzahlklassen nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen. Legende: Chromosomenanzahl pro Metaphase für jede Chromosomenanzahlklasse; nd = nicht durchgeführt; Par = Parentallinie; Symbole (*): s. Methoden, J)

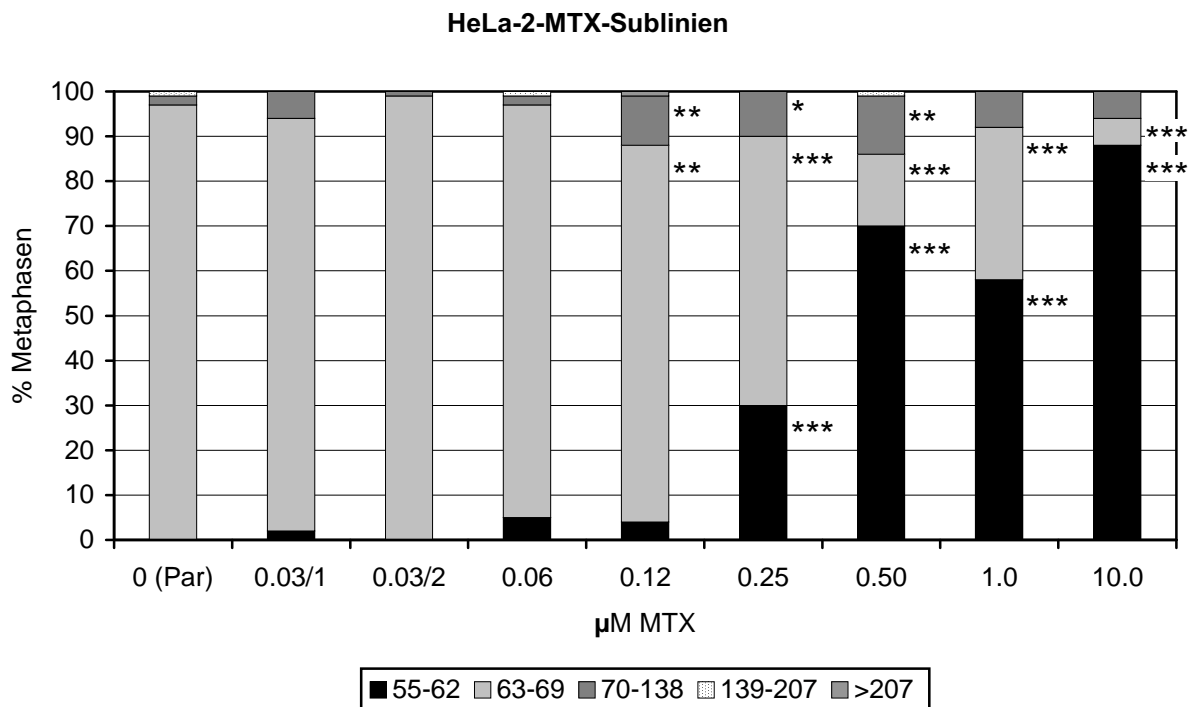


Abb. 19: Häufigkeit von Metaphasen der HeLa-2-MTX-Sublinien in den einzelnen Chromosomenanzahlklassen nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen. Legende: Chromosomenanzahl pro Metaphase für jede Chromosomenanzahlklasse; Par = Parentallinie; Symbole (*): s. Methoden, J)

B.4) Strukturelle Aberrationen in den HeLa-MTX-Sublinien

B.4.1) Gaps

Metaphasen mit Chromatid- und/oder Chromosomengaps wurden bei der Auswertung zur Kategorie Metaphasen mit Gaps zusammengefasst. Ein Beispiel für einen Chromatidgap zeigt Abbildung 20.

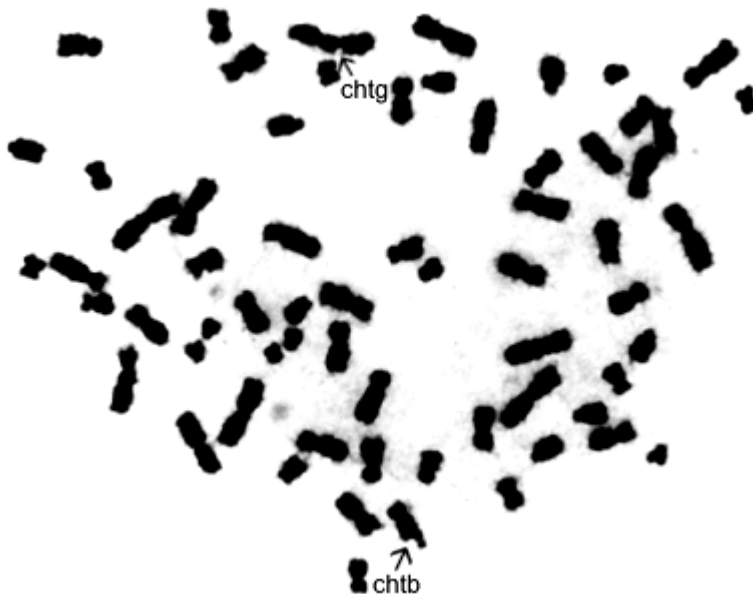


Abb. 20: Metaphase aus einer HeLa-2-MTX-Sublinie mit einem Chromatidgap (chtg; Pfeil) und einem Chromatidbruch (chtb; Pfeil) (Giemsafärbung).

Metaphasen mit Gaps traten in der Parentallinie nicht auf.

Nach dem ersten Selektionsschritt enthielten die bei Selektion 1 und 2 erzeugten Sublinien, HeLa-1-MTX-0.03/1 und HeLa-2-MTX-0.03/1, jeweils einen erhöhten Anteil an gaphaltigen Metaphasen von 12% bzw. 10% (s. Abb. 21). Bei den nachfolgenden HeLa-1-MTX-Sublinien sank dieser Anteil auf Werte zwischen 0% und 6% ab.

In den HeLa-2-MTX-Sublinien war dagegen eine andere Tendenz zu beobachten. Nach der zweiten Sublinie HeLa-2-MTX-0.03/2, die im Gegensatz zu HeLa-1-MTX-0.03/2 keine Metaphasen mit Gaps aufwies, nahm der Anteil an gaphaltigen Metaphasen bei den nachfolgenden Sublinien HeLa-2-MTX-0.06 und HeLa-2-MTX-0.12 wieder auf 6-7% zu und erreichte bei HeLa-2-MTX-0.25 ein Maximum von 16%. Bei den letzten beiden Sublinien HeLa-2-MTX-0.50 und HeLa-2-MTX-1.0 betrug die Häufigkeit von Metaphasen mit Gaps 6-8%. Die aus einer zusätzlichen Selektion stammende Sublinie HeLa-2-MTX-10.0 zeigte dagegen nur noch in 1% der Metaphasen Gaps.

Die Anzahl an Gaps, die pro Metaphase gefunden wurde, lag i.d.R. bei 1. Eine Ausnahme bildete nur die Sublinie HeLa-2-MTX-0.25, die zwischen 1 und 4 Gaps pro gaphaltiger Metaphase aufwies.

Metaphasen, die sowohl Gaps als auch Brüche (s. B.4.2) enthielten, traten nur bei vier HeLa-2-MTX-Sublinien zu 1-3% auf. Diese Metaphasen wurden in der Aberrationsauswertung sowohl als Metaphasen mit Gaps als auch als Metaphasen mit Brüchen gezählt.

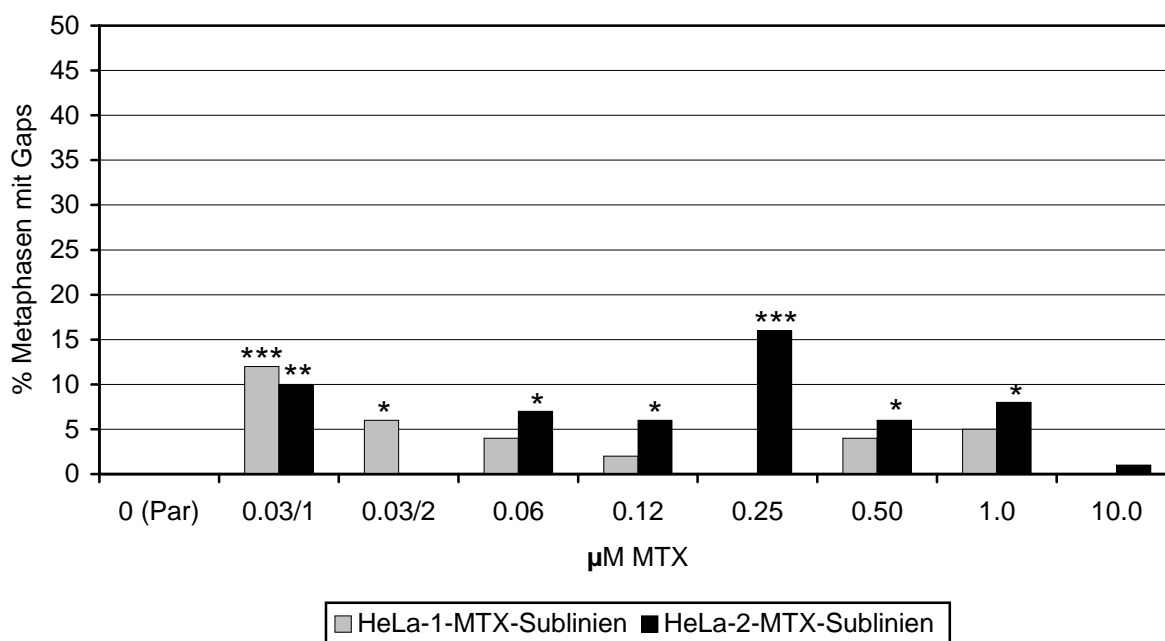


Abb. 21: Häufigkeit von Metaphasen mit Gaps in den HeLa-MTX-Sublinien nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen. Par = Parentallinie; Symbole (*): s. Methoden, J)

B.4.2) Brüche (Breaks)

Metaphasen mit Chromatid- und/oder Chromosomenbrüchen (Breaks) wurden bei der Auswertung zur Kategorie Metaphasen mit Brüchen zusammengefasst. Abbildung 20 (s. B.4.1) zeigt ein Beispiel für einen Chromatidbruch.

Im Gegensatz zur Parentallinie, bei der keine Brüche beobachtet wurden, trat in den HeLa-MTX-Sublinien ein geringer Anteil von 1-5% an Metaphasen mit Brüchen auf (s. Abb. 22).

Bei Selektion 1 enthielten die Sublinien HeLa-1-MTX-0.03/1, HeLa-1-MTX-0.03/2, HeLa-1-MTX-0.12 und HeLa-1-MTX-0.25 jeweils 2-3% Metaphasen mit Brüchen.

Die HeLa-2-MTX-Sublinien wiesen ab dem dritten Selektionsschritt in 0.06 µM MTX zwischen 1% und 5% bruchhaltige Metaphasen auf. Der höchste Anteil von 5% lag in HeLa-2-MTX-0.25 vor. Bei der Sublinie HeLa-2-MTX-10.0 wurden keine Metaphasen mit Brüchen gefunden.

Die Anzahl an Brüchen, die pro bruchhaltiger Metaphase vorlag, schwankte zwischen 1 und 3. Der am häufigsten auftretende Wert war 1 Bruch pro bruchhaltiger Metaphase.

Bei Vergleich der Metaphasenanteile mit Gaps und mit Brüchen zeigte sich, dass bei fast allen HeLa-MTX-Sublinien der Anteil an gaphaltigen Metaphasen höher als der Anteil an Metaphasen mit Brüchen war (vgl. Abb. 21 und 22). Die Maximalwerte in diesen Metaphasenkategorien wurden bei beiden Selektionen jeweils in einer einzigen Sublinie beobachtet. Bei Selektion 1 traten die höchsten Werte direkt in der ersten erzeugten Sublinie HeLa-1-MTX-0.03/1 auf, die 12% Metaphasen mit Gaps und 3% Metaphasen mit Brüchen enthielt. In den MTX-Sublinien aus Selektion 2 wurden die höchsten Anteile an Metaphasen mit Gaps und mit Brüchen erst in Sublinie HeLa-2-MTX-0.25 detektiert, die mit 16% gap- und 5% bruchhaltigen Metaphasen die Maximalwerte von Selektion 1 übertraf.

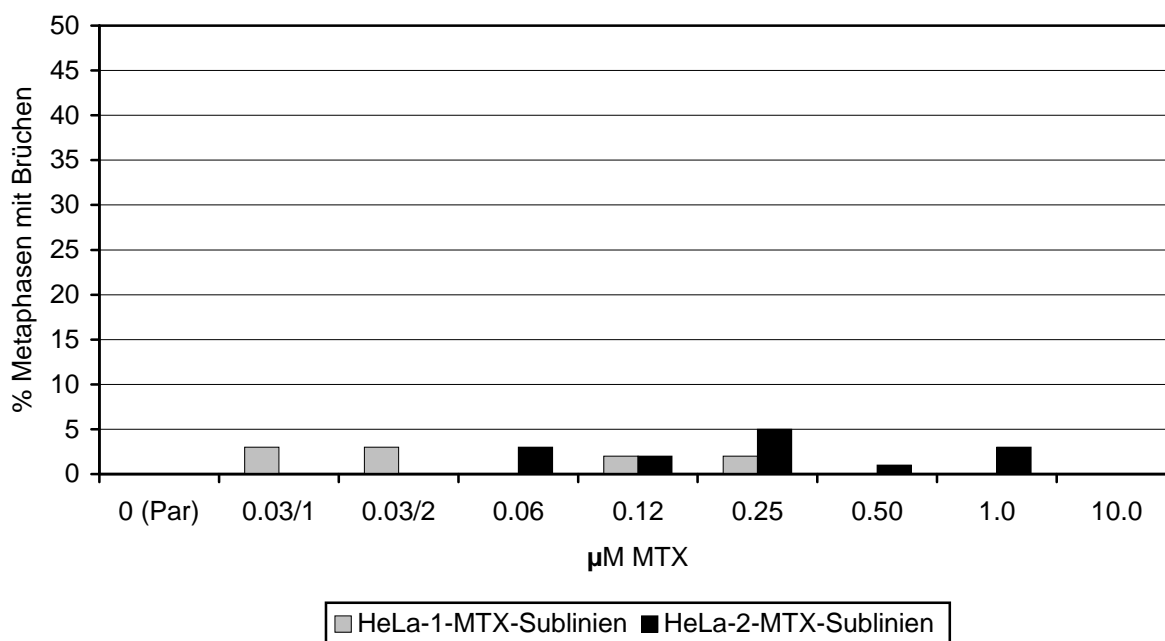


Abb. 22: Häufigkeit von Metaphasen mit Brüchen in den HeLa-MTX-Sublinien nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen. Par = Parentallinie

B.4.3) Azentrische Fragmente

Ein azentrisches Fragment (Ace) in einer Metaphase wurde nur dann als solches gewertet, wenn es aus zwei parallel nebeneinanderliegenden Chromatidstücken bestand, die jeweils die Breite einer einzelnen Chromatide aufwiesen. Einzelchromatidstücke, die als Resultat eines Chromatidbruchs auftraten, wurden von der Wertung ausgeschlossen, um eine mögliche Verwechslung mit Farbstoffpartikeln auf dem Metaphasenpräparat zu vermeiden. Die Ace erschienen in den Metaphasen der HeLa-MTX-Sublinien meist als Produkt eines Chromosomenbruchs, bei dem das abgebrochene und dislozierte Chromosomenstück als azentrisches Fragment in unmittelbarer Nähe des betroffenen Chromosoms lag. In diesen Fällen wurden die Metaphasen sowohl als Metaphasen mit Bruch als auch als Metaphasen mit Ace gezählt. Metaphasen mit einem Ace ohne erkennbaren Chromosomenbruch traten vereinzelt auf und wurden als Metaphasen mit Ace, aber nicht als Metaphasen mit Bruch gewertet.

In den HeLa-MTX-Sublinien wiesen die Ace eine variable Länge auf. Zur Unterscheidung von Dmin wurden die Ace nur dann als Fragmente angesehen, wenn sie entweder als Resultat eines Chromosomenbruchs erkannt werden konnten oder sich durch ihr Längen/Breiten-Verhältnis von Dmin unterschieden. Fragmente, die in Metaphasen ohne erkennbaren Chromosomenbruch auftraten, wurden als Ace gewertet, wenn sie einzeln vorlagen und ihre Länge ihre Breite überstieg. Bei gleicher Länge und Breite wurden sie als Dmin angesehen. Fragmente mit geringerer Länge als Breite wurden nie beobachtet.

Metaphasen mit Ace traten nicht in der Parentallinie, jedoch in einigen HeLa-MTX-Sublinien in bis zu 6% der ausgewerteten Metaphasen auf (s. Abb. 23).

Bei Selektion 1 enthielten die ersten fünf MTX-Sublinien, HeLa-1-MTX-0.03/1 bis HeLa-1-MTX-0.25, Metaphasen mit Ace in Anteilen von 1-3%.

Von den HeLa-2-MTX-Sublinien wiesen HeLa-2-MTX-0.06 und HeLa-2-MTX-0.12 jeweils 1% Ace-haltige Metaphasen auf. Sublinie HeLa-2-MTX-0.25 zeigte, wie bei den Metaphasen mit Gaps und mit Brüchen, auch bei den Metaphasen mit Ace mit 6% den höchsten Anteil aller HeLa-MTX-Sublinien. In den Metaphasen der nachfolgenden HeLa-2-MTX-Sublinien wurden keine Ace mehr beobachtet.

Die als positiv gewerteten Metaphasen enthielten nicht mehr als ein Ace, mit Ausnahme einer Metaphase mit zwei Ace, die bei Sublinie HeLa-2-MTX-0.06 gefunden wurde.

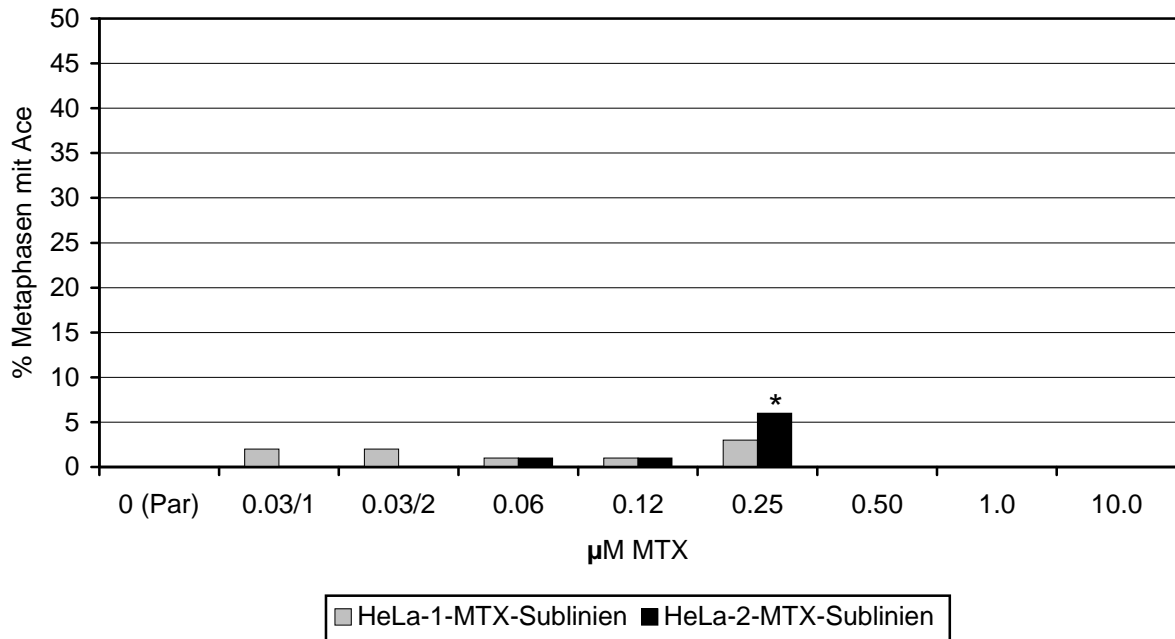


Abb. 23: Häufigkeit von Metaphasen mit azentrischem Fragment (Ace; ohne Dmin) in den HeLa-MTX-Sublinien nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen. Par = Parentallinie; Symbol (*): s. Methoden, J)

Bei einigen HeLa-MTX-Sublinien war der Anteil an Metaphasen mit Ace um 1-3% niedriger als der Anteil an Metaphasen mit Brüchen (s. B.4.2). Dies wurde möglicherweise durch die gewählten Kriterien für die Auswertung von Metaphasen mit Ace (s.o.) und durch die Zusammenfassung von Metaphasen mit Chromatid- und Chromosomenbrüchen zur Kategorie Metaphasen mit Brüchen (s. B.4.2) bedingt.

B.4.4) Pulverisiertes Chromatin

In den giemsaefärbten Metaphasen einiger HeLa-MTX-Sublinien traten unregelmäßig geformte Chromatinaggregate auf, die sehr viele dekondensierte (oder unterkondensierte) Chromosomenabschnitte im Wechsel mit kurzen kondensierten Abschnitten enthielten, aber morphologisch weder als Chromosomen noch als Ace oder Dmin identifiziert werden konnten (s. Abb. 24). Diese Chromatinaggregate wurden als pulverisiertes Chromatin (Pvz) bezeichnet. Metaphasen mit einer oder mehreren Einheiten an Pvz wurden in der Kategorie Metaphasen mit Pvz erfasst. In Metaphasen mit Dmin war Pvz aufgrund seines Erscheinens in aggregierter Form ohne individuell abgrenzbare Dmin von diesen gut unterscheidbar.

Durch weitere Untersuchungen mit anderen Methoden konnte die Zusammensetzung des Pvz aus humaner DNA nachgewiesen werden (s. B.10.2.2).

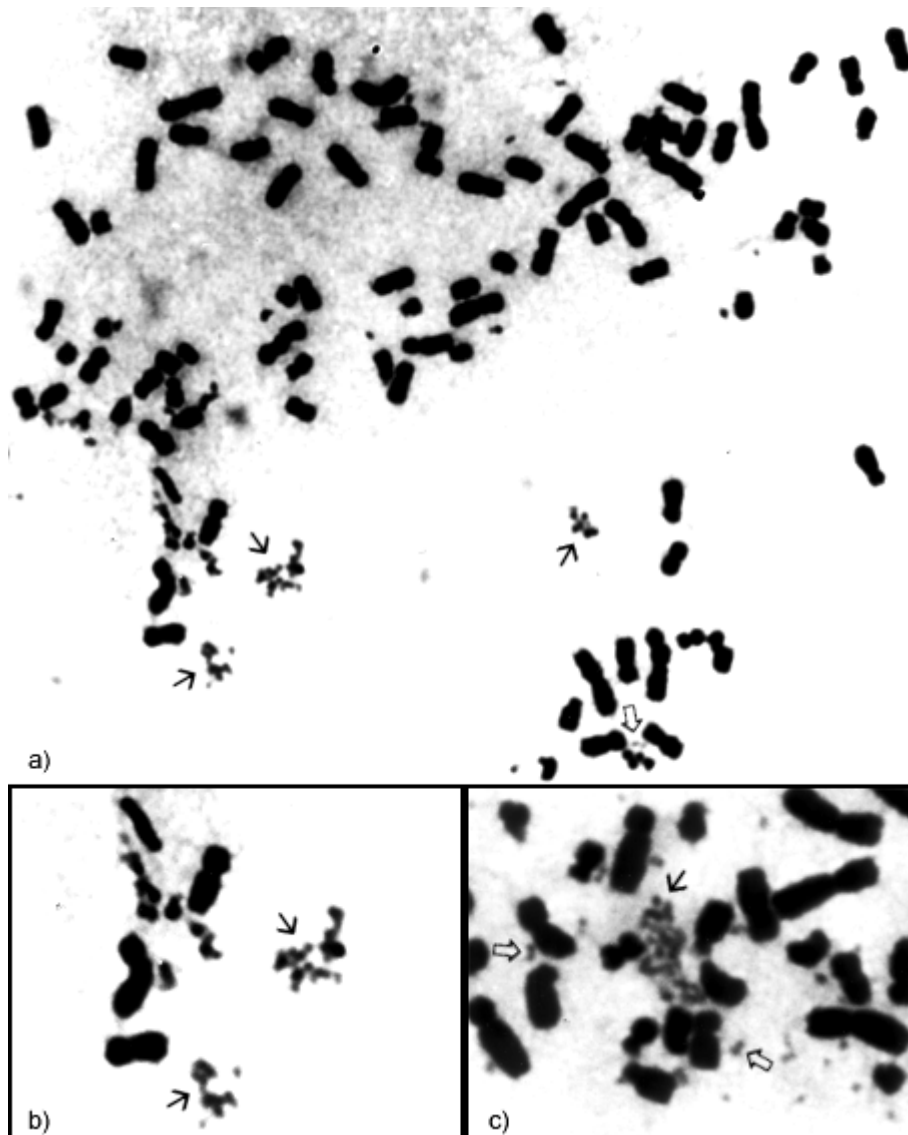


Abb. 24: Metaphase aus einer HeLa-2-MTX-Sublinie mit pulverisiertem Chromatin (Pvz) und Metaphasenausschnitte (Giemsafärbung).

a) HeLa-Metaphase mit Pvz (schwarze Pfeile) und Dmin (weißer Pfeil).

b) Ausschnitt aus a): Pvz (schwarze Pfeile) mit kondensierten (dunkle Färbung) und de- bzw. unterkondensierten Abschnitten (hellere Färbung) zwischen Chromosomen.

c) Ausschnitt einer Metaphase aus einer HeLa-1-MTX-Sublinie mit Dmin (weiße Pfeile) und einem Aggregat aus Pvz (oder assoziierten Dmin?; schwarzer Pfeil) zwischen Chromosomen.

Metaphasen mit Pvz wurden in der HeLa-Parentallinie nicht beobachtet.

Von den in Selektion 1 erzeugten Sublinien enthielten HeLa-1-MTX-0.03/1 und HeLa-1-MTX-0.12 nur geringe Anteile von jeweils 2% an Pvz-haltigen Metaphasen (s. Abb. 25). Die Sublinien aus den zwei nachfolgenden Selektionsschritten zeigten dagegen einen starken Anstieg dieses Metaphasenanteils, der bei HeLa-1-MTX-0.25 14% und bei HeLa-1-MTX-0.50 32% erreichte. Da diese beiden Sublinien bereits einen erhöhten Anteil an Metaphasen mit Dmin enthielten (s. B.4.9), könnte die Zunahme von Metaphasen mit Pvz hier nicht nur durch zusätzliche Pulverisierungsereignisse an Chromosomen, sondern auch durch Bil-

dung größerer Aggregate aus miteinander assoziierten Dmin hervorgerufen worden sein (s. Abb. 24c). Eine Unterscheidung dieser beiden denkbaren Entstehungsmechanismen des Pvz war jedoch morphologisch nicht möglich. Allerdings lagen in der als letzte selektionierten Sublinie HeLa-1-MTX-1.0 nur noch 1% Pvz-haltige Metaphasen vor, obwohl diese Sublinie gleichzeitig den höchsten Anteil an Metaphasen mit Dmin aufwies (s. B.4.9). Dieser Rückgang von Pvz-haltigen Metaphasen könnte auf eine Selektion zugunsten von Zellen ohne Pvz bei HeLa-1-MTX-1.0 hinweisen.

Bei den HeLa-2-MTX-Sublinien traten Metaphasen mit Pvz nur in niedrigen Anteilen von 1-6% auf. Der Maximalwert von 6% wurde nur in HeLa-2-MTX-1.0 und HeLa-2-MTX-10.0 erreicht und lag wesentlich unter dem bei den HeLa-1-MTX-Sublinien ermittelten Höchstwert von 32% (s.o.).

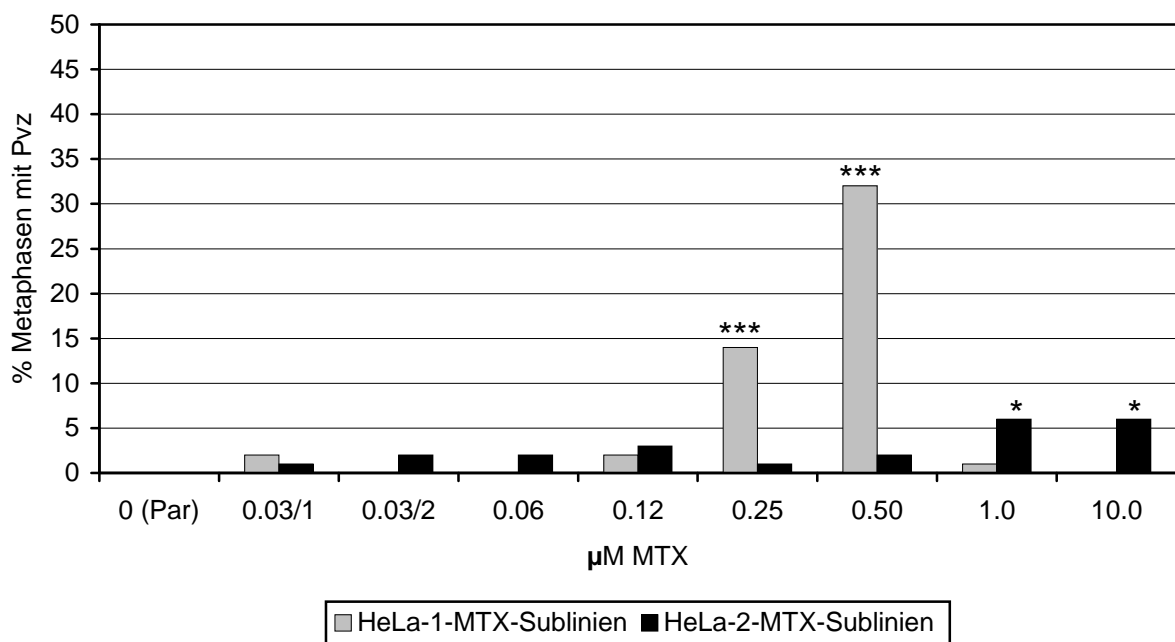


Abb. 25: Häufigkeit von Metaphasen mit pulverisiertem Chromatin (Pvz) in den HeLa-MTX-Sublinien nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen. Par = Parentallinie; Symbole (*): s. Methoden, J)

B.4.5) Ringchromosomen

Metaphasen mit Ringchromosomen lagen in der Parentallinie und in den HeLa-1-MTX-Sublinien nicht vor. Bei den HeLa-2-MTX-Sublinien wurden Ringchromosomen nur in jeweils einer Metaphase von HeLa-2-MTX-0.12 (7 Ringchromosomen) und HeLa-2-MTX-1.0 (1 Ringchromosom) beobachtet.

B.4.6) Dizentrische Chromosomen

Metaphasen mit dizentrischen Chromosomen (Dic) traten bereits in der Parentallinie mit einer Häufigkeit von 5% auf (s. Abb. 26). Die Metaphasen enthielten hier jeweils ein Dic.

Bei den ersten drei MTX-Sublinien aus Selektion 1, HeLa-1-MTX-0.03/1 bis HeLa-1-MTX-0.06, wurden Dic in 3-9% der Metaphasen gefunden. In Sublinie HeLa-1-MTX-0.12 erreichte der Anteil an Metaphasen mit Dic mit 16% den höchsten Wert aller HeLa-1-MTX-Sublinien. Auch die nachfolgenden Sublinien HeLa-1-MTX-0.25 bis HeLa-1-MTX-1.0 wiesen mit Anteilen von 11-15% erhöhte Werte in dieser Metaphasenkategorie auf. Die Anzahl der Dic pro Metaphase schwankte bei den HeLa-1-MTX-Sublinien

zwischen 1 und 4. Der Hauptanteil, d.h. mindestens 63%, der ausgewerteten Metaphasen pro Sublinie enthielt 1 Dic.

Bei Selektion 2 zeigten die MTX-Sublinien aus den ersten drei Selektionsschritten, HeLa-2-MTX-0.03/1 bis HeLa-2-MTX-0.06, mit 5-8% Metaphasen mit Dic ähnlich hohe Anteile wie die entsprechenden HeLa-1-MTX-Sublinien. Ab Sublinie HeLa-2-MTX-0.12 stieg der Anteil der Dic-haltigen Metaphasen auf über 10% an. Die Maximalwerte wurden in HeLa-2-MTX-0.50 mit 26% Dic-haltigen Metaphasen und in HeLa-2-MTX-1.0 mit 25% Dic-haltigen Metaphasen beobachtet. Die durch eine zusätzliche Selektion erzeugte Sublinie HeLa-2-MTX 10.0 wies dagegen nur noch 14% Metaphasen mit Dic auf. Die Anzahl der Dic pro Metaphase lag bei den HeLa-2-MTX-Sublinien zwischen 1 und 6. Mindestens 56% der ausgewerteten Metaphasen einer Sublinie enthielten jedoch nur 1 Dic.

Bei beiden Selektionen war in den HeLa-MTX-Sublinien aus den Selektionsschritten ab 0.12 μM MTX eine Zunahme von Metaphasen mit Dic feststellbar. Dieser Anstieg fiel in den HeLa-2-MTX-Sublinien stärker aus als in den HeLa-1-MTX-Sublinien. Dementsprechend wiesen die Sublinien aus dem letzten Selektionsschritt jeweils unterschiedlich erhöhte Anteile von Metaphasen mit Dic auf, die bei HeLa-1-MTX-1.0 15% und bei HeLa-2-MTX-1.0 25% betragen.

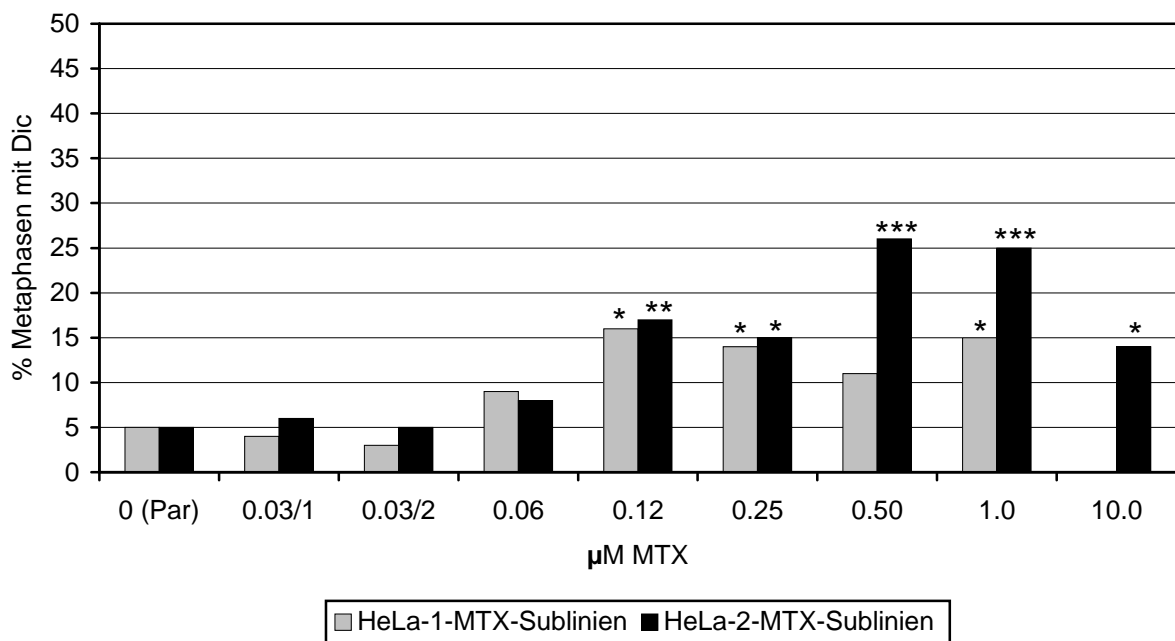


Abb. 26: Häufigkeit von Metaphasen mit dizentrischen Chromosomen (Dic) in den HeLa-MTX-Sublinien nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen. Par = Parentallinie; Symbole (*): s. Methoden, J)

B.4.7) Trizentrische Chromosomen

Bei einigen HeLa-MTX-Sublinien trat neben Metaphasen mit Dic auch ein höherer Anteil an Metaphasen mit trizentrischen Chromosomen (Trc) auf (s. Abb. 27), der in einer eigenen Kategorie erfaßt wurde.

Alle Trc, die in den Metaphasen der HeLa-MTX-Sublinien beobachtet wurden, wiesen eine einheitliche Morphologie auf, die darauf schliessen ließ, dass es sich in allen Fällen um den gleichen Markerchromosomentyp handelte (s. Abb. 28). Die Trc waren sowohl durch eine außergewöhnliche Größe als auch durch die spezifische Anordnung ihrer drei C-Band-positiven Regionen gekennzeichnet und dadurch in

den Metaphasen eindeutig identifizierbar. Innerhalb der Trc lagen zwei der drei C-Band-positiven Regionen relativ nahe beieinander an einem Chromosomenende und die dritte befand sich am gegenüberliegenden Chromosomenende. Die mittlere Region zeigte häufig eine höhere Färbungsintensität als die beiden äußeren Regionen.

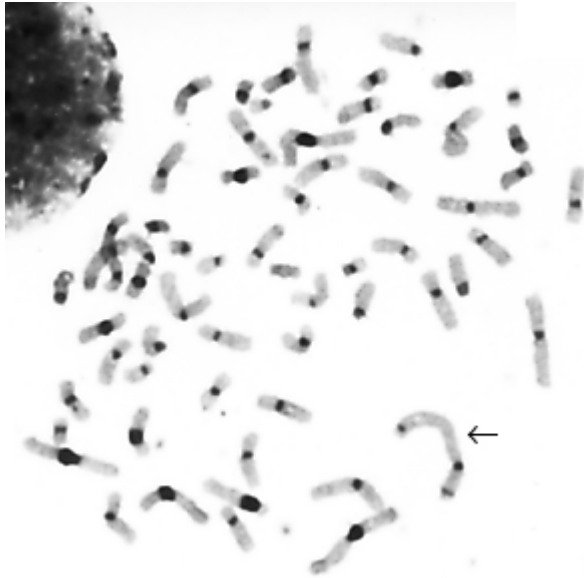


Abb. 27: Metaphase aus Sublinie HeLa-1-MTX-0.25 (C-Bänderung). Die C-Band-positiven Regionen erscheinen dunkel und markieren heterochromatinreiche Chromosomenabschnitte wie die Centromerregionen. Ein auffallend langes trizentrisches Chromosom (Pfeil) ist erkennbar.

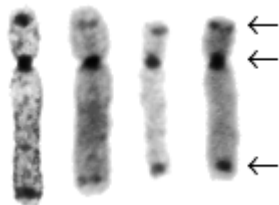


Abb. 28: Trizentrische Chromosomen aus verschiedenen Metaphasen der HeLa-MTX-Sublinien (C-Bänderung). Die Chromosomen zeigen eine einheitliche Morphologie und Lokalisation der drei C-Band-positiven Regionen (Pfeile).

Im Gegensatz zu Dic (s. B.4.6) kamen Trc nicht bei allen HeLa-MTX-Sublinien und auch nicht in der Parentallinie vor (s. Abb. 29).

Bei den MTX-Sublinien aus Selektion 1 trat erstmals in HeLa-1-MTX-0.03/1 eine einzelne Metaphase mit zwei Trc auf. Danach konnten Trc-haltige Metaphasen erst wieder in Sublinie HeLa-1-MTX-0.12 detektiert werden, die mit 17% den höchsten Anteil dieser Metaphasen aufwies. Die nachfolgenden Sublinien zeigten eine beständige Abnahme der Metaphasen mit Trc auf 7% bei HeLa-1-MTX-0.25 und 1-2% bei HeLa-1-MTX-0.50 und HeLa-1-MTX-1.0. In den Trc-haltigen Metaphasen der HeLa-1-MTX-Sublinien lag, bis auf eine Ausnahme in HeLa-1-MTX-0.03/1 (s.o.), jeweils nur 1 Trc vor.

Bei Selektion 2 wurden Trc zuerst in 4% der ausgewerteten Metaphasen von Sublinie HeLa-2-MTX-0.12 beobachtet. Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Selektion 1 trat der höchste Anteil an Metaphasen mit Trc in Sublinie HeLa-2-MTX-0.25 auf, erreichte aber mit 17% den gleichen Wert wie bei Selektion 1. Von den nachfolgenden Sublinien enthielt nur noch HeLa-2-MTX-0.50 einen reduzierten Anteil von 3% Metaphasen mit Trc. In der zusätzlich selektierten Sublinie HeLa-2-MTX-10.0 lagen keine Trc vor. Die Anzahl der Trc pro Trc-haltiger Metaphase betrug in den HeLa-2-MTX-Sublinien meist 1. Nur in den Sublinien HeLa-2-MTX-0.25 und HeLa-2-MTX-0.50 traten 2-3% Metaphasen mit 2 oder 3 Trc auf.

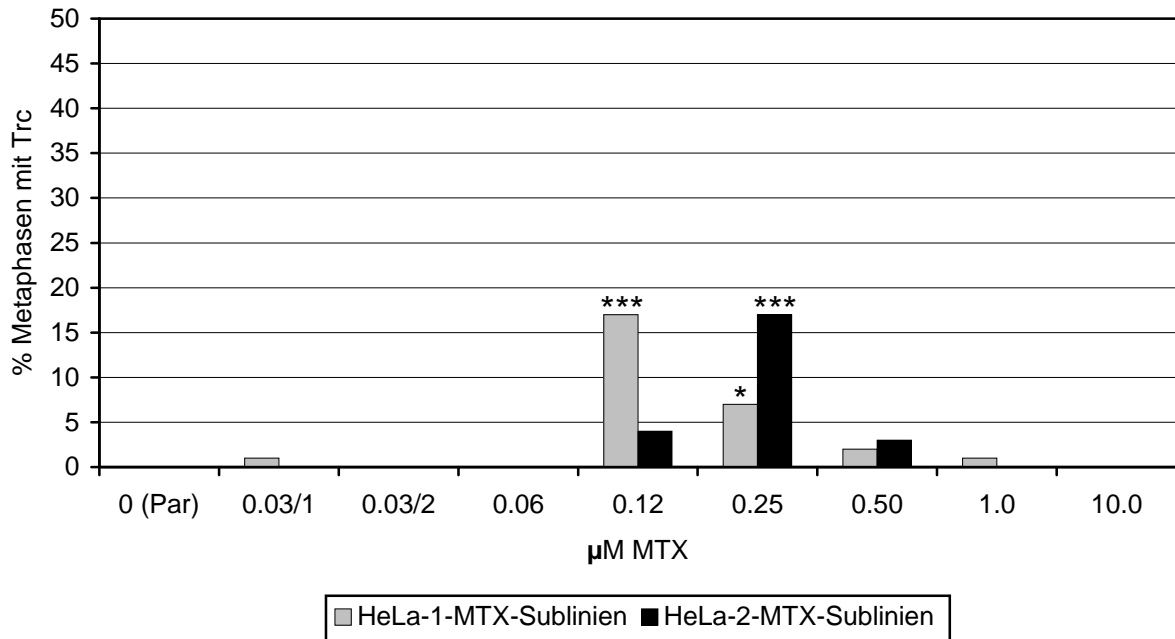


Abb. 29: Häufigkeit von Metaphasen mit trizentrischen Chromosomen (Trc) in den HeLa-MTX-Sublinien nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen. Par = Parentallinie; Symbole (*): s. Methoden, J)

B.4.8) Das derivative Chromosom 'Der(5)sp'

Während der Aberrationsauswertung fielen in den Metaphasen einiger HeLa-MTX-Sublinien neue Markerchromosomen mit ungewöhnlicher Größe auf (s. Abb. 30).



Abb. 30: Metaphase aus Sublinie HeLa-2-MTX-0.25 mit einem ungewöhnlich langen Markerchromosom (Pfeil) (Giemsafärbung).

Eine G-Banden-Analyse ergab, dass diese Markerchromosomen in allen Metaphasen ein identisches Bandenmuster aufwiesen und daher jeweils den gleichen Chromosomentyp repräsentierten (s. Abb. 31). Die Markerchromosomen enthielten je ein vollständiges Chromosom 5 (#5), an dessen kurzem (p) und

langem (q) Chromosomenarm jeweils in der terminalen Region ein weiteres Chromosomensegment addiert war. Das Segment am Ende von 5p konnte anhand seines G-Bandenmusters nicht identifiziert werden. Die terminale Region von 5q war mit dem terminalen q-Abschnitt eines weiteren #5 verbunden, das eine Deletion in 5p (Bruchpunkt vermutlich in 5p13) aufwies. Die beiden 5q-Abschnitte waren invertiert angeordnet und schienen über ihre terminalen Regionen fest verbunden zu sein, so dass das Vorliegen einer Telomerassoziation zwischen ihnen als unwahrscheinlich angesehen wurde. Das G-Bandenmuster lieferte keinen Hinweis auf die Anwesenheit einer HSR in den Markerchromosomen.

Dieser Markerchromosomentyp wird im folgenden abgekürzt als 'Der(5)sp' (sp = speziell, zur Abgrenzung von anderen derivativen Chromosomen in den HeLa-Metaphasen) bezeichnet.



Abb. 31: Auffällige Markerchromosomen (Der(5)sp) aus verschiedenen Metaphasen der HeLa-MTX-Sublinien (G-Bänderung). Die Markerchromosomen erscheinen aufgrund verschiedener Kondensationsgrade unterschiedlich lang, zeigen aber ein identisches Muster der Hauptbanden. Das Chromosom 5 (#5) rechts dient zum Vergleich und stammt aus derselben Metaphase wie das Markerchromosom links neben ihm.

Die Der(5)sp entsprachen sowohl in Form als auch in Größe den Trc, die in den C-gebänderten Metaphasen einiger HeLa-MTX-Sublinien gefunden wurden (s. B.4.7; vgl. Abb. 31 und Abb. 28). Daher stellten die Trc und die Der(5)sp wahrscheinlich den gleichen Chromosomentyp in jeweils unterschiedlicher Färbung dar. Auf Basis dieser Annahme enthielt ein Der(5)sp ein #5 und zwei weitere Chromosomensegmente (s.o.) sowie drei C-Band-positive Regionen. Die spezifische Anordnung der C-Band-positiven Regionen (s. Abb. 28) ließ darauf schließen, dass die beiden äußeren Regionen jeweils in einem der Chromosomensegmente lokalisiert waren und die mittlere Region die Centromerregion des #5 darstellte. Demnach bestand das Der(5)sp aus einem #5 mit zwei terminal an 5p und 5q addierten centrischen Chromosomensegmenten, von denen eines als ein #5 mit 5p-Deletion identifiziert wurde (s. Abb. 32). Karyotypisch wurde das Der(5)sp beschrieben als: $\text{der}(?;5;5)(?::5p15 \rightarrow 5q35::5q35 \rightarrow 5p?13:)$.

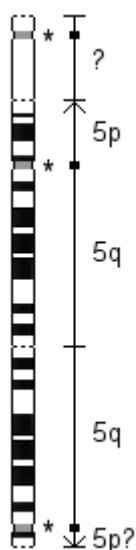


Abb. 32: Schematisches Modell zur Darstellung der wahrscheinlichen Zusammensetzung des Der(5)sp nach G- und C-Bandenanalyse. Das G-Banden-Ideogramm links zeigt ein vollständiges #5 (Mitte) mit einem an die terminale 5p-Region addierten centrischen Chromosomensegment unbekannter Herkunft (weißes Segment; oben) und einem an den terminalen 5q-Abschnitt invertiert addierten #5 mit 5p-Deletion (unten). Die Enden der einzelnen Segmente sind durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. Die Symbole (*) neben dem Ideogramm markieren die Lage der Centromere nach C-Bänderung dieses Chromosomentyps. Auf der rechten Seite ist die Orientierung der einzelnen Segmente innerhalb des Der(5)sp, soweit bekannt, durch senkrechte Pfeile angegeben. Dabei entsprechen die Rechtecke den Centromeren und die horizontalen Linien den Segmentenden. ?: fragliches oder unbekanntes Segment

Die vollständige Aufklärung der Zusammensetzung des Der(5)sp erfolgte mit anderen Methoden und wird in späteren Kapiteln dargestellt (s. B.7.2 und B.10.3.3).

Da das Der(5)sp anhand seines spezifischen G-Bandenmusters eindeutig identifizierbar war, konnte der Anteil an Metaphasen mit diesem derivativen Chromosomentyp in den HeLa-MTX-Sublinien bestimmt werden. Das Der(5)sp wurde dabei sowohl in MTX-Sublinien aus Selektion 1 als auch aus Selektion 2, jedoch nicht in der Parentallinie detektiert.

Bei Selektion 1 wurde die erste Metaphase mit einem Der(5)sp in der Sublinie HeLa-1-MTX-0.03/2 beobachtet (s. Abb. 33). Weitere Der(5)sp-haltige Metaphasen traten erst in HeLa-1-MTX-0.12 und den beiden nachfolgenden Sublinien wieder auf. In HeLa-1-MTX-0.12 lag mit 18.4% der höchste Anteil dieser Metaphasen vor. HeLa-1-MTX-0.25 und HeLa-1-MTX-0.50 zeigten dagegen eine zunehmende Reduktion der Metaphasen mit Der(5)sp auf 3.3% bzw. 1%. Die Der(5)sp-haltigen Metaphasen der HeLa-1-MTX-Sublinien wiesen jeweils ein Der(5)sp auf, mit Ausnahme einer Metaphase mit zwei Kopien des Der(5)sp in HeLa-1-MTX-0.50.

Bei den HeLa-2-MTX-Sublinien trat das Der(5)sp erstmals in 1% der Metaphasen von HeLa-2-MTX-0.06 auf. Die nachfolgenden Sublinien HeLa-2-MTX-0.12 und HeLa-2-MTX-0.25 enthielten mit 15% bzw. 15.5% die höchsten Anteile an Der(5)sp-haltigen Metaphasen bei Selektion 2. In den anschließend selektionierten Sublinien war das Der(5)sp nicht mehr nachweisbar. Die Anzahl der Der(5)sp pro Metaphase betrug bei den HeLa-2-MTX-Sublinien i.d.R. eins. Daneben lagen bei HeLa-2-MTX-0.12 eine Metaphase mit vier Der(5)sp und bei HeLa-2-MTX-0.25 eine Metaphase mit zwei Der(5)sp vor.

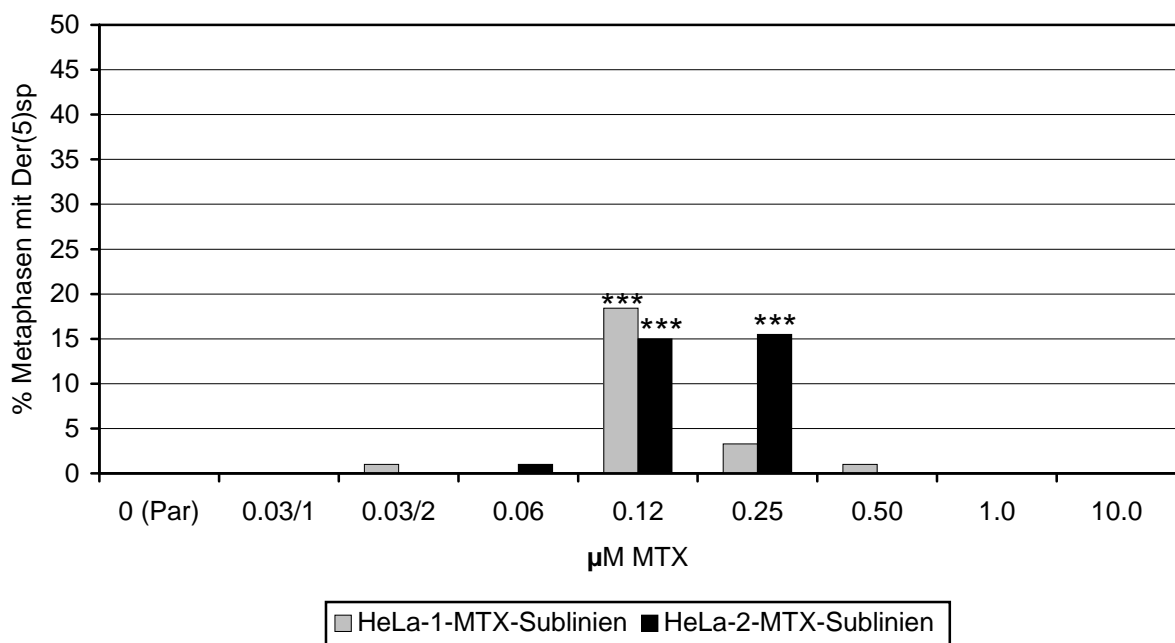


Abb. 33: Häufigkeit von Metaphasen mit Der(5)sp in den HeLa-MTX-Sublinien nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen. Par = Parentallinie; Symbole (*): s. Methoden, J)

Ein Vergleich der Häufigkeiten von Metaphasen mit Der(5)sp und mit Trc (s. B.4.7; vgl. Abb. 33 und Abb. 29) ergab, dass die Häufigkeiten in beiden Metaphasenkategorien sowohl bei den HeLa-1- als auch bei den HeLa-2-MTX-Sublinien eine gleichartige Verteilung zeigten (einzige Ausnahme: HeLa-2-MTX-0.12).

Auch die Maximalwerte wurden in beiden Kategorien jeweils in derselben Sublinie erreicht. Bei Selektion 1 war dies in Sublinie HeLa-1-MTX-0.12 der Fall, die sowohl den höchsten Anteil an Metaphasen mit Der(5)sp (18.4%) als auch an Metaphasen mit Trc (17%) enthielt. Bei Selektion 2 wies Sublinie HeLa-2-MTX-0.25 die höchsten Metaphasenanteile mit Der(5)sp (15.5%) und mit Trc (17%) auf. Die vergleichbar hohen Anteile der Metaphasen mit diesen Chromosomentypen in den HeLa-MTX-Sublinien sprachen neben der übereinstimmenden Morphologie von Der(5)sp und Trc (s.o.) ebenfalls für die Annahme, dass die Der(5)sp in den G-gebänderten Metaphasen und die Trc in den C-gebänderten Metaphasen jeweils den gleichen Chromosomentyp darstellten.

B.4.9) Double Minutes

Die Detektion von Double Minutes (Dmin) in 2% der Metaphasen der HeLa-Parentallinie zeigte, dass bereits bei dieser Linie ein geringer Anteil an extrachromosomal amplifizierten Sequenzen vorlag.

In den MTX-Sublinien aus den ersten vier Selektionsschritten veränderten sich die Metaphasenanteile mit Dmin bei beiden Selektionen nicht wesentlich, sondern schwankten zwischen 0 und 6% (s. Abb. 34). Ab dem Selektionsschritt in 0.25 μ M MTX war in den erzeugten MTX-Sublinien von Selektion 1 und 2 eine Zunahme von Metaphasen mit Dmin zu beobachten, die jedoch in unterschiedlicher Weise erfolgte.

Die MTX-Sublinien aus Selektion 1 zeigten ab HeLa-1-MTX-0.25 eine kontinuierliche Zunahme des Anteils Dmin-haltiger Metaphasen auf 39% bei HeLa-1-MTX-0.25, 49% bei HeLa-1-MTX-0.50 und 76% bei HeLa-1-MTX-1.0. Bei Selektion 2 trat zunächst eine geringe Erhöhung der Metaphasen mit Dmin auf 9% bei HeLa-2-MTX-0.25 ein, der ein sprunghafter Anstieg auf 78% bei HeLa-2-MTX-0.50 folgte. Sublinie HeLa-2-MTX-1.0 wies dagegen wieder eine nur geringe Zunahme der Dmin-haltigen Metaphasen auf 81% auf. Bei beiden Selektionen enthielten die Sublinien aus dem letzten Selektionsschritt dennoch vergleichbare Anteile an Metaphasen mit Dmin (HeLa-1-MTX-1.0: 76%; HeLa-2-MTX-1.0: 81%). Ein Anteil von 100% Metaphasen mit Dmin wurde erst bei Sublinie HeLa-2-MTX-10.0 erreicht.

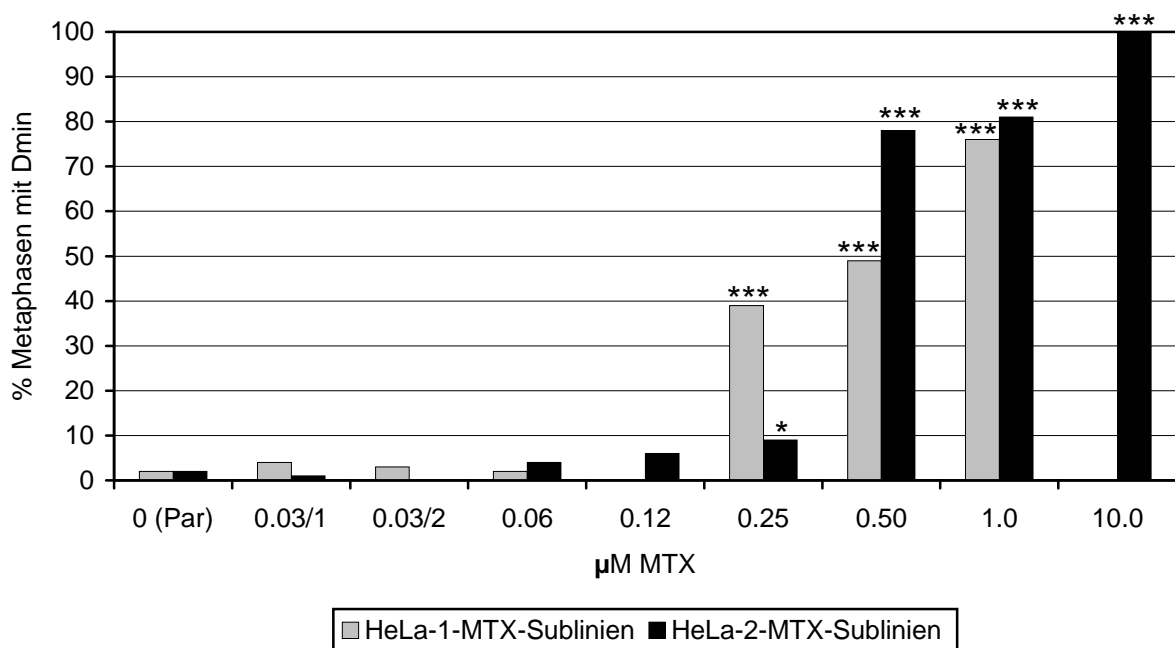


Abb. 34: Häufigkeit von Metaphasen mit Double Minutes (Dmin) in den HeLa-MTX-Sublinien nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen. Par = Parentallinie; Symbole (*): s. Methoden, J)

Die Zunahme von Dmin-haltigen Metaphasen in den HeLa-MTX-Sublinien signalisierte, dass die Genamplifikationsinduktion durch Selektion mit MTX erfolgreich verlaufen war. Bei beiden Selektionen konnten MTX-Sublinien mit einer extrachromosomalen Genamplifikation in mehr als 75% der Zellen erzeugt werden. Die Proliferationsaktivität der selektionierten Zellpopulationen der einzelnen Sublinien in MTX-haltigem Medium wies auf den Erwerb einer Resistenz gegen die jeweils vorliegende MTX-Konzentration hin.

Die Dmin in den Metaphasen der HeLa-MTX-Sublinien zeigten meist eine einheitliche Größe und waren C-Band-negativ (s. Abb. 35). Einzelne vorliegende (Single) Minutes traten nur selten auf.

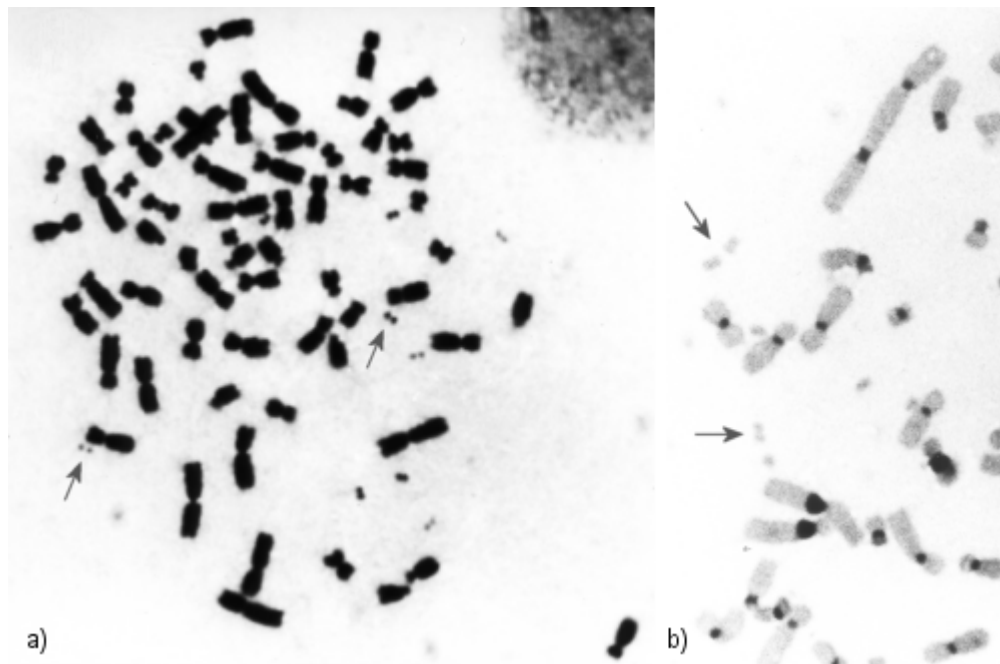


Abb. 35: Metaphase aus Sublinie HeLa-1-MTX-1.0 und Metaphasenausschnitt mit Double Minutes (Dmin)
 a) HeLa-Metaphase mit Dmin in leicht unterschiedlicher Größe (Pfeile) (Giemsafärbung). Die Dmin erscheinen als doppelkugelförmige Strukturen und liegen zufällig zwischen den Chromosomen verteilt.
 b) Ausschnitt einer Metaphase mit Dmin aus einer HeLa-MTX-Sublinie nach C-Bänderung. Die C-Band-positiven Centromerregionen sind dunkel gefärbt. Die Dmin (Pfeile) sind hell und daher C-Band-negativ.

B.4.10) Double Minute-Anzahl pro Metaphase

Durch Bestimmung der Dmin-Anzahl pro Metaphase konnten bei einigen HeLa-MTX-Sublinien größere Unterschiede im Dmin-Gehalt der Metaphasen im Vergleich zur Parentallinie detektiert werden.

Bei der Parentallinie lag die Dmin-Anzahl der 2% Dmin-haltigen Metaphasen (s. B.4.9) bei 1-2.

Die MTX-Sublinien von Selektion 1 wiesen nach den ersten vier Selektionsschritten nur geringe Anteile an Metaphasen mit Dmin auf (s. B.4.9), die bis auf zwei Ausnahmen (2 Metaphasen mit >150 Dmin bei HeLa-1-MTX-0.03/1) weniger als 10 (1-6) Dmin enthielten (s. Abb. 36). Ab dem Selektionsschritt in 0.25 μ M MTX erhöhte sich der Metaphasenanteil mit Dmin in den erzeugten Sublinien zunehmend (s. B.4.9). Die Anzahl der Dmin pro Metaphase blieb jedoch im überwiegenden Teil (in >60%) der Dmin-haltigen Metaphasen von HeLa-1-MTX-0.25, HeLa-1-MTX-0.50 und HeLa-1-MTX-1.0 bei unter 10.

HeLa-1-MTX-0.25 zeigte neben 35% Metaphasen mit <10 Dmin 4% Metaphasen mit höheren Dmin-Anzahlen bis maximal 36. Bei HeLa-1-MTX-0.50 lagen 48% Metaphasen mit <10 Dmin und nur eine Metaphase mit >10 (22) Dmin vor. In Sublinie HeLa-1-MTX-1.0 nahm der Metaphasenanteil mit <10 Dmin (47%) gegenüber HeLa-1-MTX-0.50 nicht zu. Jedoch war in dieser Sublinie ein Anstieg von Metaphasen mit >10 Dmin auf 29%, davon 22% mit 10-19 Dmin und 7% mit 20-80 Dmin, zu beobachten, der auf eine Tendenz zur Anreicherung von Metaphasen mit einer erhöhten Dmin-Anzahl hindeutete.

In den HeLa-2-MTX-Sublinien aus den ersten vier Selektionsschritten traten wie in den HeLa-1-MTX-Sublinien nur wenige Dmin-haltige Metaphasen auf (s. B.4.9), die zwischen 1 und 7 Dmin enthielten (s. Abb. 37). Nach dem Selektionsschritt in 0.25 μ M MTX war in den erzeugten Sublinien sowohl eine Zunahme von Metaphasen mit unter 10 Dmin als auch von Metaphasen mit über 10 Dmin zu beobachten. Diese fiel bei Sublinie HeLa-2-MTX-0.25 mit 4% Metaphasen mit <10 Dmin und erstmals 5% Metaphasen mit 10-20 Dmin noch gering aus. HeLa-2-MTX-0.50 wies dagegen eine starke Anreicherung von Metaphasen mit <10 Dmin (55%) und Metaphasen mit 10-19 Dmin (19%) auf. Zusätzlich lagen 3% Metaphasen mit 20-32 Dmin und eine Metaphase mit >150 Dmin vor. Bei Sublinie HeLa-2-MTX-1.0 sank der Anteil der Metaphasen mit <10 Dmin auf 40% bei gleichzeitigem Anstieg der Metaphasen mit 10-19 Dmin (21%) und mit 20-29 Dmin (9%). In weiteren 11% der Metaphasen dieser Sublinie wurden Dmin-Anzahlen zwischen 30 und 77 ermittelt. Sublinie HeLa-2-MTX-10.0 zeigte eine noch stärkere Erhöhung der Metaphasenanteile mit >10 Dmin. Von 100 % Dmin-haltigen Metaphasen (s. B.4.9) enthielten nur noch 18% <10 Dmin, jedoch 25% 10-19 Dmin und 21% 20-29 Dmin. Daneben traten 24% Metaphasen mit 30-49 Dmin und 12% Metaphasen mit 50-112 Dmin auf.

Bei beiden Selektionen wies der Hauptanteil (>60%) der Dmin-haltigen Metaphasen nicht mehr als maximal 30 Dmin auf. Metaphasen mit größeren Dmin-Anzahlen wurden fast ausschließlich in MTX-Sublinien aus den Selektionsschritten in 0.25 μ M oder höheren MTX-Konzentrationen gefunden. Der Anteil von Metaphasen mit >30 Dmin betrug bei den HeLa-1-MTX-Sublinien nur 1-2%. In den HeLa-2-MTX-Sublinien erreichte er leicht höhere Werte von 3% bei HeLa-2-MTX-0.50 und 10% bei HeLa-2-MTX-1.0. Sublinie HeLa-2-MTX-10.0 enthielt dagegen 35% Metaphasen mit einer Dmin-Anzahl von über 30.

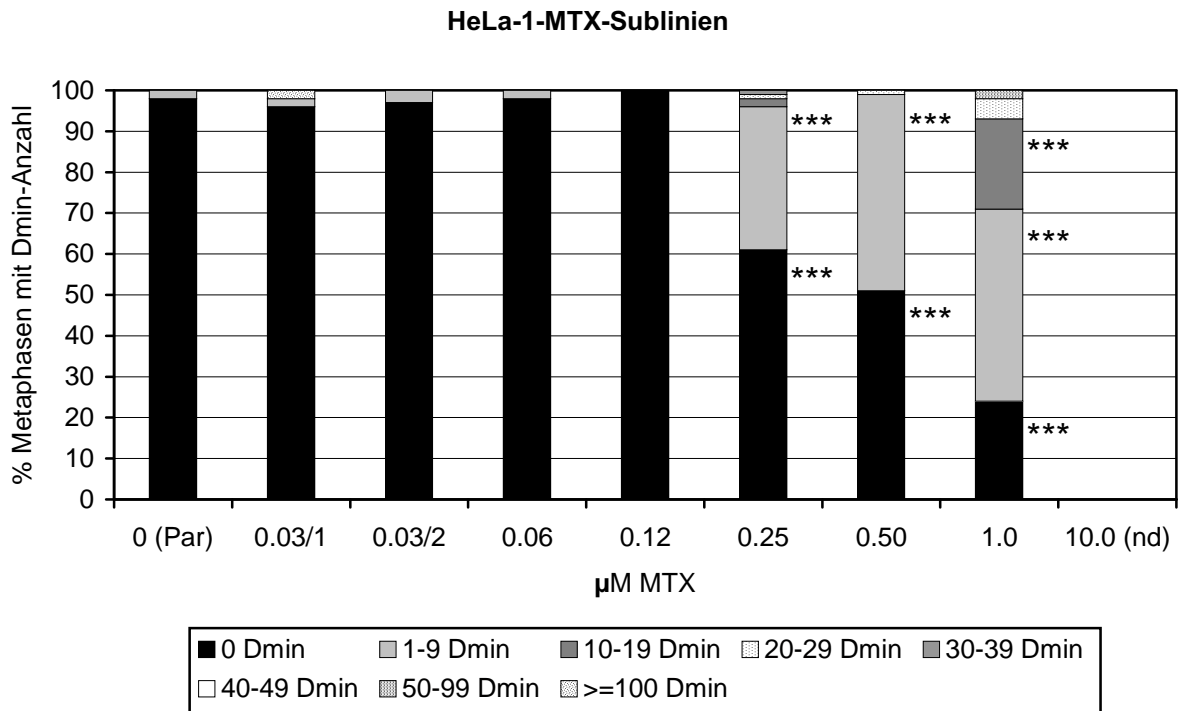


Abb. 36: Häufigkeit von Metaphasen mit der in der Legende aufgeführten Anzahl Double Minutes (Dmin) in den HeLa-1-MTX-Sublinien nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen. nd = nicht durchgeführt; Par = Parentallinie; Symbole (*): s. Methoden, J)

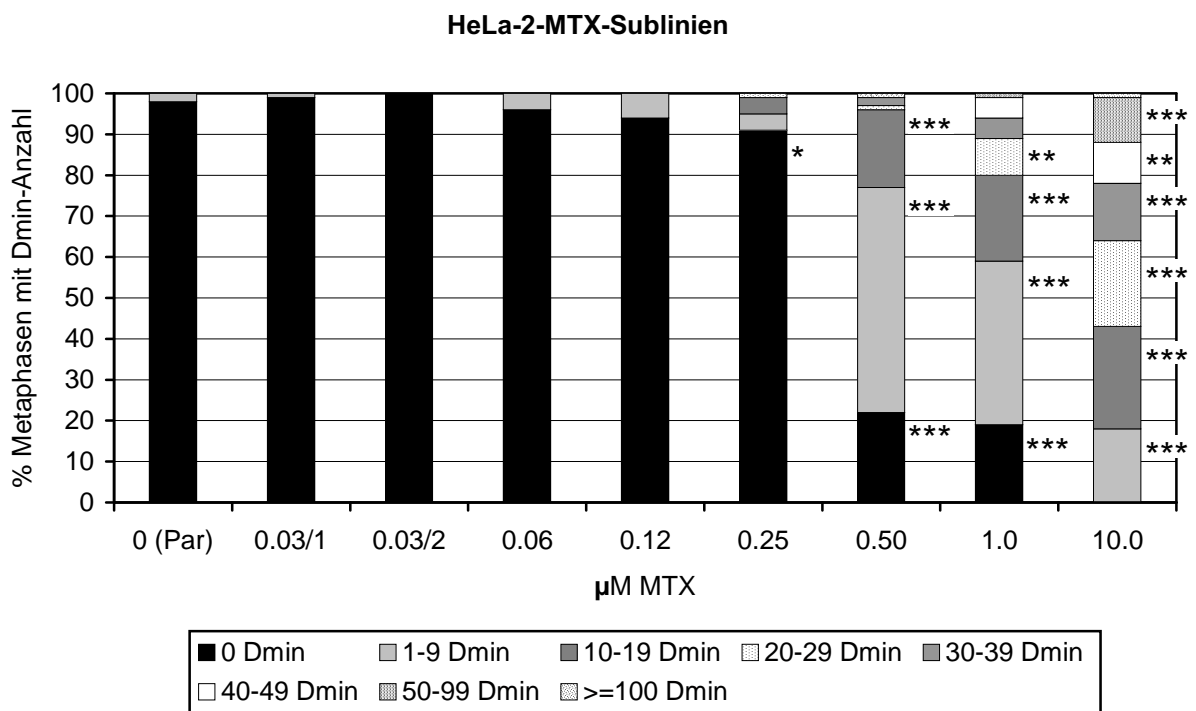


Abb. 37: Häufigkeit von Metaphasen mit der in der Legende aufgeführten Anzahl Double Minutes (Dmin) in den HeLa-2-MTX-Sublinien nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen. Par = Parentallinie; Symbole (*): s. Methoden, J)

B.5) HeLa-Karyotypauswertung vor und nach Methotrexat-Selektion

Eine Karyotypauswertung wurde bei der HeLa-Parentallinie sowie den MTX-Sublinien HeLa-1-MTX-1.0, HeLa-2-MTX-1.0 und HeLa-2-MTX-10.0 vorgenommen.

Die Karyotypauswertung ergab bereits bei der Parentallinie eine hohe Heterogenität der Karyotypen. Es lagen nicht einmal zwei Metaphasen mit dem gleichen Karyotyp vor. Die ausgewerteten Metaphasen zeigten jeweils einen hypotriploiden Karyotyp (bis auf eine Ausnahme mit 111 Chromosomen) mit zahlreichen chromosomalen Rearrangements, der sowohl unveränderte Chromosomen in variabler Kopienanzahl als auch verschiedene Markerchromosomentypen in unterschiedlicher Anzahl umfaßte (s. B.5.1).

Da eine detaillierte Analyse der Zusammensetzung der Markerchromosomen im Rahmen der Arbeit nicht möglich war, wurde die Karyotypauswertung der HeLa-Linien auf die Überprüfung des Vorliegens von HSRs und die Bestimmung der auftretenden Kopienanzahlen der normalen Chromosomen beschränkt. Als 'normale Chromosomen' wurden die 23 verschiedenen Chromosomen des weiblichen humanen Karyotyps ohne Aberrationen (Chromosomen 1-22 und X) bezeichnet. Auf Basis der ermittelten Kopienanzahlen konnte für jedes normale Chromosom eine modale Kopienanzahl festgelegt werden.

B.5.1) Beispielkaryogramme der HeLa-Parentallinie und der Sublinien HeLa-1-MTX-1.0, HeLa-2-MTX-1.0 und HeLa-2-MTX-10.0

Die folgenden Abbildungen zeigen Beispielkaryogramme von Metaphasen aus der Parentallinie und aus den karyotypisierten MTX-Sublinien. In den Karyogrammen bezeichnen M1 bis M10 Markerchromosomen. Aus Platzmangel wurden mehrere Markerchromosomen an die für ein Markerchromosom vorgesehene Stelle gesetzt. Die Anordnung der Markerchromosomen erfolgte nach ihrem Erscheinungsbild und ihrer Größe und wurde nach der Festlegung, soweit möglich, in allen Karyogrammen eingehalten. Die unter M1, M4, M5, M6 und M8 einsortierten Markerchromosomen traten in den meisten HeLa-Metaphasen auf. Sie wurden so sortiert, dass ihre Bezeichnung mit der Nummer des normalen Chromosoms, von dem sie wahrscheinlich abgeleitet sind, übereinstimmt (z.B. entspricht das Markerchromosom unter M4 einem derivativen #4). Die Karyotypangaben erfolgten in Relation zu einem triploiden Karyotyp.

Karyotypangaben zu den Beispielkaryogrammen:

Abb. 38: Karyogramm einer Metaphase aus der HeLa-Parentallinie. Karyotyp:

65<3n>,XX,-X,-1,-2,-3,-3,-4,-4,-5,-6,-6,-8,-9,-10,-11,-13,-13,-18,-19,-19,-20,-22,-22,-22,+19mar

Abb. 39: Karyogramm einer Metaphase aus HeLa-1-MTX-1.0 (Dmin nicht mit abgebildet). Karyotyp:

66<3n>,XX,-X,-1,-2,-3,-3,-4,-4,-4,-5,-6,-6,-8,-9,-10,-11,-13,-14,-16,-18,-19,-19,-19,-20,-22,+21mar,dmin

Abb. 40: Karyogramm einer Metaphase aus HeLa-2-MTX-1.0 (ohne Dmin). Karyotyp:

63<3n>,XX,-X,-1,-2,-3,-3,-4,-4,-5,-6,-8,-9,-10,-11,-13,-13,-13,-15,-19,-19,-20,-21,-21,-22,+17mar

Abb. 41: Karyogramm einer Metaphase aus HeLa-2-MTX-10.0 (Dmin zum Teil mit abgebildet). Karyotyp:

58<3n>,XX,-X,-1,-2,-3,-3,-4,-4,-5,-6,-8,-9,-10,-11,-13,-15,-16,-16,-17,-18,-18,-19,-19,-21,-21,-22,-22,+15mar,dmin

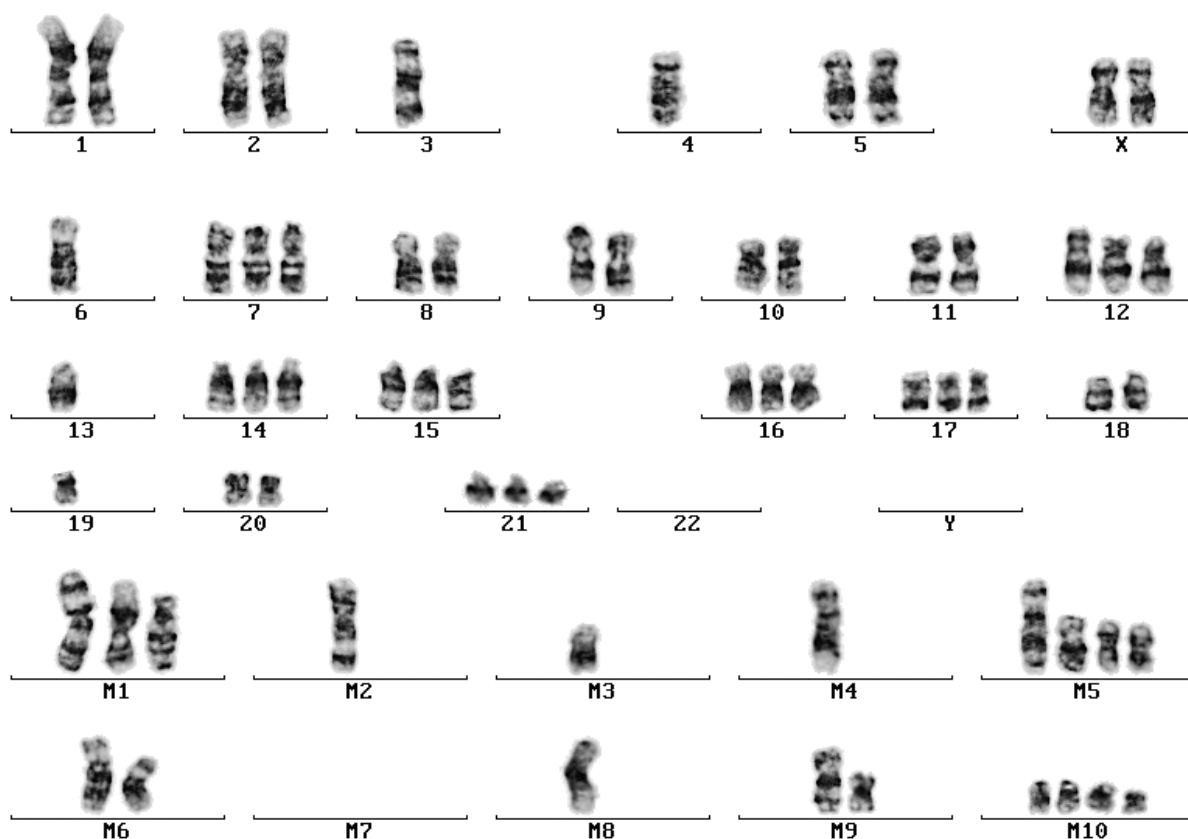


Abb. 38: Karyogramm einer Metaphase aus der HeLa-Parentallinie. Angaben zum Karyotyp s. S. 82

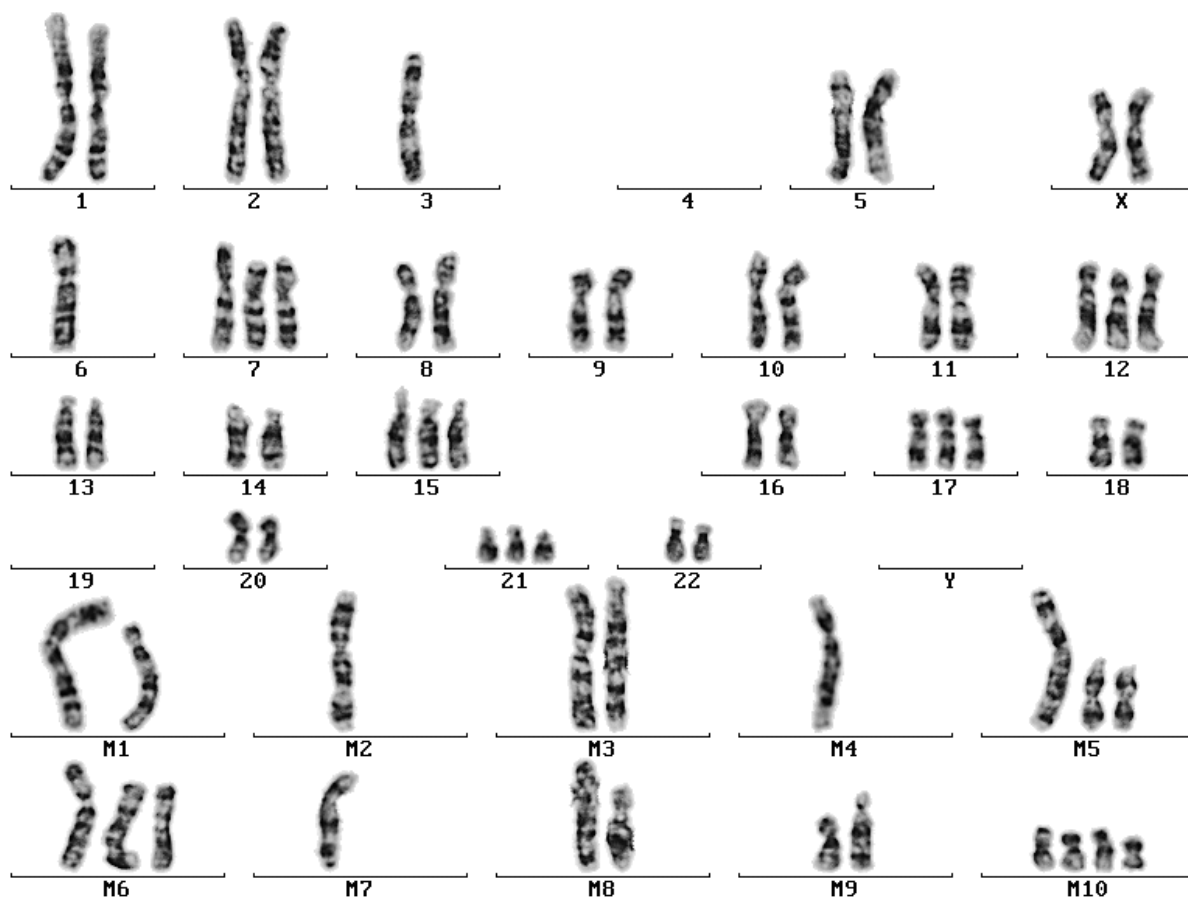


Abb. 39: Karyogramm einer Metaphase aus HeLa-1-MTX-1.0. Angaben zum Karyotyp s. S. 82

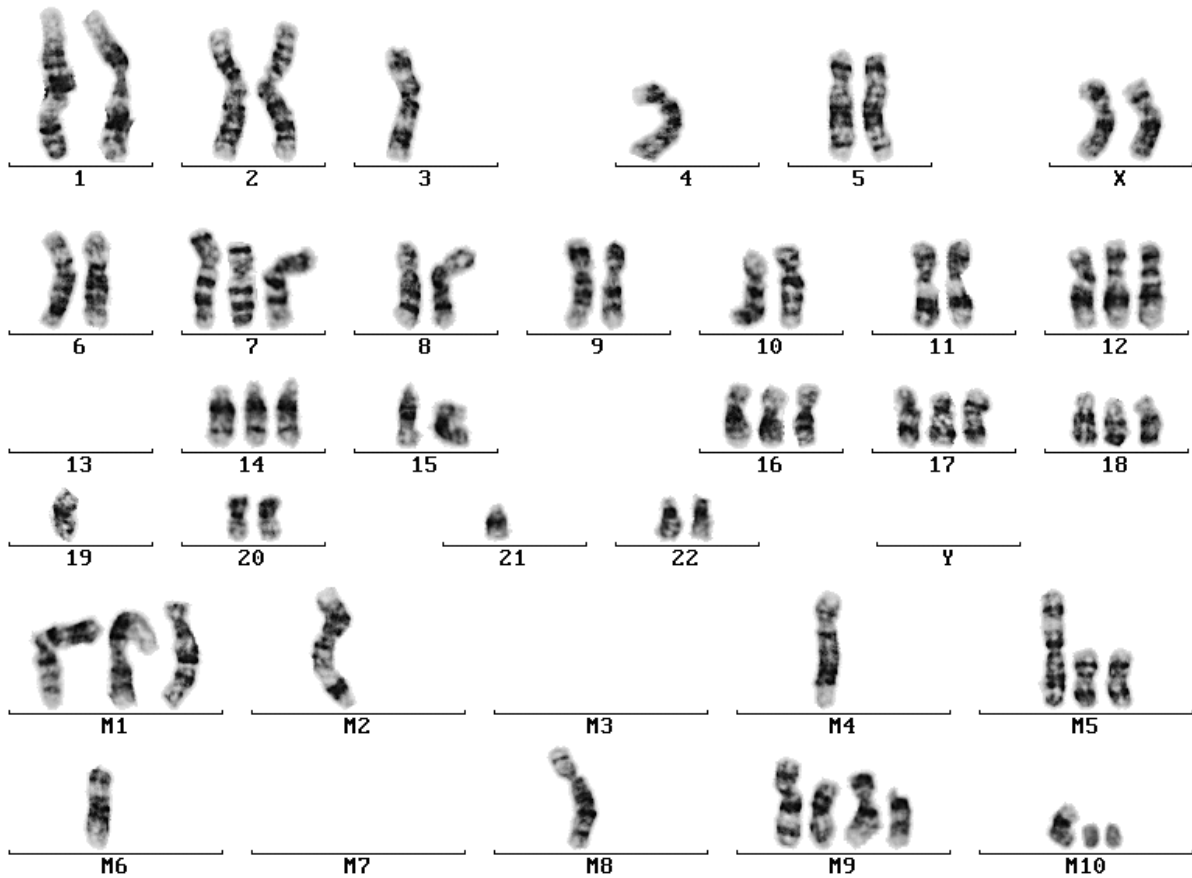


Abb. 40: Karyogramm einer Metaphase aus HeLa-2-MTX-1.0. Angaben zum Karyotyp s. S. 82

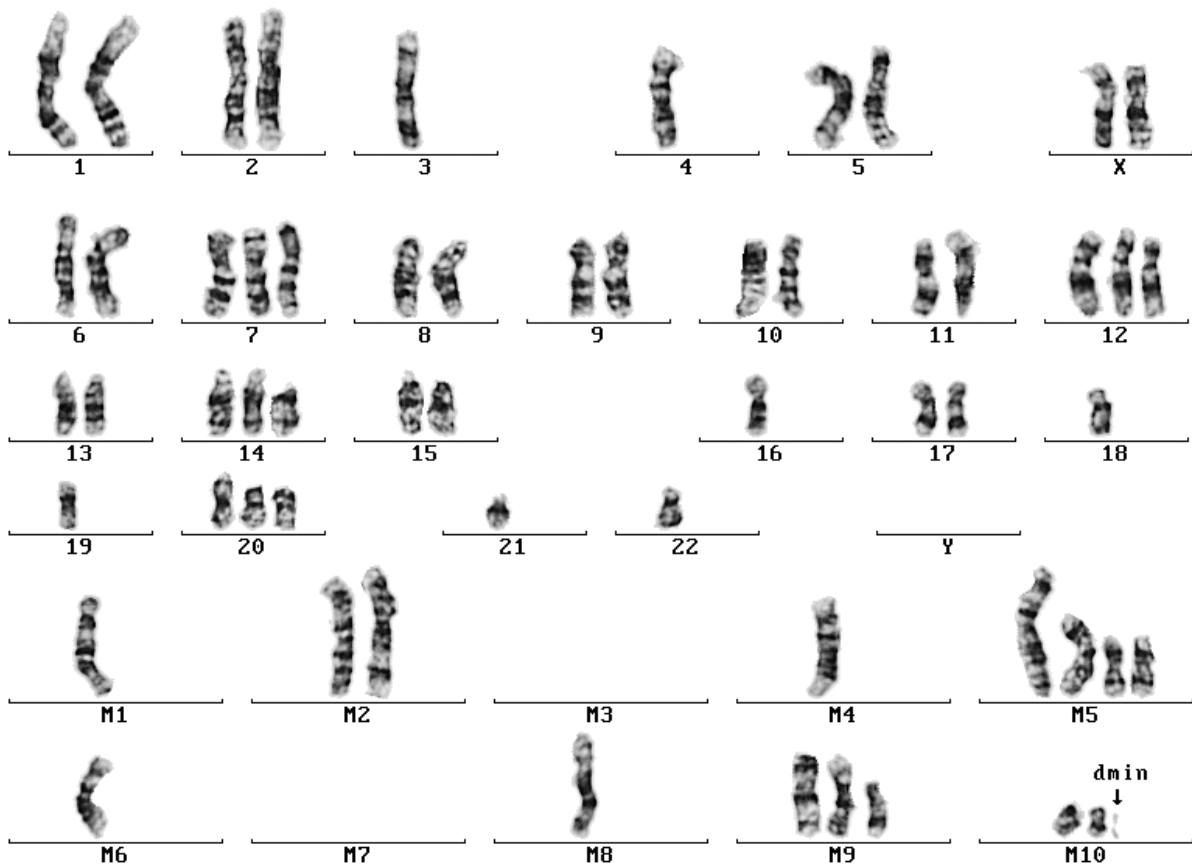


Abb. 41: Karyogramm einer Metaphase aus HeLa-2-MTX-10.0. Angaben zum Karyotyp s. S. 82

B.5.2) Kopienanzahlen der normalen Chromosomen in der HeLa-Parentallinie und den Sublinien HeLa-1-MTX-1.0, HeLa-2-MTX-1.0 und HeLa-2-MTX-10.0

B.5.2.1) Kopienanzahlen der normalen Chromosomen in der HeLa-Parentallinie

Bei der Parentallinie wurden insgesamt 39 Metaphasen mit einer Chromosomenanzahl von 62-68 ausgewertet. Die Metaphasen enthielten 15-24 Markerchromosomen. Bei den normalen Chromosomen schwankte die Kopienanzahl zwischen 0 und 3. 12 der 23 verschiedenen normalen Chromosomen lagen in mehr als 50% der Metaphasen in zweifacher Kopie vor (s. Abb. 42).

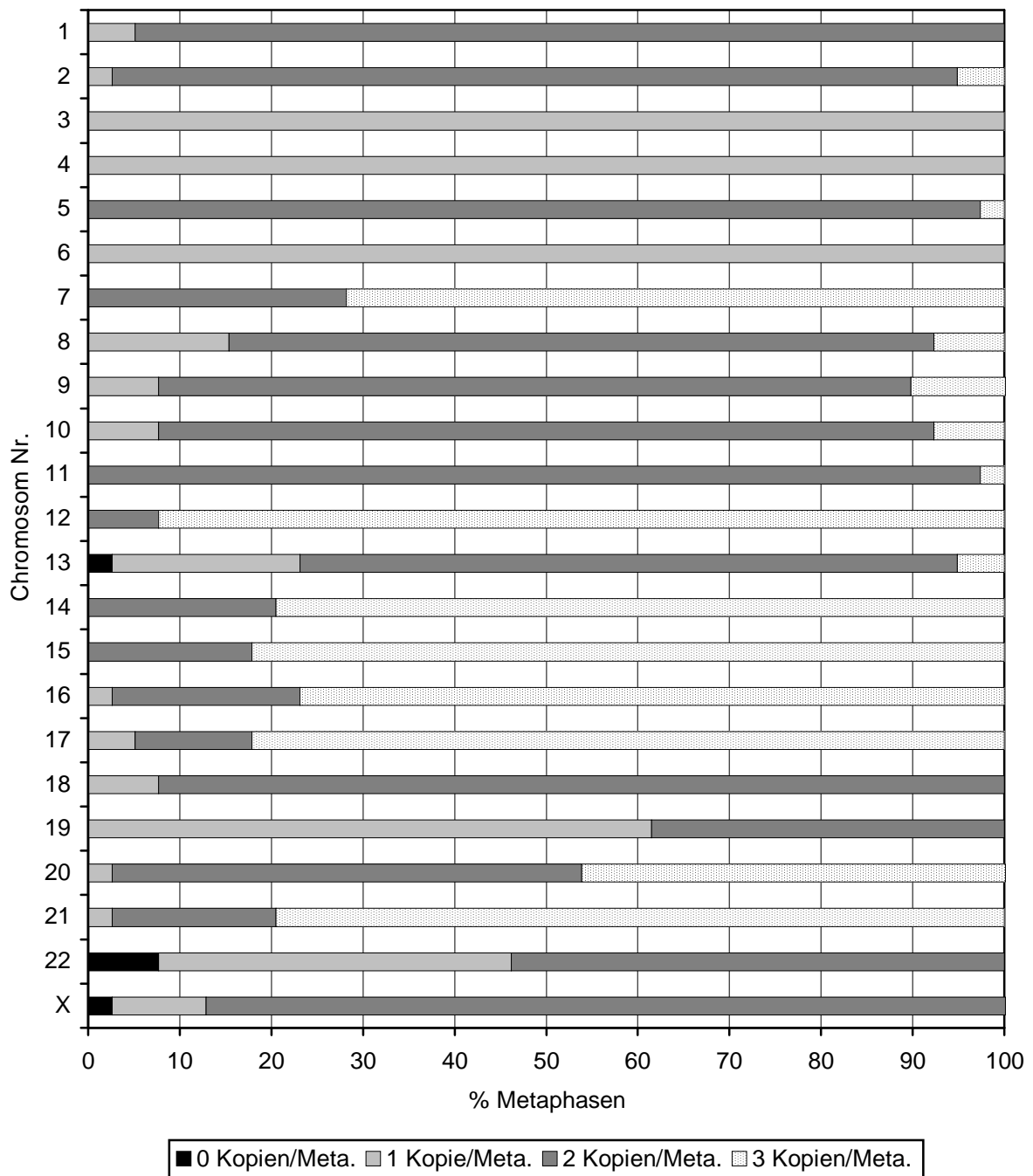


Abb. 42: Häufigkeit von Metaphasen mit der in der Legende angegebenen Kopienanzahl pro Metaphase (Kopien/Meta.) für die normalen Chromosomen in der HeLa-Parentallinie.

B.5.2.2) Kopienanzahlen der normalen Chromosomen in HeLa-1-MTX-1.0

Die 21 ausgewerteten Metaphasen von HeLa-1-MTX-1.0 wiesen 65-68 Chromosomen auf. Die Anzahl der Markerchromosomen lag zwischen 17 und 24. Für die 23 verschiedenen normalen Chromosomen wurde eine Kopienanzahl von 0-4 pro Metaphase ermittelt (s. Abb. 43). HSRs waren nicht vorhanden, aber alle Metaphasen enthielten Dmin.

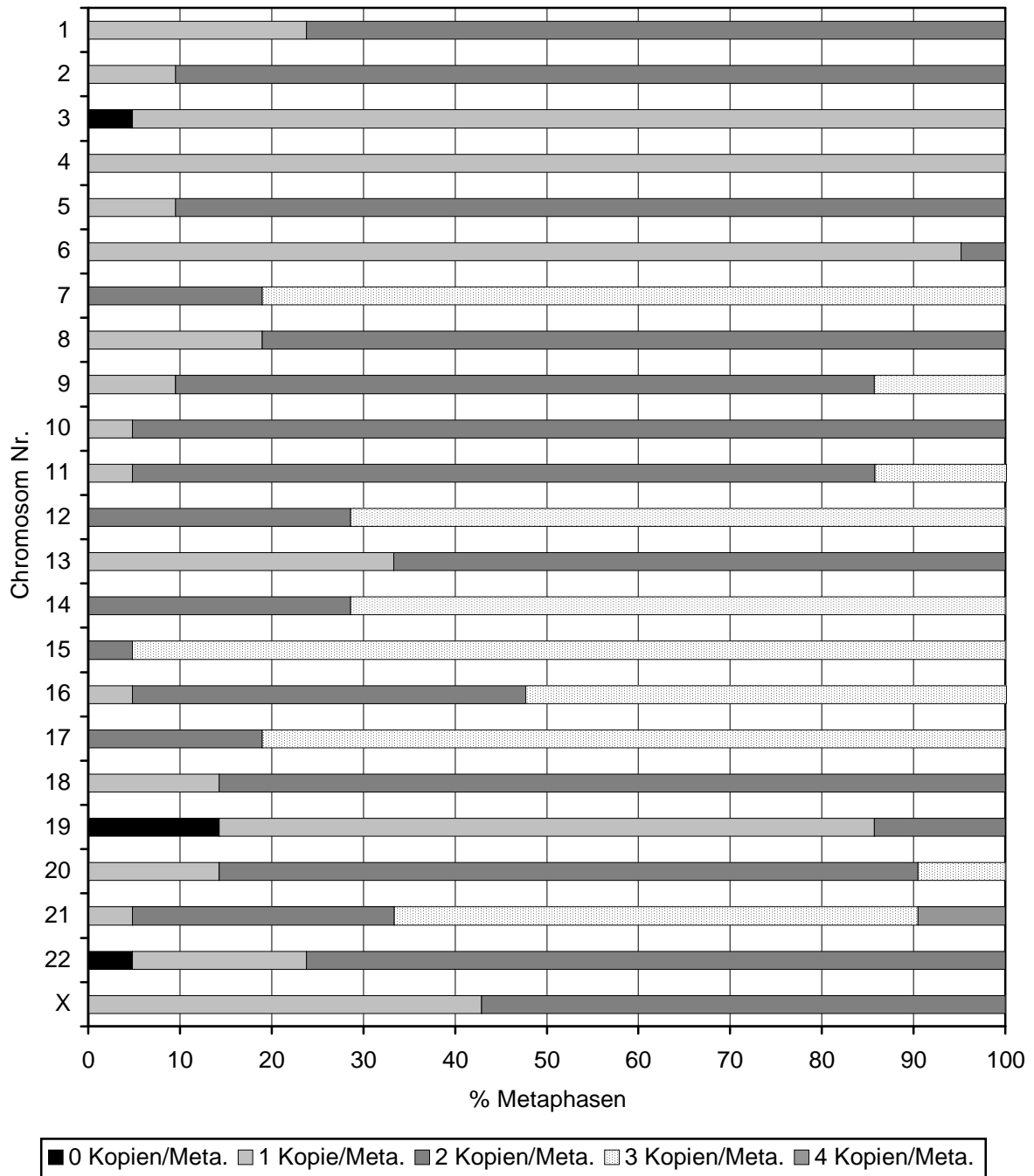


Abb. 43: Häufigkeit von Metaphasen mit der in der Legende angegebenen Kopienanzahl pro Metaphase (Kopien/Meta.) für die normalen Chromosomen in HeLa-1-MTX-1.0.

B.5.2.3) Kopienanzahlen der normalen Chromosomen in HeLa-2-MTX-1.0

Bei HeLa-2-MTX-1.0 wurden 20 Metaphasen karyotypisiert, von denen 18 Dmin enthielten. HSRs wurden nicht gefunden. Pro Metaphase lagen 58-67 Chromosomen vor, mit Ausnahme einer Metaphase mit 111 Chromosomen. Die Anzahl der Markerchromosomen betrug 17-41. Normale Chromosomen traten in den Metaphasen in Kopienanzahlen zwischen 0 und 6 auf (s. Abb. 44).

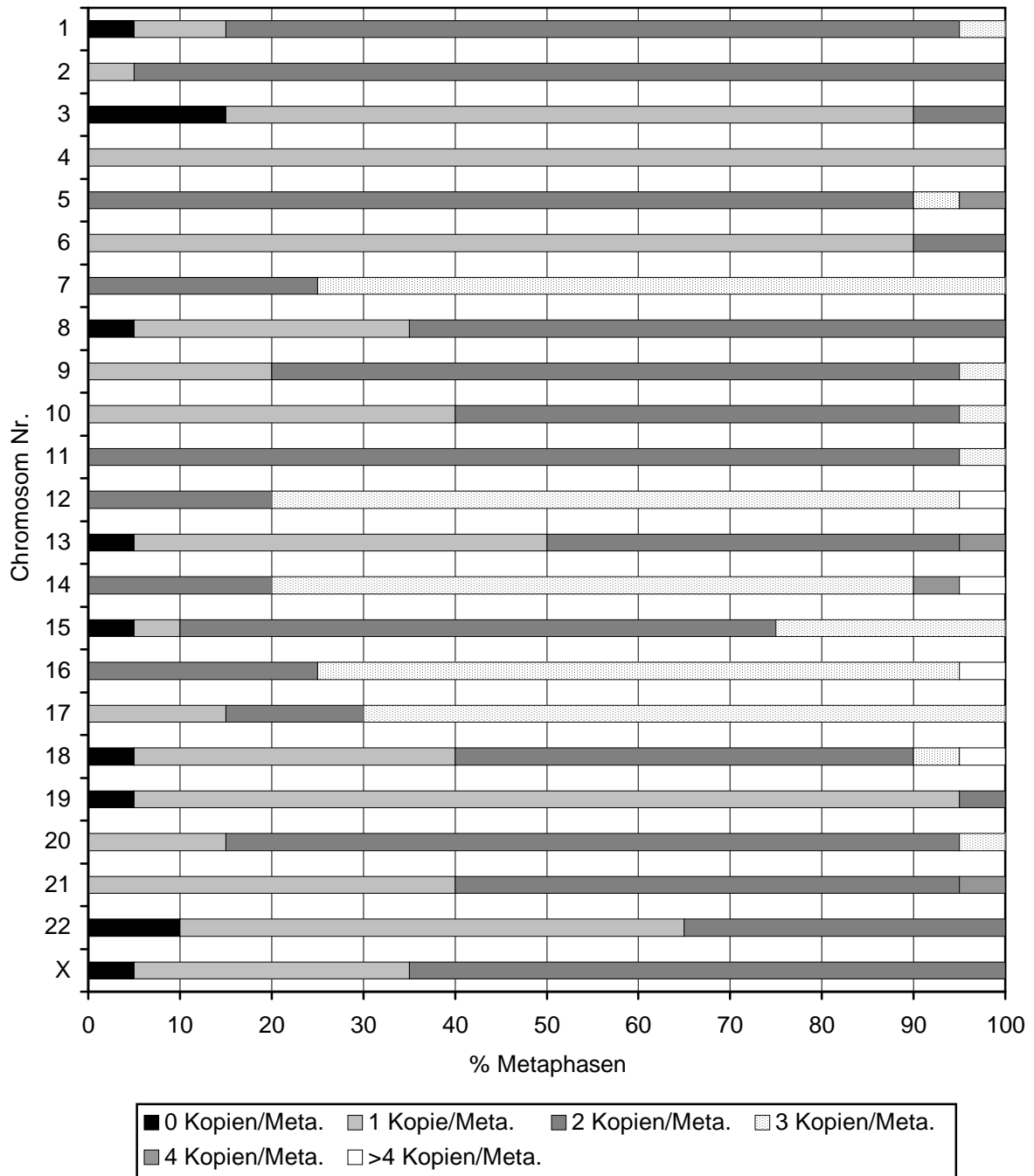


Abb. 44: Häufigkeit von Metaphasen mit der in der Legende angegebenen Kopienanzahl pro Metaphase (Kopien/Meta.) für die normalen Chromosomen in HeLa-2-MTX-1.0.

B.5.2.4) Kopienanzahlen der normalen Chromosomen in HeLa-2-MTX-10.0

Die 25 ausgewerteten Metaphasen von HeLa-2-MTX-10.0 wiesen keine Chromosomen mit HSRs auf, jedoch wurden in 24 Metaphasen Dmin detektiert. Bei einer Gesamtanzahl von 56-65 Chromosomen lagen pro Metaphase zwischen 15 und 24 Markerchromosomen vor. Die normalen Chromosomen erreichten in den Metaphasen Kopienanzahlen zwischen 0 und 4 (s. Abb. 45).

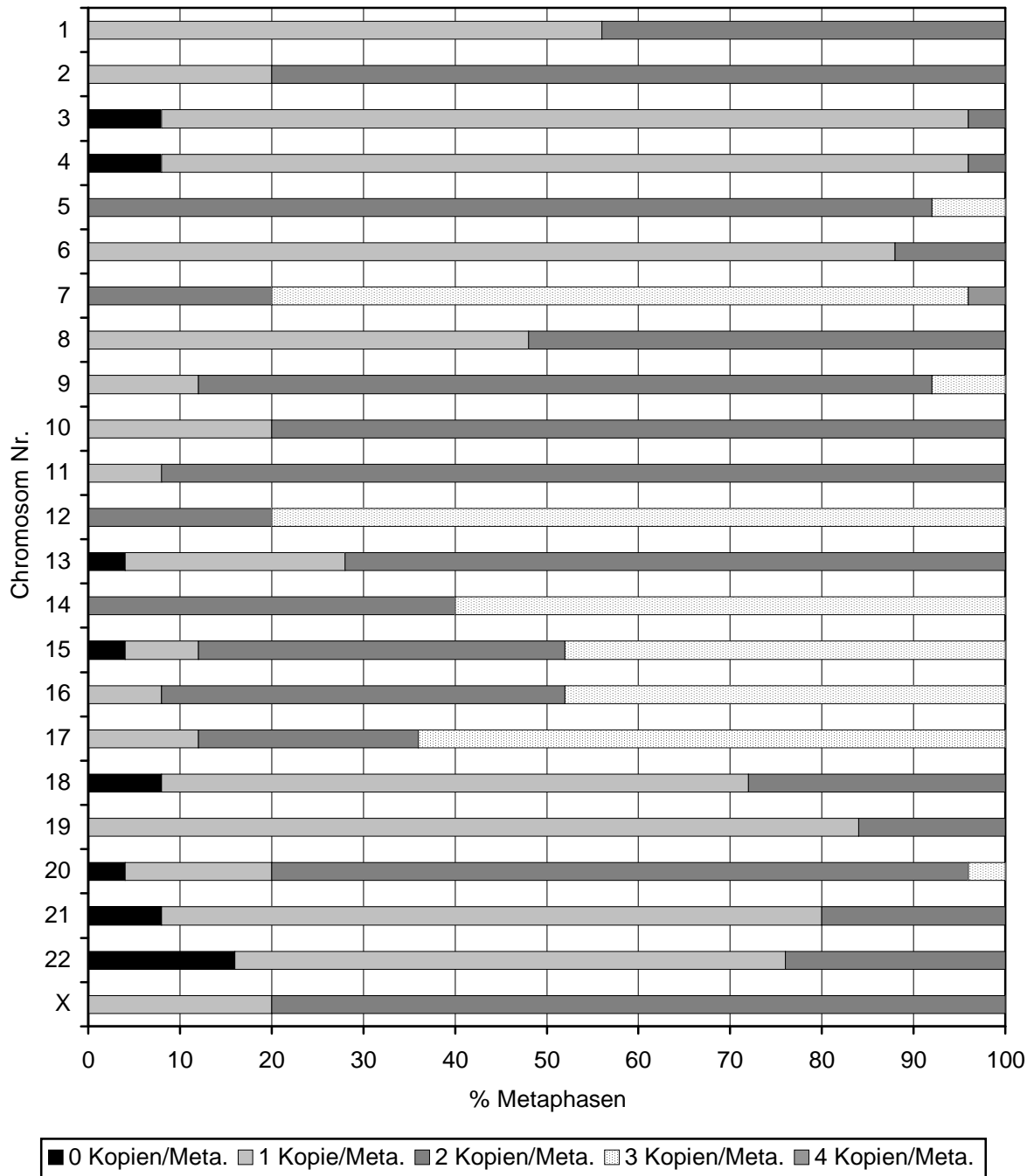


Abb. 45: Häufigkeit von Metaphasen mit der in der Legende angegebenen Kopienanzahl pro Metaphase (Kopien/Meta.) für die normalen Chromosomen in HeLa-2-MTX-10.0.

B.5.3) Modale Kopienanzahl der normalen Chromosomen bei der HeLa-Parentallinie und den Sublinien HeLa-1-MTX-1.0, HeLa-2-MTX-1.0 und HeLa-2-MTX-10.0

Die Karyotypauswertung der HeLa-Parentallinie und der MTX-Sublinien zeigte, dass jedes der 23 normalen Chromosomen in etwa 50% der untersuchten Metaphasen einer Linie eine jeweils individuelle, aber einheitliche Kopienanzahl aufwies. Daher konnte für jedes normale Chromosom eine modale Kopienanzahl festgelegt werden, die der am häufigsten aufgetretenen Kopienanzahl in den ausgewerteten Metaphasen einer HeLa-Linie entsprach (s. Tab. 8). Bei jeder HeLa-Linie lagen die normalen Chromosomen i.d.R. in mehr als 50% der karyotypisierten Metaphasen in der ermittelten modalen Kopienanzahl vor.

In der Parentallinie wiesen 12 der 23 normalen Chromosomen eine modale Kopienanzahl von zwei auf. 4 der normalen Chromosomen waren in nur einer Kopie und 7 in dreifacher Kopie vorhanden (s. Tab. 8). Diese Kopienanzahlen entsprachen bei den meisten Chromosomen den Werten, die in der Literatur (Chen 1988) als modale Kopienanzahlen für die verwendete HeLa S3-Zelllinie beschrieben worden sind. Ausnahmen bildeten die Chromosomen (#) 4, 6 und 18, für die in der Literatur (s.o.) eine um eins (#4 und #18) bzw. um zwei (#6) höhere Kopienanzahl angegeben wird.

Der Vergleich der modalen Kopienanzahlen von Parentallinie und den untersuchten MTX-Sublinien ergab bei Sublinie HeLa-1-MTX-1.0 keine Unterschiede. In den Sublinien HeLa-2-MTX-1.0 und HeLa-2-MTX-10.0 waren jedoch bei mehreren normalen Chromosomen erniedrigte modale Kopienanzahlen zu verzeichnen (s. Tab. 8). HeLa-2-MTX-1.0 wies einen Verlust von je einer Kopie bei den Chromosomen 13, 15, 21 und 22 und HeLa-2-MTX-10.0 bei den Chromosomen 1, 18 und 22 auf. Eine um zwei verringerte modale Kopienanzahl trat nur in HeLa-2-MTX-10.0 bei #21 auf.

Die Abnahme der modalen Kopienanzahl bei einigen normalen Chromosomen kann sowohl auf einen Verlust dieser Chromosomen als auch auf ihre Beteiligung an chromosomalen Rearrangements mit Bildung neuer Markerchromosomen hinweisen. Letzteres muss nicht mit einem tatsächlichen Chromosomenverlust einhergehen, lässt aber auf Bruch- und Rekombinationsereignisse an den betroffenen Chromosomen schliessen.

Tabelle 8: Modale Kopienanzahl der normalen Chromosomen in den Metaphasen der HeLa-Parentallinie und der Sublinien HeLa-1-MTX-1.0, HeLa-2-MTX-1.0 und HeLa-2-MTX-10.0

HeLa-Linie	Modale Kopienanzahl der normalen Chromosomen in >50% der Metaphasen			Veränderungen der modalen Kopienanzahl im Vergleich zur Parentallinie
	Chromosomen mit 1 Kopie	Chromosomen mit 2 Kopien	Chromosomen mit 3 Kopien	
HeLa-Parentallinie	3, 4, 6, 19	1, 2, 5, 8, 9, 10, 11, 13, 18, 20, 22, X	7, 12, 14, 15, 16, 17, 21	/
HeLa-1-MTX-1.0	3, 4, 6, 19	1, 2, 5, 8, 9, 10, 11, 13, 18, 20, 22, X	7, 12, 14, 15, 16, 17, 21	—
HeLa-2-MTX-1.0	3, 4, 6, 13 ^a , 19, 22	1, 2, 5, 8, 9, 10, 11, 13 ^a , 15, 18, 20, 21, X	7, 12, 14, 16, 17	-13 ^a , -15, -21, -22
HeLa-2-MTX-10.0	1, 3, 4, 6, 18, 19, 21, 22	2, 5, 8, 9, 10, 11, 13, 20, X	7, 12, 14, 15 ^b , 16 ^b , 17	-1, -18, -21, -21, -22

^a in 45% der Metaphasen; ^b in 48% der Metaphasen

B.6) 5q-Status in den HeLa-MTX-Sublinien

Die Bestimmung des 5q-Status, d.h. der Anzahl der 5q-Kopien sowie der 5q-Trägerchromosomen pro Metaphase (s. Methoden, E.3), ermöglichte eine genaue Analyse der Veränderungen des *DHFR*-tragenden Chromosomenarms im Verlauf der MTX-Selektionen. Bei allen HeLa-MTX-Linien konnten mindestens 90 der 100 auf Aberrationen (s. B.4) ausgewerteten Metaphasen auf ihren 5q-Status untersucht werden. Dabei wurden die Metaphasen nach ihrer Chromosomenanzahl und unter Zusammenfassung der Chromosomenanzahlklassen von B.3.1) in eine Metaphasengruppe mit ≤ 69 (55-69) Chromosomen und eine Metaphasengruppe mit >69 Chromosomen eingeteilt. Der Grenzwert von 69 Chromosomen wurde nach den Ergebnissen von B.3) gewählt, um den 5q-Status des überwiegenden, hypotriploiden Metaphasenanteils getrennt von dem des Metaphasenanteils mit höherem Ploidiegrad zu erfassen. Dies erlaubte bei Vorliegen einer erhöhten 5q-Anzahl einen Rückschluss auf die Art des 5q-Zugewinns. In der Metaphasengruppe mit ≤ 69 Chromosomen konnte eine 5q-Zunahme infolge einer Polyploidisierung, d.h. einer Erhöhung der Kopienanzahl aller Chromosomen, ausgeschlossen werden, so dass ein selektiver 5q-Zugewinn wahrscheinlicher erschien. In der Metaphasengruppe mit >69 Chromosomen waren dagegen beide Möglichkeiten denkbar.

B.6.1) 5q-Status in der HeLa-Parentallinie

Die HeLa-Parentallinie wies 97% Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen auf (s. B.3.1), die alle drei 5q enthielten. Als 5q-Trägerchromosomen wurden zwei Chromosomen (#) 5 und ein derivatives Chromosom, das einem $\text{der}(3;5)(p10;q10)$ entsprach und im folgenden mit 'm5' abgekürzt wird, identifiziert (s. Abb. 46). Da dieser 5q-Status in allen ausgewerteten Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen vorlag, wurde er als der für die Parentallinie charakteristische Status angesehen und als '5q-Normalstatus', abgekürzt 'N', bezeichnet. Die Kombination der 5q-Trägerchromosomen beim 5q-Normalstatus wurde in Kurzform mit der Formel $N = 2\#5 + m5$ beschrieben. Die Anzahl von drei 5q pro Metaphase entsprach einer trisomen Kopienanzahl von 5q bei der Parentallinie, ohne dass jedoch eine Trisomie von #5 vorhanden war. Metaphasen mit >69 Chromosomen traten bei der Parentallinie zu 3% auf (s. B.3.1). In 1% dieser Metaphasen wurden eine 5q-Anzahl von drei sowie der 5q-Normalstatus und in 2% höhere 5q-Anzahlen von fünf bis neun in Verbindung mit anderen 5q-Status (s. B.6.4.2) ermittelt.



Abb. 46: 5q-Trägerchromosomen in 97% der Metaphasen der HeLa-Parentallinie. Neben zwei Chromosomen (#) 5 ist ein derivatives Chromosom (m5) vorhanden, das eine Fusion zwischen 3p und 5q darstellt. Das centromerliefernde Chromosomensegment des m5 konnte nach dem G-Bandenmuster nicht eindeutig identifiziert werden. Dieser 5q-Status wurde als '5q-Normalstatus', abgekürzt 'N', bezeichnet (Formel: $N = 2\#5 + m5$).

B.6.2) Gaps und Brüche in 5q

In den Metaphasen der HeLa-MTX-Sublinien wurden Gaps und Brüche in den 5q-Trägerchromosomen #5 und m5 (s. B.6.1) nur selten beobachtet. Gaps waren innerhalb der 5q-Trägerchromosomen als nicht angefärbte Orte auch in den negativen (hellen) G-Banden erkennbar, da diese Banden eine noch gut

sichtbare Färbung aufwiesen (s. Abb. 46). Brüche wurden aufgrund der Dislokation des entstandenen azentrischen Fragments detektiert. Beide Aberrationen traten innerhalb von #5 und m5 in unterschiedlichen Regionen von 5q auf (5p von #5 war nie betroffen) (s. Abb. 47).

In den MTX-Sublinien von Selektion 1 lagen insgesamt drei Gaps und zwei Brüche in 5q in fünf Metaphasen (aus HeLa-1-MTX-0.03/1 (1), HeLa-1-MTX-0.03/2 (2), HeLa-1-MTX-0.25 (1) und HeLa-1-MTX-0.50 (1)) vor. Die Gaps waren alle in der Region 5q13 lokalisiert, jedoch in einer Metaphase in #5 und in zwei Metaphasen in m5. Die Chromosomenbrüche betrafen beide die Centromerregion in m5.

Die HeLa-2-MTX-Sublinien zeigten insgesamt zwei Gaps und einen Bruch in 5q in drei Metaphasen (aus HeLa-2-MTX-0.06 (1) und HeLa-2-MTX-1.0 (2)). Je ein Gap traten in 5q15 (#5) und 5q21 (m5) auf. Der einzige Bruch (Chromatidbruch) wurde in 5q31 (#5) beobachtet.

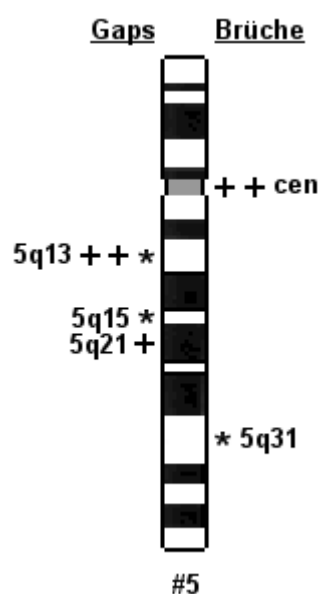


Abb. 47: Ideogramm von Chromosom (#) 5 mit Markierung der 5q-Regionen, in denen Gaps und Brüche bei den HeLa-MTX-Sublinien auftraten. Die 5q-Regionen von #5 und m5 (s. B.6.1) sind zur Unterscheidung durch verschiedene Symbole (* und +, s.u.) gekennzeichnet. Die Bandenbezeichnungen der von einem Gap oder Bruch betroffenen Regionen sind angegeben.

Die Anzahl der Symbole entspricht der Häufigkeit, mit der eine 5q-Region in #5 bzw. m5 von einem Gap oder Bruch betroffen wurde.

* = 5q-Region in #5 mit einem Gap oder Bruch

+ = 5q-Region in m5 (s. B.6.1) mit einem Gap oder Bruch

B.6.3) 5q-Anzahl pro Metaphase

Zur besseren Übersicht wurden die ausgewerteten Metaphasen der HeLa-MTX-Sublinien nach ihrer 5q-Anzahl in drei Kategorien eingeteilt (s. Tab. 9). Die Erstellung der Kategorien erfolgte auf Grundlage der bei der Parentallinie vorherrschenden 5q-Anzahl von drei (s. B.6.1).

Tabelle 9: Metaphasenkategorien nach 5q-Anzahl

5q-Anzahl pro Metaphase	Metaphasenkategorie
3	Metaphasen mit 3x5q
>3	Metaphasen mit >3x5q
<3	Metaphasen mit <3x5q

Bei der HeLa-Parentallinie traten in der Metaphasengruppe mit ≤ 69 Chromosomen ausschließlich Metaphasen mit 3x5q auf (s. B.6.1). Höhere 5q-Anzahlen ($>3x5q$) wurden nur in 2% Metaphasen mit >69 Chromosomen und 5q-Anzahlen unter drei ($<3x5q$) gar nicht beobachtet.

In den MTX-Sublinien von Selektion 1 lag der überwiegende Anteil der ausgewerteten Metaphasen, d.h. mindestens 89%, in der Metaphasengruppe mit ≤ 69 Chromosomen vor. In dieser Gruppe zeigten sich bei

einzelnen HeLa-1-MTX-Sublinien deutliche Unterschiede in den Häufigkeiten der Metaphasen mit $3x5q$, $>3x5q$ und $<3x5q$ im Vergleich zur Parentallinie. Die ersten Veränderungen in der 5q-Anzahl pro Metaphase wurden bei den Sublinien HeLa-1-MTX-0.06 und HeLa-1-MTX-0.12 beobachtet, die beide erhöhte Anteile von Metaphasen mit $>3x5q$ (HeLa-1-MTX-0.06: 19%; HeLa-1-MTX-0.12: 25.5%) enthielten (s. Abb. 48). Gleichzeitig wiesen beide Sublinien eine entsprechende Reduktion der Metaphasen mit $3x5q$ auf. Bei den nachfolgenden Sublinien HeLa-1-MTX-0.25 und HeLa-1-MTX-0.50 nahm der Metaphasenanteil mit $3x5q$ weiter ab (HeLa-1-MTX-0.25: 41%; HeLa-1-MTX-0.50: 22%). Parallel dazu trat eine starke Anreicherung von Metaphasen mit verringerter 5q-Anzahl ($<3x5q$) auf 50% bei HeLa-1-MTX-0.25 und 65% bei HeLa-1-MTX-0.50 ein. Metaphasen mit $>3x5q$ erreichten dagegen nur geringe Anteile von 8% bei HeLa-1-MTX-0.25 und 2% bei HeLa-1-MTX-0.50. Die letzte Sublinie HeLa-1-MTX-1.0 zeigte mit 80% Metaphasen mit $3x5q$ und nur noch 13% Metaphasen mit $<3x5q$ eine Umkehr der Tendenzen der beiden vorherigen Sublinien, unterschied sich aber mit diesen Werten dennoch signifikant von der Parentallinie. Metaphasen mit >69 Chromosomen traten bei den einzelnen HeLa-1-MTX-Sublinien nur zu 1-11% auf, so dass in dieser Metaphasengruppe aufgrund der niedrigen Häufigkeiten keine signifikanten Veränderungen der 5q-Anzahl erkennbar wurden. Die meisten Metaphasen mit >69 Chromosomen enthielten jedoch mehr als drei 5q (s. Abb. 49).

Bei den MTX-Sublinien von Selektion 2 wies der Hauptanteil (87-99%) der Metaphasen ≤ 69 Chromosomen auf. In dieser Metaphasengruppe zeigte bereits Sublinie HeLa-2-MTX-0.03/2 eine leichte Erniedrigung des Metaphasenanteils mit $3x5q$ (s. Abb. 50). Die nachfolgenden Sublinien HeLa-2-MTX-0.06 und HeLa-2-MTX-0.12 tendierten wie die entsprechenden MTX-Sublinien von Selektion 1 (s.o.) zu einer Anreicherung von Metaphasen mit $>3x5q$ (HeLa-2-MTX-0.06: 12%; HeLa-2-MTX-0.12: 28%) bei gleichzeitiger Abnahme von Metaphasen mit $3x5q$. Ab Sublinie HeLa-2-MTX-0.25 unterschieden sich die in den HeLa-2-MTX-Sublinien auftretenden Veränderungen jedoch deutlich von denen, die in den entsprechenden HeLa-1-MTX-Sublinien beobachtet wurden. Bei HeLa-2-MTX-0.25 trat, im Gegensatz zu HeLa-1-MTX-0.25, ein weiterer Anstieg der Metaphasen mit $>3x5q$ auf 48.5% ein. Der Metaphasenanteil mit $<3x5q$ erhöhte sich dagegen nur geringfügig (auf 7%). Metaphasen mit $3x5q$ waren wie bei HeLa-1-MTX-0.25 erheblich reduziert (34%). Sublinie HeLa-2-MTX-0.50 zeigte mit 79% Metaphasen mit $3x5q$, nur noch 5% Metaphasen mit $>3x5q$ und 3% Metaphasen mit $<3x5q$ wieder eine Annäherung an die bei der Parentallinie vorliegende Verteilung in den Metaphasenkategorien, die sich bei HeLa-2-MTX-1.0 fortsetzte. Der Metaphasenanteil mit $3x5q$ erreichte bei HeLa-2-MTX-1.0 mit 84% jedoch noch nicht den Wert der Parentallinie (97%). Sublinie HeLa-2-MTX-10.0 wies dagegen in keiner Metaphasenkategorie mehr Unterschiede zur Parentallinie auf.

Metaphasen mit >69 Chromosomen lagen in den HeLa-2-MTX-Sublinien in Anteilen von 1-13% vor und enthielten zum überwiegenden Teil mehr als drei 5q (s. Abb. 51). Signifikante Veränderungen der 5q-Anzahl waren in dieser Metaphasengruppe aufgrund der geringen Häufigkeiten jedoch nicht feststellbar.

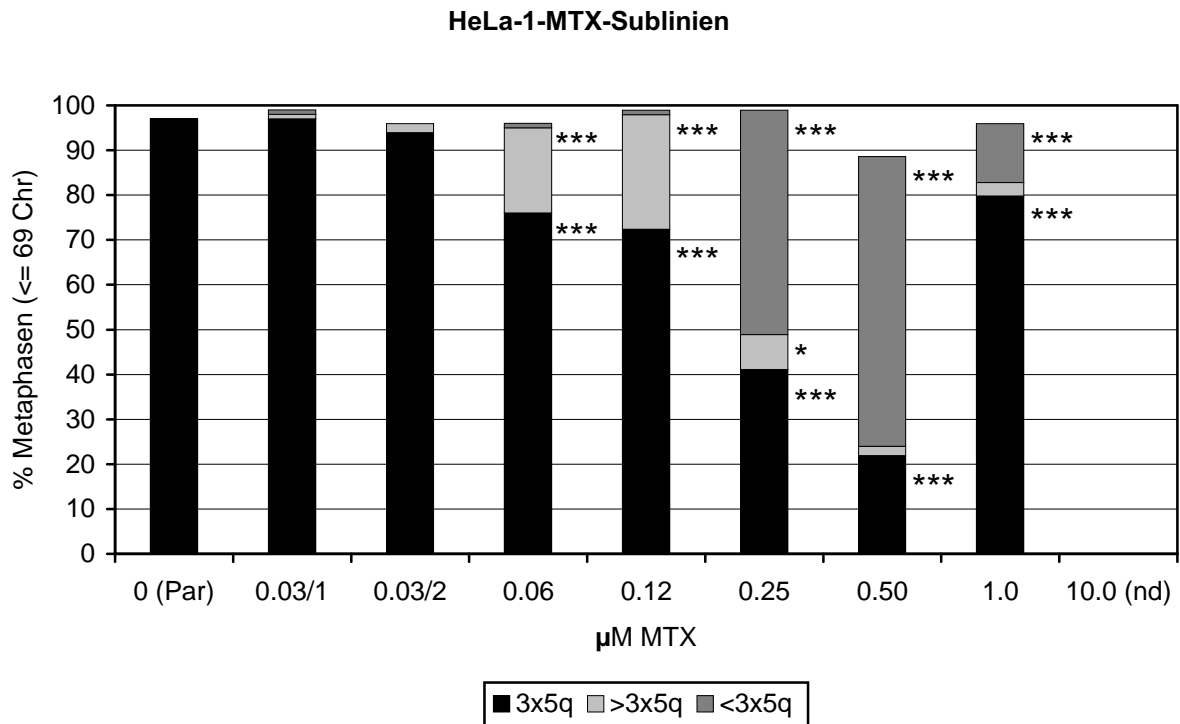


Abb. 48: Häufigkeit von Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen und der in der Legende aufgeführten 5q-Anzahl in den HeLa-1-MTX-Sublinien nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen.

Chr = Chromosomen; nd = nicht durchgeführt; Par = Parentallinie; Symbole (*): s. Methoden, J)

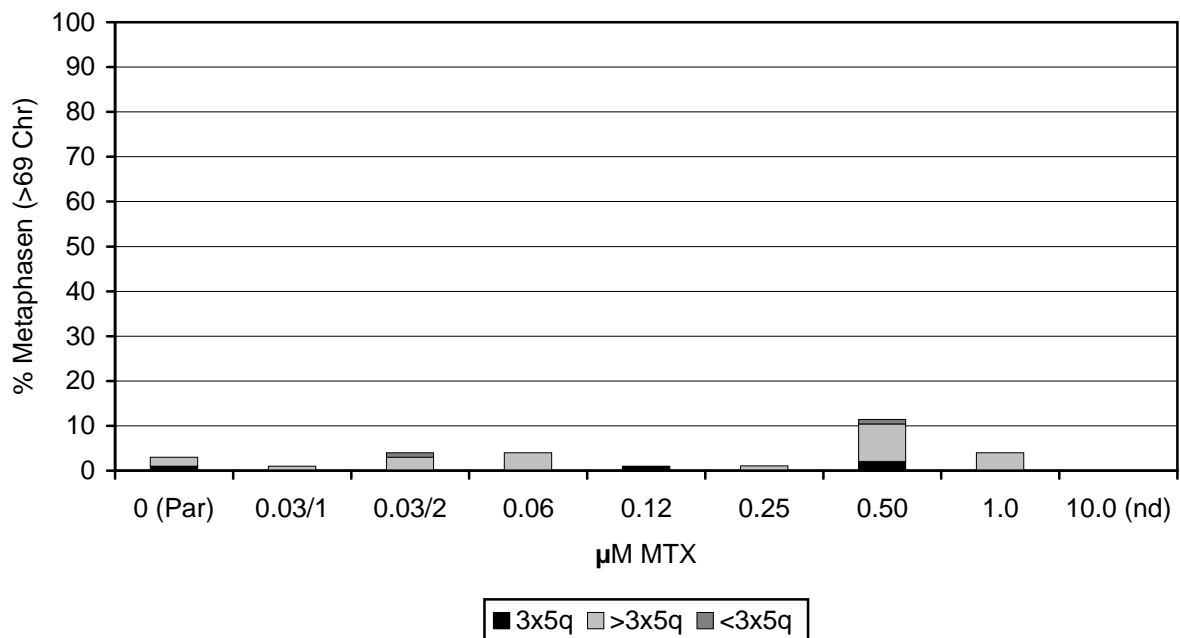


Abb. 49: Häufigkeit von Metaphasen mit >69 Chromosomen und der in der Legende aufgeführten 5q-Anzahl in den HeLa-1-MTX-Sublinien nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen.

Chr = Chromosomen; nd = nicht durchgeführt; Par = Parentallinie

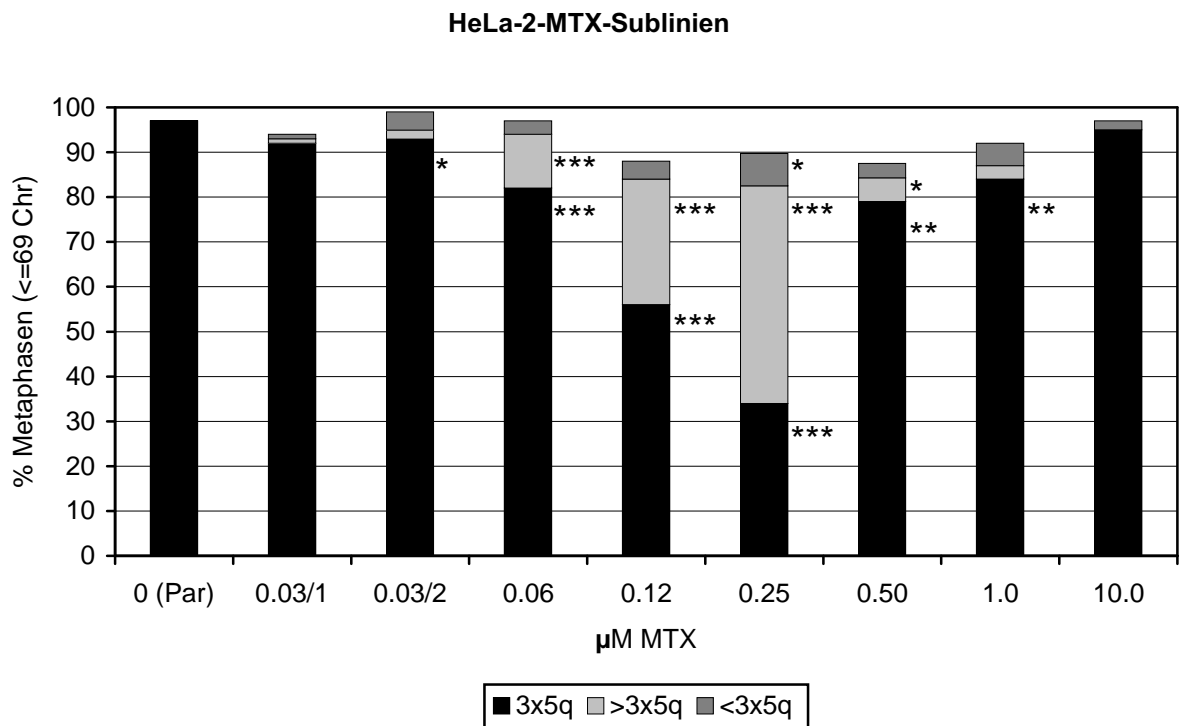


Abb. 50: Häufigkeit von Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen und der in der Legende aufgeführten 5q-Anzahl in den HeLa-2-MTX-Sublinien nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen.

Chr = Chromosomen; Par = Parentallinie; Symbole (*): s. Methoden, J)

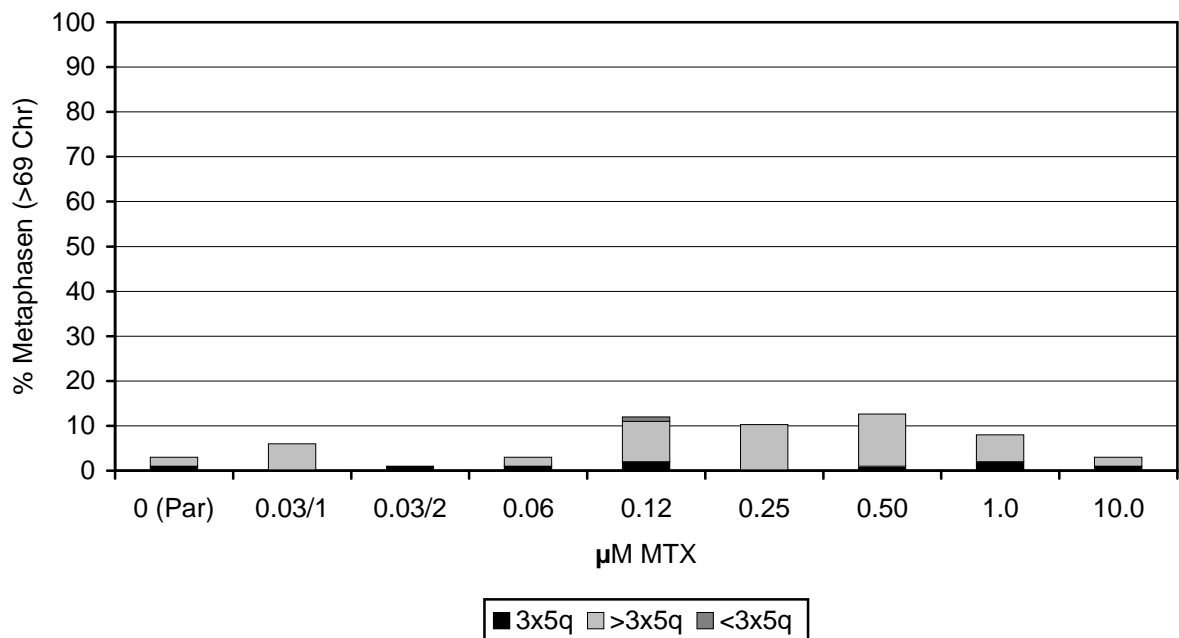


Abb. 51: Häufigkeit von Metaphasen mit > 69 Chromosomen und der in der Legende aufgeführten 5q-Anzahl in den HeLa-2-MTX-Sublinien nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen.

Chr = Chromosomen; Par = Parentallinie

B.6.4) 5q-Trägerchromosomen pro Metaphase

In den HeLa-MTX-Sublinien konnten bestimmte Kombinationen von 5q-Trägerchromosomen ermittelt werden, die jeweils in einem größeren Anteil von Metaphasen vorlagen. Diese Kombinationen wurden als Kategorien zur Metaphasensortierung verwendet und als Formel in Relation zum 5q-Normalstatus (N; s. B.6.1) beschrieben (s. Tab. 10). Dabei wurden derivative Chromosomen mit ein oder zwei vollständigen 5q, die in den HeLa-MTX-Sublinien neu auftraten, zusammenfassend als 'derivative 5q-haltige Chromosomen' bezeichnet (unter Ausschluss des m5 (s. B.6.1)) und nach Anzahl der enthaltenen 5q in derivative Chromosomen mit einem 5q, abgekürzt 'Der(1x5q)', und mit zwei 5q, abgekürzt 'Der(2x5q)', eingeteilt.

Tabelle 10: Metaphasenkategorien nach Kombination der 5q-Trägerchromosomen

Metaphasen mit	Kategorie	Kombination der 5q-Trägerchromosomen	Σ 5q
3x5q	N	5q-Normalstatus: $N = 2\#5+m5$ (s. B.6.1)	3
	Nicht N	anderer 5q-Status als N	3
>3x5q	N+#5	ein zusätzliches #5	4
	N+m5	ein zusätzliches m5	4
	N+1x5q ^a	ein zusätzliches 5q und 5q-Status $\neq N+\#5$ und $\neq N+m5$	4
	N+ $\geq 2x5q^a$	zwei oder mehr zusätzliche 5q	≥ 5
<3x5q	N-#5	ein #5 fehlt	2
	N-m5	ein m5 fehlt	2
	N-1x5q ^a	ein 5q fehlt und 5q-Status $\neq N-\#5$ und $\neq N-m5$	2
	N-2x5q ^a	zwei 5q fehlen	1

^a verschiedene Kombinationen der 5q-Trägerchromosomen möglich, s. B.6.4.1)-B.6.4.3)

B.6.4.1) 5q-Trägerchromosomen in Metaphasen mit 3x5q

Der 5q-Normalstatus (N; s. B.6.1), der bei der Parentallinie in allen Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen vorlag, trat auch bei fast allen HeLa-1-MTX-Sublinien in über 90% der Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen und 3x5q auf (s. Abb. 52). Metaphasen mit einem anderen Status als N (Nicht N) bei 3x5q wurden in fünf HeLa-1-MTX-Sublinien zu 1-3% beobachtet. Die einzige Ausnahme bildete HeLa-1-MTX-0.12, die 10% Metaphasen mit 3x5q und Nicht N enthielt. Von diesen zeigten 6% die Kombination N-#5+m5, 2% die Kombination N-#5+1Der(1x5q) und je 1% wiesen N-m5+1Der(1x5q) bzw. N+#5-m5 auf.

In der Metaphasengruppe mit >69 Chromosomen betrug der Anteil von Metaphasen mit 3x5q bei allen HeLa-1-MTX-Sublinien nur maximal 1%, da diese Metaphasen meist >3x5q enthielten. Ein anderer 5q-Status als N erschien nur in einer Metaphase der Sublinie HeLa-1-MTX-0.50 (mit N-#5+m5).

In der Metaphasengruppe mit ≤ 69 Chromosomen zeigten die Metaphasen mit 3x5q bei allen HeLa-2-MTX-Sublinien zum überwiegenden Teil den 5q-Normalstatus (s. Abb. 53). Metaphasen mit einem veränderten Status (Nicht N) bei 3x5q traten in fünf HeLa-2-MTX-Sublinien mit einer Häufigkeit von 1-8% auf. Das Maximum von 8% Metaphasen mit Nicht N lag, wie bei Selektion 1 (s.o.), in der Sublinie aus dem vierten Selektionsschritt, HeLa-2-MTX-0.12, vor und setzte sich aus 4% Metaphasen mit der Kombination N-#5+m5, 2% Metaphasen mit N-2#5+1Der(5)sp (Der(5)sp mit 2x5q; s. B.4.8) sowie jeweils 1% Metaphasen mit N-#5-m5+1Der(5)sp und N+#5-m5 zusammen.

Die Metaphasengruppe mit >69 Chromosomen enthielt bei allen HeLa-2-MTX-Sublinien nur einen Anteil von maximal 2% Metaphasen mit 3x5q, die ausschließlich den 5q-Normalstatus aufwiesen.

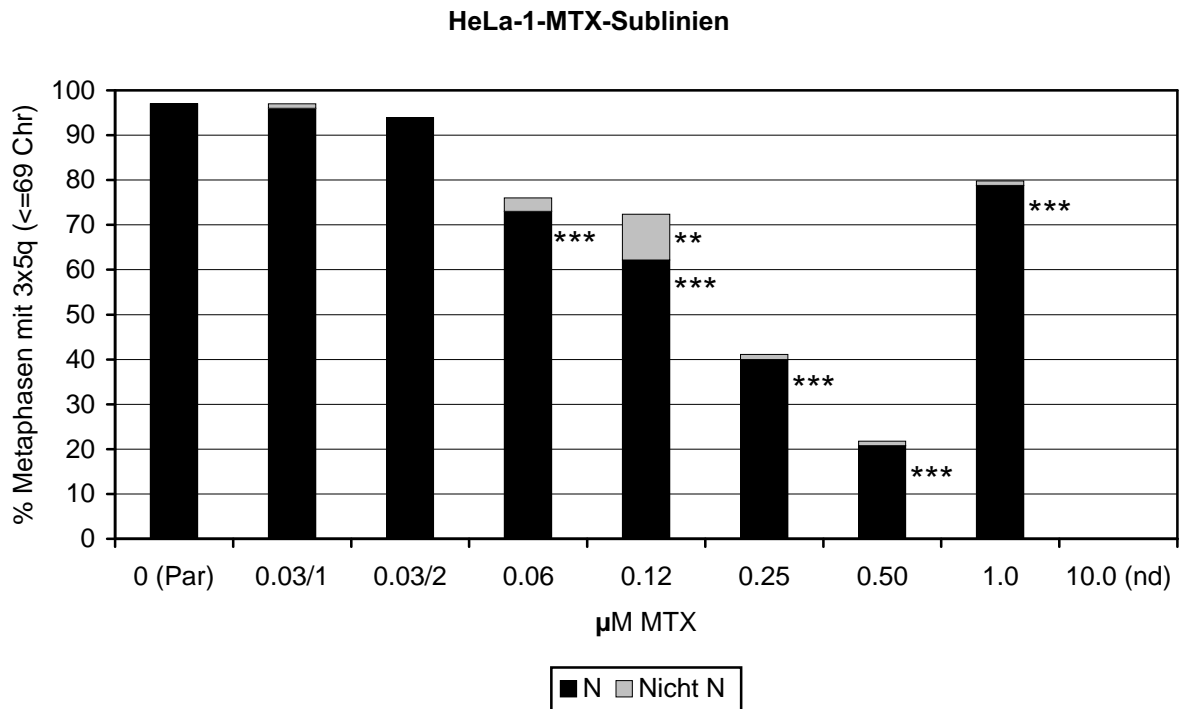


Abb. 52: Häufigkeit von Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen, 3x5q und dem in der Legende aufgeführten 5q-Status in den HeLa-1-MTX-Sublinien nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen. Chr = Chromosomen; nd = nicht durchgeführt; Par = Parentallinie; Symbole (*): s. Methoden, J)

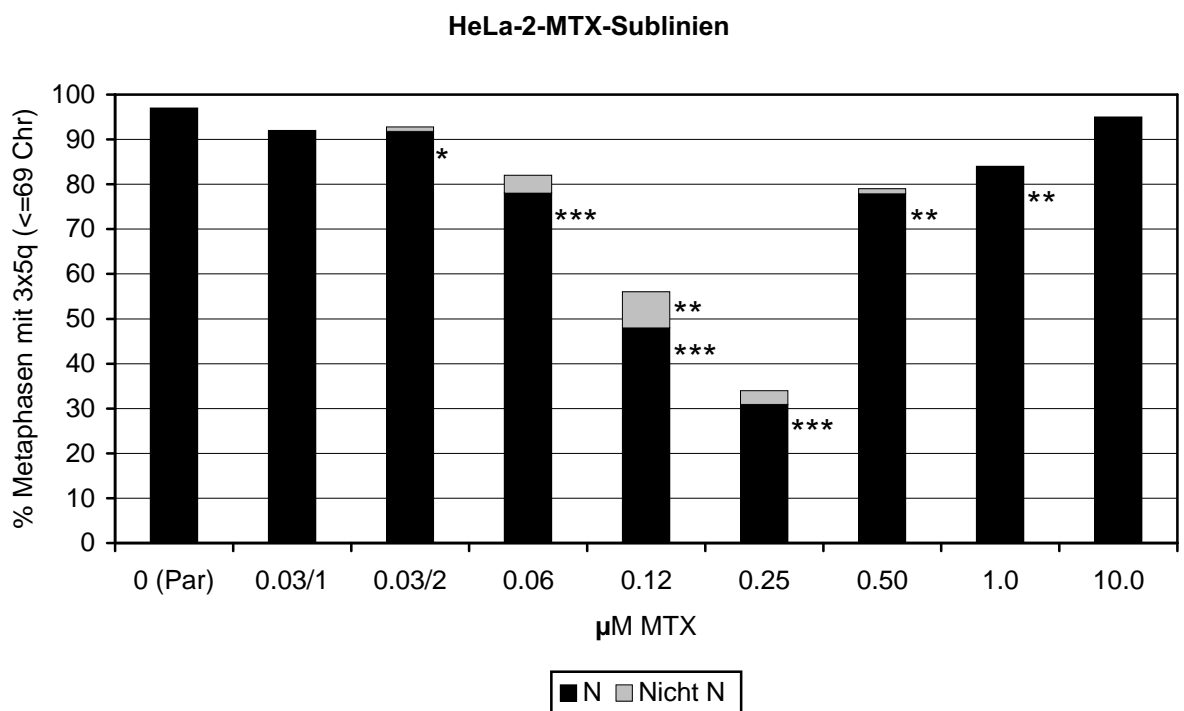


Abb. 53: Häufigkeit von Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen, 3x5q und dem in der Legende aufgeführten 5q-Status in den HeLa-2-MTX-Sublinien nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen. Chr = Chromosomen; Par = Parentallinie; Symbole (*): s. Methoden, J)

B.6.4.2) 5q-Trägerchromosomen in Metaphasen mit >3x5q

Die Parentallinie enthielt nur in der Metaphasengruppe mit >69 Chromosomen 2% Metaphasen mit erhöhter 5q-Anzahl (s. B.6.3), die jeweils zusätzliche Kopien von #5 und/oder m5 zeigten (je 1% mit der Kombination $N+2\#5$ und $N+4\#5+2m5$).

Bei Selektion 1 traten signifikant erhöhte Anteile an Metaphasen mit >3x5q bei ≤ 69 Chromosomen in den Sublinien HeLa-1-MTX-0.06, HeLa-1-MTX-0.12 und HeLa-1-MTX-0.25 auf (s. B.6.3). Dabei lag in den meisten Metaphasen ein Zugewinn von einem 5q und dementsprechend eine Gesamtanzahl von 4x5q vor. Zugewinne von zwei 5q waren nur in maximal 1% der Metaphasen pro MTX-Sublinie und höhere 5q-Zugewinne gar nicht zu beobachten.

Bei HeLa-1-MTX-0.06 wurde in 11% der insgesamt 19% Metaphasen mit >3x5q ein 5q-Zugewinn in Form eines zusätzlichen #5 ermittelt (5q-Status: $N+\#5$; s. Tab.10). Weitere 5% der Metaphasen wiesen ein zusätzliches m5 und 2% einen 5q-Zugewinn in anderer Form (5q-Status: $N+1x5q$; 1% mit $N+1Der(1x5q)$ und 1% mit $N+2\#5-m5$) auf. In 1% der Metaphasen konnte ein Zugewinn von zwei #5 verzeichnet werden (5q-Status: $N+\geq 2x5q$) (s. Abb. 54).

In der nachfolgenden Sublinie HeLa-1-MTX-0.12 traten insgesamt 25.5% Metaphasen mit >3x5q auf. Der Hauptanteil (18.4%) dieser Metaphasen zeigte trotz Verlust von einem #5 einen 5q-Zugewinn, der auf das Vorliegen eines zusätzlichen derivativen Chromosoms mit zwei vollständigen 5q ($Der(2x5q)$) zurückzuführen war (5q-Status: $N+1x5q$). Das zusätzliche $Der(2x5q)$ wurde in 17.3% der Metaphasen als $Der(5)sp$ (s. B.4.8) und in 1% als 5q-Isochromosom, $i(5)(q10)$, identifiziert. Im Gegensatz zur vorherigen MTX-Sublinie (s.o.) war der Zugewinn von einem #5 bei HeLa-1-MTX-0.12 nur noch in 4.1% der Metaphasen zu beobachten. Daneben wiesen 2% Metaphasen ein zusätzliches m5 (5q-Status: $N+m5$) und 1% einen Zugewinn von einem $Der(5)sp$ ohne #5-Verlust (5q-Status: $N+\geq 2x5q$) auf.

Sublinie HeLa-1-MTX-0.25 enthielt noch 3% Metaphasen mit einem $Der(5)sp$ und #5-Verlust sowie 1% Metaphasen mit $N+\#5$, 2% mit $N+m5$ und 1% mit $N+\geq 2x5q$ (Kombination: $N+\#5+1Der(1x5q)$).

In der Metaphasengruppe mit >69 Chromosomen lagen bei den HeLa-1-MTX-Sublinien überwiegend Metaphasen mit >3x5q vor, die jedoch aufgrund der niedrigen Gesamthäufigkeiten in dieser Gruppe (s. B.6.3) nicht mehr als maximal 8% der Metaphasen einer MTX-Sublinie repräsentierten. Die erhöhten 5q-Anzahlen von 4-8 waren in diesen Metaphasen i.d.R. durch zusätzliche Kopien von #5 und/oder m5 bedingt. Derivative 5q-haltige Chromosomen traten nur in einer Metaphase von HeLa-1-MTX-0.50 auf (mit $N+m5+2Der(5)sp$).

Bei Selektion 2 wurden in den Sublinien HeLa-2-MTX-0.06, HeLa-2-MTX-0.12, HeLa-2-MTX-0.25 und HeLa-2-MTX-0.50 signifikant erhöhte Anteile von Metaphasen mit >3x5q bei ≤ 69 Chromosomen gefunden (s. B.6.3). Der Hauptanteil dieser Metaphasen wies einen Zugewinn von einer 5q-Kopie (Gesamtanzahl: 4x5q) auf. Daneben lagen bis zu 7% Metaphasen mit Zugewinnen von zwei bis drei 5q vor.

Sublinie HeLa-2-MTX-0.06 enthielt insgesamt 12% Metaphasen mit >3x5q und ≤ 69 Chromosomen. Die 5q-Zugewinne resultierten bei 11% dieser Metaphasen aus der Anwesenheit eines zusätzlichen 5q-Trägerchromosoms, das in 6% der Metaphasen einem #5, in 4% einem m5 und in 1% einem $Der(1x5q)$ entsprach. 1% der Metaphasen zeigte die schon bei Selektion 1 (s.o.) beobachtete Kombination aus einem zusätzlichen $Der(5)sp$ (mit 2x5q; s. B.4.8) und Verlust eines #5 (5q-Status: $N+1x5q$) (s. Abb. 55).

Bei Sublinie HeLa-2-MTX-0.12 war in 14% von insgesamt 28% Metaphasen mit $>3x5q$ ein 5q-Zugewinn durch ein zusätzliches #5 feststellbar. Metaphasen mit einem Der(5)sp und #5-Verlust erreichten in dieser Sublinie, im Gegensatz zu HeLa-1-MTX-0.12, nur einen Anteil von 8%. Zugewinne von einem m5 oder Der(1x5q) traten in je 1% der Metaphasen auf. In weiteren 4% Metaphasen wurden zwei zusätzliche 5q-Kopien detektiert (5q-Status: $N+\geq 2x5q$), die bei 3% der Metaphasen in Form eines Der(5)sp und bei 1% in Form eines #5 und m5 vorlagen.

Sublinie HeLa-2-MTX-0.25 zeigte mit 48.5% den höchsten Anteil an Metaphasen mit $>3x5q$ von allen HeLa-2-MTX-Sublinien (s. B.6.3). 41.3% dieser Metaphasen wiesen einen Zugewinn von einem 5q auf, der bei 16.5% auf einem zusätzlichen #5, bei 12.4% auf einem zusätzlichen m5 und bei ebenfalls 12.4% auf einem zusätzlichen Der(5)sp in Kombination mit einem #5-Verlust beruhte. Ein geringerer Anteil von 7.2% Metaphasen enthielt Zugewinne von zwei bis drei 5q-Kopien. Die zusätzlichen 5q lagen in 4.1% der Metaphasen in Form eines 5q-Isochromosoms ($i(5)(q10)$), in 2.1% als m5 und/oder #5 und in 1% als Der(5)sp und m5 vor.

In der nachfolgenden Sublinie HeLa-2-MTX-0.50 betrug der Anteil an Metaphasen mit $>3x5q$ nur noch 5%. 5q-Zugewinne traten in jeweils 2% der Metaphasen als zusätzliches #5 bzw. als 5q-Isochromosom und in 1% als zusätzliches m5 auf.

Die Metaphasengruppe mit >69 Chromosomen enthielt bei den HeLa-2-MTX-Sublinien hauptsächlich Metaphasen mit $>3x5q$, die in den einzelnen MTX-Sublinien Anteile von maximal 12% erreichten. Die 5q-Anzahl schwankte bei diesen Metaphasen zwischen 4 und 15 und erreichte in mindestens 42% der Metaphasen einen Wert von ≥ 5 . Als zusätzlich vorliegende 5q-Trägerchromosomen wurden überwiegend #5 und/oder m5 und nur in wenigen Fällen derivative 5q-haltige Chromosomen (in 2-3% der Metaphasen von HeLa-2-MTX-0.12 und HeLa-2-MTX-0.25) ermittelt.

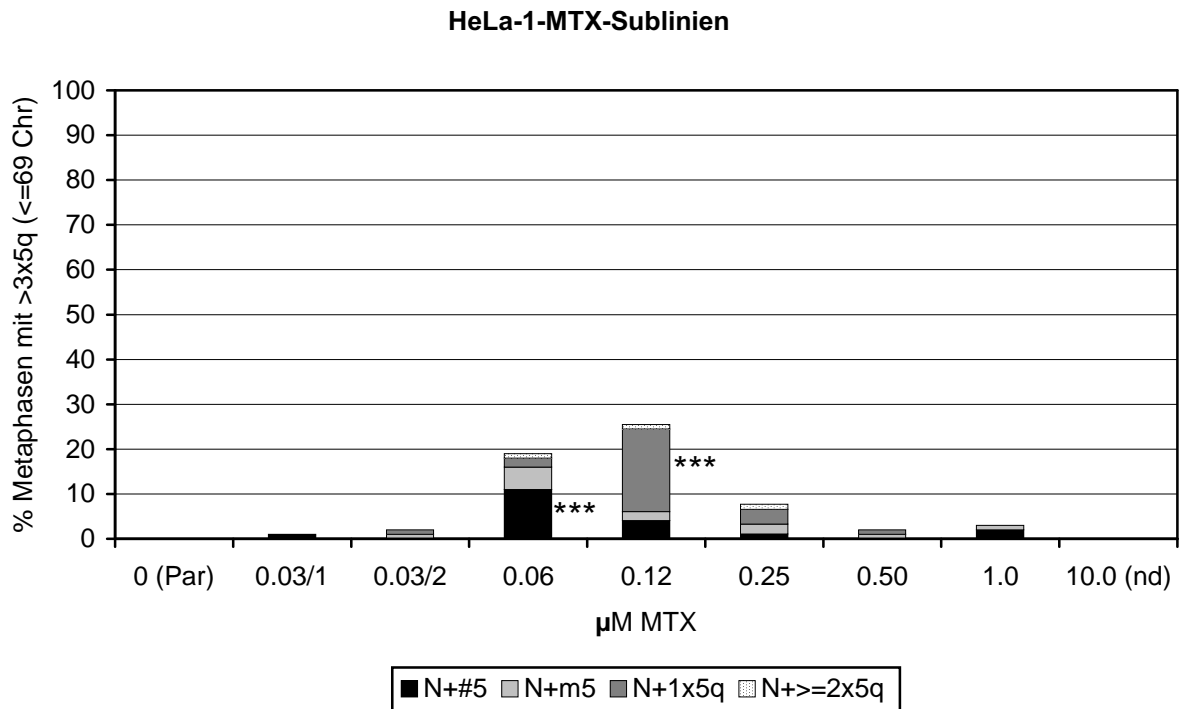


Abb. 54: Häufigkeit von Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen, $>3x5q$ und dem in der Legende aufgeführten 5q-Status in den HeLa-1-MTX-Sublinien nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen. Chr = Chromosomen; nd = nicht durchgeführt; Par = Parentallinie; Symbole (*): s. Methoden, J)

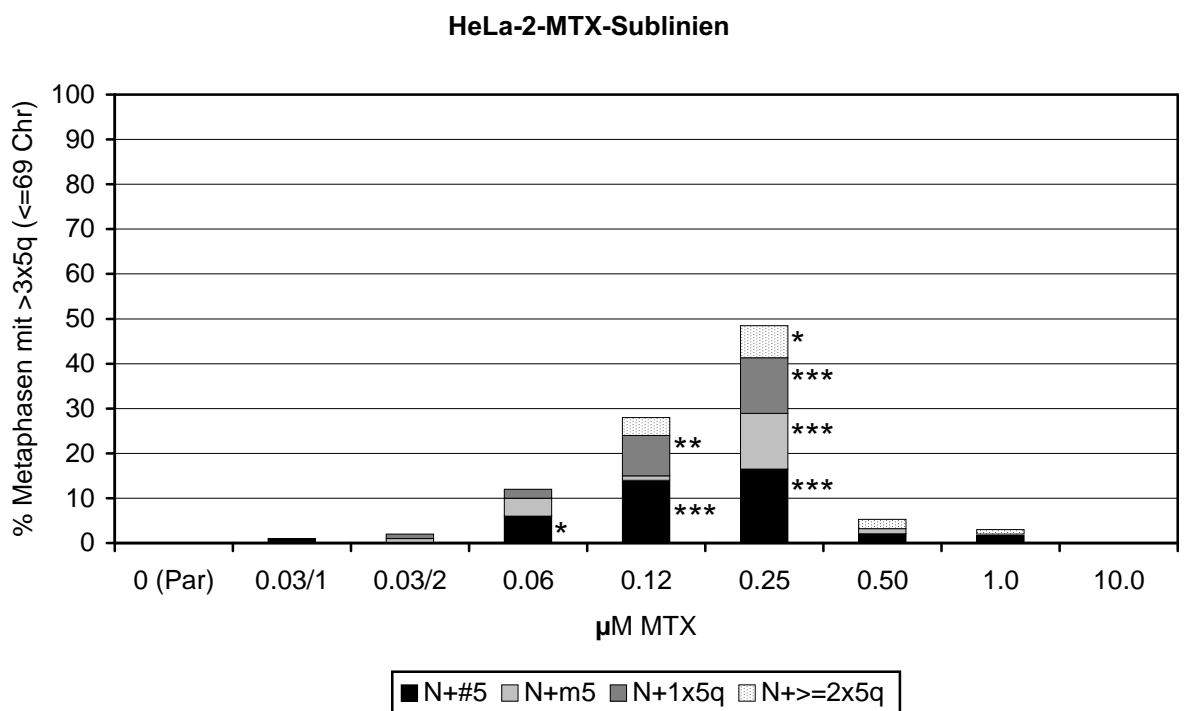


Abb. 55: Häufigkeit von Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen, $>3x5q$ und dem in der Legende aufgeführten 5q-Status in den HeLa-2-MTX-Sublinien nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen. Chr = Chromosomen; Par = Parentallinie; Symbole (*): s. Methoden, J)

B.6.4.3) 5q-Trägerchromosomen in Metaphasen mit <math><3x5q</math>

Metaphasen mit <math><3x5q</math> traten in der Parentallinie nicht auf.

Bei Selektion 1 enthielten nur die Sublinien aus den letzten drei Selektionsschritten (HeLa-1-MTX-0.25, HeLa-1-MTX-0.50 und HeLa-1-MTX-1.0) signifikant erhöhte Metaphasenanteile mit <math><3x5q</math>, die ausschließlich in der Metaphasengruppe mit ≤ 69 Chromosomen vorlagen (s. B.6.3).

Die 5q-Anzahl war in fast allen dieser Metaphasen durch den Verlust von einer 5q-Kopie auf zwei reduziert. Ein Verlust von zwei 5q lag nur einmal in einer Metaphase von HeLa-1-MTX-0.25 (mit N-#5-m5) vor. Metaphasen mit vollständigem Verlust der 5q-Trägerchromosomen wurden in den HeLa-1-MTX-Sublinien nicht beobachtet.

Im überwiegenden Teil der Metaphasen mit <math><3x5q</math> resultierte der 5q-Verlust aus dem Verlust eines #5 (5q-Status: N-#5) (s. Abb. 56).

Bei Sublinie HeLa-1-MTX-0.25 traf dies auf 44.4% der Metaphasen mit <math><3x5q</math> zu. 5q-Verluste in anderer Form wurden nur in 5.5% Metaphasen festgestellt und beruhten bei jeweils 2.2% der Metaphasen auf dem Verlust von einem m5 (5q-Status: N-m5) bzw. von zwei 5q-Trägerchromosomen (#5, m5) in Kombination mit einem zusätzlichen Der(1x5q) (5q-Status: N-1x5q) und bei 1.1% auf dem alleinigen Verlust von zwei 5q-Trägerchromosomen (5q-Status: N-2x5q; s.o.). Sublinie HeLa-1-MTX-0.50 wies in allen Metaphasen mit erniedrigter 5q-Anzahl (65%; s. B.6.3) einen #5-Verlust auf. HeLa-1-MTX-1.0 zeigte in 12% von nur noch 13% Metaphasen mit <math><3x5q</math> ebenfalls einen #5-Verlust und in 1% einen m5-Verlust.

Metaphasen mit >69 Chromosomen und <math><3x5q</math>, aufgrund eines #5-Verlustes, traten nur bei HeLa-1-MTX-0.03/2 und HeLa-1-MTX-0.50 zu jeweils 1% auf.

Im Gegensatz zu Selektion 1 lagen Metaphasen mit <math><3x5q</math> in den MTX-Sublinien von Selektion 2 nur in geringen Anteilen von unter 10% vor. Die Reduktion der 5q-Anzahl war in diesen Metaphasen ausschließlich durch den Verlust von einem 5q in Form eines #5 oder m5 bedingt.

In der Metaphasengruppe mit ≤ 69 Chromosomen wies Sublinie HeLa-2-MTX-0.25 die einzige signifikante Erhöhung dieses Metaphasenanteils auf (s. B.6.3). Sie enthielt insgesamt 7% Metaphasen mit <math><3x5q</math>, die überwiegend, d.h. in 6% der Metaphasen, den Verlust eines #5 zeigten (s. Abb. 57). Der Verlust eines m5 wurde dagegen nur in 1% der Metaphasen beobachtet. Auch in den übrigen MTX-Sublinien resultierte die erniedrigte 5q-Anzahl meist aus der Abwesenheit eines #5.

Die einzige Metaphase mit >69 Chromosomen und <math><3x5q</math>, durch #5-Verlust, trat bei Sublinie HeLa-2-MTX-0.12 auf.

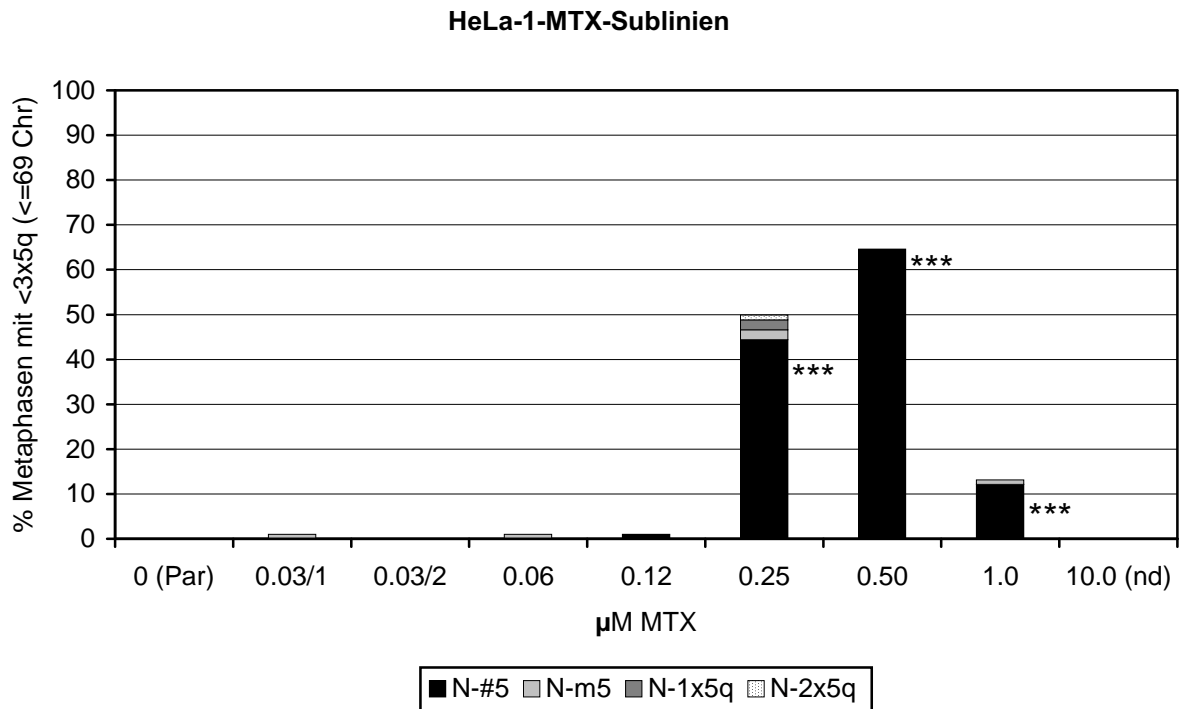


Abb. 56: Häufigkeit von Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen, $< 3 \times 5q$ und dem in der Legende aufgeführten 5q-Status in den HeLa-1-MTX-Sublinien nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen. Chr = Chromosomen; nd = nicht durchgeführt; Par = Parentallinie; Symbole (*): s. Methoden, J)

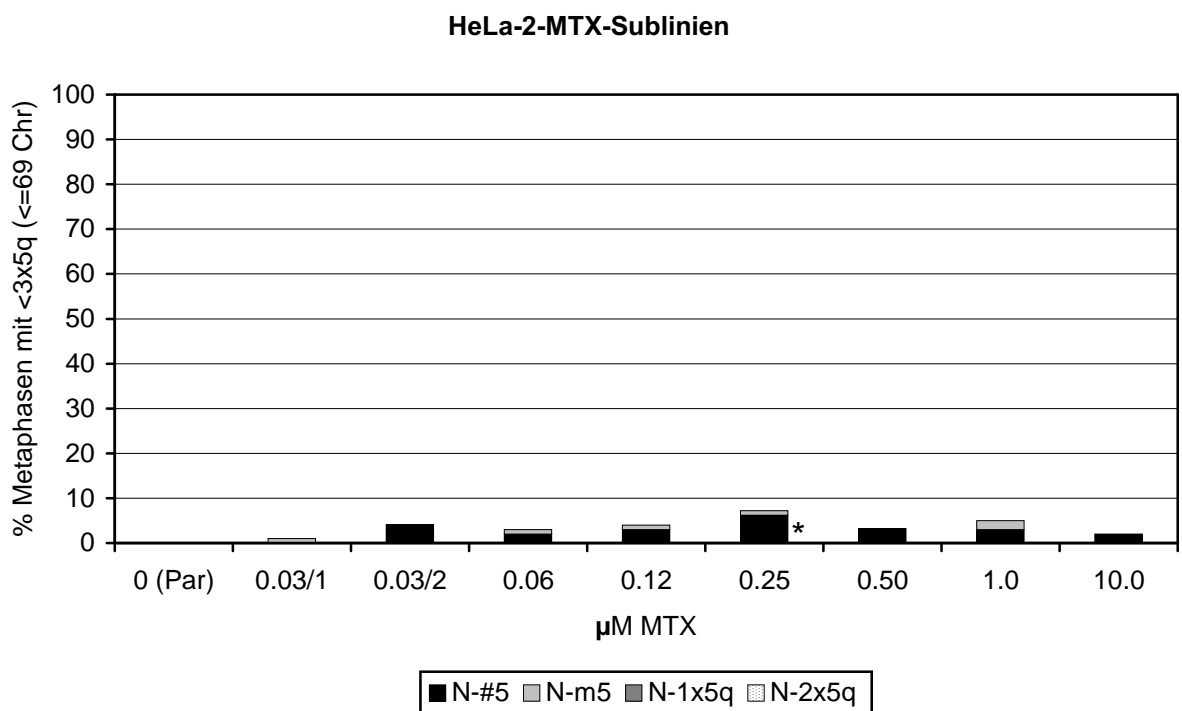


Abb. 57: Häufigkeit von Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen, $< 3 \times 5q$ und dem in der Legende aufgeführten 5q-Status in den HeLa-2-MTX-Sublinien nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen. Chr = Chromosomen; Par = Parentallinie; Symbol (*): s. Methoden, J)

B.6.5) 5q-Status in Double Minute-haltigen Metaphasen

Bei den HeLa-MTX-Sublinien konnten die Metaphasen mit Double Minutes (Dmin) nach ihrem 5q-Status in drei Kategorien eingeteilt werden (s. Tab. 11). Die Kategorien wurden nach der Häufigkeit der einzelnen Kombinationen von 5q-Trägerchromosomen (s. Tab. 10) in diesen Metaphasen erstellt.

Tabelle 11: Kategorien der Metaphasen mit Dmin nach Kombination der 5q-Trägerchromosomen

Metaphasen mit	Kategorie	Kombination der 5q-Trägerchromosomen	Σ 5q
3x5q	N+Dmin	5q-Normalstatus: N = 2#5+m5 (s. B.6.1) mit Dmin	3
<3x5q	N-#5+Dmin	ein #5 fehlt, mit Dmin	2
=, >, < 3x5q	Anderer 5q-Status+Dmin ^a	alle übrigen Kombinationen der 5q-Trägerchromosomen in Tab. 10, mit Dmin	1-≥5

^a verschiedene Kombinationen der 5q-Trägerchromosomen möglich

In der Parentallinie lagen 2% Metaphasen mit Dmin vor (s. B.4.9), die den 5q-Normalstatus (N; s. B.6.1) und ≤69 Chromosomen aufwiesen.

Bei Selektion 1 war ab Sublinie HeLa-1-MTX-0.25 ein kontinuierlicher Anstieg von Metaphasen mit Dmin zu beobachten (s. B.4.9). In der Metaphasengruppe mit ≤69 Chromosomen trat bei HeLa-1-MTX-0.25 und HeLa-1-MTX-0.50 im Hauptanteil (>68%) der Metaphasen mit Dmin ein Verlust von einem #5 auf (s. Abb. 58), da diese Sublinien eine Anreicherung von Metaphasen mit #5-Verlust enthielten (50% bzw. 65%; s. B.6.4.3). Dmin lagen jedoch nur in 60% bzw. 57% der Metaphasen mit #5-Verlust und daneben auch in Metaphasen mit anderem 5q-Status vor. Bei HeLa-1-MTX-1.0 wiesen dagegen 80% der Dmin-haltigen Metaphasen den 5q-Normalstatus und nur noch 14% einen #5-Verlust auf und spiegelten damit die in dieser Sublinie aufgetretenen 5q-Statusveränderungen (s. B.6.3 und B.6.4) wieder.

In der Metaphasengruppe mit >69 Chromosomen traten bei HeLa-1-MTX-0.03/2 1%, bei HeLa-1-MTX-0.50 6% und bei HeLa-1-MTX-1.0 4% Metaphasen mit Dmin auf, die bis auf 1% Metaphasen mit #5-Verlust in HeLa-1-MTX-0.50 alle einen 5q-Zugewinn zeigten (Kategorie Anderer 5q-Status+Dmin).

Bei Selektion 2 lagen signifikant erhöhte Anteile von Metaphasen mit Dmin ab Sublinie HeLa-2-MTX-0.25 vor (s. B.4.9). In den Dmin-haltigen Metaphasen mit ≤69 Chromosomen wurde überwiegend der 5q-Normalstatus N detektiert. Sublinie HeLa-2-MTX-0.25 wies 4% Metaphasen mit Dmin und N und 3% mit Dmin und einem #5-Verlust auf (s. Abb. 59). Nur 2% der Dmin-haltigen Metaphasen zeigten einen 5q-Zugewinn, obwohl diese Sublinie den höchsten Anteil (48.5%; s. B.6.4.3) an Metaphasen mit >3x5q von allen HeLa-2-MTX-Sublinien enthielt. In den nachfolgenden Sublinien HeLa-2-MTX-0.50 und HeLa-2-MTX-1.0 sowie in HeLa-2-MTX-10.0 trat in über 90% der Metaphasen mit Dmin der 5q-Normalstatus auf. Ein #5-Verlust war, im Gegensatz zu Selektion 1, nur in geringen Anteilen (<5%) der Dmin-haltigen Metaphasen zu beobachten.

Metaphasen mit >69 Chromosomen und Dmin erreichten Anteile von 1% bei HeLa-2-MTX-0.12, 12% bei HeLa-2-MTX-0.50, 4% bei HeLa-2-MTX-1.0 und 3% bei HeLa-2-MTX-10.0. Mit Ausnahme von 1% Metaphasen mit N+Dmin in HeLa-2-MTX-10.0 waren diese Metaphasen durch 5q-Zugewinne gekennzeichnet.

Die unterschiedlichen 5q-Stati in den Metaphasen mit Dmin zeigten, dass bei den HeLa-MTX-Sublinien kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Dmin und einem bestimmten 5q-Status bestand.

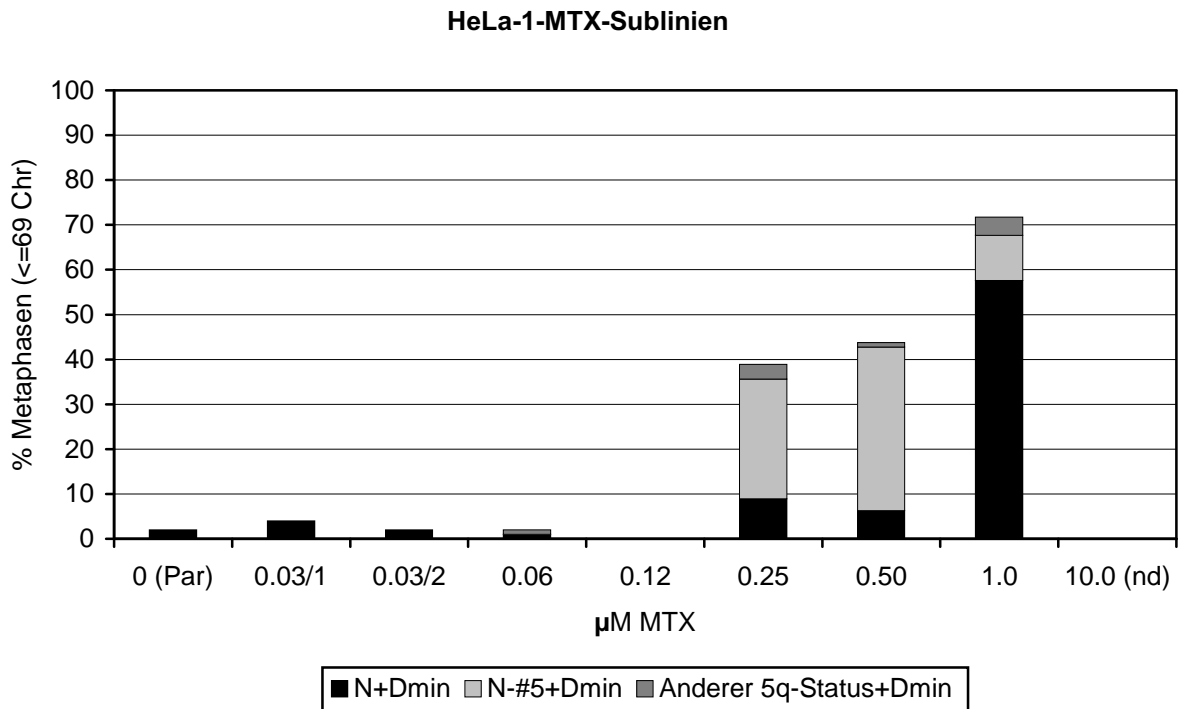


Abb. 58: Häufigkeit von Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen, Double Minutes (Dmin) und dem in der Legende aufgeführten 5q-Status in den HeLa-1-MTX-Sublinien nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen. Chr = Chromosomen; nd = nicht durchgeführt; Par = Parentallinie

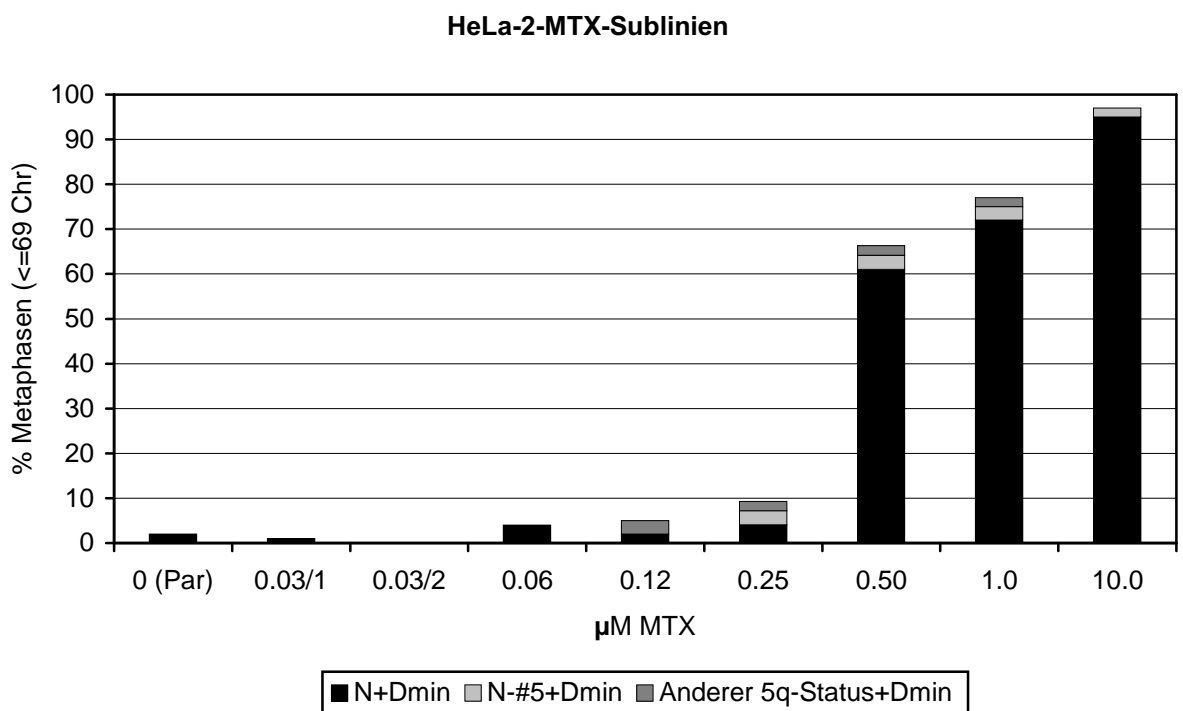


Abb. 59: Häufigkeit von Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen, Double Minutes (Dmin) und dem in der Legende aufgeführten 5q-Status in den HeLa-2-MTX-Sublinien nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen. Chr = Chromosomen; Par = Parentallinie

B.6.6) Derivative 5q-haltige Chromosomen

Derivative 5q-haltige Chromosomen bezeichneten die in den HeLa-MTX-Sublinien neu auftretenden derivativen Chromosomen mit ein oder zwei vollständigen 5q, abgekürzt als Der(1x5q) bzw. Der(2x5q), exklusive des m5 (s. B.6.4). Ihre Zusammensetzung wurde anhand ihres G-Bandenmusters untersucht.

B.6.6.1) Metaphasen mit derivativen 5q-haltigen Chromosomen

Derivative 5q-haltige Chromosomen traten in der Parentallinie nicht auf.

Bei Selektion 1 lagen nur in der Metaphasengruppe mit ≤ 69 Chromosomen signifikant erhöhte Anteile an Metaphasen mit derivativen 5q-haltigen Chromosomen vor. Sublinie HeLa-1-MTX-0.12 wies mit 22% den höchsten Anteil dieser Metaphasen auf, der sich aus 19% Metaphasen mit Der(2x5q) und 3% mit Der(1x5q) zusammensetzte. HeLa-1-MTX-0.25 enthielt jeweils 3.3% Metaphasen mit Der(1x5q) und Der(2x5q) und alle übrigen HeLa-1-MTX-Sublinien maximal 1% Metaphasen mit überwiegend Der(1x5q) (s. Abb. 60).

Metaphasen mit >69 Chromosomen und derivativen 5q-haltigen Chromosomen traten nur in HeLa-1-MTX-0.50 zu 1% auf.

Bei Selektion 2 waren signifikant erhöhte Metaphasenanteile mit derivativen 5q-haltigen Chromosomen ebenfalls nur in der Metaphasengruppe mit ≤ 69 Chromosomen und in den MTX-Sublinien aus den gleichen Selektionsschritten wie bei Selektion 1 zu beobachten. HeLa-2-MTX-0.12 und HeLa-2-MTX-0.25 blieben mit Anteilen von 15% bzw. 19% Metaphasen mit derivativen 5q-haltigen Chromosomen jedoch unter dem Höchstwert von Selektion 1 (s.o.). Bei beiden Sublinien überwogen die Metaphasen mit Der(2x5q) gegenüber den Metaphasen mit Der(1x5q) (HeLa-2-MTX-0.12: 14% mit Der(2x5q) / 1% mit Der(1x5q); HeLa-2-MTX-0.25: 18% mit Der(2x5q) / 1% mit Der(1x5q)). In allen anderen HeLa-2-MTX-Sublinien erreichten Metaphasen mit derivativen 5q-haltigen Chromosomen Anteile von maximal 2% (s. Abb. 61).

In der Metaphasengruppe mit >69 Chromosomen zeigten 2-3% der Metaphasen von HeLa-2-MTX-0.12 und HeLa-2-MTX-0.25 derivative 5q-haltige Chromosomen.

Bei beiden Selektionen enthielten die Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen nur maximal ein derivatives 5q-haltiges Chromosom. In der Metaphasengruppe mit >69 Chromosomen wurden dagegen in den Sublinien HeLa-1-MTX-0.50, HeLa-2-MTX-0.12 und HeLa-2-MTX-0.25 1-2% Metaphasen mit zwei bis vier derivativen 5q-haltigen Chromosomen beobachtet.

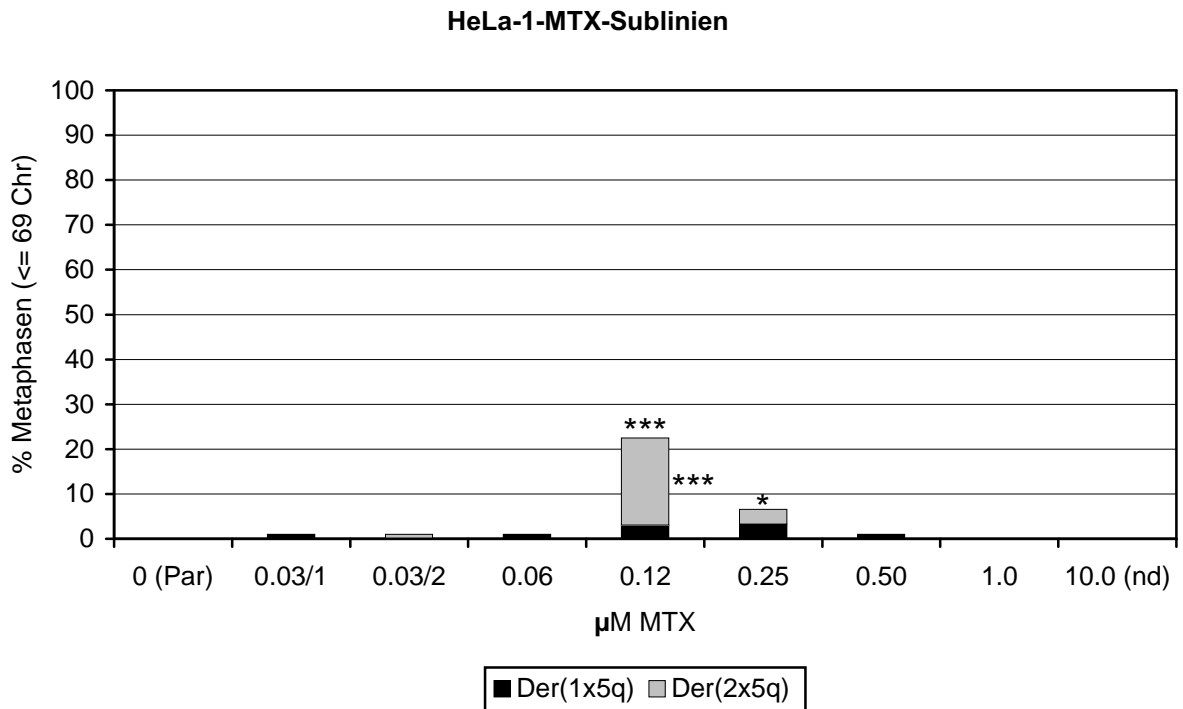


Abb. 60: Häufigkeit von Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen und derivativen Chromosomen mit einem 5q (Der(1x5q)) und mit zwei 5q (Der(2x5q)) in den HeLa-1-MTX-Sublinien nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen. Chr = Chromosomen; nd = nicht durchgeführt; Par = Parentallinie; Symbole (*): s. Methoden, J), über Säulen bezogen auf Gesamtanteil, neben Säulen bezogen auf Einzelanteil

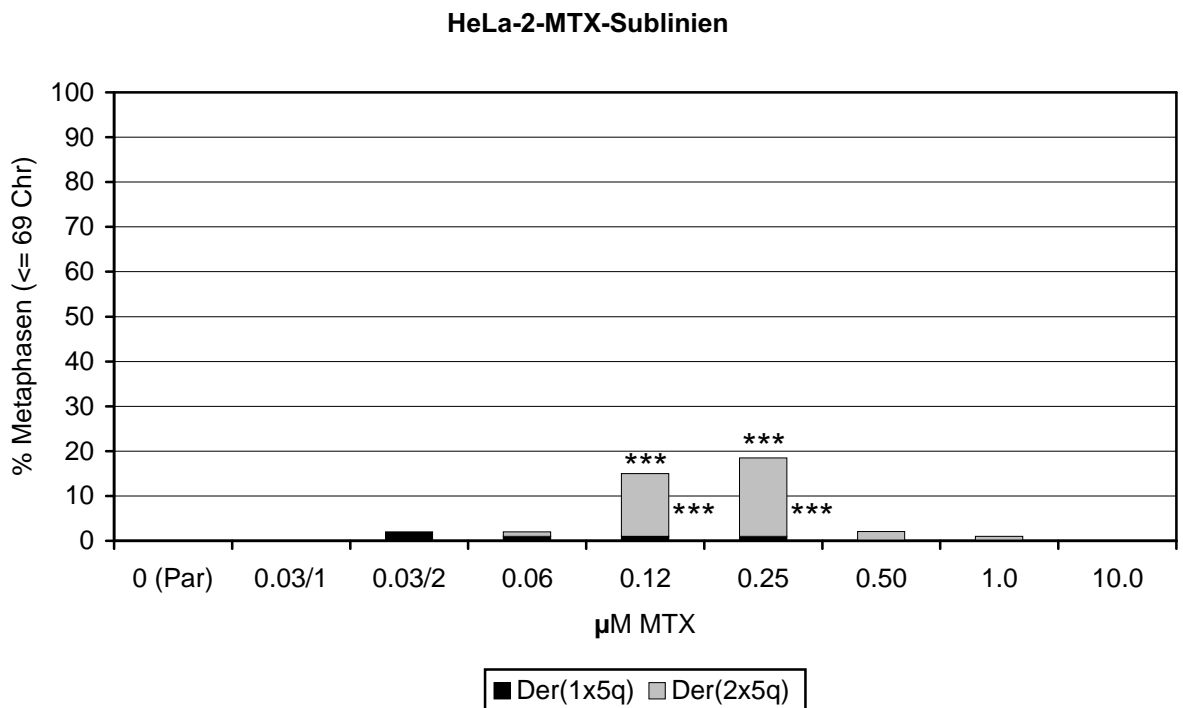


Abb. 61: Häufigkeit von Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen und derivativen Chromosomen mit einem 5q (Der(1x5q)) und mit zwei 5q (Der(2x5q)) in den HeLa-2-MTX-Sublinien nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen. Chr = Chromosomen; Par = Parentallinie; Symbole (*): s. Methoden, J), über Säulen bezogen auf Gesamtanteil, neben Säulen bezogen auf Einzelanteil

B.6.6.2) Typen der derivativen 5q-haltigen Chromosomen

Bei Selektion 1 wurden in allen HeLa-1-MTX-Sublinien zusammen 33 Metaphasen mit insgesamt 34 derivativen 5q-haltigen Chromosomen detektiert. 9 dieser Chromosomen wiesen ein 5q (Der(1x5q)) und 25 zwei 5q (Der(2x5q)) auf. Die Der(1x5q) umfaßten drei #5 mit einer Deletion in 5p, ein #5 mit einer Inversion in 5q sowie fünf derivative Chromosomen, die aus einer Translokation von 5q, #5 oder m5 auf ein jeweils anderes Chromosom resultierten (s. Tab. 12). Die Translokationsbruchpunkte in #5 lagen in der Centromerregion oder der terminalen 5p-Region. Der(2x5q) traten in zwei Formen auf: als Der(5)sp (24x) und seltener als 5q-Isochromosom, i(5)(q10), (1x).

Die MTX-Sublinien von Selektion 2 und die Sublinie HeLa-2-MTX-10.0 enthielten zusammen 45 Metaphasen mit insgesamt 50 derivativen 5q-haltigen Chromosomen. Dabei lagen derivative Chromosomen mit zwei 5q erheblich häufiger als solche mit einem 5q vor (44 Der(2x5q) gegenüber 6 Der(1x5q); s. Tab. 12). Die Der(1x5q) stellten derivative Chromosomen mit Translokation von einem 5q oder #5 auf jeweils unterschiedliche andere Chromosomen dar. Die Translokationsbruchpunkte betrafen in #5 mehrmals die Centromerregion und je einmal die terminale 5q-Region bzw. eine 5q-Region unterhalb des Centromers (5q?13). Der(2x5q) erschienen, wie bei Selektion 1, als Der(5)sp (35x) und als 5q-Isochromosom (9x).

Tabelle 12: Derivative 5q-haltige Chromosomen in den HeLa-MTX-Sublinien

HeLa-1-MTX-Sublinien		HeLa-2-MTX-Sublinien	
Der(1x5q)	Σ	Der(1x5q)	Σ
del(5)(p10)	3	der(1)t(1;5)(q32;q11)	1
der(5)t(5;?8)(?q10;?p10)	1	der(3)t(3;5)(p26;q11)	1
der(5)t(5;12)(p15;p13)	1	der(5)t(5;7)(q35;?q22)	1
der(5)t(5;15)(q10;q10)	1	der(7)t(5;7)(q11;q36)	1
der(5)t(5;16)(p15;q24)	1	der(?)t(1;?9)(p10;?q10)t(5;?9)(q?13;?q34)	1
der(?)t(3;15)(p?26;q26)t(3;5)(p?10;q?10)	1	der(?)t(?;3)(p?;q10)t(?;5)(q?;q11)	1
inv(5)(q13q35)	1		
Gesamtanzahl	9	Gesamtanzahl	6
Der(2x5q)	Σ	Der(2x5q)	Σ
Der(5)sp (s. B.4.8)	24	Der(5)sp (s. B.4.8)	35
i(5)(q10)	1	i(5)(q10)	9
Gesamtanzahl	25	Gesamtanzahl	44

B.6.6.3) 5q-Status in Metaphasen mit derivativen 5q-haltigen Chromosomen

Bei beiden Selektionen wurde nur in den Metaphasen mit dem am häufigsten vorliegenden derivativen 5q-haltigen Chromosom, dem Der(5)sp (s. Tab. 12), ein bevorzugtes Auftreten eines #5-Verlustes beobachtet (5q-Status: N+1x5q; s. B.6.4.2). Metaphasen mit anderen derivativen 5q-haltigen Chromosomen zeigten unterschiedliche 5q-Status und traten in so geringen Anteilen auf (s. B.6.6.1), dass keine Präferenz für einen bestimmten 5q-Status erkennbar war.

B.7) Lokalisation von #5-Sequenzen in den HeLa-MTX-Sublinien

Zur Überprüfung des durch G-Bänderung ermittelten 5q-Status (s. B.6) erfolgte bei ausgewählten HeLa-MTX-Sublinien eine weitere Analyse der Metaphasen durch Whole Chromosome Painting (WCP) mit einer #5-spezifischen Sonde. Bei den Metaphasen mit Der(5)sp (s. B.4.8) wurde ein Zwei-Farben-Painting mit spezifischen Sonden für die Chromosomen 5 und 2 durchgeführt, da nach dem G-Bandenmuster eine Zusammensetzung des Der(5)sp aus #5- und #2-Sequenzen vermutet wurde.

Die Spezifität der verwendeten #5- und #2-Sonden wurde durch ein Zwei-Farben-Painting mit beiden Sonden auf Metaphasen mit normalem weiblichen Karyotyp (46,XX) überprüft. In allen 31 ausgewerteten Metaphasen zeigten die anhand ihres DAPI-Bandenmusters identifizierten Chromosomen 5 jeweils eine vollständige Markierung durch die #5-Sonde und die Chromosomen 2 eine vollständige Markierung durch die #2-Sonde. Kreuzhybridisierungen der WCP-Sonden auf anderen Chromosomen traten nicht auf, so dass die Sonden unter den vorliegenden Hybridisierungsbedingungen als spezifisch für die Chromosomen 5 bzw. 2 angesehen wurden.

B.7.1) #5-Sequenzen in Metaphasen der Parentallinie und der MTX-0.12-Sublinien

Zur Identifizierung der #5-sequenzhaltigen Chromosomen wurden 11 Metaphasen der HeLa-Parentallinie sowie 33 Metaphasen von HeLa-1-MTX-0.12 und 44 Metaphasen von HeLa-2-MTX-0.12 nach #5-WCP ausgewertet. Alle untersuchten Metaphasen der HeLa-Parentallinie sowie der beiden MTX-Sublinien enthielten ≤ 69 Chromosomen und wiesen insgesamt jeweils sechs Chromosomen auf, die eine vollständige oder teilweise Markierung durch die #5-Sonde zeigten. Diese Chromosomen konnten bis auf eine Ausnahme anhand ihres DAPI-Bandenmusters vollständig identifiziert werden (s. Tab. 13, Abb. 62-63).

Tabelle 13: #5-sequenzhaltige Chromosomen in HeLa-Metaphasen nach #5-WCP

#5-sequenzhaltige Chromosomen pro Metaphase	Anzahl		
	Chr	5p	5q
#5	2	2	2
m5 (derivatives Chromosom, s. B.6.1)	1	0	1
5p-Isochromosom, i(5)(p10)	2	4	0
der(?;5)(?;p10) (derivatives Chromosom aus Fusion von 5p mit unbekanntem Chromosomensegment)	1	1	0
Gesamtanzahl	6	7	3

Chr = Chromosom(en)

Das #5-WCP bestätigte die bereits durch G-Bänderung identifizierten #5 und m5 (s. B.6.1) als 5q-Trägerchromosomen in den ausgewerteten HeLa-Metaphasen. Weitere 5q-tragende Chromosomen wurden nicht detektiert. Die durch #5-WCP ermittelten 5q-Trägerchromosomen stimmten in Anzahl und Typ pro Metaphase mit den Chromosomen überein, die in G-gebänderten Metaphasen mit 5q-Normalstatus als 5q-Trägerchromosomen erkannt wurden (s. B.6.1). Dies zeigte, dass alle Chromosomen mit vollständigem 5q in den HeLa-Metaphasen durch G-Bänderung richtig identifiziert werden konnten und daher der in G-gebänderten Metaphasen bestimmte 5q-Status (s. B.6) zumindest bei Vorliegen des 5q-Normalstatus dem tatsächlichen 5q-Status der Metaphasen entsprach.

Die drei 5p-tragenden Chromosomen wurden erst durch das #5-WCP eindeutig als Chromosomen mit #5-Anteilen erkannt und infolgedessen auch die unterschiedlichen Kopienanzahlen von 5p und 5q in den HeLa-Metaphasen detektiert: pro Metaphase lagen insgesamt drei Kopien von 5q und sieben Kopien von 5p vor (s. Tab. 13).

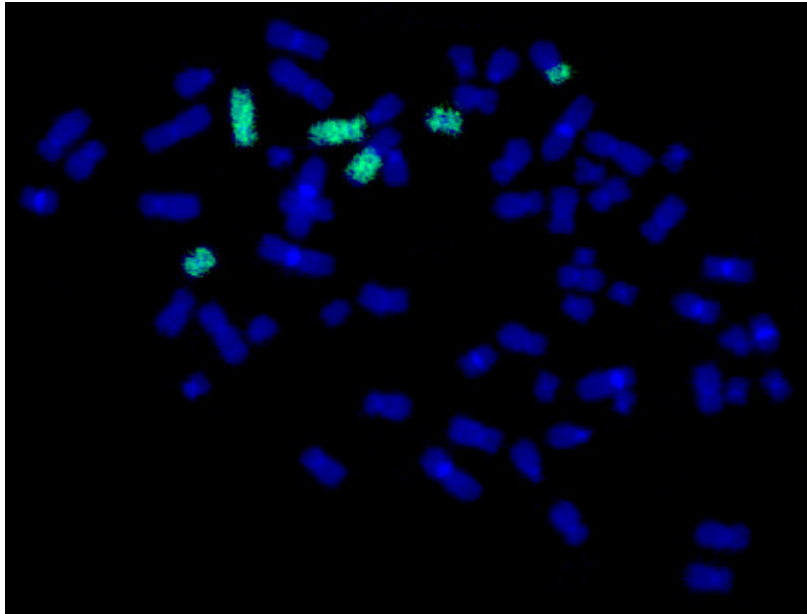


Abb. 62: #5-Painting in einer Metaphase aus HeLa-2-MTX-0.12. Die durch die #5-spezifische Sonde markierten Chromosomensegmente zeigen eine grüne Fluoreszenz. Vier vollständig und zwei partiell markierte Chromosomen sind erkennbar.

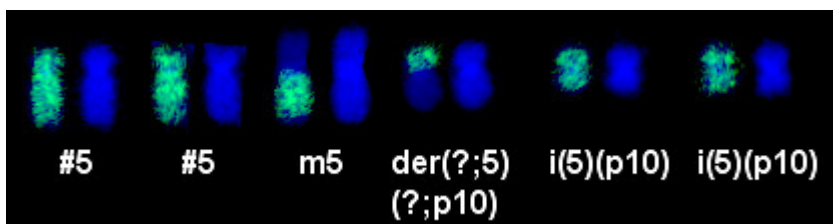


Abb. 63: Zusammenstellung der durch #5-Painting markierten Chromosomen aus der Metaphase von Abb. 62 mit Angabe des Chromosomentyps (s. Tab. 13). Die linksstehenden Chromosomen zeigen die Fluoreszenzmarkierung der #5-Sonde (grün), rechts daneben sind dieselben Chromosomen in der DAPI-AMD-Gegenfärbung (blau) abgebildet.

B.7.2) #5- und #2-Sequenzen in Metaphasen mit 'Der(5)sp'

Metaphasen mit Der(5)sp traten in den Sublinien HeLa-1-MTX-0.12 und HeLa-2-MTX-0.12 in erhöhten Anteilen von 15-18% auf (s. B.4.8). Nach Zwei-Farben-Painting mit spezifischen Sonden für #5 und #2 wurden auf den Präparaten beider Sublinien zusammen sieben Metaphasen (≤ 69 Chromosomen) mit insgesamt 8 Der(5)sp gefunden. Die Der(5)sp in den hybridisierten Metaphasen entsprachen sowohl in der Morphologie als auch im DAPI-Bandenmuster den Der(5)sp in den G-gebänderten Metaphasen derselben Sublinien und stellten daher den gleichen Chromosomentyp dar. In allen Der(5)sp-enthaltenden Metaphasen lag der bereits bei der 5q-Status-Analyse (s. B.6.4.2) ermittelte Verlust eines #5 vor.

Die hybridisierten Der(5)sp zeigten einheitlich eine vollständige Markierung durch die #5-spezifische Sonde (s. Abb. 64 und 65). Eine Beteiligung von #2-Sequenzen an der Zusammensetzung der Der(5)sp war daher ausgeschlossen. Das durch G-Bänderung nicht zu identifizierende Segment der Der(5)sp (s. B.4.8)

enthielt nach dem WCP-Resultat ebenfalls #5-Sequenzen. Informationen über die Anteile von 5p und/oder 5q in diesem Segment konnten jedoch nicht gewonnen werden, da die #5-spezifische Sonde keine Unterscheidung dieser beiden Chromosomenarme ermöglichte.

Durch das Zwei-Farben-Painting erfolgte zusätzlich eine Aufklärung der Zusammensetzung des durch #5-Painting detektierten $\text{der}(?)5(?)p10)$ (s. B.7.1, Tab. 13). Dieses derivative Chromosom wies eine vollständige Markierung des unbekanntem Chromosomensegments durch die #2-Sonde auf und konnte unter Berücksichtigung des DAPI-Bandenmusters als $\text{der}(2;5)(p10;p10)$ identifiziert werden (s. Abb. 64).

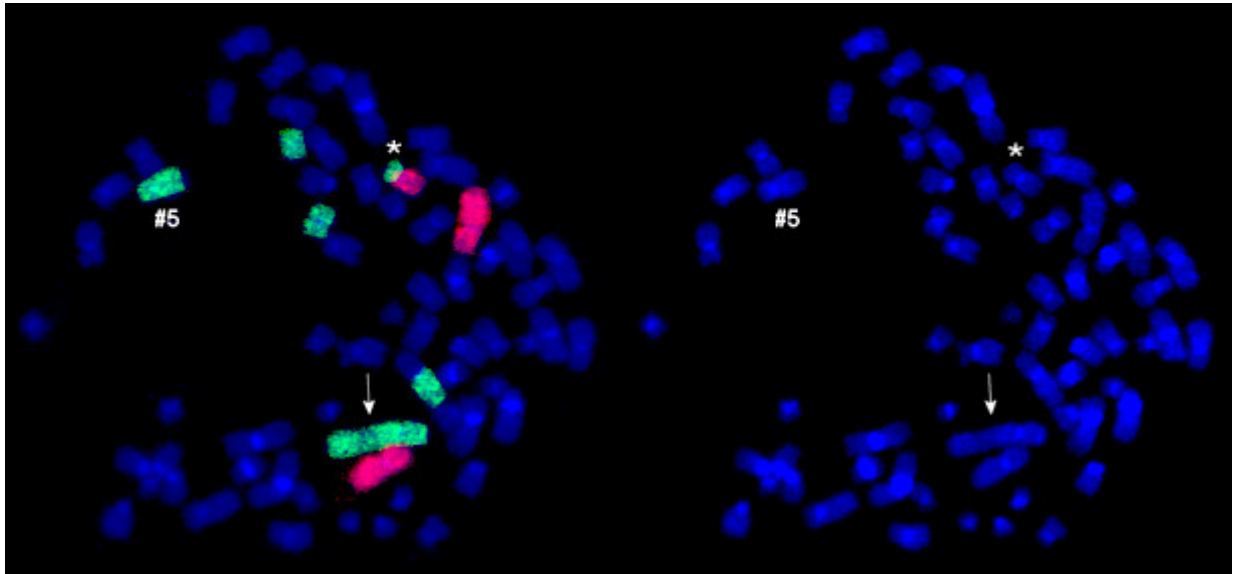


Abb. 64: Kombiniertes #5- und #2-Painting in einer Metaphase aus HeLa-2-MTX-0.12. #5-spezifische Chromosomensegmente zeigen eine grüne, #2-spezifische Chromosomensegmente eine rote Fluoreszenz (linke Seite). Das $\text{Der}(5)\text{sp}$ (Pfeil) enthält ausschließlich #5-Sequenzen. Ein weiteres derivatives Chromosom (*) setzt sich aus #5- und #2-Sequenzen zusammen und entspricht nach dem DAPI-Bandenmuster einem $\text{der}(2;5)(p10;p10)$ (vgl. Abb. 63). Zusätzlich liegen ein #5, ein m5 (partiell markiert), zwei 5p-Isochromosomen und zwei #2 vor. Die rechte Seite zeigt die Metaphase in der DAPI-AMD-Gegenfärbung.

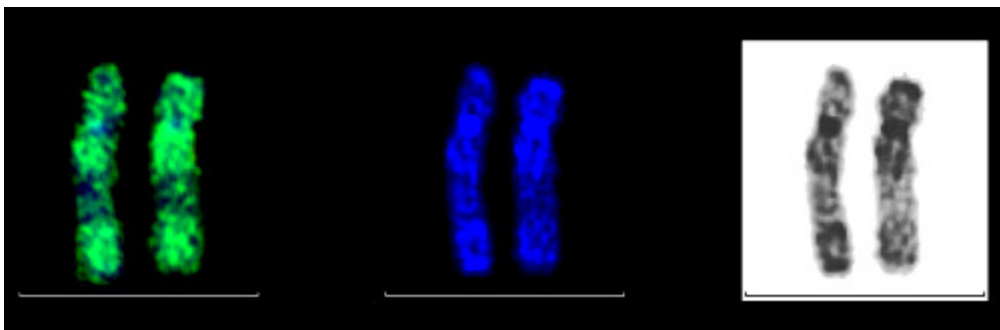


Abb. 65: #5-Painting auf zwei $\text{Der}(5)\text{sp}$ aus verschiedenen Metaphasen von HeLa-2-MTX-0.12. Die $\text{Der}(5)\text{sp}$ werden durch die #5-spezifische Sonde vollständig markiert (grün, linksstehende Chromosomen). Das DAPI-Bandenmuster der $\text{Der}(5)\text{sp}$ (blau, mittlere Chromosomen bzw. invertiert zu schwarz-weiß, rechte Chromosomen) entspricht dem Bandenmuster der $\text{Der}(5)\text{sp}$ nach G-Bänderung (s. B.4.8).

B.7.3) #5-Sequenzen in Metaphasen mit Double Minutes

Zur Lokalisation von #5-Sequenzen in Metaphasen mit Dmin wurden 24 Dmin-haltige Metaphasen von HeLa-1-MTX-1.0 und 12 Dmin-haltige Metaphasen von HeLa-2-MTX-1.0 nach #5-WCP ausgewertet. In allen Metaphasen mit Dmin (≤ 69 Chromosomen) lagen sechs durch die #5-Sonde vollständig oder partiell markierte Chromosomen vor, die den in der Parentallinie detektierten #5-sequenzhaltigen Chromosomen (s. B.7.1) entsprachen. Zusätzlich zeigten auch die Dmin eine Markierung, die auf eine Amplifikation von #5-Sequenzen in Form von Dmin in diesen Metaphasen schliessen ließ (s. Abb. 66).

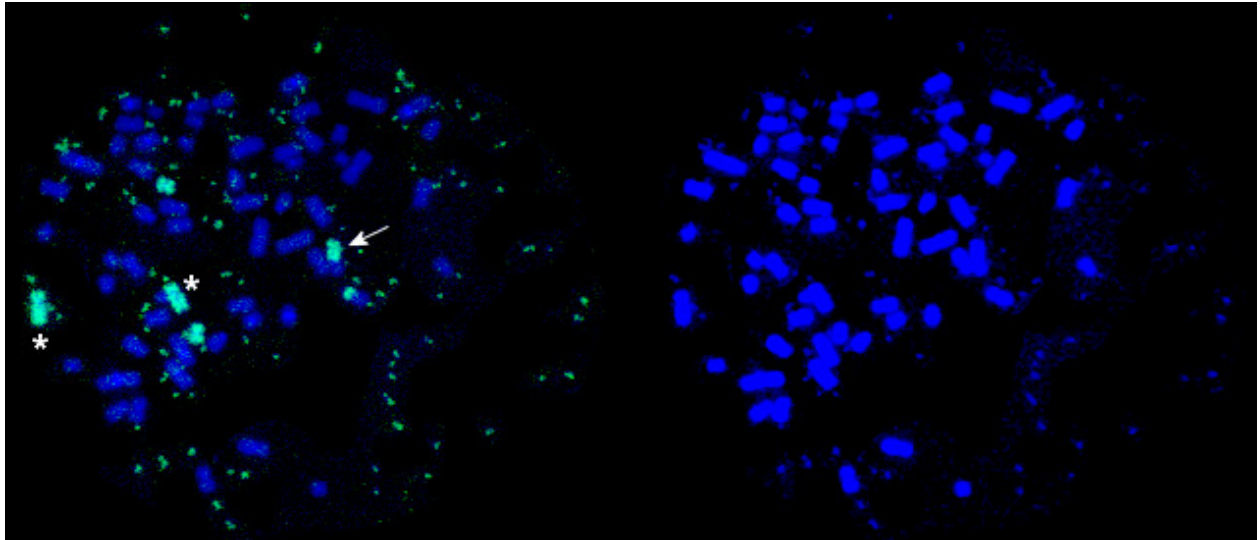


Abb. 66: #5-Painting in einer Dmin-haltigen Metaphase aus HeLa-2-MTX-1.0. Die #5-spezifischen Sequenzen zeigen eine grüne Fluoreszenz (linke Seite). Sowohl die #5-sequenzhaltigen Chromosomen als auch die Dmin sind markiert (vgl. mit rechtem Bild der DAPI-AMD-Gegenfärbung). Die markierten Chromosomen entsprechen zwei #5 (*), einem m5 (Pfeil), dem derivativen Chromosom der(2;5)(p10;p10) (unterhalb von m5, mit partieller Markierung; vgl. Abb. 63 und 64) und zwei 5p-Isochromosomen.

B.8) Chromosomale Herkunft der amplifizierten Gensequenzen

Die Detektion von Kopienanzahlunterschieden und die genaue Lokalisation der Herkunft der Sequenzen, die in den letzten Sublinien der MTX-Selektionen in Form von Dmin amplifiziert wurden, erfolgten durch Comparative Genomische Hybridisierung (CGH). Für die CGH-Ansätze wurde jeweils die DNA der MTX-Sublinien HeLa-1-MTX-1.0, HeLa-2-MTX-1.0 und HeLa-2-MTX-10.0 als Test-DNA und die DNA der HeLa-Parentallinie als Referenz-DNA verwendet. Zur Markierung der DNAs erwies sich die Direktmarkierung als die geeignetste Methode, da direktmarkierte DNAs in den CGH-Ansätzen eine homogenere Fluoreszenz als haptenmarkierte DNAs zeigten.

B.8.1) CGH-Kontrollansätze mit hapten- und direktmarkierter DNA

Die verwendeten DNA-Markierungsmethoden (s. Methoden, G.3) und die festgelegten Profilschwellenwerte (s. Methoden, G.9) wurden durch CGH-Kontrollansätze in Form von Negativkontrollen überprüft. Beim CGH-Kontrollansatz mit haptenmarkierter DNA der HeLa-Parentallinie (als Test- und Referenz-DNA eingesetzt) zeigte die Profilauswertung keine Kopienanzahlzugewinne oder -verluste an. Die Profillinie

verlief bei den meisten Chromosomen innerhalb der für die HeLa-Zellen festgelegten Schwellenwerte. Geringe Profilausschläge über die obere Schwelle waren nur in den von der Auswertung ausgeschlossenen Centromerregionen einzelner Chromosomen zu beobachten (s. Abb. 67). Für CGH-Ansätze mit haptenmarkierter HeLa-DNA wurden die verwendeten Schwellenwerte daher als geeignet zur Detektion spezifischer Kopienanzahlunterschiede angesehen.

Die neu etablierte Methode der DNA-Direktmarkierung wurde zuerst in einem CGH-Kontrollansatz mit direktmarkierten DNAs aus den PB-Leukocyten von jeweils einer gesunden männlichen (Test-DNA) und weiblichen (Referenz-DNA) Person überprüft. Für die Profilauswertung wurden die auf einer diploiden Kopienanzahl der genetischen Sequenzen basierenden Werte 0.75 für die untere und 1.25 für die obere Schwelle verwendet. Diese CGH ergab bei allen Autosomen einen Profilverlauf innerhalb der Schwellenwerte. Bei den Geschlechtschromosomen entsprachen die Profilverläufe den unterschiedlichen Kopienanzahlen im männlichen und weiblichen Genom. Die Profillinie des X-Chromosoms unterschritt die untere Schwelle, da es in der männlichen Test-DNA zu 50% gegenüber der weiblichen Referenz-DNA unterrepräsentiert war. Das Y-Chromosom zeigte aufgrund seiner 100%igen Überrepräsentation in der Test-DNA einen starken Profilausschlag über die obere Schwelle (s. Abb. 68).

Die Profilauswertung des CGH-Kontrollansatzes mit direktmarkierter DNA der HeLa-Parentallinie ergab bei allen Chromosomen einen Profilverlauf innerhalb der für die HeLa-Zellen festgelegten Schwellenwerte. Nur die Centromer- und Heterochromatinregionen der Chromosomen 1, 9 und 16 wiesen eine Unterschreitung der unteren Schwelle auf (s. Abb. 69). Da diese Regionen jedoch von der CGH-Auswertung ausgeschlossen waren (s. Methoden, G.10), wurden die verwendeten Schwellenwerte beibehalten.

B.8.2) CGH-Ansätze der HeLa-MTX-Sublinien

Die Profilauswertung der CGH-Ansätze der Sublinien HeLa-1-MTX-1.0, HeLa-2-MTX-1.0 und HeLa-2-MTX-10.0 ergab, dass in allen drei Sublinien ein Zugewinn von Sequenzen aus einer #5-Region, die mindestens die Banden 5q13q14 umfaßte, vorlag (s. Tab. 14). Bei den Sublinien HeLa-1-MTX-1.0 und HeLa-2-MTX-1.0 überschritt die Profillinie die obere Schwelle in dieser #5-Region nur knapp (s. Abb. 70-71). Dagegen zeigte das #5-Profil bei HeLa-2-MTX-10.0 einen starken Profilausschlag über die obere Schwelle in der Region 5q11.2q15, der auf einen hohen Zugewinn bzw. eine Amplifikation von Sequenzen aus dieser Region hinwies (s. Abb. 72). Nach visueller Inspektion der CGH-Metaphasen war der Sequenzzugewinn jedoch auf die Bande 5q13 begrenzt. Diese Lokalisation stimmte mit dem in der Literatur für das humane *DHFR* angegebenen Locus, 5q11.2q13.2 (UniGene 1999; Anagnou et al. 1988), überein und ließ auf eine Amplifikation dieses Gens schließen. Weitere Kopienanzahlzugewinne wurden nicht detektiert. Kopienanzahlverluste waren nur bei HeLa-2-MTX-1.0 und HeLa-2-MTX-10.0 zu beobachten, die beide einen Verlust von #18-Sequenzen zeigten (18p bei HeLa-2-MTX-1.0, #18 bei HeLa-2-MTX-10.0; s. Tab. 14). HeLa-2-MTX-10.0 wies zusätzlich Verluste von Sequenzen aus 1p und 15q und von #21 auf.

Tabelle 14: Kopienanzahlzugewinne und -verluste in den HeLa-1- und HeLa-2-MTX-Sublinien

Test-Sublinie	Zugewinn	Verlust
HeLa-1-MTX-1.0	5q13q14 (visuell: 5q13)	—
HeLa-2-MTX-1.0	5q12q14 (visuell: 5q13)	18p
HeLa-2-MTX-10.0	5q11.2q15 (Amplifikation; visuell: 5q13)	1p33p36.3, 15q11.2q14, 18, 21

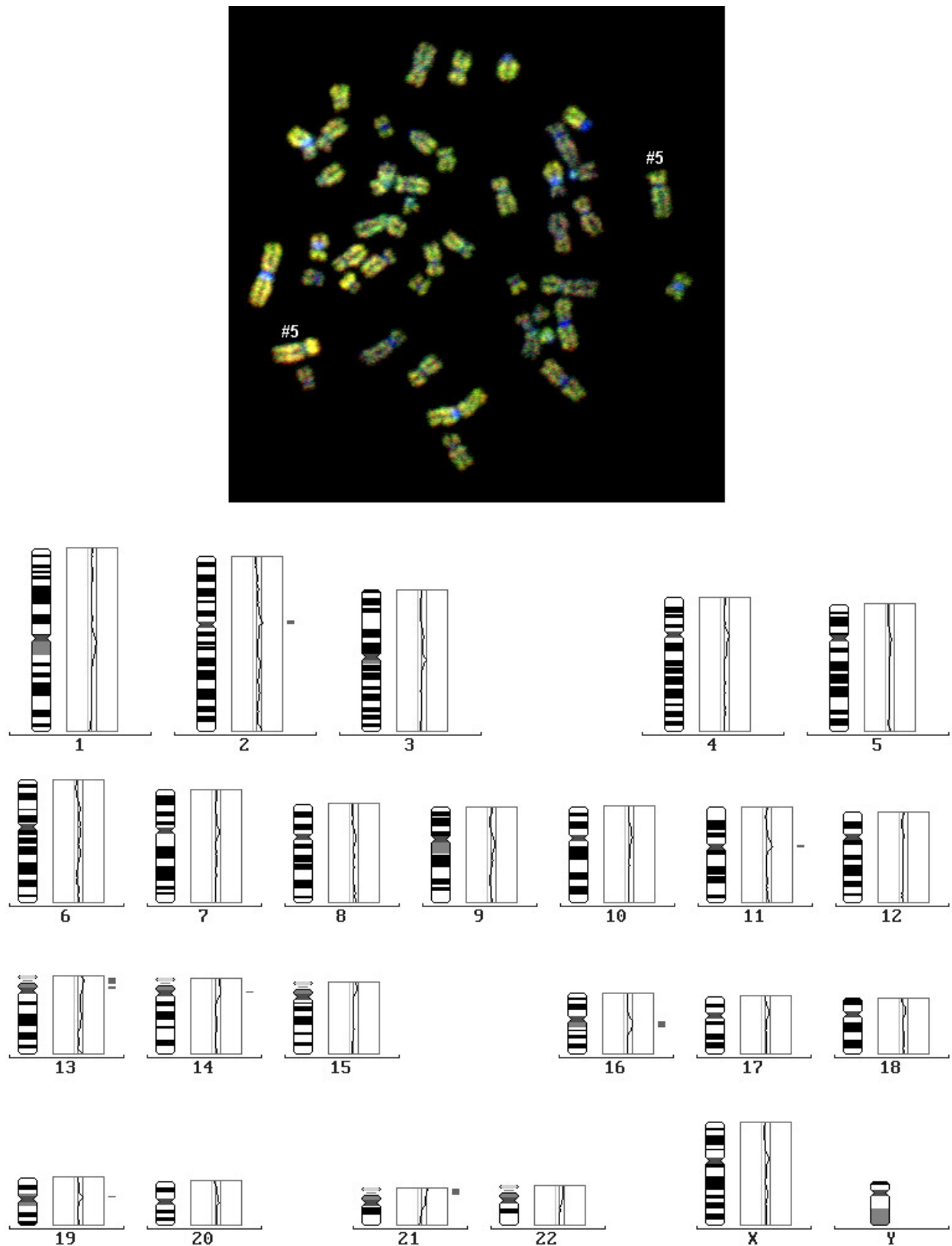


Abb. 67: CGH-Metaphase und CGH-Mittelprofil von 6 ausgewerteten Metaphasen des CGH-Kontrollansatzes mit haptenmarkierter DNA der HeLa-Parentallinie. Als Schwellenwerte wurden 0.83 für die untere und 1.17 für die obere Schwelle verwendet. Die Profilverläufe zeigen keine Kopienanzahlzugewinne oder -verluste an. Geringe Profilüberschreitungen treten nur in den von der Auswertung ausgeschlossen Centromerregionen einzelner Chromosomen auf.

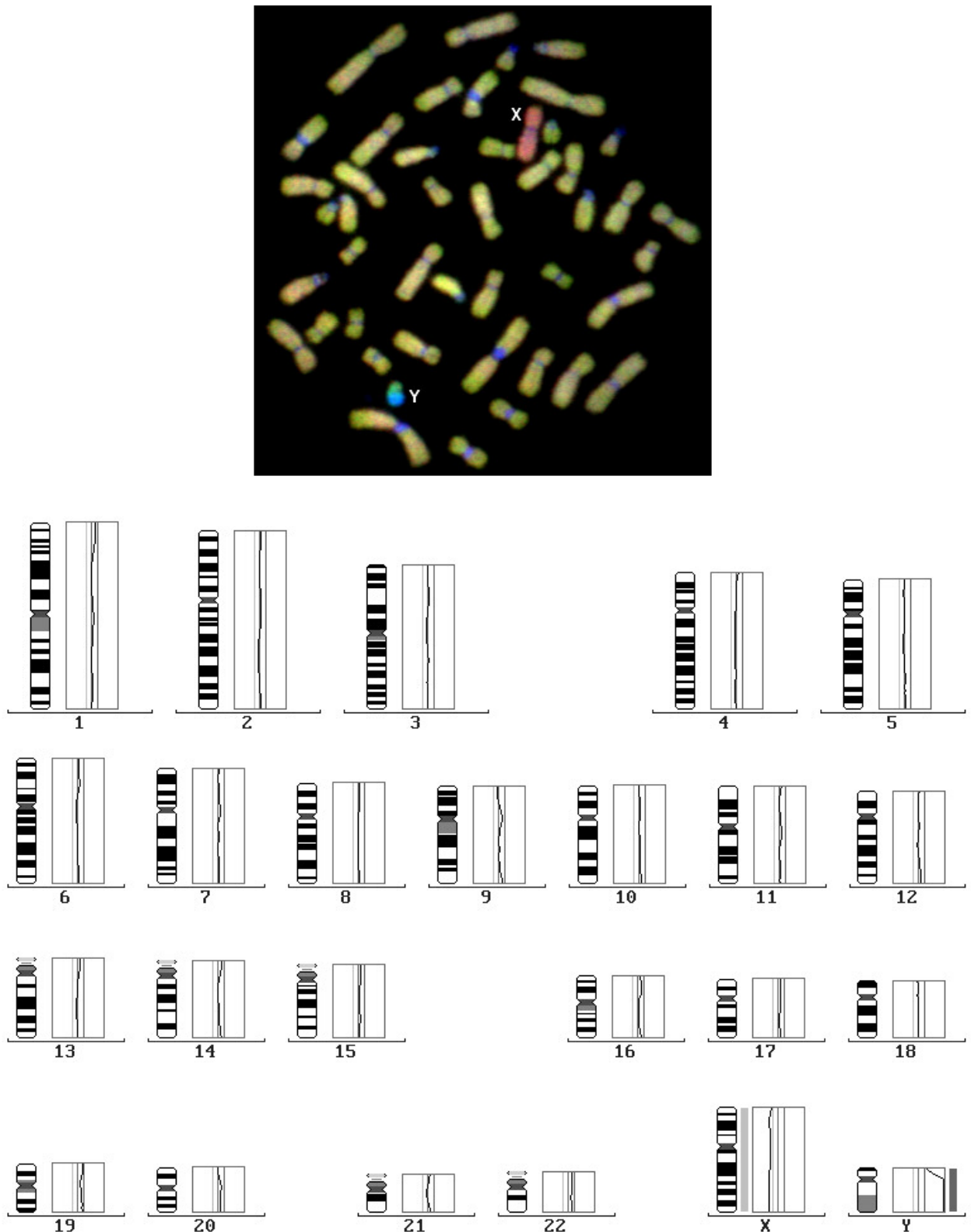


Abb. 68: CGH-Metaphase und CGH-Mittelprofil von 16 ausgewerteten Metaphasen des CGH-Kontrollansatzes mit direktmarkierter DNA aus männlichen und weiblichen Leukocyten. Als Schwellenwerte wurden 0.75 für die untere und 1.25 für die obere Schwelle verwendet. Die Profilauswertung ergibt eine Unterrepräsentanz des X-Chromosoms und eine Überrepräsentanz des Y-Chromosoms in der männlichen Test-DNA. Die Hybridisierung auf dem Heterochromatinblock in Yq ist supprimiert und zeigt nur die Fluoreszenz der DAPI-AMD-Gegenfärbung. Alle Chromosomen zeigen eine sehr homogene Hybridisierung.

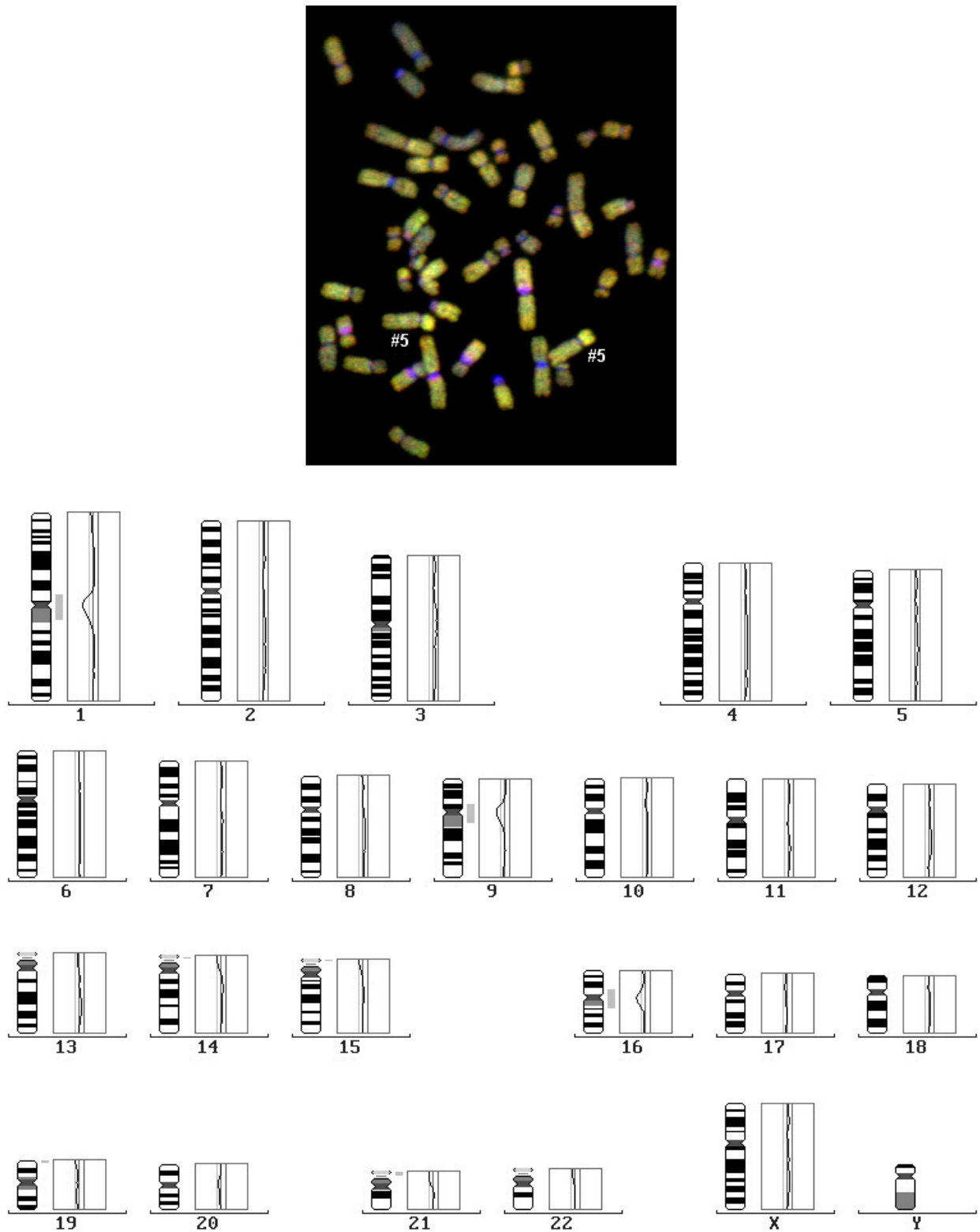


Abb. 69: CGH-Metaphase und CGH-Mittelprofil von 11 ausgewerteten Metaphasen des CGH-Kontrollansatzes mit direktmarkierter DNA der HeLa-Parentallinie. Als Schwellenwerte wurden 0.83 für die untere und 1.17 für die obere Schwelle verwendet. Die Profilverläufe zeigen keine Kopienanzahlzugewinne oder -verluste an. Profilüberschreitungen treten nur in den von der Auswertung ausgeschlossenen Centromer- und Heterochromatinregionen einzelner Chromosomen auf.

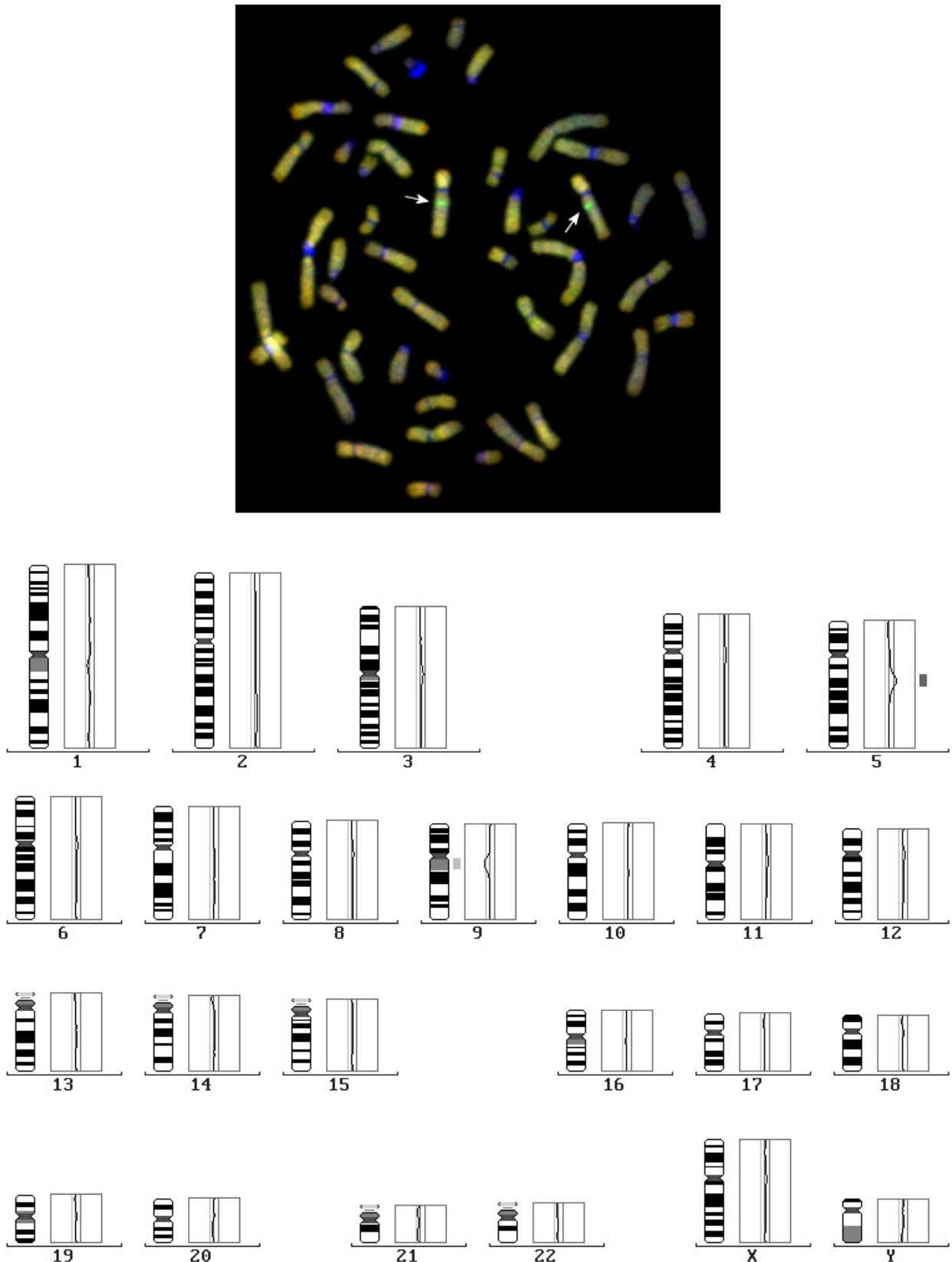


Abb. 70: CGH-Metaphase und CGH-Mittelprofil von 19 ausgewerteten Metaphasen des CGH-Ansatzes der Sublinie HeLa-1-MTX-1.0 mit Direktmarkierung. Als Schwellenwerte wurden 0.83 für die untere und 1.17 für die obere Schwelle verwendet. Die Profilauswertung zeigt einen Kopienanzugewinn in 5q13q14 (Pfeile im Bild; Balken im Profil) im Genom der Sublinie. Der Profilausschlag in der Heterochromatinregion von 9q ist unspezifisch.

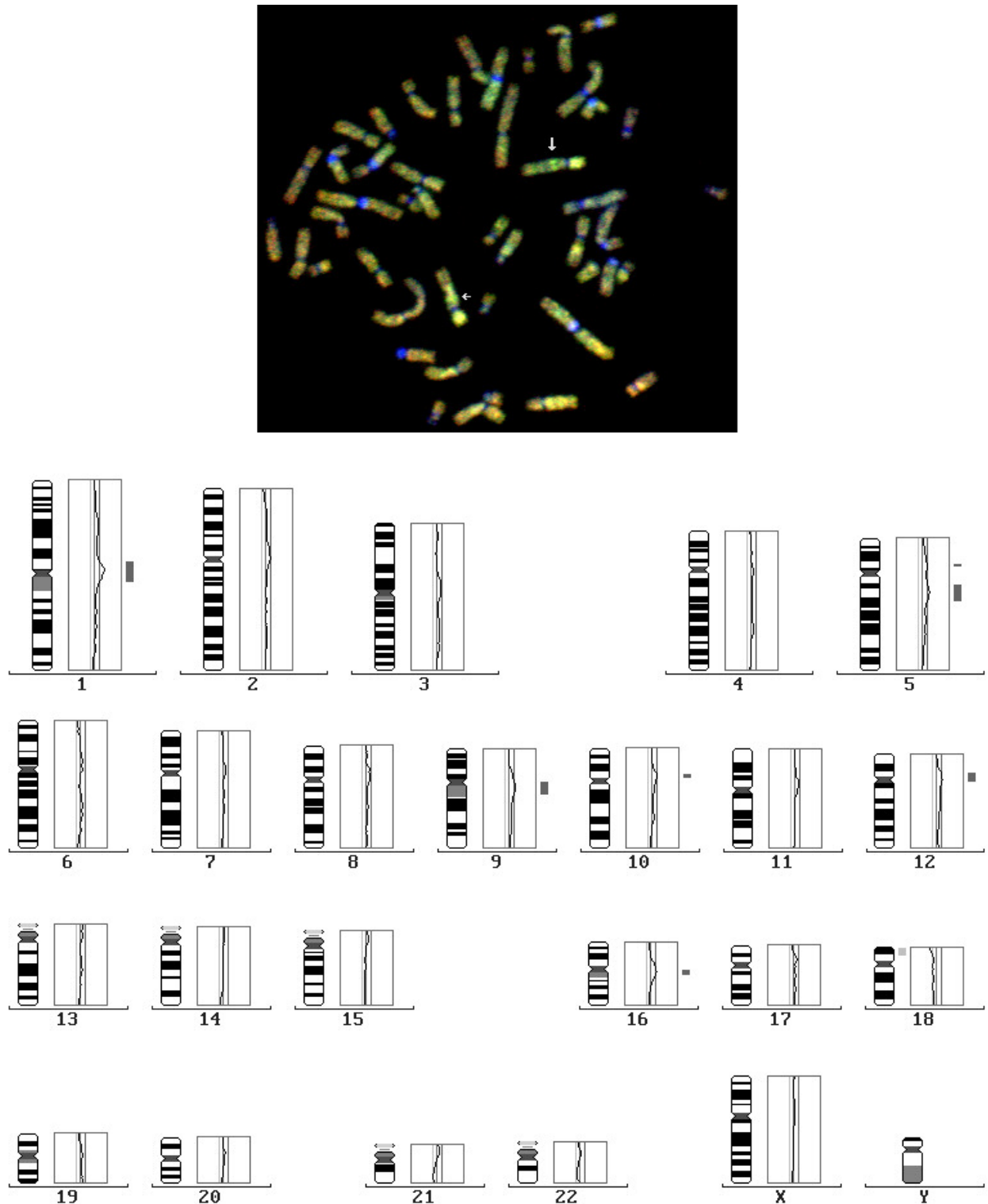


Abb. 71: CGH-Metaphase und CGH-Mittelprofil von 6 ausgewerteten Metaphasen des CGH-Ansatzes der Sublinie HeLa-2-MTX-1.0 mit Haptenmarkierung. Als Schwellenwerte wurden 0.83 für die untere und 1.17 für die obere Schwelle verwendet. Die Profilauswertung zeigt einen Sequenzzugewinn in 5q12q14 (Pfeile im Bild; Balken im Profil) und einen Kopienanzahlverlust von 18p (Balken im Profil) im Genom der Sublinie. Die Profilausschläge in den Centromerregionen einzelner Chromosomen sind unspezifisch.

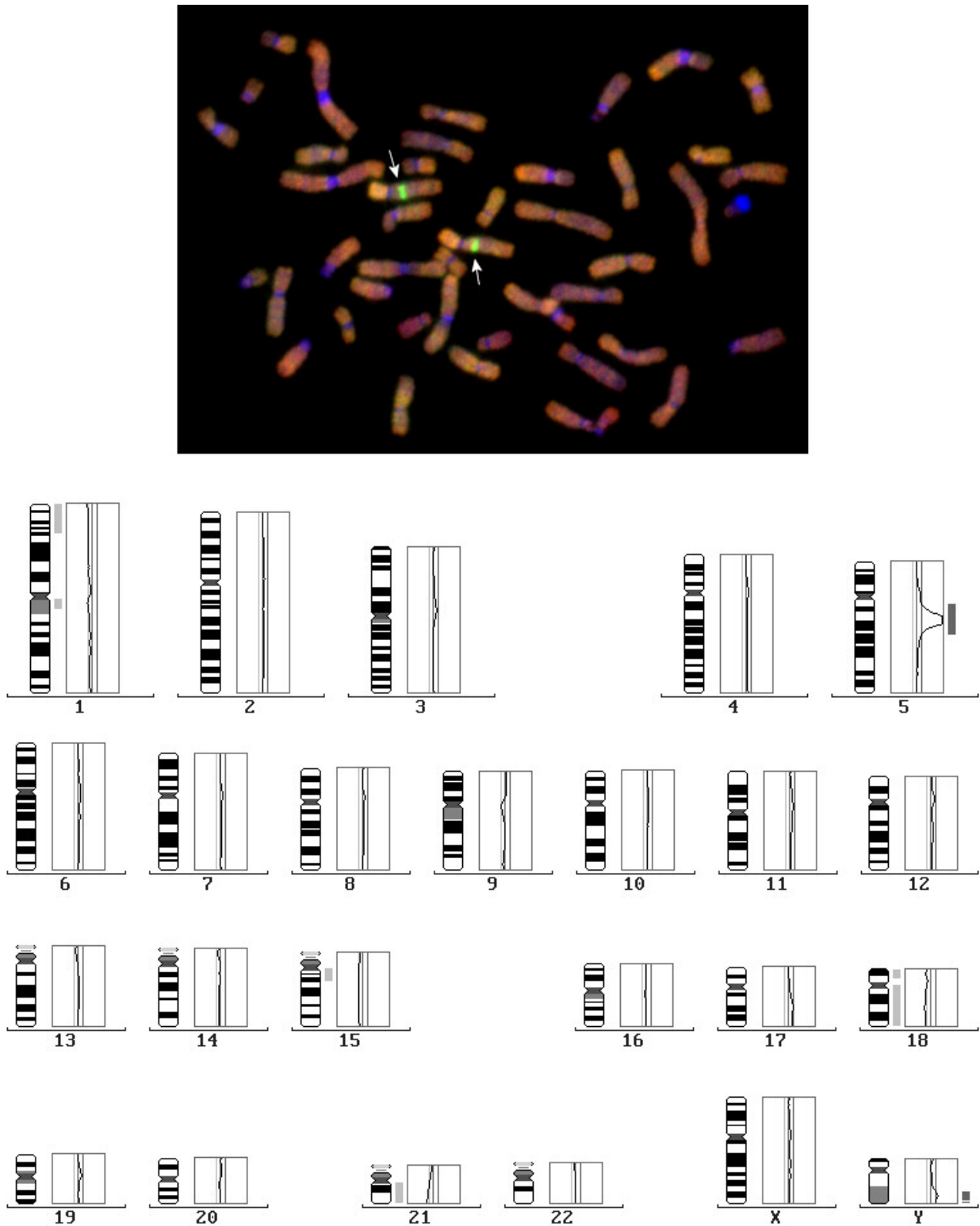


Abb. 72: CGH-Metaphase und CGH-Mittelprofil von 26 ausgewerteten Metaphasen des CGH-Ansatzes der Sublinie HeLa-2-MTX-10.0 mit Direktmarkierung. Als Schwellenwerte wurden 0.83 für die untere und 1.17 für die obere Schwelle verwendet. Die Profilauswertung zeigt eine Sequenzamplifikation in 5q11.2q15 (Pfeile im Bild; Balken im Profil) und einen Kopienanzahlverlust von 1p33p36.3, 15q11.2q14, #18 und #21 (Balken im Profil) im Genom der Sublinie. Die Profilausschläge in den Heterochromatinregionen von 1q und Yq sind unspezifisch.

B.9) Nachweis der amplifizierten Gensequenz

Das humane *DHFR*-Gen wurde durch FISH mit einer genspezifischen Sonde lokalisiert. Die Überprüfung der Spezifität der verwendeten *DHFR*-Sonde erfolgte durch FISH auf Metaphasen mit normalem männlichen Karyotyp (46,XY). Bei der Auswertung wurde ein Fluoreszenzsignal zur Unterscheidung von Hintergrundfluoreszenz nur dann als spezifisches Signal der *DHFR*-Sonde gewertet, wenn es auf beiden Chromatiden eines Chromosoms an gleicher Stelle auftrat, d.h. das Chromosom zwei paarweise nebeneinander liegende Einzelsignale aufwies (Viegas-Péquignot 1992). Aufgrund der geringen Größe der Sonde (8.6 kb genomisches *DHFR*-Insert) wurde nicht in allen ausgewerteten Metaphasen ein spezifisches Signal auf beiden homologen Chromosomen detektiert.

In zehn ausgewerteten Metaphasen wiesen insgesamt 14 #5 spezifische Signale der *DHFR*-Sonde auf (s. Abb. 73). 9 #5 zeigten eine Lokalisation der Sonde in der Bande 5q13, 4 #5 in 5q14 und 1 #5 in 5q12. Die häufigste Lokalisation der *DHFR*-Sonde lag auf 5q13 und stimmte mit den Angaben des Lieferanten der Sonde überein (s. Methoden, I.1.2). Spezifische Signale auf anderen Chromosomen, insbesondere auf den Chromosomen 3, 6 und 18, die Pseudogene des *DHFR* enthalten (Anagnou et al. 1988; Anagnou et al. 1984), wurden nicht beobachtet. Daher wurde die *DHFR*-Sonde unter den vorliegenden Hybridisierungsbedingungen als spezifisch für den funktionalen *DHFR*-Locus angesehen.

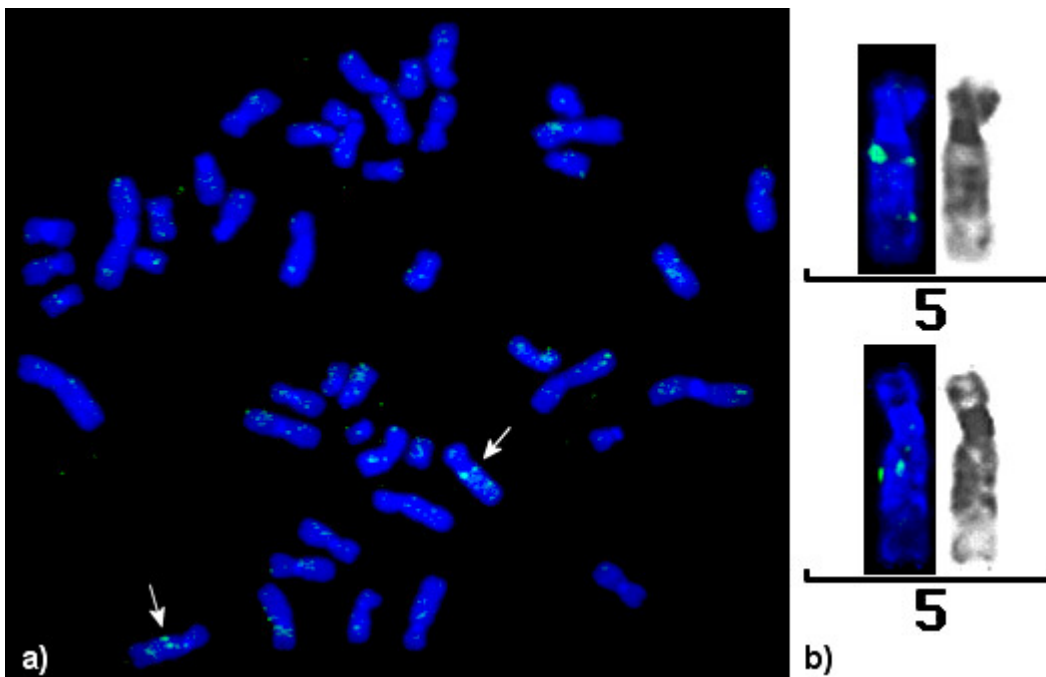


Abb. 73: FISH mit einer humanen *DHFR*-Sonde auf eine Metaphase mit normalem männlichen Karyotyp (46,XY) (a). Die beiden Chromosomen mit einem spezifischen Signal der Sonde (grün; Pfeile) können anhand des Bandenmusters der DAPI-AMD-Gegenfärbung als #5 identifiziert und die Sondenbindungsstelle auf 5q13 lokalisiert werden (b).

Bei den MTX-Sublinien HeLa-1-MTX-1.0 und HeLa-2-MTX-10.0 war nach FISH mit der *DHFR*-Sonde in allen ausgewerteten Metaphasen (12 bei HeLa-1-MTX-1.0, 10 bei HeLa-2-MTX-10.0, jeweils mit ≤ 69 Chromosomen) ein intensives Fluoreszenzsignal der *DHFR*-Sonde auf den enthaltenen Dmin zu beobachten (s. Abb. 74). Dies zeigte, dass in diesen Sublinien eine Amplifikation des *DHFR* in extrachromo-

somaler Form vorlag und die durch CGH detektierte #5-Region mit Sequenzzugewinn (s. B.8) das *DHFR* beinhaltete. Letzteres wurde auch durch die übereinstimmende chromosomale Lokalisation von *DHFR*-Sonde (s.o.) und der #5-Region mit Sequenzzugewinn bestätigt.

Die Lokalisation der *DHFR*-spezifischen Signale auf den Chromosomen war dagegen nur in sehr wenigen Metaphasen der beiden MTX-Sublinien und nur jeweils auf einem der vorhandenen #5 möglich. Dies war auch in hybridisierten Metaphasen der Parentallinie der Fall, so dass keine Analyse der intrachromosomal vorliegenden *DHFR*-Signale erfolgen konnte. Mögliche Gründe dafür stellten die geringe Größe der *DHFR*-Sonde, die bereits die Lokalisation in den Metaphasen mit normalem Karyotyp erschwerte (s.o.), und die zum Teil starke Kontraktion der Chromosomen in den HeLa-Metaphasen dar.

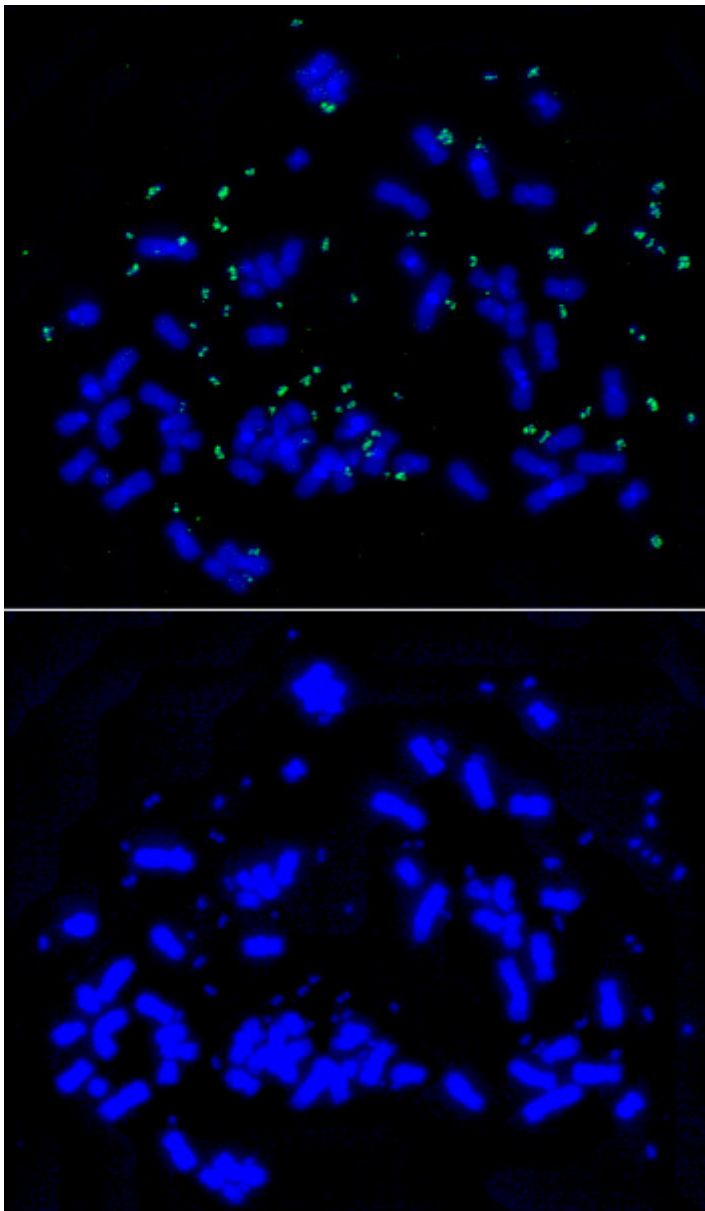


Abb. 74: FISH mit der humanen *DHFR*-Sonde auf eine Metaphase aus HeLa-1-MTX-1.0 (oberes Bild) und DAPI-AMD-Gegenfärbung der Chromosomen (unteres Bild). Während alle Dmin ein Signal der *DHFR*-Sonde (grün) zeigen, ist eine Lokalisation des *DHFR*-Signals auf den Chromosomen nicht möglich.

B.10) Lokalisation des Amplicons in den HeLa-MTX-Sublinien

Da die *DHFR*-Sequenz auf den Chromosomen der HeLa-Metaphasen durch FISH mit der *DHFR*-Sonde nicht lokalisiert werden konnte (s. B.9), wurde als Alternative eine Reverse In situ-Hybridisierung (REVISH) durchgeführt, bei der die amplifizierte Sequenz (Amplicon) der MTX-Sublinien aus den letzten Selektionsschritten als 'Sonde' für die *DHFR*-Region eingesetzt wurde. Dies war möglich, da die Sublinien HeLa-1-MTX-1.0, HeLa-2-MTX-1.0 und HeLa-2-MTX-10.0 nur ein einziges Amplicon enthielten und dieses in der Region des *DHFR*-Gens lokalisiert war (s. B.8.2) bzw. das *DHFR*-Gen beinhaltete (s. B.9). Die REVISH-Ansätze erfolgten in Form von CGHs auf Metaphasen der MTX-Sublinien. Die CGHs wurden wie der CGH-Ansatz der Sublinie HeLa-2-MTX-10.0 durchgeführt, weil die als amplifiziert detektierte Region bei diesem Ansatz im Vergleich zu den CGH-Ansätzen der Sublinien HeLa-1-MTX-1.0 und HeLa-2-MTX-1.0 das stärkste Signal zeigte (s. B.8.2) und somit am leichtesten zu visualisieren war.

B.10.1) Lokalisation des Amplicons in Metaphasen mit Double Minutes

Die Eignung der REVISH zur Detektion des Amplicons wurde durch REVISH auf Metaphasen der Sublinien HeLa-1-MTX-1.0 und HeLa-2-MTX-10.0 überprüft. In beiden Sublinien lag das Amplicon sowohl extrachromosomal in Dmin (s. B.9) als auch intrachromosomal in 5q-Trägerchromosomen (s. B.6) vor.

Nach der REVISH wurde das Amplicon in den Metaphasen beider Sublinien in den Dmin und in den 5q-Trägerchromosomen detektiert (s. Abb. 76). Die Lokalisation des Amplicons in den Dmin bestätigte, dass diese das als 'Sonde' verwendete Amplicon enthielten. Da auch die *DHFR*-Sequenz in den Dmin nachgewiesen wurde (s. B.9), stellte diese Sequenz einen Bestandteil des Amplicons dar, so dass die Lokalisation des Amplicons Rückschlüsse auf die Lokalisation des *DHFR* in den HeLa-Metaphasen ermöglichte.

Die intrachromosomale Lokalisation des Amplicons wurde in Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen und 5q-Normalstatus (s. B.6.1) der beiden Sublinien untersucht. In 32 Metaphasen von HeLa-1-MTX-1.0 und 18 Metaphasen von HeLa-2-MTX-10.0 zeigten die drei auftretenden 5q-Trägerchromosomen, zwei #5 und ein m5, jeweils ein Ampliconsignal. Damit entsprach die 5q-Anzahl von drei der intrachromosomal vorliegenden Kopienanzahl des Amplicons bzw. des *DHFR*-Gens in diesen Metaphasen. Mit Hilfe des DAPI-Bandenmusters wurde das Amplicon auf den 5q-Trägerchromosomen in 5q13, der Region des *DHFR* (s. B.9), lokalisiert (s. Abb. 75).

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde die REVISH als geeignet zur Detektion und Lokalisation des Amplicons in den Chromosomen der HeLa-Metaphasen angesehen.

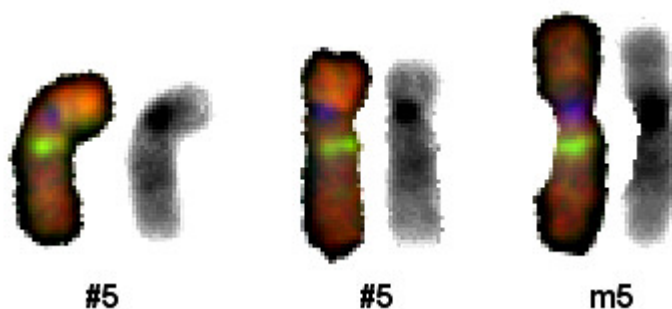


Abb. 75: Zusammenstellung der Chromosomen mit Ampliconsignal aus der REVISH-Metaphase von Abb. 76. Die beiden #5 und das derivative Chromosom m5 zeigen ein grünes Ampliconsignal (linksstehende Chromosomen), das in der Region 5q13 lokalisiert ist (invertiertes Bild der DAPI-AMD-Gegenfärbung, rechte Chromosomen).

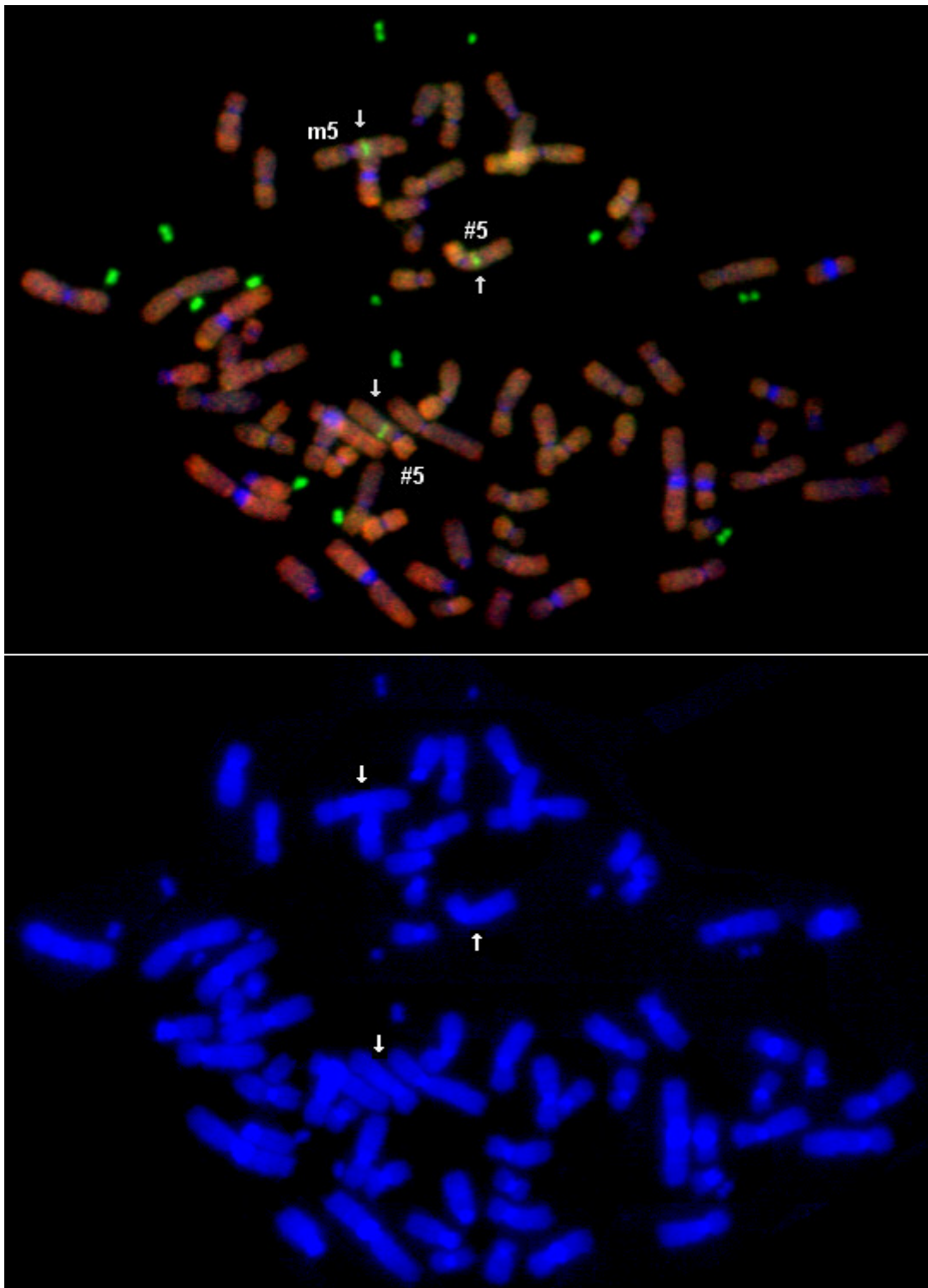


Abb. 76: REVISH auf eine Metaphase aus HeLa-1-MTX-1.0 (oberes Bild) und DAPI-AMD-Gegenfärbung der Metaphase (unteres Bild). Alle Dmin zeigen ein Signal der amplifizierten Sequenz (grün). Daneben sind drei weitere, intrachromosomal lokalisierte Signale (Pfeile) auf zwei #5 und dem derivativen 5q-Trägerchromosom m5 sichtbar. In dieser Metaphase liegt der 5q-Normalstatus (s. B.6.1) vor.

B.10.2) Intrachromosomale Ampliconanzahl pro Metaphase

Die intrachromosomale Ampliconanzahl pro Metaphase entsprach der Summe der auf Chromosomen lokalisierten Ampliconsignale in einer Metaphase. Extrachromosomal vorliegende Ampliconsignale wurden dabei nicht berücksichtigt.

Zur Ermittlung von Anzahl und Lokalisation der intrachromosomalen Amplicons wurden bei den HeLa-MTX-Sublinien pro Sublinie je nach Verfügbarkeit zwischen 26 und 51 REVISH-Metaphasen ausgewertet. Analog zur 5q-Status-Bestimmung (s. B.6) erfolgte eine Einteilung der Metaphasen nach ihrer Chromosomenanzahl in Metaphasen mit ≤ 69 und > 69 Chromosomen. In beiden Metaphasengruppen wurde eine weitere Einteilung der Metaphasen nach Anzahl der intrachromosomalen Amplicons vorgenommen. Dazu wurden die bei der 5q-Anzahl-Auswertung verwendeten drei Kategorien (s. B.6.3) entsprechend modifiziert (s. Tab. 15).

Tabelle 15: Metaphasenkategorien nach intrachromosomaler Ampliconanzahl

intrachromosomale Ampliconanzahl pro Metaphase	Metaphasenkategorie
3	Metaphasen mit 3 int. Amplicons
>3	Metaphasen mit >3 int. Amplicons
<3	Metaphasen mit <3 int. Amplicons

int. = intrachromosomal

Der 5q-Status wurde in den REVISH-Metaphasen anhand des DAPI-Bandenmusters ermittelt und die jeweils vorliegende Kombination der 5q-Trägerchromosomen in Relation zum 5q-Normalstatus (N) angegeben (s. B.6.1, B.6.4). Mit Ausnahme des m5 (s. B.6.1) wurden derivative Chromosomen mit Amplicon als 'derivative Amplicon-haltige Chromosomen' bezeichnet, da in diesen Chromosomen nicht immer vollständige 5q erkennbar waren. Nach Anzahl der enthaltenen Amplicons wurden sie in derivative Chromosomen mit einem Amplicon, abgekürzt 'Der(1xAmplicon)', mit zwei Amplicons, abgekürzt 'Der(2xAmplicon)', und mit drei Amplicons, abgekürzt 'Der(3xAmplicon)', eingeteilt.

B.10.2.1) Intrachromosomale Ampliconanzahl in der HeLa-Parentallinie

Bei der HeLa-Parentallinie wiesen 94% der ausgewerteten REVISH-Metaphasen ≤ 69 Chromosomen und drei intrachromosomale Amplicons auf (s. Abb. 77). In 88% dieser Metaphasen lag der 5q-Normalstatus N (s. B.6.1) und in 6% Metaphasen ein anderer 5q-Status vor (Kombinationen: $N+\#5-m5$ (4%) und $N-\#5+1Der(1xAmplicon)$ (2%)).

Metaphasen mit > 69 Chromosomen traten zu 6% auf und umfaßten 2% Metaphasen mit drei Amplicons und 5q-Normalstatus sowie 4% Metaphasen mit fünf bzw. sechs Amplicons auf einer entsprechenden Anzahl an 5q-Trägerchromosomen oder derivativen Amplicon-haltigen Chromosomen (Kombinationen: $N+m5+1Der(1xAmplicon)$ (2%) und $2N$ (2%)).

In insgesamt 96% der Metaphasen (≤ 69 und > 69 Chromosomen) stimmte die 5q-Anzahl mit der Anzahl an intrachromosomalen Amplicons bzw. *DHFR*-Kopien überein. Ausnahmen waren nur in 4% Metaphasen zu beobachten, die jeweils ein derivatives Chromosom mit einem Amplicon enthielten, das nicht als 5q-Trägerchromosom erkannt wurde.

B.10.2.2) Intrachromosomale Ampliconanzahl in den HeLa-1-MTX-Sublinien

Bei den HeLa-1-MTX-Sublinien wies der überwiegende Teil (88-100%) der REVISH-Metaphasen eine Chromosomenanzahl von ≤ 69 auf. In dieser Metaphasengruppe waren erste signifikante Veränderungen in der intrachromosomalen Ampliconanzahl gegenüber der Parentallinie (s. B.10.2.1) bei Sublinie HeLa-1-MTX-0.06 zu beobachten (s. Abb. 77). HeLa-1-MTX-0.06 zeigte einen erhöhten Anteil (50%) an Metaphasen mit >3 intrachromosomalen Amplicons bei gleichzeitiger Abnahme der Metaphasen mit 3 Amplicons auf 45%. Im Hauptanteil (42%) der Metaphasen mit >3 Amplicons lag ein zusätzliches Amplicon vor, das in 21% der Metaphasen auf einem #5 und in 5% auf einem m5 lokalisiert war. 3% der Metaphasen enthielten ein zusätzliches Der(1xAmplicon) und 13% wiesen einen #5- oder m5-Verlust in Kombination mit einem Der(2xAmplicon) auf. In 8% der Metaphasen wurden zwei zusätzliche Amplicons detektiert, die aus dem Vorliegen eines Der(3xAmplicon) bei gleichzeitigem #5-Verlust resultierten.

HeLa-1-MTX-0.12 enthielt mit 70% den höchsten Anteil an Metaphasen mit >3 intrachromosomalen Amplicons von allen HeLa-1-MTX-Sublinien. Die meisten dieser Metaphasen (40%) zeigten ebenfalls einen Zugewinn von einem Amplicon. Dieser erfolgte in Form eines zusätzlichen Amplicon-haltigen Chromosoms, das in 30% der Metaphasen einem #5 und in jeweils 5% einem m5 oder Der(1xAmplicon) entsprach. Daneben traten 30% Metaphasen mit Zugewinn von zwei Amplicons auf, die alle einen #5-Verlust und ein Der(3xAmplicon) aufwiesen. Metaphasen mit 3 Amplicons waren dagegen auf 30% reduziert.

In den nachfolgenden Sublinien HeLa-1-MTX-0.25, HeLa-1-MTX-0.50 und HeLa-1-MTX-1.0 setzte sich die Anreicherung von Metaphasen mit Zugewinnen intrachromosomaler Amplicons nicht fort. Der Anteil der Metaphasen mit >3 Amplicons erreichte bei HeLa-1-MTX-0.25 nur noch 15% und bei HeLa-1-MTX-0.50 und HeLa-1-MTX-1.0 jeweils 6%. Dagegen zeigte sich bei HeLa-1-MTX-0.25 und HeLa-1-MTX-0.50 ein starker Anstieg von Metaphasen mit <3 Amplicons auf 39% bzw. 43%. In diesen Metaphasen lag eine Reduktion der intrachromosomalen Ampliconanzahl auf zwei vor, die hauptsächlich auf einem #5-Verlust und seltener auf einem m5-Verlust beruhte. Bei HeLa-1-MTX-0.25 wiesen 33% der Metaphasen mit <3 Amplicons einen #5-Verlust und je 3% einen m5-Verlust bzw. einen Verlust aller #5 und m5 bei gleichzeitigem Auftreten von zwei Der(1xAmplicon) auf. HeLa-1-MTX-0.50 enthielt in allen Metaphasen mit erniedrigter Ampliconanzahl einen #5-Verlust. In HeLa-1-MTX-1.0 wurden noch 20% Metaphasen mit <3 Amplicons und ebenfalls einem #5-Verlust detektiert.

Parallel dazu nahm der Anteil der Metaphasen mit 3 Amplicons in HeLa-1-MTX-0.25, HeLa-1-MTX-0.50 und HeLa-1-MTX-1.0 wieder zu (auf 44%, 39% und 65%), blieb jedoch auch in HeLa-1-MTX-1.0 im Vergleich zur Parentallinie signifikant erniedrigt. Die Metaphasen mit 3 Amplicons wiesen bei allen HeLa-1-MTX-Sublinien überwiegend (zu $>81\%$) den 5q-Normalstatus auf. In den Metaphasen mit anderem 5q-Status lag i.d.R. ein #5-Verlust in Kombination mit einem Der(1xAmplicon) vor.

Bei HeLa-1-MTX-0.25 und HeLa-1-MTX-0.50 wies ein Teil der Metaphasen pulverisiertes Chromatin (Pvz; s. B.4.4) auf, das nach REVISH Hybridisierungssignale zeigte. Dies bestätigte die Zusammensetzung des Pvz aus humaner DNA. Ampliconsignale wurden in den Pvz-Aggregaten nicht beobachtet.

Metaphasen mit >69 Chromosomen traten in den HeLa-1-MTX-Sublinien zu maximal 12% auf und enthielten meist >3 intrachromosomale Amplicons (Wertebereich: 4-12 Amplicons pro Metaphase; Modalwert aller Metaphasen mit >69 Chromosomen der HeLa-1-MTX-Sublinien: 6 Amplicons pro Metaphase). Signifikante Unterschiede zur Parentallinie wurden jedoch aufgrund der geringen Häufigkeiten der Metaphasen in dieser Gruppe nicht sichtbar.

B.10.2.3) Intrachromosomale Ampliconanzahl in den HeLa-2-MTX-Sublinien

Der Hauptanteil (86-100%) der ausgewerteten REVISH-Metaphasen der HeLa-2-MTX-Sublinien enthielt ≤ 69 Chromosomen, nur Sublinie HeLa-2-MTX-0.50 wies einen geringeren Anteil von 70% Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen auf. In dieser Metaphasengruppe war bei den Sublinien HeLa-2-MTX-0.03/2 bis HeLa-2-MTX-0.25 eine kontinuierliche Abnahme der Metaphasen mit 3 intrachromosomalen Amplicons festzustellen (auf 86% bei HeLa-2-MTX-0.03/2, 63% bei HeLa-2-MTX-0.06, 27% bei HeLa-2-MTX-0.12 und 16% bei HeLa-2-MTX-0.25). Parallel dazu trat ab Sublinie HeLa-2-MTX-0.06 eine Zunahme von Metaphasen mit >3 Amplicons auf (s. Abb. 78).

HeLa-2-MTX-0.06 wies 30.2% Metaphasen mit >3 Amplicons auf, die sich aus 25.6% Metaphasen mit Zugewinn von einem Amplicon und 4.6% Metaphasen mit Zugewinn von zwei Amplicons zusammensetzten. Der Zugewinn eines Amplicons war überwiegend auf das Vorliegen eines zusätzlichen #5, m5 oder Der(1xAmplicon) zurückzuführen (in jeweils 7%, 9.3% und 4.6% der Metaphasen). In weiteren 4.6% der Metaphasen lag ein Der(2xAmplicon) in Verbindung mit einem #5-Verlust vor. Ein Zugewinn von zwei Amplicons wurde in jeweils 2.3% Metaphasen mit einem Der(3xAmplicon) und #5-Verlust bzw. mit zwei zusätzlichen #5 sowie einem Der(1xAmplicon) und m5-Verlust detektiert.

HeLa-2-MTX-0.12 enthielt mit 60% einen fast doppelt so hohen Anteil an Metaphasen mit >3 Amplicons als HeLa-2-MTX-0.06. Auch hier wiesen die meisten Metaphasen (44.4%) ein zusätzliches Amplicon auf, das hauptsächlich auf einem #5 vorlag (in 33.3% der Metaphasen). Ein zusätzliches m5 trat in 6.7% der Metaphasen und ein zusätzliches Der(1xAmplicon) in 4.4% der Metaphasen auf. Der Zugewinn von zwei Amplicons war in 15.6% der Metaphasen mit >3 Amplicons zu beobachten und erfolgte bei 13.3% dieser Metaphasen in Form eines zusätzlichen Der(3xAmplicon) bei gleichzeitigem #5-Verlust und bei 2.2% in Form von zwei zusätzlichen m5.

In HeLa-2-MTX-0.25 wurde der höchste Anteil, 72%, an Metaphasen mit >3 Amplicons von allen HeLa-2-MTX-Sublinien detektiert. 58% dieser Metaphasen zeigten einen Zugewinn von einem Amplicon, der bei 30% aus dem Vorliegen eines zusätzlichen #5, bei 22% aus einem zusätzlichen m5 und bei 4% aus einem zusätzlichen Der(1xAmplicon) resultierte. In weiteren 2% Metaphasen lag ein Zugewinn von einem m5 und zwei Der(1xAmplicon) bei vollständigem Verlust der #5 vor. 10% der Metaphasen mit >3 Amplicons wiesen einen Zugewinn von zwei Amplicons auf, der in 6% der Metaphasen durch das Auftreten eines Der(3xAmplicon) in Verbindung mit einem #5-Verlust und in 4% durch das Auftreten eines Der(2xAmplicon) bedingt war. Metaphasen mit Zugewinn von drei Amplicons (bei ≤ 69 Chromosomen) traten nur in HeLa-2-MTX-0.25 auf und erreichten einen Anteil von 4%. Von diesen enthielten jeweils 2% einen Zugewinn von drei #5 bzw. von je einem Der(1xAmplicon) und Der(2xAmplicon).

Ab Sublinie HeLa-2-MTX-0.50 dominierten wieder Metaphasen mit 3 Amplicons in den MTX-Sublinien. Gleichzeitig war eine starke Reduktion der Metaphasen mit >3 Amplicons zu beobachten. Bei HeLa-2-MTX-0.50 lagen 54% Metaphasen mit 3 Amplicons und nur noch 16% Metaphasen mit erhöhter Ampliconanzahl (je 4% mit $N+\#5$, $N+m5$ und $N+1Der(2xAmplicon)$ sowie je 2% mit $N-m5+2Der(1xAmplicon)$ und $N-m5+1Der(2xAmplicon)$) vor. HeLa-2-MTX-1.0 und HeLa-2-MTX-10.0 wiesen 77% bzw. 65.5% Metaphasen mit 3 Amplicons und 15% bzw. 14% Metaphasen mit >3 Amplicons auf. In den Metaphasen mit Ampliconzugewinn wurden bei HeLa-2-MTX-1.0 Zugewinne von ein und zwei #5, von einem Der(1xAmplicon) sowie von einem Der(2xAmplicon) bei m5-Verlust ermittelt. Bei HeLa-2-MTX-10.0 traten

Zugewinne von einem Der(1xAmplicon) und von zwei Der(1xAmplicon) in Kombination mit einem Der(2xAmplicon) und vollständigem Verlust der #5 auf.

Metaphasen mit 3 Amplicons zeigten bei allen HeLa-2-MTX-Sublinien überwiegend (zu $\geq 75\%$) den 5q-Normalstatus. Ein anderer 5q-Status war nur in einem geringen Anteil dieser Metaphasen zu beobachten und meist durch einen #5-Verlust bei Vorliegen eines Der(1xAmplicon) charakterisiert.

Metaphasen mit < 3 Amplicons erreichten in den HeLa-2-MTX-Sublinien, im Gegensatz zu den HeLa-1-MTX-Sublinien (s.o.), nur Anteile von maximal 10% und wiesen infolge eines #5-Verlustes zwei intrachromosomale Amplicons auf. Die einzige Ausnahme stellte eine Metaphase in HeLa-2-MTX-0.25 mit Verlust eines #5 und m5 bei Anwesenheit von Dmin dar.

Auf die Metaphasengruppe mit > 69 Chromosomen entfielen nur maximal 14% der Metaphasen der HeLa-2-MTX-Sublinien, mit Ausnahme von HeLa-2-MTX-0.50, die 30% Metaphasen mit > 69 Chromosomen enthielt. Im Hauptanteil dieser Metaphasen wurden > 3 Amplicons detektiert (Wertebereich: 4-21 Amplicons pro Metaphase; Modalwert aller Metaphasen mit > 69 Chromosomen der HeLa-2-MTX-Sublinien: 6 Amplicons pro Metaphase).

Im Vergleich ergab die Auswertung von Anzahl und Lokalisation der intrachromosomalen Amplicons in den HeLa-MTX-Sublinien die gleichen Tendenzen, die auch bei der 5q-Status-Auswertung nach G-Bänderung (s. B.6) festgestellt wurden. In den meisten Metaphasen entsprach die 5q-Anzahl der Anzahl an intrachromosomalen Amplicons bzw. *DHFR*-Kopien. Nur in Metaphasen mit derivativen Amplicon-haltigen Chromosomen, die keinen vollständigen 5q enthielten und somit anhand des DAPI-Bandenmusters nicht als 5q-Trägerchromosomen erkannt wurden, wurde eine höhere Anzahl an intrachromosomalen Amplicons als an 5q detektiert. Dies zeigte, dass die Abschätzung der intrachromosomalen *DHFR*-Kopienanzahl anhand der 5q-Anzahl in G-gebänderten HeLa-Metaphasen zu einem richtigen Ergebnis führen konnte, jedoch das Risiko einer Unterschätzung der tatsächlich vorhandenen Anzahl an intrachromosomalen *DHFR*-Kopien in sich barg.

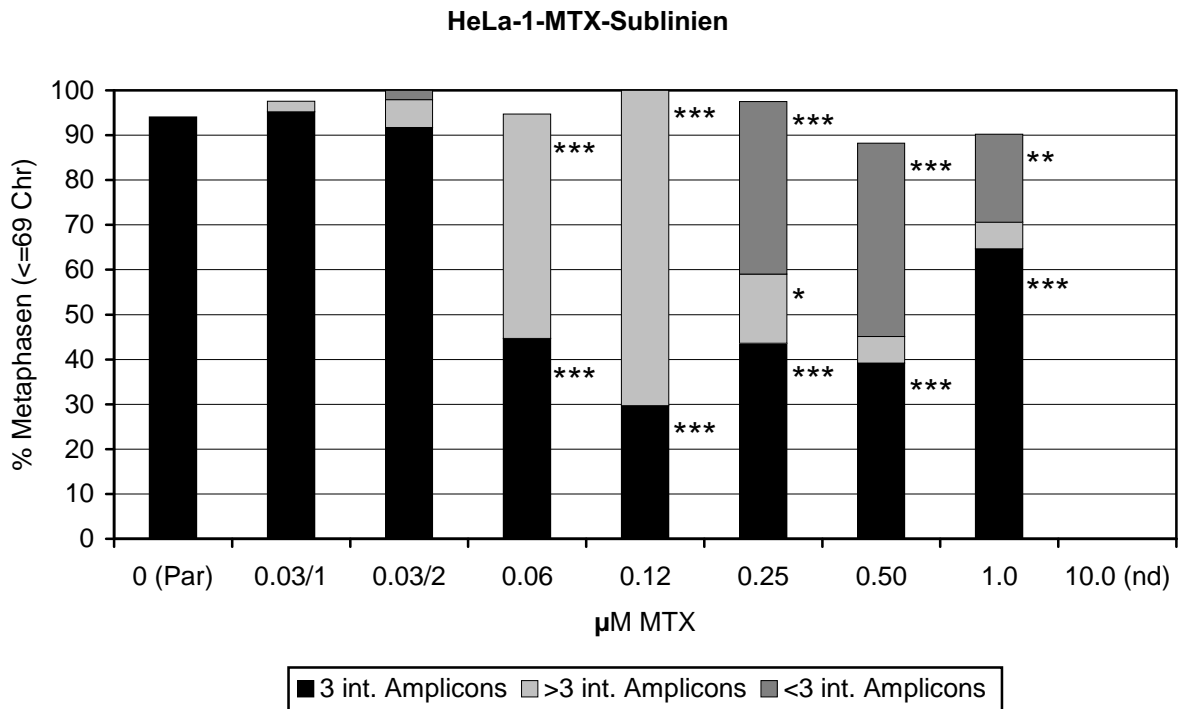


Abb. 77: Häufigkeit von Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen und der in der Legende aufgeführten intra-chromosomalen Ampliconanzahl in den HeLa-1-MTX-Sublinien nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen. Chr = Chromosomen; int. = intrachromosomal; nd = nicht durchgeführt; Par = Parentallinie; Symbole (*): s. Methoden, J)

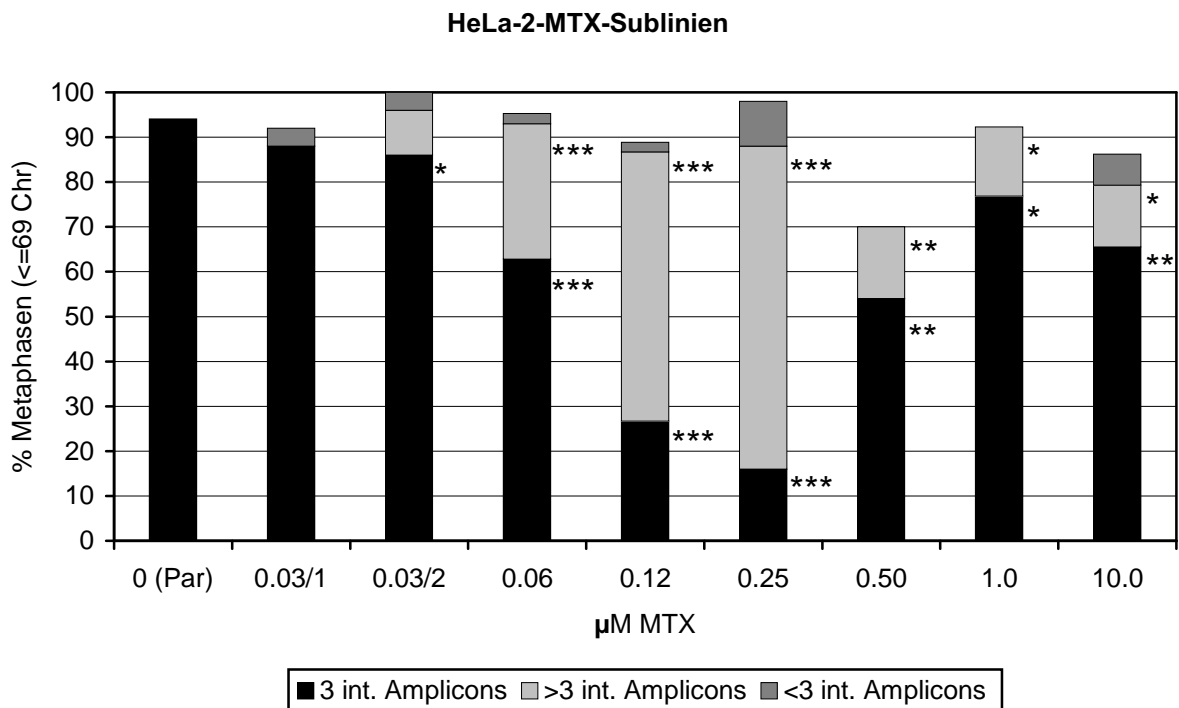


Abb. 78: Häufigkeit von Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen und der in der Legende aufgeführten intra-chromosomalen Ampliconanzahl in den HeLa-2-MTX-Sublinien nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen. Chr = Chromosomen; int. = intrachromosomal; Par = Parentallinie; Symbole (*): s. Methoden, J)

B.10.3) Derivative Amplicon-haltige Chromosomen

Derivative Amplicon-haltige Chromosomen umfaßten derivative Chromosomen mit ein, zwei oder drei Amplicons (mit Ausnahme des m5 (s. B.6.1)) und wurden abgekürzt als Der(1xAmplicon), Der(2xAmplicon) und Der(3xAmplicon) bezeichnet (s. B.10.2).

B.10.3.1) Metaphasen mit derivativen Amplicon-haltigen Chromosomen

Die HeLa-Parentallinie enthielt jeweils 2% Metaphasen mit ≤ 69 und mit >69 Chromosomen, die je ein Der(1xAmplicon) aufwiesen.

Bei Selektion 1 traten nur in der Metaphasengruppe mit ≤ 69 Chromosomen signifikant erhöhte Anteile an Metaphasen mit derivativen Amplicon-haltigen Chromosomen auf. In Sublinie HeLa-1-MTX-0.06 lagen 26% dieser Metaphasen vor, die 5% Metaphasen mit Der(1xAmplicon), 13% Metaphasen mit Der(2xAmplicon) und 8% Metaphasen mit Der(3xAmplicon) beinhalteten (s. Abb. 79). HeLa-1-MTX-0.12 wies 35% Metaphasen mit derivativen Amplicon-haltigen Chromosomen, davon 5% mit Der(1xAmplicon) und 30% mit Der(3xAmplicon), auf. Die übrigen HeLa-1-MTX-Sublinien enthielten in maximal 8% der ausgewerteten Metaphasen derivative Chromosomen, die jeweils ein Amplicon zeigten. Eine Ausnahme stellte HeLa-1-MTX-0.25 dar, die je 3% Metaphasen mit Der(1xAmplicon), Der(3xAmplicon) und zwei Der(1xAmplicon) aufwies.

Metaphasen mit >69 Chromosomen und derivativen Amplicon-haltigen Chromosomen lagen nur in HeLa-1-MTX-0.03/1 und HeLa-1-MTX-0.50 zu jeweils 2% und mit je einem Der(2xAmplicon) vor.

Bei Selektion 2 wurden signifikant erhöhte Anteile an Metaphasen mit derivativen Amplicon-haltigen Chromosomen ebenfalls nur in der Metaphasengruppe mit ≤ 69 Chromosomen beobachtet. Die Sublinien HeLa-2-MTX-0.06 und HeLa-2-MTX-0.12 enthielten mit 16% bzw. 17.7% vergleichbare Anteile von Metaphasen mit derivativen Amplicon-haltigen Chromosomen (s. Abb. 80). Bei HeLa-2-MTX-0.06 überwogen Metaphasen mit Der(1xAmplicon) (9%) gegenüber Metaphasen mit Der(2xAmplicon) (5%) und Der(3xAmplicon) (2%). In HeLa-2-MTX-0.12 dominierten dagegen, wie bei HeLa-1-MTX-0.12 (s.o.), Metaphasen mit Der(3xAmplicon) (13.3%) neben einem nur geringen Anteil an Metaphasen mit Der(1xAmplicon) (4.4%). HeLa-2-MTX-0.25 wies mit 22% den höchsten Anteil an Metaphasen mit derivativen Amplicon-haltigen Chromosomen aller HeLa-2-MTX-Sublinien auf. In jeweils 6% dieser Metaphasen lagen ein Der(1xAmplicon), ein Der(2xAmplicon) bzw. ein Der(3xAmplicon) vor und in 4% traten zwei derivative Chromosomen mit ein bis zwei Amplicons auf (2% mit zwei Der(1xAmplicon) sowie 2% mit einem Der(1xAmplicon) und einem Der(2xAmplicon)). In der nachfolgenden Sublinie HeLa-2-MTX-0.50 wurden nur noch 8% Metaphasen mit derivativen Amplicon-haltigen Chromosomen gefunden, von denen 6% ein Der(2xAmplicon) und 2% zwei Der(1xAmplicon) enthielten. HeLa-2-MTX-1.0 und HeLa-2-MTX-10.0 zeigten wieder höhere Anteile von 15% bzw. 17% dieser Metaphasen, die überwiegend ein Der(1xAmplicon) aufwiesen (11% bei HeLa-2-MTX-1.0; 14% bei HeLa-2-MTX-10.0). Bei HeLa-2-MTX-1.0 waren zusätzlich 4% Metaphasen mit einem Der(2xAmplicon) und bei HeLa-2-MTX-10.0 3% Metaphasen mit einer Kombination aus zwei Der(1xAmplicon) und einem Der(2xAmplicon) vorhanden.

In der Metaphasengruppe mit >69 Chromosomen traten derivative Amplicon-haltige Chromosomen in maximal 7% der Metaphasen der HeLa-2-MTX-Sublinien auf. Diese Metaphasen enthielten zwischen 1 und 11 derivative Chromosomen mit ein bis drei Amplicons.

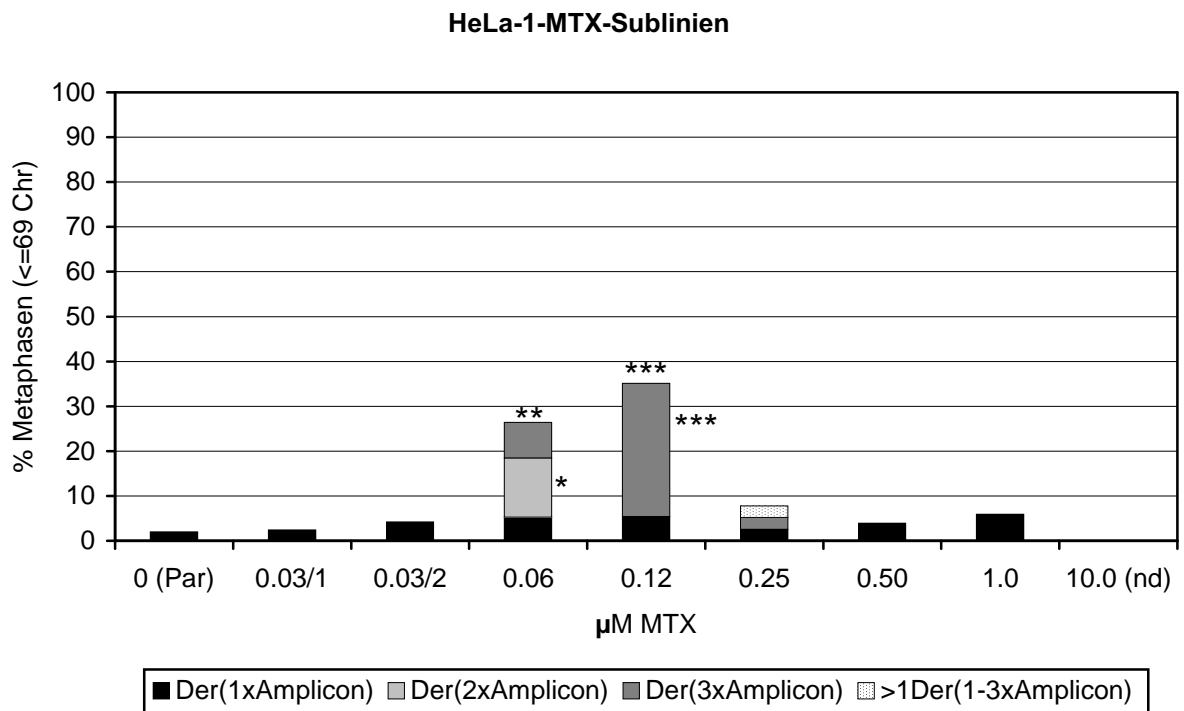


Abb. 79: Häufigkeit von Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen und derivativen Chromosomen mit ein, zwei und drei Amplicons (Der(1xAmplicon), Der(2xAmplicon), Der(3xAmplicon)) in den HeLa-1-MTX-Sublinien nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen. Abkürzungen und Symbole (*): s.u.

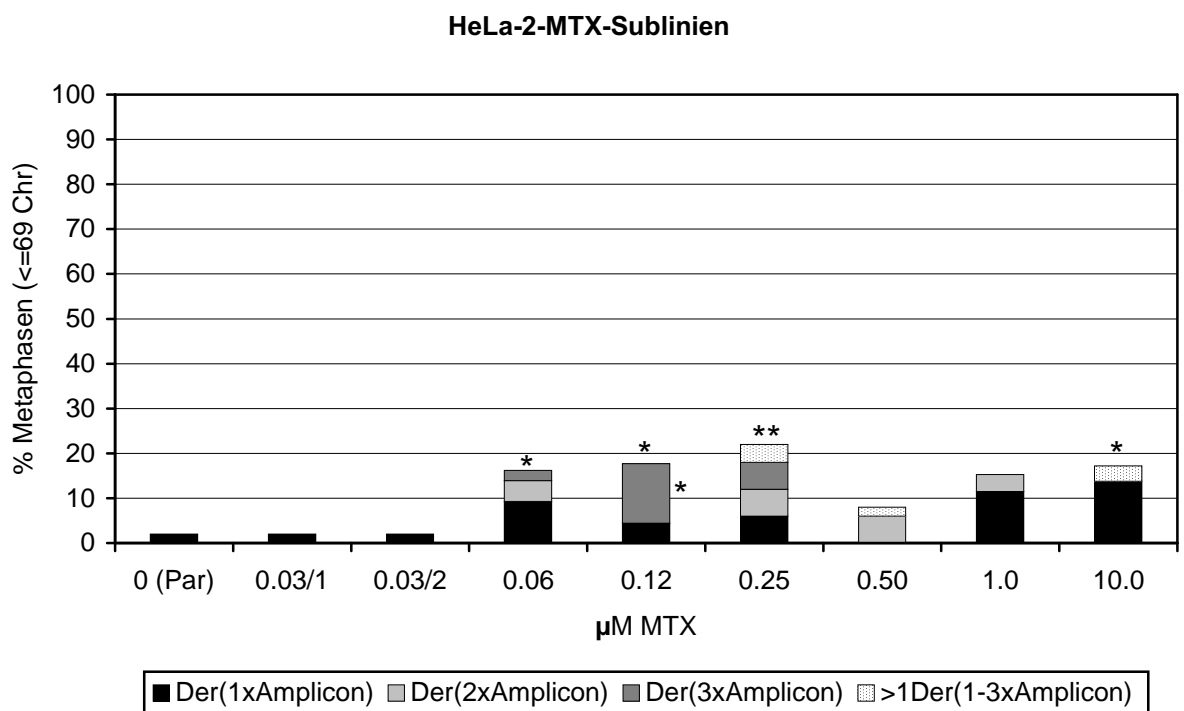


Abb. 80: Häufigkeit von Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen und derivativen Chromosomen mit ein, zwei und drei Amplicons (Der(1xAmplicon), Der(2xAmplicon), Der(3xAmplicon)) in den HeLa-2-MTX-Sublinien nach Selektion in den angegebenen MTX-Konzentrationen.

Abkürzungen: Chr = Chromosomen; nd = nicht durchgeführt; Par = Parentallinie. Symbole (*): s. Methoden, J), über Säulen bezogen auf Gesamtanteil, neben Säulen bezogen auf Einzelanteil

B.10.3.2) Typen der derivativen Amplicon-haltigen Chromosomen

In den Metaphasen der HeLa-MTX-Sublinien traten unterschiedliche Typen von derivativen Amplicon-haltigen Chromosomen auf, deren Zusammensetzung anhand des DAPI-Bandenmusters häufig nicht aufgeklärt werden konnte. Daher wurde eine Unterscheidung nach Anzahl der enthaltenen Centromere in uni-, di- und trizentrische derivative Amplicon-haltige Chromosomen vorgenommen. 5q-Isochromosomen und derivative Chromosomen mit dupliziertem Amplicon waren eindeutig identifizierbar und wurden gesondert erfaßt (s. Tab. 16).

Die beiden derivativen Amplicon-haltigen Chromosomen, die in den ausgewerteten Metaphasen der HeLa-Parentallinie vorlagen, konnten als dizentrische Der(1xAmplicon) charakterisiert werden.

Die HeLa-1-MTX-Sublinien enthielten zusammen 36 Metaphasen mit insgesamt 37 derivativen Amplicon-haltigen Chromosomen. Je 15 dieser Chromosomen wiesen ein bzw. drei Amplicons und 7 zwei Amplicons auf (s. Tab. 16). Die Der(1xAmplicon) lagen überwiegend (13x) als unizentrische Chromosomen vor. Der(2xAmplicon) traten in Form von uni- und dizentrischen sowie 5q-Isochromosomen und als derivative Chromosomen mit dupliziertem Amplicon auf. Die Der(3xAmplicon) waren durchgehend trizentrisch.

Die HeLa-2-MTX-Sublinien und die Sublinie HeLa-2-MTX-10.0 wiesen zusammen 49 Metaphasen mit insgesamt 70 derivativen Amplicon-haltigen Chromosomen auf. Der Hauptanteil (41) dieser Chromosomen enthielt ein Amplicon und lag als uni- oder dizentrisches Chromosom vor (s. Tab. 16). Bei den Der(2xAmplicon) überwogen die 5q-Isochromosomen (8) gegenüber derivativen Chromosomen mit dupliziertem Amplicon (4) und di- bzw. trizentrischen Chromosomen (2 bzw. 1). Die 14 Der(3xAmplicon) waren wie bei den HeLa-1-MTX-Sublinien ausschließlich trizentrisch.

Tabelle 16: Derivative Amplicon-haltige Chromosomen in den HeLa-MTX-Sublinien

Chromosomentyp	HeLa-1-MTX-Sublinien	HeLa-2-MTX-Sublinien
Der(1xAmplicon)	15	41
unizentrisch	13	26
dizentrisch	2	15
Der(2xAmplicon)	7	15
unizentrisch	2	
i(5)(q10)	2	8
dupliziertes Amplicon	2	4
dizentrisch	1	2
trizentrisch		1
Der(3xAmplicon)	15	14
trizentrisch	15	14

B.10.3.3) Lokalisation des Amplicons auf dem derivativen Chromosom 'Der(5)sp'

Die Der(3xAmplicon), die in den Metaphasen einiger HeLa-MTX-Sublinien auftraten, zeigten eine einheitliche Morphologie und Anordnung der Amplicons, so dass sie jeweils den gleichen Chromosomentyp darstellten (s. Abb. 81). Sie waren trizentrisch und entsprachen in Größe, Anordnung der drei Centromere und dem DAPI-Bandenmuster den Der(5)sp, die in den Metaphasen derselben MTX-Sublinien nach G-Bänderung identifiziert wurden (s. B.4.8).

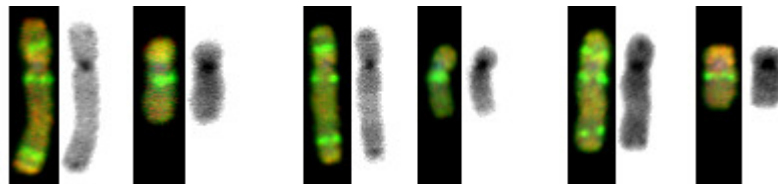


Abb. 81: REVISH auf Der(5)sp und #5 aus drei verschiedenen Metaphasen der HeLa-2-MTX-Sublinien. Die Der(5)sp sind durch drei Ampliconsignale (grün) in spezifischer Anordnung gekennzeichnet. Zum Vergleich ist rechts neben jedem Der(5)sp ein #5 aus derselben Metaphase eingefügt, das nur ein Ampliconsignal zeigt. Zu jedem REVISH-Chromosom ist das invertierte Bild seiner DAPI-AMD-Gegenfärbung (schwarzweiß; rechts neben der REVISH-Abbildung) dargestellt.

Da das Amplicon in den REVISH-Metaphasen jeweils die Region 5q13 markierte (s. B.10.1), ließen die drei Amplicons in den Der(5)sp auf das Vorliegen von drei Kopien dieser Region schließen. Die Anordnung der beiden unteren Amplicons der Der(5)sp entsprach der invertierten Anordnung der beiden vollständigen 5q innerhalb dieser Chromosomen, die bereits durch G-Bänderung ermittelt worden war (s. B.4.8). Das dritte Amplicon wurde in dem anhand seines G-Bandenmusters nicht identifizierbaren Segment unterhalb des Centromers lokalisiert (s. Abb. 81). Direkt unter dem Amplicon war dieses Segment mit der terminalen 5p-Region des vollständigen #5 in den Der(5)sp fusioniert.

Die Detektion eines Amplicons und die Zusammensetzung aus #5-Sequenzen (s. B.7.2) bei dem unbekanntem Segment ließen darauf schließen, dass dieses Segment das centrische Produkt eines Chromosomenbruchs in einem #5 unterhalb von 5q13 darstellte. Die Lage des Centromers in diesem Segment wies auf eine weitere Deletion in 5p hin.

Das Der(5)sp entsprach demzufolge dem Resultat einer Fusion eines #5 mit zwei weiteren centrischen #5-Segmenten, die zuvor durch Bruchereignisse entstanden waren (s. Abb. 82). Die addierten #5-Segmente enthielten jeweils ein Amplicon, so dass die Fusion zur Entstehung eines derivativen Chromosoms mit einer erhöhten Ampliconanzahl führte. Die Amplicons waren innerhalb des Der(5)sp jedoch soweit voneinander entfernt angeordnet, dass das Vorliegen der Vorstufe einer HSR in den Der(5)sp unwahrscheinlich erschien. Unter Zusammenfassung aller Ergebnisse wurde die karyotypische Beschreibung des Der(5)sp vervollständigt zu:

$\text{trc}(5;5;5)(:5?p13\rightarrow 5q?15::5p15\rightarrow 5q35::5q35\rightarrow 5p?13:)$.

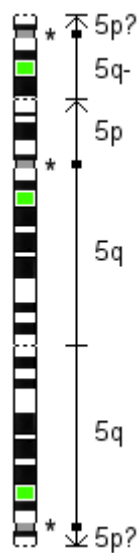


Abb. 82: Schematisches Modell zur Darstellung der wahrscheinlichen Zusammensetzung des Der(5)sp unter Berücksichtigung aller Ergebnisse. Das G-Banden-Ideogramm links zeigt ein vollständiges #5 (Mitte) mit einem an die terminale 5p-Region addierten centrischen #5-Segment (oben), das Deletionen in 5p und 5q aufweist, und einem an den terminalen 5q-Abschnitt invertiert addierten #5 mit 5p-Deletion (unten). Die Enden der einzelnen Segmente sind durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. Die Symbole (*) neben dem Ideogramm markieren die Lage der Centromere nach C-Bänderung dieses Chromosomentyps. Die Regionen, die nach REVISH Ampliconsignale zeigen, sind grün eingefärbt und entsprechen jeweils der Bande 5q13. Auf der rechten Seite ist die Orientierung der einzelnen Segmente innerhalb des Der(5)sp durch senkrechte Pfeile angegeben. Dabei entsprechen die Rechtecke den Centromeren und die horizontalen Linien den Segmentenden. ?: unbekannter Bruchpunkt

B.10.3.4) 5q-Status in Metaphasen mit derivativen Amplicon-haltigen Chromosomen

Das Auftreten eines bestimmten 5q-Status war in den Metaphasen mit derivativen Amplicon-haltigen Chromosomen der HeLa-MTX-Sublinien nur bei Vorliegen des Der(5)sp bzw. Der(3xAmplicon) (s. B.10.3.3) zu beobachten. Der(5)sp (Der(3xAmplicon)) traten bei einzelnen HeLa-MTX-Sublinien in signifikant erhöhten Anteilen in der Metaphasengruppe mit ≤ 69 Chromosomen auf (s. B.10.3.1) und lagen in allen Metaphasen in Kombination mit Verlust eines #5 vor (s. B.10.2). Derivative Chromosomen mit ein oder zwei Amplicons wurden in Metaphasen mit unterschiedlichen 5q-Status gefunden, so dass keine Präferenz für einen bestimmten 5q-Status festgestellt werden konnte.

C) Langzeitkultivierung von HeLa-Zellen ohne Selektion

Zur Ermittlung des Einflusses der Kultivierungsbedingungen auf die Ausprägung von chromosomalen Veränderungen und Genamplifikationen wurde die für die MTX-Selektionen verwendete HeLa-Zelllinie über einen längeren Zeitraum ohne Einwirkung einer Selektionssubstanz kultiviert. Diese Langzeitkultivierung erfolgte unter den gleichen Bedingungen und über einen vergleichbaren Zeitraum wie die MTX-Selektionen. Die chromosomalen Veränderungen wurden ebenfalls mit den gleichen Methoden untersucht.

C.1) Schema der Subkultivierungen der Langzeitkultur

Die für die Langzeitkultivierung vorgesehene HeLa-Zellkultur wurde aus dem eingefrorenen Zellvorrat der HeLa-Parentallinie angelegt und entsprechend dem Selektionsprotokoll für die MTX-Selektionen subkultiviert. Das Anlegen der Subkulturen erfolgte jedoch mit einer höheren Zellzahl (1×10^6 Zellen), um die Auswirkungen der dadurch erforderlichen häufigen Subkultivierungen auf die spontane Rate an chromosomalen Veränderungen beobachten zu können. Jede Subkultur entsprach einer neuen Sublinie (Langzeit- bzw. LZ-Sublinie), die in diesem Fall ohne Selektionsdruck erzeugt wurde und die Ausgangszellen für die nächste Sublinie lieferte (s. Abb. 83).

Die im Verlauf der Langzeitkultivierung erzeugten Sublinien wurden zusammenfassend als HeLa-LZ-Sublinien bezeichnet. Die einzelnen LZ-Sublinien wurden entsprechend ihrer Reihenfolge durchnummeriert und nach folgendem Schema benannt:

[HeLa] - [LZ] - [Nr. Sublinie].

Die HeLa-Zellkultur, mit der die Langzeitkultivierung begonnen wurde (Parentallinie), entsprach dabei der Linie HeLa-LZ-0.

Die Kultivierungszeit zwischen zwei Subkultivierungen lag bei allen LZ-Sublinien konstant bei vier bis fünf Tagen (s. Abb. 83). Nach insgesamt 84 Tagen und 18 Subkultivierungen wurde die Langzeitkultivierung der HeLa-Zellen beendet.

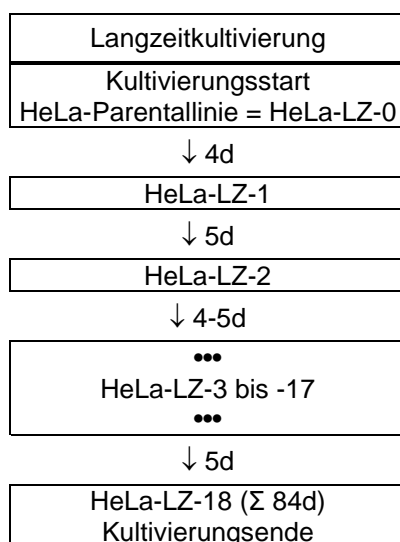


Abb. 83: Abfolge der Subkultivierungen bei der Langzeitkultivierung von HeLa-Zellen. Für jede Sublinie sind die Kultivierungszeit in Tagen (d) bis zur Subkultivierung sowie der Name angegeben. Die aus der Langzeitkultivierung resultierenden Sublinien wurden als HeLa-LZ-Sublinien bezeichnet.

C.2) Generationszeiten und -zahlen der HeLa-LZ-Sublinien

Die insgesamt 18 HeLa-LZ-Sublinien wiesen Generationszeiten zwischen 24 h und 32 h mit einem Mittelwert von 28.6 +/- 2.0 h auf (s. Abb. 84) und zeigten damit keine Unterschiede zur durchschnittlichen Generationszeit der Parentallinie von 30 h (in Vorversuchen ermittelt).

Die Generationszahl schwankte bei den LZ-Sublinien zwischen 3.1 und 4.4 Zellgenerationen (Mittelwert: 3.9 +/- 0.33).

Diese Ergebnisse ließen auf eine relativ konstante Proliferationsaktivität der HeLa-Zellen unter den vorliegenden Kultivierungsbedingungen schließen, die durch häufige Subkultivierung und zunehmende Kultivierungsdauer nicht beeinflusst wurde.

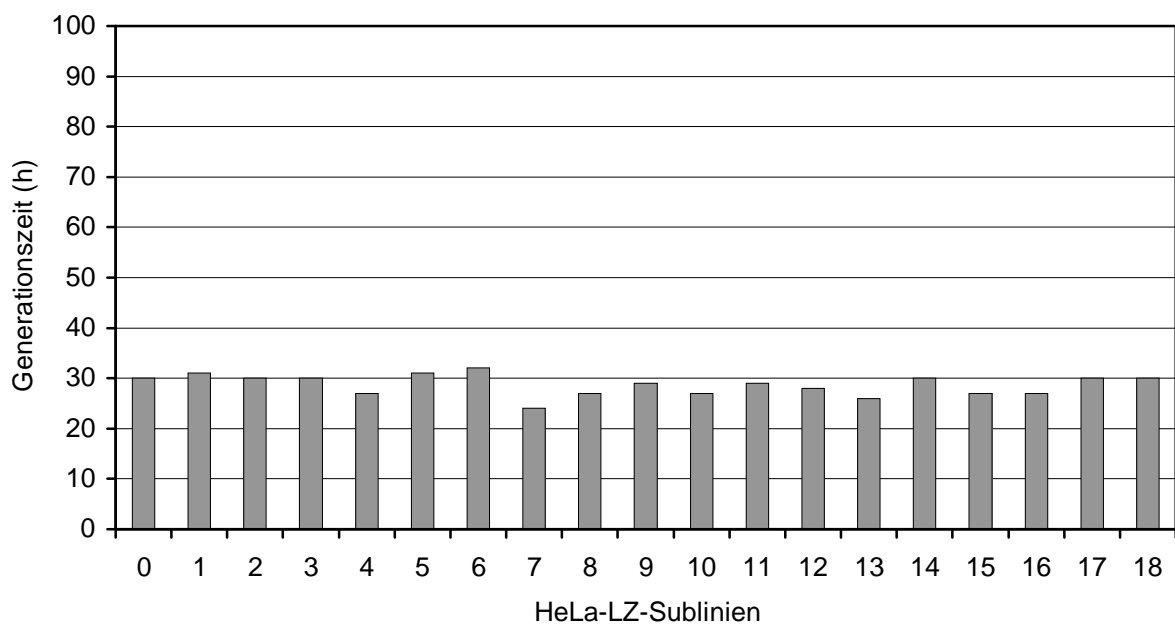


Abb. 84: Generationszeiten der HeLa-LZ-Sublinien. 0 = Parentallinie

C.3) Chromosomenanzahl pro Metaphase in den HeLa-LZ-Sublinien

Die Ermittlung von Chromosomenanzahlveränderungen in den HeLa-LZ-Sublinien erfolgte auf Grundlage der gleichen Chromosomenanzahlklassen wie bei den HeLa-MTX-Sublinien (s. B.3.1).

Die Häufigkeitsverteilung der Metaphasen auf die Chromosomenanzahlklassen blieb bei allen HeLa-LZ-Sublinien weitgehend konstant (s. Abb. 85). Der Hauptanteil ($\geq 87\%$) der Metaphasen aller LZ-Sublinien enthielt zwischen 63 und 69 Chromosomen. Geringere Chromosomenanzahlen (55-62) lagen in bis zu 6% der Metaphasen vor und maximal 9% der Metaphasen wiesen 70-138 Chromosomen auf. Metaphasen mit Chromosomenanzahlen über 138 (139->207) wurden nur in einzelnen LZ-Sublinien mit einer Häufigkeit von 1-2% beobachtet.

Größere Häufigkeitsunterschiede in den Chromosomenanzahlklassen im Vergleich zur Parentallinie traten bei keiner LZ-Sublinie auf.

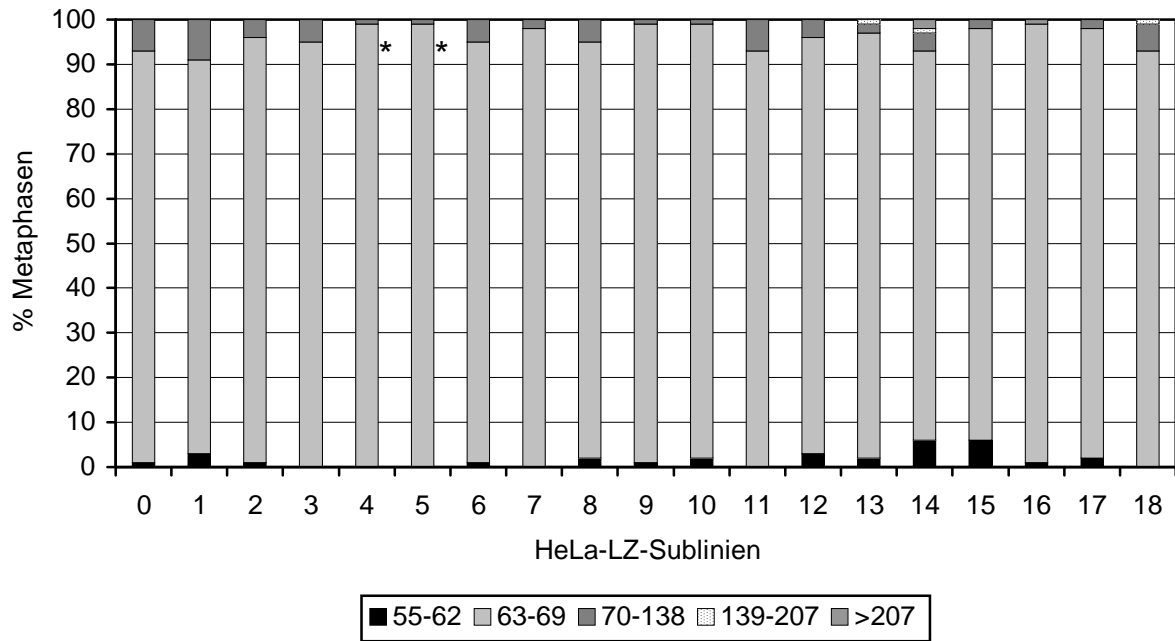


Abb. 85: Häufigkeit von Metaphasen der HeLa-LZ-Sublinien in den einzelnen Chromosomenanzahlklassen. Legende: Chromosomenanzahl pro Metaphase für jede Chromosomenanzahlklasse; 0 = Parentallinie; Symbole (*): s. Methoden, J)

C.4) Strukturelle Aberrationen in den HeLa-LZ-Sublinien

C.4.1) Gaps, Brüche (Breaks) und azentrische Fragmente

Metaphasen mit Gaps (Chromatid- und/oder Chromosomengaps) traten in der Parentallinie der LZ-Sublinien mit einer Häufigkeit von 8% auf. Auch die erste LZ-Sublinie, HeLa-LZ-1, wies mit 9% Metaphasen mit Gaps noch einen relativ hohen Anteil gegenüber allen nachfolgenden LZ-Sublinien auf, die maximal 5% gaphaltige Metaphasen enthielten (s. Abb. 86). Die Anzahl an Gaps pro Metaphase betrug 1-2.

Metaphasen mit Gaps und Brüchen lagen nur vereinzelt vor und wurden in beiden Kategorien erfasst.

Metaphasen mit Brüchen (Chromatid- und/oder Chromosomenbrüche) erreichten in der Parentallinie einen Anteil von 3% und bei den LZ-Sublinien Anteile zwischen 0% und 6% (s. Abb. 86). Diese Metaphasen wiesen jeweils einen Bruch auf.

Die Häufigkeiten von Metaphasen mit Gaps und mit Brüchen unterschieden sich in den LZ-Sublinien nicht wesentlich voneinander. Die größten Unterschiede lagen bei der Parentallinie mit 8% gap- und 3% bruchhaltigen Metaphasen sowie bei Sublinie HeLa-LZ-3 mit 5% gap- und 1% bruchhaltigen Metaphasen vor.

Azentrische Fragmente (Ace) wurden in den Metaphasen der LZ-Sublinien nach den unter B.4.3) aufgeführten Kriterien, mit und ohne erkennbaren Chromosomenbruch, erfasst. Ace traten bei der Parentallinie in 2% und bei fünf LZ-Sublinien (HeLa-LZ-1, HeLa-LZ-2, HeLa-LZ-3, HeLa-LZ-11 und HeLa-LZ-14) in jeweils 1% der Metaphasen auf. Die Ace-Anzahl betrug in allen Metaphasen 1.

Einige LZ-Sublinien wiesen einen höheren Anteil an Metaphasen mit Brüchen als mit Ace auf, der möglicherweise durch die Auswertungskriterien für Ace (s. B.4.3) und die Zusammenfassung von Metaphasen mit Chromatid- und Chromosomenbrüchen (s.o.) bedingt wurde.

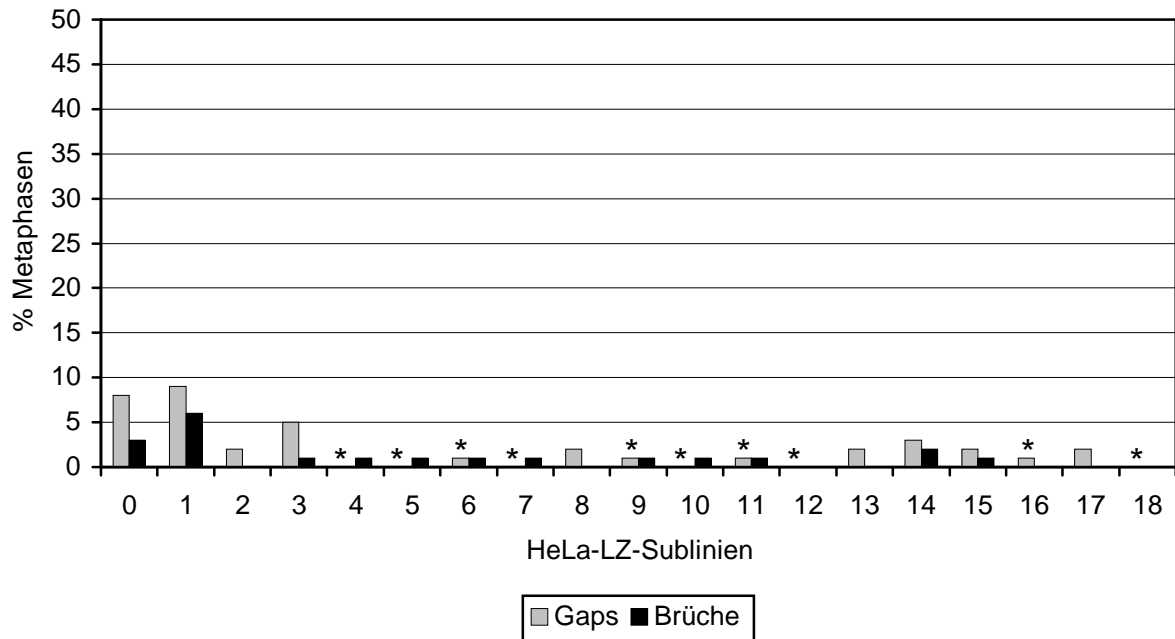


Abb. 86: Häufigkeit von Metaphasen mit Gaps und mit Brüchen in den HeLa-LZ-Sublinien. 0 = Parentallinie; Symbole (*): s. Methoden, J)

C.4.2) Pulverisiertes Chromatin

Metaphasen mit pulverisiertem Chromatin (Pvz) wurden nach den Angaben in B.4.4) ausgewertet. Pvz-haltige Metaphasen traten in der Parentallinie und in den meisten der LZ-Sublinien nicht auf. Ausnahmen bildeten die Sublinien HeLa-LZ-2, HeLa-LZ-5, HeLa-LZ-16 und HeLa-LZ-17 mit 1-2% Metaphasen mit Pvz sowie HeLa-LZ-18 und HeLa-LZ-14, die mit 3% bzw. 5% die höchsten Anteile an Metaphasen mit Pvz enthielten.

C.4.3) Ringchromosomen und dizentrische Chromosomen

Ein Ringchromosom wurde nur ein einziges Mal in einer Metaphase der Sublinie HeLa-LZ-1 beobachtet. Dizentrische Chromosomen (Dic) lagen dagegen in den Metaphasen der LZ-Sublinien häufiger vor. Bereits die Parentallinie wies 4% Metaphasen mit jeweils einem Dic auf. In den LZ-Sublinien erreichten Dic-haltige Metaphasen vergleichbare Anteile von 1-8% (s. Abb. 87). Über 90% dieser Metaphasen enthielten ein Dic und der restliche Anteil 2-3 Dic.

C.4.4) Trizentrische Chromosomen und das derivative Chromosom 'Der(5)sp'

Trizentrische Chromosomen (Trc) wurden nur ein Mal in der Sublinie HeLa-LZ-12 detektiert, die eine Metaphase mit zwei gleichartigen Trc enthält. Diese Trc unterschieden sich jedoch in Größe und Morphologie deutlich von den Trc, die in den MTX-Sublinien vorlagen (s. B.4.7).

Das als Der(5)sp bezeichnete derivative Chromosom (s. B.4.8), das in den Metaphasen einiger MTX-Sublinien auffiel, trat bei den LZ-Sublinien nicht auf.

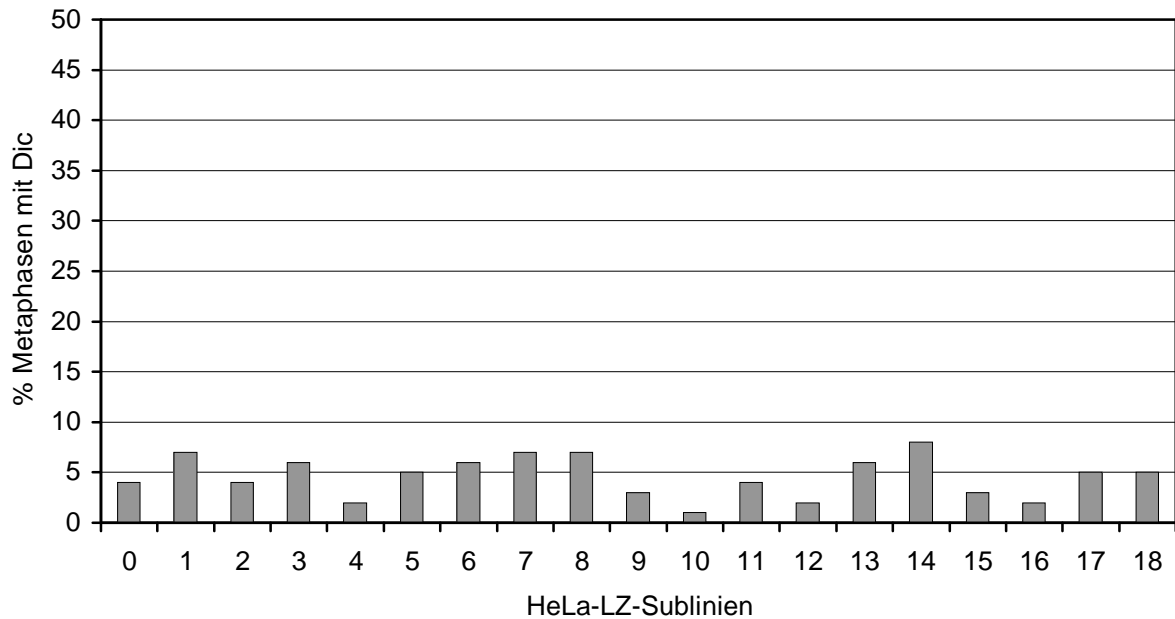


Abb. 87: Häufigkeit von Metaphasen mit dizentrischen Chromosomen (Dic) in den HeLa-LZ-Sublinien. 0 = Parentallinie

C.4.5) Double Minutes und Double Minute-Anzahl pro Metaphase

Double Minutes (Dmin) lagen bei der Parentallinie in 3% der Metaphasen vor. Die einzelnen LZ-Sublinien enthielten zwischen 0% und 3% Metaphasen mit Dmin (s. Abb. 88).

Die Anzahl der Dmin schwankte in den Dmin-haltigen Metaphasen der LZ-Sublinien zwischen 1 und 4. Größenunterschiede zwischen den Dmin wurden nicht beobachtet.

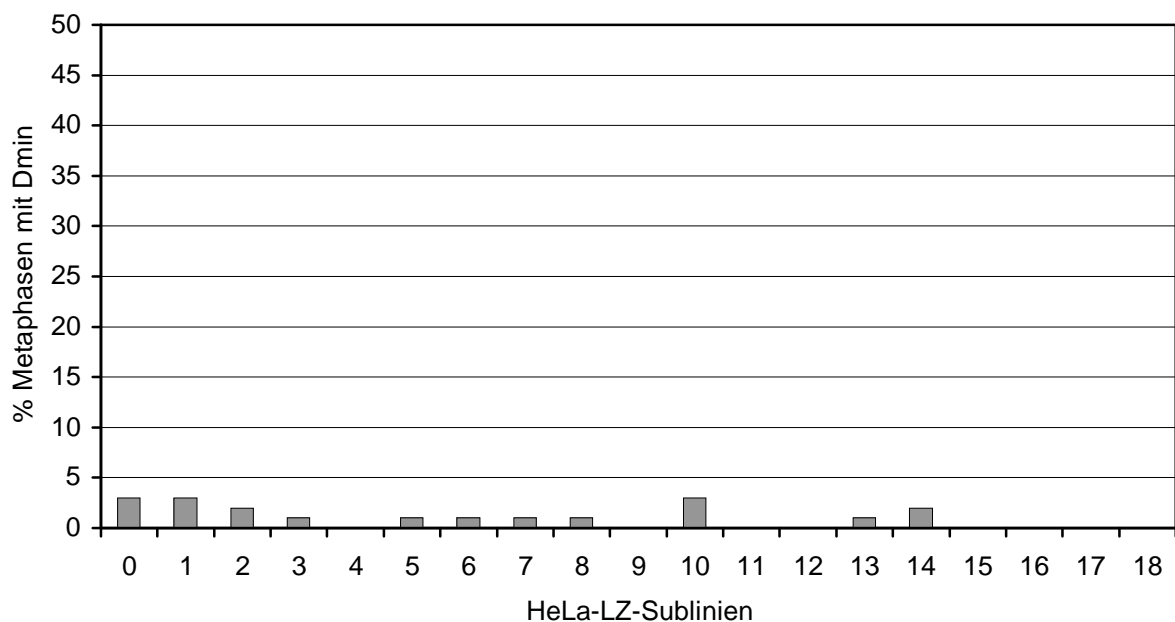


Abb. 88: Häufigkeit von Metaphasen mit Double Minutes (Dmin) in den HeLa-LZ-Sublinien. 0 = Parentallinie

Da im Verlauf der Langzeitkultivierung keine Anreicherung von Dmin-haltigen Metaphasen bei den LZ-Sublinien eintrat, konnte die spontane Ausprägung einer neuen, extrachromosomalen Genamplifikation in der verwendeten HeLa-Zelllinie unter den vorliegenden Kultivierungsbedingungen als unwahrscheinlich angesehen werden.

C.5) HeLa-Karyotypauswertung vor und nach Langzeitkultivierung

Eine Karyotypauswertung wurde bei der Parentallinie HeLa-LZ-0 und bei der letzten LZ-Sublinie HeLa-LZ-18 nach den gleichen Kriterien wie bei den MTX-Sublinien (s. B.5) vorgenommen. Beide Sublinien zeigten eine hohe Heterogenität der Karyotypen. Die ausgewerteten Metaphasen wiesen einen hypotriploiden Karyotyp (bis auf eine Metaphase mit 71 Chromosomen) mit zahlreichen chromosomalen Rearrangements auf (s. C.5.1).

C.5.1) Beispielkaryogramme von HeLa-LZ-0 und HeLa-LZ-18

Die folgenden Abbildungen zeigen Beispielkaryogramme von Metaphasen aus HeLa-LZ-0 und aus HeLa-LZ-18. Die Markerchromosomen (M1 bis M10) wurden in den Karyogrammen entsprechend wie bei den MTX-Sublinien sortiert (s. B.5.1) und die Karyotypen in Relation zu einem triploiden Karyotyp angegeben.

Karyotypangaben zu den Beispielkaryogrammen:

Abb. 89: Karyogramm einer Metaphase aus der Parentallinie HeLa-LZ-0. Karyotyp:

66<3n>,XX,-X,-1,-2,-3,-3,-4,-4,-5,-6,-6,-8,-9,-10,-11,-13,-16,-18,-19,-19,-20,-22,+18mar

Abb. 90: Karyogramm einer Metaphase aus HeLa-LZ-18. Karyotyp:

64<3n>,X,-X,-X,-1,-2,-2,-3,-3,-4,-4,-5,-6,-6,-8,-8,-9,-10,-11,-13,-13,-14,-15,-18,-19,-19,-20,-22,+21mar

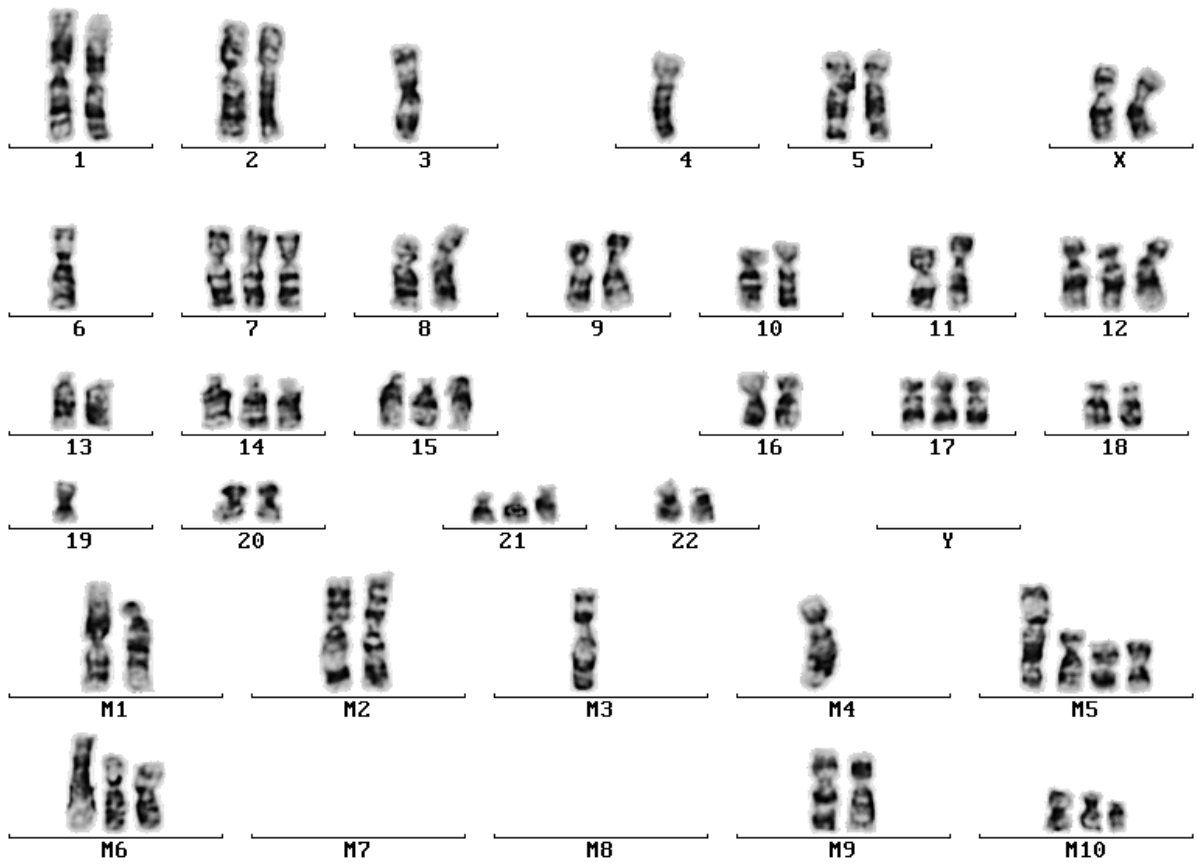


Abb. 89: Karyogramm einer Metaphase aus HeLa-LZ-0 (Parentallinie). Angaben zum Karyotyp s. S. 137

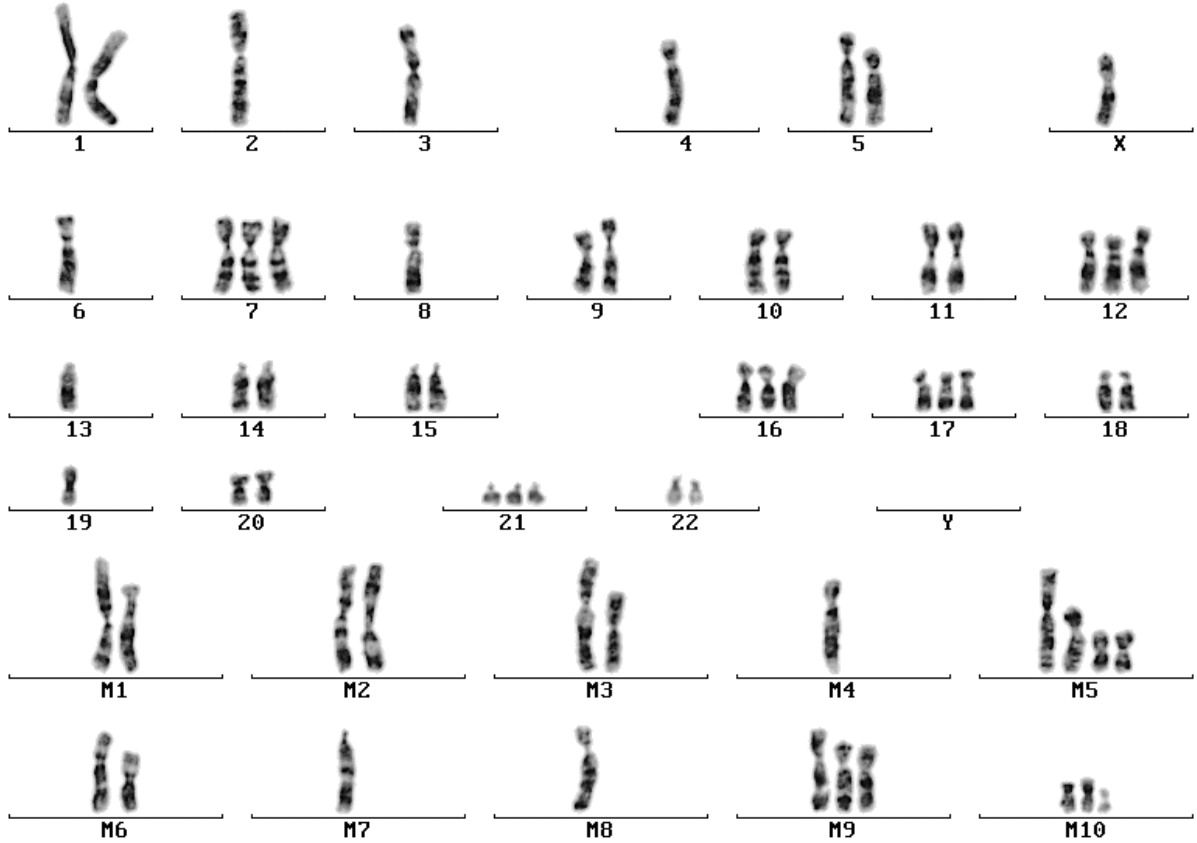


Abb. 90: Karyogramm einer Metaphase aus HeLa-LZ-18. Angaben zum Karyotyp s. S. 137

C.5.2) Kopienanzahlen der normalen Chromosomen in HeLa-LZ-0 und HeLa-LZ-18

C.5.2.1) Kopienanzahlen der normalen Chromosomen in HeLa-LZ-0

Die 21 ausgewerteten Metaphasen der Parentallinie HeLa-LZ-0 enthielten zwischen 62 und 71 Chromosomen. Die Kopienanzahl der normalen Chromosomen lag bei 0-4. 12 der 23 verschiedenen normalen Chromosomen waren in mehr als 50% der Metaphasen in zweifacher Kopie vorhanden (s. Abb. 91). Pro Metaphase traten 15-22 Markerchromosomen auf.

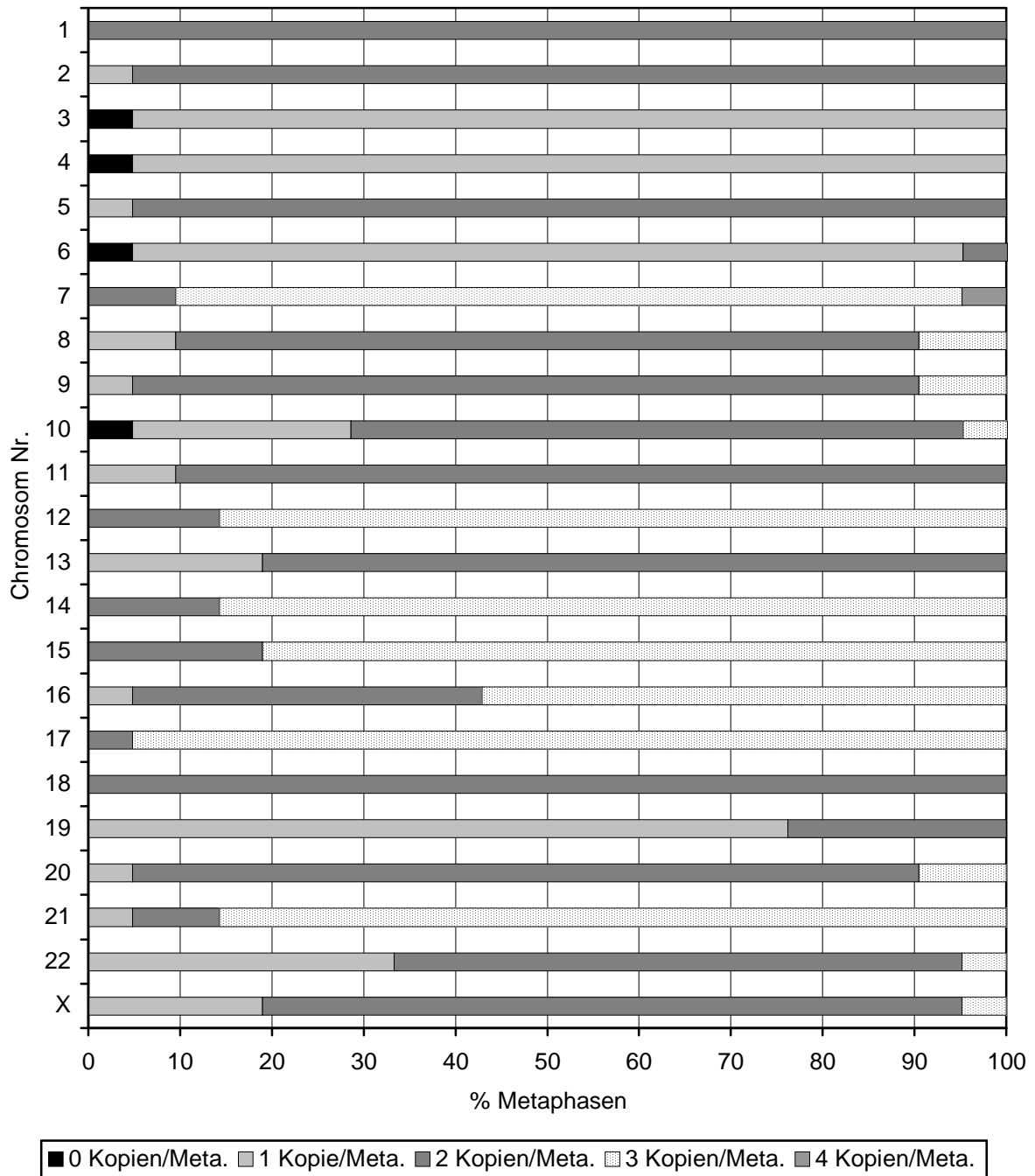


Abb. 91: Häufigkeit von Metaphasen mit der in der Legende angegebenen Kopienanzahl pro Metaphase (Kopien/Meta.) für die normalen Chromosomen in der Parentallinie HeLa-LZ-0.

C.5.2.2) Kopienanzahlen der normalen Chromosomen in HeLa-LZ-18

Bei HeLa-LZ-18 wurden 20 Metaphasen mit einer Chromosomenanzahl von 61-67 karyotypisiert. Neben 15-22 Markerchromosomen pro Metaphase lagen normale Chromosomen in einer variablen Kopienanzahl zwischen 0 und 4 vor (s. Abb. 92). Dmin und HSRs traten nicht auf.

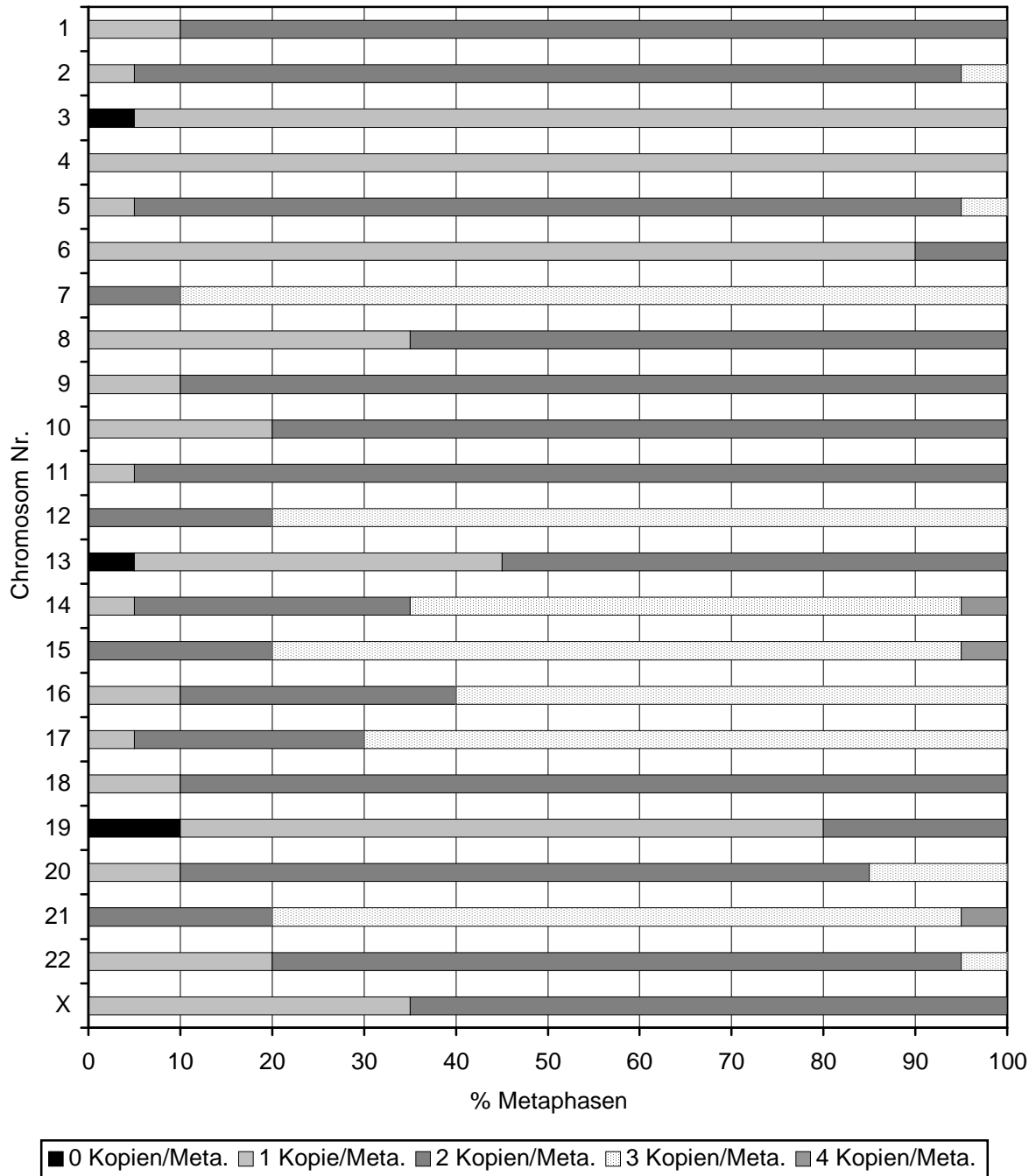


Abb. 92: Häufigkeit von Metaphasen mit der in der Legende angegebenen Kopienanzahl pro Metaphase (Kopien/Meta.) für die normalen Chromosomen in HeLa-LZ-18.

C.5.3) Modale Kopienanzahl der normalen Chromosomen bei HeLa-LZ-0 und HeLa-LZ-18

Die modale Kopienanzahl der normalen Chromosomen bei HeLa-LZ-0 und HeLa-LZ-18 wurde wie bei den MTX-Sublinien (s. B.5.3) auf Basis der für diese Chromosomen ermittelten Kopienanzahlen (s. C.5.2) bestimmt. Sie entsprach der am häufigsten aufgetretenen Kopienanzahl eines normalen Chromosoms in den ausgewerteten Metaphasen einer HeLa-Linie (s. Tab. 17). Sowohl bei HeLa-LZ-0 als auch bei HeLa-LZ-18 wiesen die normalen Chromosomen in mehr als 50% der untersuchten Metaphasen die jeweils ermittelte modale Kopienanzahl auf.

Bei der Parentallinie HeLa-LZ-0 wiesen 12 der 23 normalen Chromosomen eine modale Kopienanzahl von zwei auf. 4 der normalen Chromosomen zeigten eine Kopienanzahl von eins und 7 der normalen Chromosomen lagen in den meisten Metaphasen in drei Kopien vor (s. Tab. 17). Diese Werte entsprachen den für die Parentallinie der MTX-Sublinien ermittelten modalen Kopienanzahlen für die normalen Chromosomen (s. B.5.3).

Die letzte LZ-Sublinie HeLa-LZ-18 unterschied sich in den modalen Kopienanzahlen der normalen Chromosomen nicht von HeLa-LZ-0, so dass auf eine relative Stabilität dieser Kopienanzahlen für die normalen Chromosomen in den HeLa-Zellen geschlossen werden konnte.

Tabelle 17: Modale Kopienanzahl der normalen Chromosomen in den Metaphasen der Parentallinie HeLa-LZ-0 und der Sublinie HeLa-LZ-18

HeLa-Linie	Modale Kopienanzahl der normalen Chromosomen in >50% der Metaphasen			Veränderungen der modalen Kopienanzahl im Vergleich zur Parentallinie
	Chromosomen mit 1 Kopie	Chromosomen mit 2 Kopien	Chromosomen mit 3 Kopien	
HeLa-LZ-0 (Parentallinie)	3, 4, 6, 19	1, 2, 5, 8, 9, 10, 11, 13, 18, 20, 22, X	7, 12, 14, 15, 16, 17, 21	/
HeLa-LZ-18	3, 4, 6, 19	1, 2, 5, 8, 9, 10, 11, 13, 18, 20, 22, X	7, 12, 14, 15, 16, 17, 21	—

C.6) 5q-Status in HeLa-LZ-0 und HeLa-LZ-18

Der 5q-Status, d.h. die Anzahl der 5q-Kopien und die 5q-Trägerchromosomen pro Metaphase (s. Methoden, E.3), wurde in der Parentallinie HeLa-LZ-0 und der letzten LZ-Sublinie HeLa-LZ-18 entsprechend wie bei den HeLa-MTX-Sublinien (s. B.6) bestimmt, um spontane Veränderungen des *DHFR*-tragenden Chromosomenarms nach der Langzeitkultivierung zu ermitteln. Bei beiden Sublinien wurden jeweils 100 Metaphasen untersucht und analog zur Auswertung bei den MTX-Sublinien (s. B.6) in Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen und > 69 Chromosomen eingeteilt. Die weitere Sortierung der Metaphasen nach 5q-Anzahl und Kombination der 5q-Trägerchromosomen erfolgte unter Verwendung derselben Metaphasenkategorien, die auch bei den MTX-Sublinien eingesetzt wurden (s. B.6.3, Tab. 9 und B.6.4, Tab. 10).

Bei der Parentallinie HeLa-LZ-0 enthielten 98% der ausgewerteten Metaphasen ≤ 69 Chromosomen und drei 5q (s. Tab. 18). Als 5q-Trägerchromosomen lagen zwei #5 und ein derivatives Chromosom vor, das mit 'm5' abgekürzt wurde (s. B.6.1). Dieser Status entsprach dem 5q-Normalstatus, abgekürzt N, der bei der Parentallinie der MTX-Sublinien als am häufigsten auftretender 5q-Status ermittelt wurde (s. B.6.1).

2% der Metaphasen von HeLa-LZ-0 wiesen >69 Chromosomen und eine 5q-Anzahl von 4 (1%) bzw. 6 (1%) auf. Die 5q-Zugewinne erfolgten in diesen Metaphasen durch Zugewinn von einem m5 bzw. durch Verdopplung der bei N vorliegenden 5q-Trägerchromosomen (Kombination: 2N).

In Sublinie HeLa-LZ-18 traten 99% Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen und einer 5q-Anzahl von drei auf (s. Tab. 18). Diese zeigten alle den 5q-Normalstatus. Daneben lagen 1% Metaphasen mit >69 Chromosomen und einer durch eine zusätzliche #5- und m5-Kopie erhöhten 5q-Anzahl (>3x5q) vor.

Tabelle 18: 5q-Status in HeLa-LZ-0 und HeLa-LZ-18

HeLa-Linie	% Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen und 5q-Status ^a :			% Metaphasen mit >69 Chromosomen und 5q-Status ^a :			
	3x5q	N	Σ 5q	>3x5q	N+m5	N+ ≥ 2 x5q	Σ 5q
HeLa-LZ-0	98	98	3	2	1	1	4 / 6
HeLa-LZ-18	99	99	3	1		1	5

^a Metaphasenkategorien nach 5q-Anzahl und Kombination der 5q-Trägerchromosomen s. B.6.3), Tab. 9 und B.6.4), Tab. 10

HeLa-LZ-0 und HeLa-LZ-18 enthielten keine Metaphasen mit <3x5q. Gaps und Brüche in 5q sowie derivative 5q-haltige Chromosomen (s. B.6.6) wurden ebenfalls in beiden LZ-Sublinien nicht beobachtet. Der 5q-Status von Dmin-haltigen Metaphasen konnte nur in 3% Metaphasen mit Dmin (s. C.4.5) von HeLa-LZ-0 ermittelt werden. 2% dieser Metaphasen wiesen den 5q-Normalstatus und 1% den Status N+ ≥ 2 x5q auf.

Im Vergleich waren zwischen HeLa-LZ-0 und HeLa-LZ-18 keine signifikanten Unterschiede im 5q-Status der Metaphasen feststellbar.

C.7) CGH-Analyse von HeLa-LZ-18

Die Sublinie HeLa-LZ-18 wurde zur Detektion von Kopienanzahlveränderungen im Vergleich zur Parentallinie HeLa-LZ-0 mit Comparativer Genomischer Hybridisierung (CGH) untersucht. Dabei diente die DNA von HeLa-LZ-18 als Test- und die DNA von HeLa-LZ-0 als Referenz-DNA.

Die Profilauswertung dieses CGH-Ansatzes ergab keine spezifischen Kopienanzahlzugewinne oder -verluste von genetischen Sequenzen bei HeLa-LZ-18 (s. Abb. 93). Dies ließ auf eine Stabilität der Kopienanzahl genetischer Sequenzen im Genom der verwendeten HeLa-S3-Zelllinie unter den vorliegenden Kultivierungsbedingungen schließen.

C.8) Lokalisation des *DHFR*-enthaltenden Amplicons in HeLa-LZ-0 und HeLa-LZ-18

Anzahl und Lokalisation des in den HeLa-MTX-Sublinien auftretenden *DHFR*-enthaltenden Amplicons wurden bei HeLa-LZ-0 und HeLa-LZ-18 mit der bei den MTX-Sublinien verwendeten REVISH-Methode (s. B.10) untersucht. Bei beiden HeLa-Linien wurden jeweils 25 Metaphasen ausgewertet, die ausschließlich intrachromosomal lokalisierte Amplicons enthielten. Die Auswertung erfolgte unter den gleichen Kriterien wie bei den HeLa-MTX-Sublinien (s. B.10.2).

Die Parentallinie HeLa-LZ-0 enthielt 92% Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen, die überwiegend (88%) drei intrachromosomale Amplicons und den 5q-Normalstatus (N; s. B.6.1) aufwiesen (s. Tab. 19). In 4% Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen wurden vier Amplicons und der Zugewinn eines m5 detektiert. Metaphasen mit > 69 Chromosomen traten zu 8% auf und zeigten eine durch unterschiedliche #5- und m5-Zugewinne erhöhte Ampliconanzahl.

Bei Sublinie HeLa-LZ-18 lagen 96% Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen vor, die alle jeweils durch drei intrachromosomale Amplicons und den 5q-Normalstatus charakterisiert waren (s. Tab. 19). Daneben traten 4% Metaphasen mit > 69 Chromosomen auf, die zwölf Amplicons in Form von #5 und m5 enthielten.

Tabelle 19: Intrachromosomale Ampliconanzahl und 5q-Status in HeLa-LZ-0 und HeLa-LZ-18

HeLa-LZ-0			HeLa-LZ-18		
% Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen und ^a :			% Metaphasen mit ≤ 69 Chromosomen und ^a :		
Σ int. Amplicons	N	N+m5	Σ int. Amplicons	N	N+m5
3	88	0	3	96	0
>3	0	4	>3	0	0
% Metaphasen mit > 69 Chromosomen und ^a :			% Metaphasen mit > 69 Chromosomen und ^a :		
Σ int. Amplicons	N+#5+m5	2N	Σ int. Amplicons	4N	
>3	4	4	>3	4	

^a Metaphasenkategorien nach intrachromosomaler Ampliconanzahl und Kombination der 5q-Trägerchromosomen s. B.10.2), Tab. 15 und B.6.4), Tab. 10; int. = intrachromosomal

Metaphasen mit < 3 intrachromosomalen Amplicons und mit derivativen Amplicon-haltigen Chromosomen (s. B.10.3) wurden weder bei HeLa-LZ-0 noch bei HeLa-LZ-18 beobachtet.

Da die ausgewerteten Metaphasen von HeLa-LZ-0 und HeLa-LZ-18 nur 5q- und Amplicon-Trägerchromosomen mit einem 5q und einem Amplicon aufwiesen (#5 und m5), entsprach die 5q-Anzahl in allen Metaphasen der Anzahl der intrachromosomalen Amplicons bzw. *DHFR*-Kopien.

Im Vergleich zeigten HeLa-LZ-0 und HeLa-LZ-18 keine signifikanten Unterschiede in der Kopienanzahl und Lokalisation der intrachromosomalen Amplicons. Dies sprach dafür, dass sich die im überwiegenden Teil der HeLa-Zellen auftretende *DHFR*-Kopienanzahl von drei auch bei längerfristiger Kultivierung unter den vorliegenden Bedingungen nicht spontan veränderte.

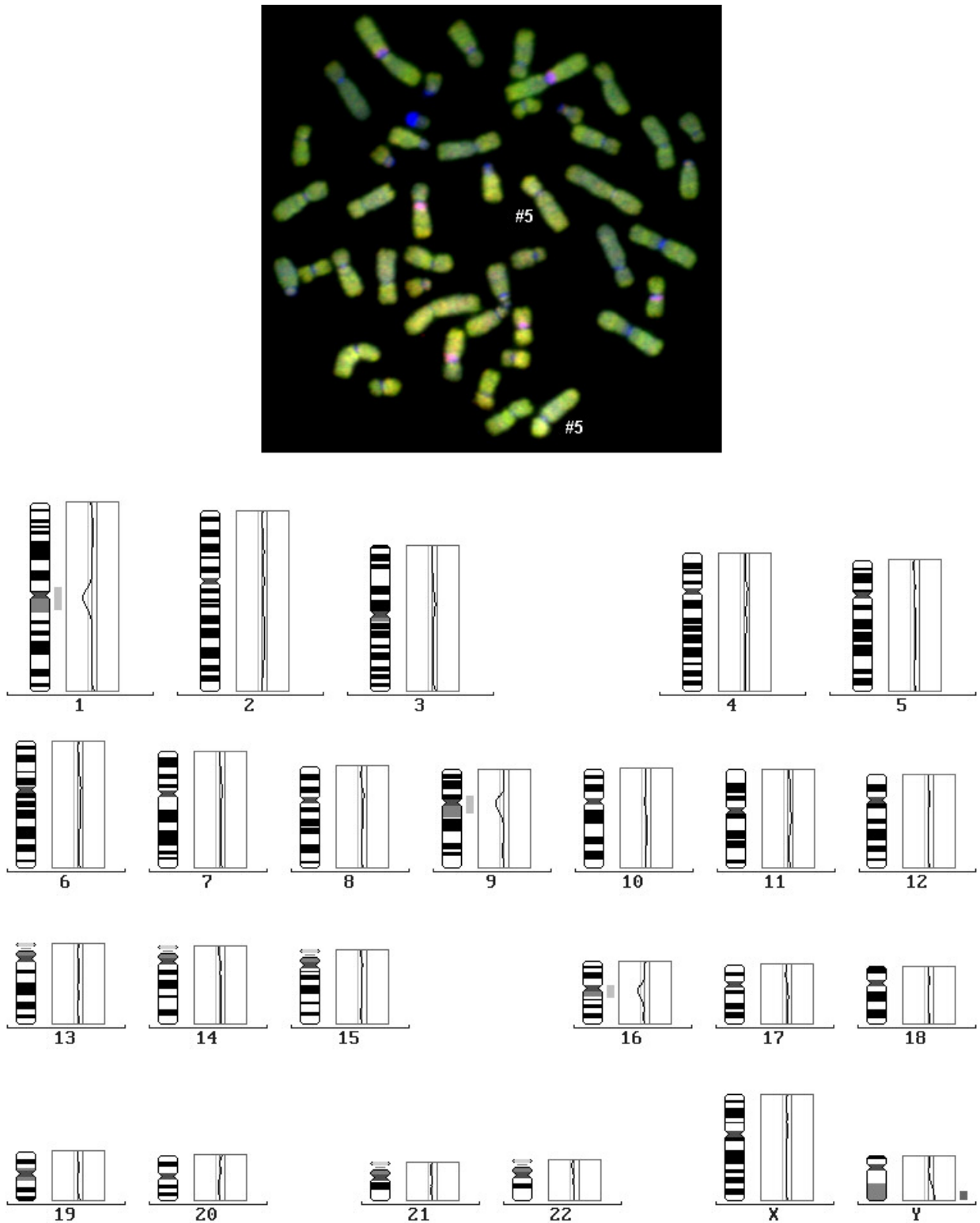


Abb. 93: CGH-Metaphase und CGH-Mittelprofil von 9 ausgewerteten Metaphasen des CGH-Ansatzes der Sublinie HeLa-LZ-18 mit Direktmarkierung. Als Schwellenwerte wurden 0.83 für die untere und 1.17 für die obere Schwelle verwendet. Die Profilverläufe zeigen keine Kopienanzahlzugewinne oder -verluste an. Profilüberschreitungen treten nur in den von der Auswertung ausgeschlossenen Centromer- und Heterochromatinregionen einzelner Chromosomen auf.

Diskussion

A) Amplifikation eines Onkogens in einem Leukämiefall

A.1) Mögliche Entstehungsmechanismen einer Onkogenamplifikation

In dem untersuchten Fall von akuter myeloischer Leukämie (AML), FAB-Subtyp M2, wurde neben dem Verlust eines X-Chromosoms eine extrachromosomale Amplifikation des Protoonkogens *MYC* in Double Minutes (Dmin) diagnostiziert. Diese Form der Genamplifikation ist bei AML selten und nur in ca. 4.5% aller Fälle beobachtet worden (Li 1983). Bei den meisten dieser Fälle lag ebenfalls eine Amplifikation von *MYC* vor (Sait et al. 2002; O'Malley et al. 1999; Fugazza et al. 1997; Fegan et al. 1995; Slovak et al. 1994; Mohamed et al. 1993; Tanaka et al. 1993; Asker et al. 1988; Alitalo et al. 1985).

Die Anzahl der Dmin lag bei der Erstdiagnose des AML-Falls im Hauptanteil (50%) der Leukämiezellen zwischen 10 und 39, so dass die Kopienanzahl von *MYC* in diesen Zellen mindestens den gleichen Wert erreichte (bei Annahme von einer *MYC*-Kopie pro Dmin). Nach FISH mit einer humanen *MYC*-Sonde zeigten die Dmin im Vergleich zu dem auf #8 lokalisierten *MYC* intensivere Fluoreszenzsignale, so dass möglicherweise mehr als eine *MYC*-Kopie in den Dmin vorlag. Dmin- und damit die extrachromosomale *MYC*-Kopienanzahl zeigten im Krankheitsverlauf keine signifikanten Veränderungen.

Die extrachromosomale *MYC*-Amplifikation war in dem analysierten AML-Fall mit der Deletion einer *MYC*-Kopie aus einem der beiden #8 kombiniert. Eine entsprechende Kombination wurde in einem Fall von Präleukämie beschrieben, bei dem die aberranten Zellen neben extrachromosomalen *MYC*-Kopien in Dmin eine durch Translokation erfolgte Verlagerung einer 8q-Region auf #9 aufwiesen (Karyotyp: 47,XX,+4,t(8;9)(q21;q34),2-78dmin). Die translozierte 8q-Region zeigte ebenfalls einen Verlust der *MYC*-Sequenz (Reddy and Sulcova 1997).

Die in diesen beiden Fällen vorliegende Deletion einer intrachromosomalen *MYC*-Kopie kann auf die Entstehung der *MYC*-Amplifikation infolge von Bruchereignissen an einem der beiden #8 hinweisen. Ein entsprechendes Erklärungsmodell wurde aufgrund von Beobachtungen bei experimentell induzierter Genamplifikation beschrieben (Windle et al. 1991; Carroll et al. 1988). Demnach stellen Chromosomenbrüche in der flankierenden Region des zu amplifizierenden Gens ein sehr frühes Ereignis der Genamplifikationsentwicklung dar und führen zur Generation eines extrachromosomalen, azentrischen Elements, das das zu amplifizierende Gen enthält (s. Abb. 94). Dieses Element rekombiniert zu einer circulären Struktur (Episom), das autonom repliziert. Die produzierten Episomen können, wenn sie der betroffenen Zelle einen Wachstumsvorteil bieten, eine Weiterentwicklung zu Dmin durchlaufen (Von Hoff 1991) oder in ein Chromosom reintegrieren (Windle et al. 1991).

Bei induzierter Genamplifikation wurde eine Hemmung der DNA-Replikation, z.B. durch cytotoxische Substanzen, als Grundlage für die Bruchereignisse angesehen, die zur Excision des später amplifizierten Gens in Form einer Replikationsschleife aus seiner chromosomalen Umgebung führen können (Windle et al. 1991). Auch die Induktion der Expression von fragilen Stellen, d.h. chromosomalen Orten, die unter bestimmten Bedingungen (z.B. Einwirkung spezifischer chemischer Substanzen) eine erhöhte Häufigkeit

von Gaps und Brüchen zeigen (Sutherland and Richards 1995), kann die Amplifikation benachbarter Gene auslösen (Coquelle et al. 1997). Ob fragile Stellen bei der Amplifikation von Onkogenen in Tumorzellen von Bedeutung sind, ist bislang ungeklärt. Für das Protoonkogen *MYC* wurde eine Lokalisation in der Nachbarschaft einer fragilen Stelle (fra(8)(q24.11), FRA8E) gezeigt (Takahashi et al. 1991).

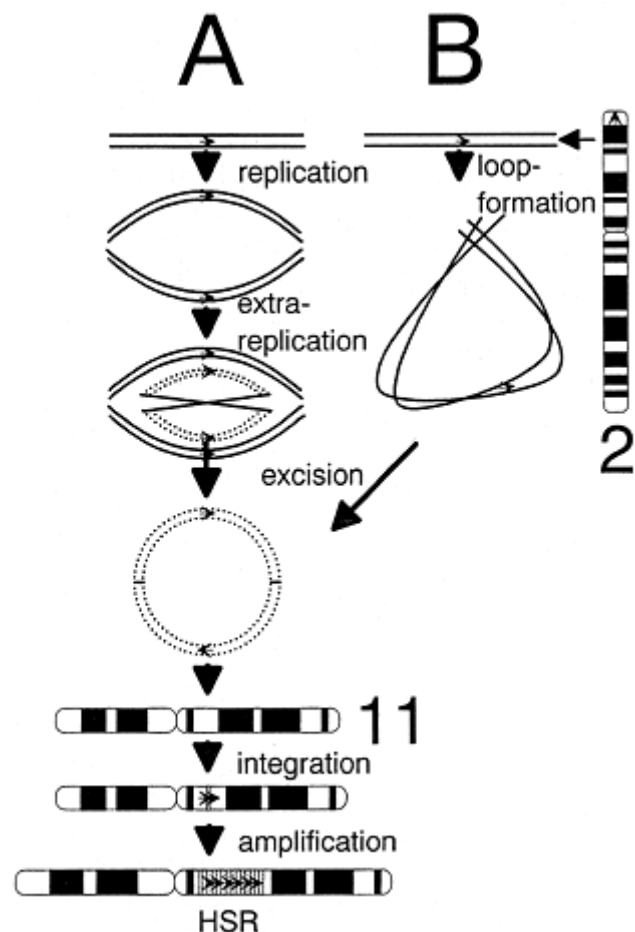
Die extrachromosomale *MYC*-Amplifikation ist nicht immer mit der Deletion einer intrachromosomal vorliegenden *MYC*-Kopie verbunden. In einem weiteren Fall von AML (M2) mit extrachromosomaler *MYC*-Amplifikation blieben die *MYC*-Kopien in beiden #8 erhalten (Karyotyp der aberranten Zellen: 45,XX,-7, der(16)t(16;20)(p13;q13),der(20)del(20)(q11q13)t(16;20)(p13;q13),+dmin; Fugazza et al. 1997). Eine vergleichbare Beobachtung wurde auch in humanen Neuroblastomen gemacht, die häufig eine Amplifikation von *MYCN* in Form von HSRs oder Dmin ohne Verlust der intrachromosomalen *MYCN*-Kopien zeigen (Corvi et al. 1994; Amler et al. 1992). Der Mechanismus der Genamplifikation lässt sich in diesen Fällen durch Annahme einer außerplanmäßigen DNA-Replikation am Locus des zu amplifizierenden Gens erklären, die zur Erzeugung zusätzlicher Kopien des Gens führt (s. Abb. 94). Diese können nach Excision zu circulären Strukturen (Episomen) rekombinieren und extrachromosomal als Dmin bestehen bleiben oder in ein Chromosom integrieren und nach sekundärer Amplifikation am Integrationsort eine HSR aus regelmäßig angeordneten Amplicons (tandem repeats) bilden. Der originale Locus des amplifizierten Gens bleibt dabei bestehen (Amler et al. 1992; Schwab 1999).

Abb. 94: Extrareplikation oder Deletion als Mechanismen der Genamplifikation

A) Extrareplikation: Durch lokale Extrareplikation werden zusätzliche Kopien eines Gens erzeugt, die nach Excision rekombinieren und sich als Dmin oder HSRs manifestieren können. Der originale Locus des amplifizierten Gens bleibt dabei erhalten.

B) Deletion: Die Excision einer Replikationschleife (loop) mit dem zu amplifizierenden Gen führt zur Deletion des Gens aus dem Ursprungschromosom. Die ausgeschnittene DNA-Sequenz kann nach Rekombination zur Bildung von Dmin oder HSRs führen.

(Schema entnommen aus: Schwab 1999)



Für die Prognose des Verlaufs einer AML scheint weniger das Vorliegen einer extrachromosomalen *MYC*-Amplifikation, sondern eher die Anwesenheit und Anzahl von zusätzlichen Chromosomenaberrationen in den Leukämiezellen von Bedeutung zu sein. Eine Analyse von vergleichbaren, in der Fachliteratur beschriebenen Fällen ergab, dass das Auftreten einer extrachromosomalen *MYC*-Amplifikation zusammen mit zahlreichen komplexen Chromosomenaberrationen mit einem schnellen Fortschreiten der Erkrankung assoziiert ist (Überlebenszeit nach Erstdiagnose maximal 6 Monate). Bei Vorliegen von nur einzelnen Chromosomenaberrationen (wie z.B. der #X-Verlust des untersuchten AML-Falls) neben einer extrachromosomalen *MYC*-Amplifikation ist der Krankheitsverlauf dagegen günstiger (Überlebenszeit nach Erstdiagnose 9-45 Monate) (Bruckert et al. 2000).

In den AML-Fällen mit günstigerem Verlauf stellte jedoch das Erscheinen von neuen chromosomalen Aberrationen in Leukämiezellen bei einem Rezidiv ein Signal für eine Verschlechterung des Krankheitsverlaufs dar (Bruckert et al. 2000). In dem untersuchten AML-Fall traten beim dritten Rezidiv erstmals neue zusätzliche Aberrationen in einem kleinen Anteil (22%) der Leukämiezellen auf. Da jedoch jede dieser Zellen unterschiedliche neue Aberrationen aufwies, lag keine klonale Veränderung vor und es erschien fraglich, ob diese Ereignisse in einzelnen Zellen ebenfalls ein Anzeichen für eine Verschlechterung des Krankheitsverlaufs darstellten. Aufgrund ihres Auftretens in proliferationsaktiven Zellen waren die neuen Aberrationen möglicherweise ein Hinweis auf eine Veränderung in der Zusammensetzung der Leukämiezellpopulation zugunsten von Zellen mit erhöhter genomischer Instabilität und/oder Resistenz gegen die eingesetzten Chemotherapeutika. Für diese Annahme sprechen die erfolglose chemotherapeutische Behandlung und der relativ schnelle Tod der Patientin nach diesem Rezidiv.

A.2) Eigenschaften und Onkogenwirkung von *MYC*

A.2.1) Das Protoonkogen *MYC*

Das Protoonkogen *MYC* ist ein Mitglied der *MYC*-Genfamilie, zu der auch *MYCL* und *MYCN* gehören (Ayer and Eisenman 1997). Cytogenetisch ist *MYC* in 8q24.12→q24.13 lokalisiert (Takahashi et al. 1991).

In ruhenden Zellen wird *MYC* nicht oder nur in sehr geringem Maß exprimiert. Seine Expression kann in diesen Zellen jedoch sehr schnell durch eine Vielzahl an Mitogenen, z.B. Cytokine und Wachstumsfaktoren, induziert werden und ist eine notwendige Voraussetzung für den Eintritt in den Zellzyklus. Während des Zellzyklus wird die *MYC*-Expression kontinuierlich aufrecht erhalten (Ayer and Eisenman 1997). Bei Entzug der notwendigen Wachstumsfaktoren wirkt *MYC* unabhängig von der Zellzyklusposition einer proliferationsaktiven Zelle apoptoseinduzierend (Desbarats et al. 1996; Ayer and Eisenman 1997; Cotter et al. 1992). In Zellen, die mit der terminalen Differenzierung beginnen, nimmt die *MYC*-Expression ab und ist in ausdifferenzierten Zellen vollständig abgeschaltet (Ayer and Eisenman 1997; Hoffman et al. 1996). Als transkriptionelle Repressoren der *MYC*-Expression wurden der Plasmacytoma-Repressor-Faktor (PRF; Genprodukt von *Blimp-1*) in differenzierenden B-Lymphocyten sowie der Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) identifiziert (Zou et al. 1997; Hoffman et al. 1996; Potter and Marcu 1997).

Die Sequenz des humanen *MYC*-Protoonkogens umfaßt inklusive Steuerungssequenzen ca. 6400 bp und enthält drei Exons von 550, 769 und 872 bp (1., 2. und 3. Exon) Größe (Battey et al. 1983). Die

Transkription der mRNA wird von zwei Promotoren (P1 und P2) innerhalb des ersten Exons gestartet (Ayer and Eisenman 1997). Der hauptsächlich produzierte Typ des MYC-Proteins wird durch Translation der Sequenz von Exon 2 und ca. 75% der Sequenz von Exon 3 erzeugt und stellt ein 64 kDa-Protein mit 439 Aminosäuren dar (Battey et al. 1983; Ayer and Eisenman 1997; Dang 1999). Posttranslational wird das Protein durch Phosphorylierung modifiziert und in den Zellkern transportiert (Potter and Marcu 1997). Die MYC-Genprodukte sind mit Halbwertszeiten von ca. 30 Minuten für die mRNA und 20-30 Minuten für das MYC-Protein sehr kurzlebig (Potter and Marcu 1997).

Die Struktur des MYC-Proteins weist einige Merkmale auf, die für Transkriptionsfaktoren typisch sind (Ayer and Eisenman 1997; Dang 1999; Koskinen et al. 1993):

- es enthält am N-Terminus eine Transaktivierungsdomäne, die 143 Aminosäuren umfaßt und drei unabhängige Aktivierungsdomänen mit unterschiedlicher Wirkungskraft beinhaltet;
- am C-Terminus befindet sich eine Basic region-Helix-Loop-Helix-Leucine Zipper- (bHLHZip)-Struktur, zusammengesetzt aus einer basischen Region, die eine sequenzspezifische Bindung an die DNA ermöglicht, sowie eine Helix-Loop-Helix/Leucin-Zipper-Domäne zur Dimerbildung mit anderen Proteinen, die eine entsprechende Domäne enthalten.

In *in vitro*-Untersuchungen wurde festgestellt, dass die basische Region des MYC-Proteins spezifisch an die E-Box-DNA-Sequenz CACGTG bindet (Blackwell et al. 1990). Das MYC-Protein bindet jedoch als Monomer *in vivo* nicht an DNA und bildet auch keine Homodimere mit DNA-Bindungsfähigkeit aus. Erst durch Heterodimerbildung des MYC-Proteins mit einem zweiten Protein namens MAX entsteht ein Proteinkomplex, der spezifisch an die CACGTG-Sequenz binden kann. Das MAX-Protein ist wie das MYC-Protein ein nukleäres Phosphoprotein mit, je nach Proteintyp, 151 oder 160 Aminosäuren. Es besitzt die gleiche bHLHZip-Struktur mit entsprechender Sequenzspezifität der DNA-Bindungsregion, enthält aber keine Transaktivierungsdomäne. MAX ist stabiler als das MYC-Protein (Halbwertszeit >12 h) und wird sowohl in proliferationsaktiven als auch in differenzierten Zellen in vergleichbaren Mengen exprimiert. Die Heterodimerbildung mit MYC erfolgt über die HLHZip-Region. MAX ist im Gegensatz zu MYC in der Lage, Homodimere zu bilden und in dieser Form spezifisch an die CACGTG-Sequenz zu binden. Die MAX/MAX-Homodimere zeigen jedoch eine geringere DNA-Bindungsaffinität und -Bindungsstabilität als die MYC/MAX-Heterodimere. In Gegenwart von MYC ist die Bildung der MYC/MAX-Heterodimere bevorzugt (Koskinen et al. 1993 und enthaltene Referenzen; Ayer and Eisenman 1997; Dang 1999).

In Transfektionsexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass MYC/MAX-Heterodimere durch Bindung an ihre spezifische E-Box-DNA-Sequenz in der Lage sind, die Transkription und Expression der Gene, die durch die E-Box-enthaltenden Promotoren reguliert werden, zu aktivieren (Ayer and Eisenman 1997; Dang 1999). Jedoch ist die Transkriptionsaktivierung (Transaktivierung) durch MYC/MAX im Vergleich zur Wirkung anderer Transkriptionsfaktoren, die ebenfalls an die MYC-spezifische E-Box-Sequenz binden können (z.B. USF), relativ schwach (Dang 1999; Eisenman 2001). Die MYC/MAX-Heterodimere besitzen darüber hinaus die Fähigkeit, im Komplex mit anderen Proteinen eine Acetylierung des Histons H4 in der Umgebung ihrer E-Box-Bindungsstelle zu erzeugen. Die dadurch an dieser Stelle wahrscheinlich hervorgerufene erhöhte Zugänglichkeit des Chromatins für andere Transkriptionsfaktoren könnte ebenfalls zu einer lokalen Aktivierung der Genexpression führen (Eisenman 2001).

Die Bindung von MYC/MAX-Heterodimeren an die E-Box-Sequenz eines Promotors kann neben transkriptionsaktivierender auch transkriptionshemmende Wirkung haben. Dies ist unter anderem bei Genen, deren Promotoren bestimmte Initiatorelemente (INRs) aufweisen, beobachtet worden (Dang 1999; Eisenman 2001).

Die MYC-spezifische E-Box-Sequenz ist in den Promoterregionen zahlreicher Gene gefunden worden, die daher als mögliche 'Zielgene' von MYC angesehen werden. Die Gruppe der Gene, deren Transkription durch MYC/MAX wahrscheinlich aktiviert wird, umfaßt Zellzyklus-regulierende Gene (z.B. *CDK4*, *CYCLIN D2*, *CDC25A*) sowie Gene, die für Stoffwechsel und Wachstum einer Zelle wichtig sind, z.B. Gene für Enzyme des Nukleotidstoffwechsels (*CAD*, *DHFR*, *TK*). Zu den Genen, deren Transkription durch MYC/MAX wahrscheinlich gehemmt wird, gehören Gene, die beim Proliferationsarrest (z.B. *p15^{INK4B}*, *p21^{CIP1}*) und bei der Zelldifferenzierung (z.B. Kollagengene, LFA-1, MHC-Klasse-I-Gene) von Bedeutung sind (Dang 1999; Lee and Dang 1997; Eisenman 2001).

Im Gegensatz zu MYC/MAX-Heterodimeren zeigen MAX/MAX-Homodimere bei Bindung an die MYC-spezifische E-Box-Sequenz keine transkriptionsaktivierende Wirkung. Sie konkurrieren aber in der Zelle mit den MYC/MAX-Heterodimeren um die E-Box-DNA-Bindungsstellen und wirken dadurch bei den MYC-Zielgenen einer Änderung der Transkriptionsaktivität durch die MYC/MAX-Heterodimere entgegen (Amin et al. 1993; Ayer and Eisenman 1997; Dang 1999) (s. Abb. 95).

Die Transaktivierungsaktivität der MYC/MAX-Heterodimere wird zusätzlich durch die Anwesenheit von Proteinen der MAD-Familie beeinflusst. Zur MAD-Familie gehören die Proteine MAD-1, MXI-1 (MAD-2), MAD-3 und MAD-4, die alle eine bHLHZip-Struktur aufweisen. MAD-Proteine bilden weder Homodimere noch Heterodimere mit MYC aus. Sie dimerisieren jedoch mit MAX unter Ausbildung von MAD/MAX-Heterodimeren, die wie MYC/MAX-Heterodimere an die MYC-spezifische E-Box-Sequenz binden können. Auf die MYC-Zielgene üben gebundene MAD/MAX-Heterodimere die entgegengesetzte Wirkung von MYC/MAX-Heterodimeren aus: sie hemmen die Transkription und damit Expression der durch MYC/MAX transkriptionsaktivierten Gene. Die Bindung der MAD/MAX-Heterodimere korreliert mit einer lokalen Histon-Deacetylierung (beobachtet bei den Histonen H3 und H4) in der Umgebung ihrer E-Box-Bindungsstelle. Diese Histonmodifikation führt wahrscheinlich zu einer erniedrigten Zugänglichkeit des Chromatins für Transkriptionsfaktoren mit der Folge einer Repression der MYC-Zielgenexpression. MAD-Proteine stellen daher eine Art Gegenspieler zu MYC dar, die zum einen mit MYC um die Bindung der verfügbaren MAX-Proteine und zum anderen als MAD/MAX-Heterodimere mit MYC/MAX-Heterodimeren um die E-Box-Bindungsstellen im Genom konkurrieren können (Ayer and Eisenman 1997; Dang 1999; Eisenman 2001).

In vielen Zelltypen werden MAD-Proteine in erhöhtem Maß während der terminalen Differenzierung exprimiert. In diesem Stadium sinkt gleichzeitig die MYC-Expression ab. Als Folge tritt in differenzierenden Zellen eine Verschiebung der Heterodimerbildung von MYC/MAX-Heterodimeren zu MAD/MAX-Heterodimeren ein. Die durch die MAD/MAX-Heterodimere erzielte Transkriptionshemmung der durch MYC/MAX aktivierten Zielgene ermöglicht wahrscheinlich die Umstellung der Zellen von Proliferationsaktivität und Zellwachstum zu Proliferationsarrest und Zelldifferenzierung (Ayer and Eisenman 1997; Dang 1999; Eisenman 2001) (s. Abb. 95).

MYC kann außer mit MAX mit einer Reihe weiterer Proteine assoziieren, darunter das TATA-bindende Protein (TBP) sowie transkriptionsregulierende Faktoren wie TFII-I und YY1. Die Auswirkungen dieser Proteininteraktionen sind jedoch noch weitgehend ungeklärt (Ayer and Eisenman 1997; Potter and Marcu 1997; Dang 1999).

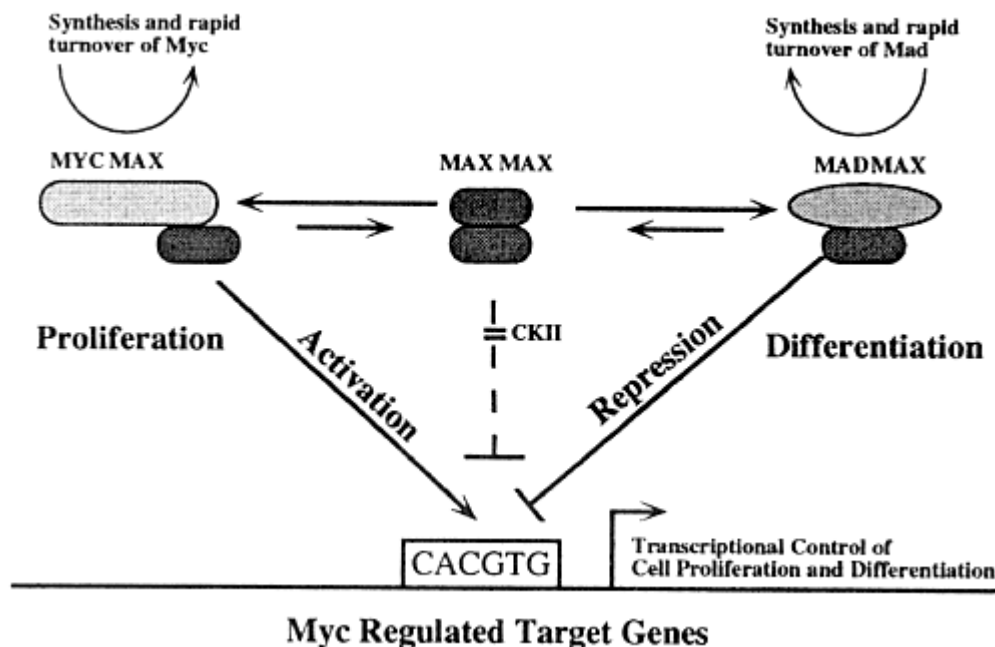


Abb. 95: Modell der Regulation der Transkriptionsaktivität bei MYC-Zielgenen durch MYC/MAX-, MAX/MAX- und MAD/MAX-Dimere. Das MYC-Protein bildet mit dem Protein MAX ein Heterodimer, das spezifisch an die E-Box-DNA-Sequenz CACGTG bindet und dadurch die Transkription der durch die E-Box-enhaltenden Promotoren regulierten Gene aktiviert. Diese MYC-Zielgene sind mit vor allem mit Wachstum, Stoffwechsel und Proliferation der Zelle assoziiert. MAX-Proteine können als Homodimere mit den MYC/MAX-Heterodimeren um die E-Box-DNA-Bindungsstellen konkurrieren, wirken jedoch nicht transkriptionsaktivierend. Die DNA-Bindungsaktivität der MAX-Homodimere wird durch Caseinkinase II (CKII)-Phosphorylierung gehemmt. MAX kann, im Gegensatz zu MYC, ebenfalls mit Proteinen der MAD-Familie dimerisieren und in dieser Form an die E-Box-Sequenz der MYC-Zielgene binden. MAD/MAX-Heterodimere hemmen die Transkription der durch MYC/MAX aktivierten Gene und werden während der Zelldifferenzierung in erhöhtem Maß gebildet, bei gleichzeitiger Abnahme der MYC-Expression. Da das MAX-Protein im Gegensatz zu MYC und MAD sehr stabil ist und konstant exprimiert wird, hängen Art und Menge der gebildeten Dimere in erster Linie von der Syntheserate von MYC bzw. MAD ab. (Schema entnommen aus: Ayer and Eisenman 1997, modifiziert)

A.2.2) Onkogenaktivierung bei MYC

In Tumorzellen sind häufig Veränderungen eines oder mehrerer Protoonkogene nachweisbar, durch die das jeweils betroffene Protoonkogen zum Onkogen aktiviert wurde. Diese Aktivierung erfolgt hauptsächlich durch Amplifikation, Mutation oder Translokation des Protoonkogens und führt zu einer anormal erhöhten Expression des Genprodukts oder zur Synthese eines veränderten Genprodukts (Schwab 1995).

Für das MYC-Protoonkogen sind in humanen Tumoren zwei aktivierende Veränderungen bekannt:

- die Amplifikation von *MYC*, die in Carcinomen der Brust, des Dickdarms, der Gebärmutter und der Lunge sowie bei einigen myeloischen Leukämieformen gefunden wurde (s. Einleitung, Tab. 1), und
- spezifische Translokationen mit Beteiligung von *MYC*, die in B-Zell-Lymphomen mit hohem Malignitätsgrad (Burkitt- und Nicht-Burkitt-Typ) und akuter lymphatischer B-Zell-Leukämie (B-ALL, FAB-Subtyp L3) sowie in akuter lymphatischer T-Zell-Leukämie (T-ALL) auftreten (Clare and Hansen 1994; Le Beau 1991).

Beide Veränderungen bewirken eine übermäßige Expression des *MYC*-Gens, die bei der *MYC*-Amplifikation als Folge der erhöhten Genkopienanzahl eintritt und bei der *MYC*-Translokation aus der Verbindung der codierenden Abschnitte von *MYC* mit einem aktiv transkribierten Gen resultiert. Bei Burkitt-Lymphomen führt die Kombination von *MYC* mit einem in antikörperproduzierenden B-Zellen aktiv transkribierten Gen für eine Immunglobulinkette (*IGH* bei t(8;14)(q24;q32), *IGK* bei t(2;8)(p12;q24), *IGL* bei t(8;22)(q24;q11)) dazu, dass die *MYC*-Expression unter die Kontrolle des jeweiligen Immunglobulingenpromotors gerät und dadurch fehlreguliert wird (Donner 1997; Solomon et al. 1991; Spencer and Groudine 1991; Le Beau 1991).

Das *MYC*-Onkogen zeigt i.d.R. keine weiteren Mutationen, mit Ausnahme der Burkitt- und einiger anderer Lymphomtypen, bei denen Punktmutationen in der codierenden Sequenz des translozierten *MYC*-Gens vorkommen können (Dang 1999; Ayer and Eisenman 1997; Donner 1997; Schwab 1995; Clare and Hansen 1994; Bernard et al. 1983; Le Beau 1991).

Bei verschiedenen myeloischen und lymphatischen Leukämien (akute und chronische Formen) ist auch eine *MYC*-Überexpression ohne nachweisbare Kopienanzahl- oder Positionsveränderung des *MYC*-Gens beobachtet worden (Rothberg et al. 1984).

Die Aktivierung des *MYC*-Protoonkogens führt in einer Zelle offenbar unabhängig vom Mechanismus der Aktivierung zu einem Verlust der Kontrolle über die *MYC*-Expression, die infolgedessen dereguliert und im Übermaß erfolgt (Ayer and Eisenman 1997). Dadurch wird in der betroffenen Zelle ein Überschuss an *MYC*-Protein synthetisiert, der nach dem in Abb. 94 dargestellten Modell eine anhaltende Verschiebung der Dimerbildung zugunsten von *MYC*/*MAX*-Heterodimeren erwarten ließe und zu einer Verstärkung aller Wirkungen von *MYC* (s. A.2.1) führen würde. Dies könnte eine Erklärung für die unkontrollierte Proliferationsaktivität von Tumorzellen mit *MYC*-Überexpression bei gleichzeitiger Blockierung der terminalen Differenzierung liefern (Hanahan and Weinberg 2000; Ayer and Eisenman 1997; Hoffman et al. 1996; Sachs 1996; Amin et al. 1993).

Andererseits erzeugt die Überexpression von *MYC* bei proliferationsaktiven Zellen auch eine erhöhte Neigung zur Apoptose. Diese tritt beschleunigt bei Entzug der von der Zelle benötigten Wachstumsfaktoren oder bei Exposition gegenüber Cytostatika ein (Dang 1999; Thompson 1998; Ayer and Eisenman 1997; Hoffman et al. 1996; Sachs 1996; Cotter et al. 1992; Williams 1991). Die erhöhte Apoptoseneigung könnte einen möglichen Schutzmechanismus des Organismus zur Eliminierung von Zellen mit aktiviertem *MYC*-Onkogen darstellen (Hanahan and Weinberg 2000; Desbarats et al. 1996). Die Überexpression eines zweiten Onkogens wie *BCL-2* oder der Verlust bzw. eine Mutation des Tumorsuppressorgens *TP53* können die apoptosefördernde Wirkung der *MYC*-Überexpression aufheben (Stenner-Liewen and Reed 2003; Pelengaris et al. 2002; Hanahan and Weinberg 2000; Sachs 1996; Lotem and Sachs 1995;

Wagner et al. 1993). Experimente an transgenen Mäusen ergaben, dass die Suppression der durch die *MYC*-Überexpression erhöhten Apoptoseneigung bereits ausreicht, um eine schnelle Progression zum malignen Tumor zu ermöglichen (Stenner-Liewen and Reed 2003; Pelengaris et al. 2002).

Dies zeigt, dass die *MYC*-Überexpression eine Zelle aufgrund der fehlerhaften Regulation von *MYC* zwar auf den Weg zur Tumorzellentwicklung bringt, jedoch zur vollständigen Zelltransformation nicht ausreicht. Die Überexpression von *MYC* kann aber zur Erhöhung der genetischen Instabilität einer Zelle beitragen und die Ausprägung weiterer genetischer Veränderungen (unter anderem Genamplifikationen) fördern (Felsher and Bishop 1999; Taylor et al. 1997; Mai et al. 1996), durch die das maligne Potential der *MYC*-überexprimierenden Zelle erhöht werden kann.

Bei akuten nichtlymphatischen Leukämien ist eine *MYC*-Überexpression in Kombination mit einer Punktmutation in *NRAS*, Coamplifikation von *PVT-1* oder hoher Expression von *MYB* beobachtet worden (Asker et al. 1988; Tanaka et al. 1993; Preisler et al. 1989). Entsprechend besteht auch bei dem in dieser Arbeit untersuchten AML-Fall die Möglichkeit, dass neben der *MYC*-Amplifikation zusätzliche Veränderungen auf molekulargenetischer Ebene vorgelegen haben, die unentdeckt blieben. Wenn dies der Fall war, haben die unentdeckten Veränderungen jedoch zumindest zu Beginn des Krankheitsverlaufs offenbar nicht zu einer Inaktivierung der Apoptoseinduktion in den Leukämiezellen geführt, da die chemotherapeutische Behandlung zunächst erfolgreich war und zwei vollständige Remissionen erzielt werden konnten.

B) Amplifikation eines Stoffwechselgens in HeLa-Zellen nach MTX-Selektion

B.1) Methodische Modifikationen

Zur Analyse der chromosomalen Veränderungen in den selektionierten HeLa-MTX-Sublinien wurden einige der eingesetzten cytogenetischen Methoden modifiziert. Da aufgrund der hohen Karyotypheterogenität der HeLa-Zellen eine Karyotypisierung der einzelnen HeLa-MTX-Sublinien nicht sinnvoll erschien, wurde der Schwerpunkt der cytogenetischen Untersuchungen auf die Analyse von Veränderungen am *DHFR*-tragenden Chromosomenarm 5q gelegt, weil bei diesem Chromosomenarm die höchste Wahrscheinlichkeit des Auftretens spezifischer, genamplifikationsbezogener Veränderungen während der Induktion der *DHFR*-Amplifikation bestand.

Die CGH wurde mit Referenz-DNA der HeLa-Parentallinie durchgeführt, um Kopienanzahlunterschiede zwischen der Parentallinie und den letzten HeLa-MTX-Sublinien ermitteln zu können. Dazu erfolgte auch eine Anpassung der Profilschwellenwerte an den überwiegend hypotriploiden Karyotyp der HeLa-Zellen. Bei der visuellen Auswertung der CGH-Kontrollansätze mit DNA der HeLa-Parentallinie zeigten bestimmte chromosomale Regionen Unterschiede in der Fluoreszenzintensität, die sowohl in der roten Fluoreszenzfarbe der Referenz-DNA als auch in der grünen Fluoreszenzfarbe der Test-DNA sichtbar wurden und daher nicht durch einen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe bedingt waren. Die Fluoreszenzintensitätsunterschiede traten sowohl in CGH-Kontrollansätzen mit Haptenmarkierung als auch mit Direktmarkierung der HeLa-Parentallinien-DNA auf und waren daher ebenfalls nicht auf die DNA-Markierungs-

methode zurückzuführen. Sie bildeten auf jedem Chromosom ein spezifisches Verteilungsmuster, das zwischen zwei Homologen einer CGH-Metaphase und zwischen den gleichen Chromosomen verschiedener CGH-Metaphasen identisch war. Bei #5 konnte z.B. in allen HeLa-CGH-Ansätzen auf 5p eine intensivere Fluoreszenz als auf 5q beobachtet werden (s. Abb. 96). Die Ursache dafür stellen vermutlich die Kopienanzahlunterschiede, die innerhalb des hypotriploiden Genoms der Parentallinie vorliegen, dar. 5p trat in den durch #5-WCP untersuchten Metaphasen der Parentallinie in einer Kopienanzahl von sieben und 5q in einer Kopienanzahl von drei auf. Die höhere Kopienanzahl von 5p könnte in der CGH zu einer besseren Absättigung der komplementären Bindungsstellen auf den Metaphasechromosomen führen und dadurch die intensivere Fluoreszenzintensität auf 5p im Vergleich zu 5q bedingen. Die Fluoreszenzintensität von 5q entsprach dabei einer trisomen Kopienanzahl.

Die Kopienanzahlunterschiede zwischen 5p und 5q wurden bei den HeLa-CGH-Kontrollansätzen nur visuell und nicht in den CGH-Profilen sichtbar, weil die Profilauswertung nur Unterschiede zwischen Test- und Referenz-DNA detektiert. Da bei den HeLa-CGH-Kontrollansätzen dieselbe DNA als Test- und Referenz-DNA eingesetzt wurde, lagen 5p und 5q in beiden DNAs in jeweils gleicher Kopienanzahl vor, so dass keine Kopienanzahlunterschiede zwischen Test- und Referenz-DNA bestanden (s. Abb. 96).

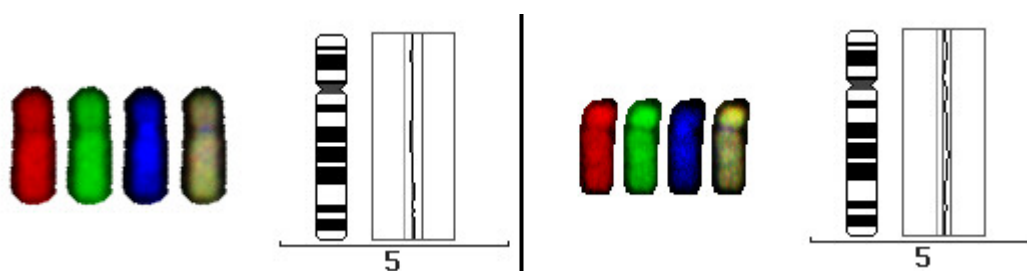


Abb. 96: Fluoreszenzintensitätsmuster von #5 in CGH-Kontrollansätzen mit Direktmarkierung von Test- und Referenz-DNA.

Die Farbauszüge von einem #5 aus den CGH-Kontrollansätzen zeigen die Rotfluoreszenz der Referenz-DNA, die Grünfluoreszenz der Test-DNA, die Blaufluoreszenz der DAPI-AMD-Gegenfärbung sowie die Dreifarbdarstellung des CGH-Chromosoms. Rechts neben den Farbauszügen ist das CGH-Mittelprofil aller ausgewerteten #5 des CGH-Ansatzes abgebildet.

Linke Seite:

Fluoreszenzintensitäten von #5 bei Verwendung von DNA aus diploiden PB-Leukocyten. Zwischen 5p und 5q sind keine Unterschiede in der Fluoreszenzintensität erkennbar.

Rechte Seite:

Fluoreszenzintensitäten von #5 bei Verwendung von DNA aus der hypotriploiden HeLa-Parentallinie. 5p weist sowohl in der Rot- als auch in der Grünfluoreszenz eine höhere Fluoreszenzintensität als 5q auf und zeigt dadurch Kopienanzahlunterschiede zwischen den beiden Chromosomenarmen im Genom der HeLa-Parentallinie an. Diese werden im CGH-Profil von #5 jedoch nicht sichtbar.

Eine Modifikation der HeLa-CGH-Methode wurde in Form der REVISH zur Lokalisation des Amplicons in den Metaphasen der HeLa-MTX-Sublinien eingesetzt. Die REVISH erwies sich als eine geeignete alternative Methode zur Lokalisation einer CGH-detektierbaren amplifizierten Sequenz, wenn keine FISH-Sonde für diese Sequenz verfügbar ist.

B.2) Verlauf der Genamplifikationsentwicklung bei den HeLa-MTX-Sublinien

Der Verlauf der *DHFR*-Amplifikationsentwicklung bei den HeLa-MTX-Sublinien war durch verschiedene Veränderungen am *DHFR*-tragenden Chromosomenarm 5q und in der intra- und extrachromosomalen *DHFR*-Kopienanzahl charakterisiert. Diese Veränderungen wurden jeweils nur in einem Teil der ausgewerteten Metaphasen einer MTX-Sublinie detektiert und waren daher nicht repräsentativ für die gesamte Zellpopulation. Sie zeigten aber die Tendenzen an, die in einem größeren Anteil der HeLa-Zellpopulation auftraten.

Da der überwiegende Teil ($\geq 70\%$) der Zellen in allen MTX-Sublinien ≤ 69 Chromosomen enthielt, wurden alle signifikanten Veränderungen im 5q-Status und der *DHFR*-Kopienanzahl im Vergleich zur Parentallinie in diesem Zellanteil detektiert. Metaphasen mit >69 Chromosomen lagen in den HeLa-MTX-Sublinien nur in geringer Anzahl vor.

Anhand der beobachteten chromosomalen und 5q- sowie *DHFR*-Statusveränderungen wurden vier Stadien der *DHFR*-Amplifikationsentwicklung in den HeLa-MTX-Sublinien unterschieden (s. Abb. 97). Die Stadien bis zum Erscheinen von Dmin stellten die frühen und die nachfolgenden Stadien die fortgeschrittenen Stadien der *DHFR*-Amplifikationsentwicklung dar.

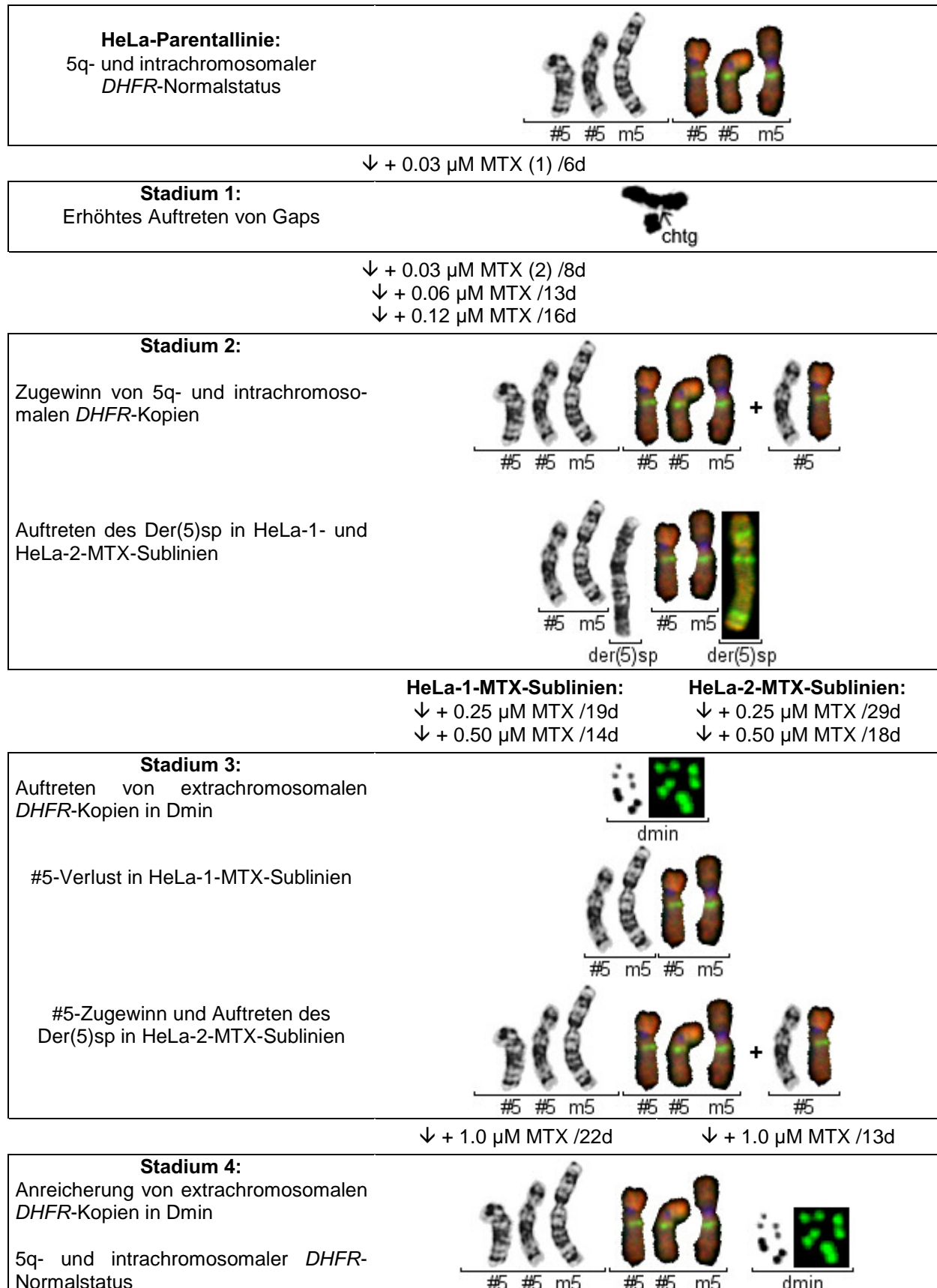


Abb. 97: Wichtigste Stadien der *DHFR*-Amplifikationsentwicklung in den HeLa-MTX-Sublinien. Die 5q-Statusveränderungen sind durch Abbildungen der jeweils vorliegenden 5q-Trägerchromosomen in G-Bänderung und nach REVISH symbolisiert. Die *DHFR*-Sequenz (Amplicon) ist auf den REVISH-Chromosomen anhand ihres grünen Fluoreszenzsignals lokalisierbar. Der(5)sp: derivatives 5q-Trägerchromosom (s. B.4.8, B.10.3.3); m5, 5q-Normalstatus: s. B.6.1), B.10.2.1)

B.2.1) Frühe Stadien der *DHFR*-Amplifikationsentwicklung

Die erste detektierte chromosomale Veränderung in den HeLa-MTX-Sublinien war eine signifikante Zunahme von Metaphasen mit Gaps nach dem ersten Selektionsschritt (auf 10-12%; Stadium 1).

Ein vergleichbar hoher Anteil an gaphaltigen Metaphasen (9%) trat allerdings auch in der ersten Sublinie aus der Langzeit(LZ)kultivierung ohne Selektion auf, der jedoch gegenüber der LZ-Parentallinie nicht signifikant erhöht war und möglicherweise eine Auswirkung des Auftauens der parentalen Zellen vor Beginn der Langzeitkultivierung darstellte. Im Vergleich zur ersten LZ-Sublinie wiesen die ersten MTX-Sublinien zum Untersuchungszeitpunkt bereits eine doppelt so lange Kultivierungszeit auf, so dass eine Manifestation von Gaps infolge des Auftauens der parentalen Zellen unwahrscheinlich war. Da der Anteil der gaphaltigen Metaphasen in den nachfolgenden LZ-Sublinien deutlich niedriger als in der ersten LZ-Sublinie war, kann eine Induktion von Gaps durch die Kultivierungsbedingungen selbst ebenfalls ausgeschlossen werden. Dies spricht dafür, dass der erhöhte Anteil an Metaphasen mit Gaps in den MTX-Sublinien wahrscheinlich eine erste Auswirkung der anhaltenden MTX-Exposition darstellte.

MTX induziert DNA-Strangbrüche und die Expression von folatsensitiven fragilen Stellen, die sich in Form von Gaps ausprägen können (Li and Kaminskas 1984; Hecht et al. 1990; Sutherland and Richards 1995). Folatsensitive fragile Stellen wurden auf verschiedenen Chromosomen, jedoch nicht auf #5 lokalisiert (Hecht et al. 1990; Sutherland and Richards 1995).

In den HeLa-MTX-Sublinien wurden insgesamt acht Gaps und Brüche in 5q beobachtet, die dreimal die Region den *DHFR*-Gens, 5q13, und fünfmal flankierende Regionen bzw. die Centromerregion betrafen. Da diese Aberrationen in MTX-Sublinien aus allen Stadien der *DHFR*-Amplifikationsentwicklung gefunden wurden, können sie in diesem Fall nicht generell als ein frühes Ereignis der Amplifikationsentwicklung (Coquelle et al. 1997) angesehen werden.

Die erhöhte Rate an Gaps blieb in den MTX-Sublinien nur kurzfristig bestehen und war nach dem zweiten Selektionsschritt nicht mehr nachweisbar. Brüche wurden in den HeLa-MTX-Sublinien nicht in erhöhter Anzahl detektiert.

Das nächste Stadium (Stadium 2) war durch eine Tendenz zur Anreicherung von intrachromosomalen *DHFR*-Kopien gekennzeichnet (30-70% Metaphasen mit *DHFR*-Kopienzugewinn). Die Anreicherung erfolgte entweder durch Zugewinn eines zusätzlichen 5q-Trägerchromosoms (#5, m5 oder ein derivatives 5q-haltiges Chromosom) oder durch Verlust eines 5q-Trägerchromosoms (hauptsächlich #5) bei gleichzeitigem Zugewinn eines neuen derivativen Chromosoms mit zwei oder drei *DHFR*-Kopien. Der #5-Verlust und das Erscheinen von derivativen *DHFR*-haltigen Chromosomen ließen auf ein erhöhtes Auftreten von Brüchen in #5 schließen.

Das auffälligste derivative Chromosom stellte das Der(5)sp mit zwei 5q und drei *DHFR*-Kopien (in 13-30% der Metaphasen der HeLa-MTX-0.12-Sublinien) dar. Die invertierte Anordnung der beiden 5q ließ sich mit dem Ablauf eines Breakage-Fusion-Bridge (BFB)-Zyklus zur Generierung des Der(5)sp in Einklang bringen (s. Abb. 98). Ein BFB-Zyklus bezeichnet die zyklische Abfolge von Bruch, Fusion und Brückenbildung, die bei Chromosomen, die aufgrund eines Bruchereignisses ein telomerfreies Ende besitzen, oder bei dizentrischen Chromosomen auftreten kann (Traut 1991). Das initiiierende Ereignis könnte ein (durch MTX induzierter?) Chromosomenbruch in der terminalen Region von 5q darstellen, der zur Entstehung eines #5 mit telomerfreiem Ende führte. Dieses durchlief nach Fusion der Schwesterchroma-

tiden einen BFB-Zyklus. Dabei muss der Riß der Chromosomenbrücke nach der Morphologie des Der(5)sp innerhalb der Centromerregion einer der Schwesterchromatiden erfolgt sein. Das Produkt entsprach einem derivativen Chromosom mit zwei 5q in invertierter Anordnung. Die Erzeugung der dritten *DHFR*-Kopie des Der(5)sp erforderte ein weiteres Bruchereignis in einem anderen #5 derselben Zelle, aus dem ein centrisches #5-Fragment mit einer *DHFR*-Kopie resultierte. Dieses könnte sich anschließend an die terminale Region des 5p innerhalb des Der(5)sp angelagert haben. Das verbliebene Bruchende des Der(5)sp ist vermutlich nicht durch Schwesterchromatidfusion repariert worden, da dieser Chromosomentyp sonst weitere BFB-Zyklen durchlaufen hätte und wahrscheinlich nicht in einem erhöhten Zellanteil detektierbar gewesen wäre.

Da das Der(5)sp vollständig aus #5-Sequenzen bestand, waren an seiner Generierung zwei #5 (kein m5) beteiligt. Die Zellen mit Der(5)sp wiesen den Verlust von nur einem #5 auf, so dass die Prozesse zur Erzeugung des Der(5)sp in Zellen abgelaufen sein müssen, die bereits ein zusätzliches #5 enthielten. Dementsprechend wurde in den HeLa-1- und HeLa-2-MTX-Sublinien aus dem Selektionsschritt vor Erscheinen des Der(5)sp (HeLa-1-MTX-0.06, HeLa-2-MTX-0.06) eine signifikante Zunahme von Metaphasen mit zusätzlichem #5 beobachtet.

Das Der(5)sp war das am häufigsten detektierte derivative *DHFR*-haltige Chromosom in den HeLa-MTX-Sublinien, trat aber nur in den MTX-Sublinien aus den Selektionsschritten in 0.06, 0.12 und 0.25 μ M MTX in erhöhten Metaphasenanteilen auf. Daher entsprach dieses Chromosom einem transienten Zwischenprodukt des *DHFR*-Amplifikationsprozesses.

Ähnliche Zwischenprodukte sind in verschiedenen Hamsterzelllinien in den frühen Stadien von induzierten Genamplifikationen beobachtet worden. In diesen Zelllinien entstand infolge von BFB-Zyklen eine intrachromosomale Genamplifikation auf dem Chromosom mit dem originalen Zielgenlocus, die durch die invertierte Anordnung der Amplicons charakterisiert war (Poupon et al. 1996; Smith et al. 1995; Ma et al. 1993; Toledo et al. 1992).

Auch in Tumoren kann sich eine intrachromosomale Genamplifikation in Form von Markerchromosomen mit einer Anreicherung von Amplicons ausprägen (Gisselsson et al. 1998).

Das Auftreten des Der(5)sp sowohl in den HeLa-1- als auch den HeLa-2-MTX-Sublinien weist darauf hin, dass in den frühen Stadien der *DHFR*-Amplifikationsentwicklung bei beiden MTX-Selektionen die gleichen Mechanismen zur Erzeugung zusätzlicher intrachromosomaler *DHFR*-Kopien wirksam waren.

Offenbar reichte der Zugewinn von ein oder zwei intrachromosomalen *DHFR*-Kopien während dieses Stadiums aus, um den Zellen einen Wachstumsvorteil zu verschaffen. Denkbar ist auch, dass in den frühen Stadien der Amplifikationsentwicklung noch andere Resistenzmechanismen gegen MTX in den Zellen wirksam waren (Banerjee et al. 1995; Bertino et al. 1996).

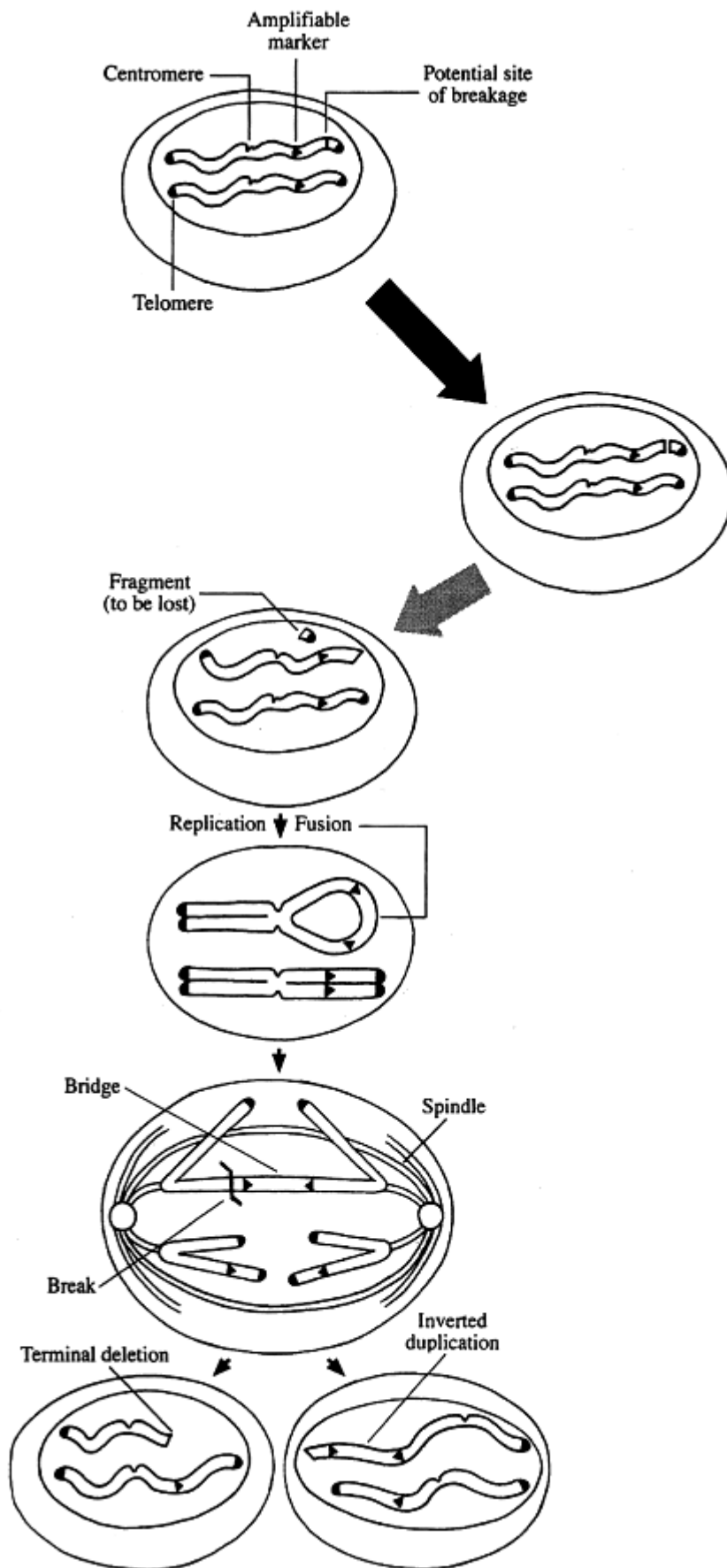


Abb. 98: Breakage-Fusion-Bridge (BFB)-Zyklen als Mechanismus der Genamplifikation

Ein BFB-Zyklus kann durch ein Bruchereignis (z.B. einen Doppelstrangbruch) ausgelöst werden, aus dem ein Chromosom mit einem fehlenden Telomer resultiert. Nach der Replikation fusionieren die Bruchenden der Schwesterchromatiden (Bildmitte). In der Anaphase bildet dieses Chromosom aufgrund der Schwesterchromatidfusion eine Chromosomenbrücke aus, die an einer beliebigen Stelle zwischen den Centromeren zerreißt. Die Tochterzellen enthalten infolgedessen wieder jeweils ein Chromosom mit einem telomerfreien Ende, das einen neuen BFB-Zyklus durchlaufen kann. Ein asymmetrischer Riß führt zu einer ungleichen Verteilung von genetischem Material in den entstandenen Chromosomen, so dass eine Tochterzelle duplizierte Sequenzen in invertierter Anordnung enthält (Zelle rechts unten) und die andere Tochterzelle einen Verlust dieser Sequenzen aufweist (Zelle links unten).

(Schema entnommen aus: Pipiras et al. 1998, modifiziert)

B.2.2) Fortgeschrittene Stadien der *DHFR*-Amplifikationsentwicklung

Nach dem fünften und sechsten Selektionsschritt (Stadium 3) zeigten die HeLa-1- und HeLa-2-MTX-Sublinien unterschiedliche Entwicklungen. Der fünfte Selektionsschritt in 0.25 μ M MTX stellte offensichtlich eine kritische Phase in beiden MTX-Selektionen dar, da sowohl die HeLa-1- als auch die HeLa-2-MTX-Sublinien bei diesem Schritt die höchsten Generationszeiten aufwiesen. In den erzeugten MTX-Sublinien beider Selektionen trat erstmals ein erhöhter Anteil an Metaphasen mit Dmin auf.

Bei den HeLa-1-MTX-Sublinien wurde parallel zum Auftreten von extrachromosomalen *DHFR*-Kopien in Dmin (39-49% der Metaphasen) eine Reduktion der intrachromosomalen *DHFR*-Kopienanzahl aufgrund eines #5-Verlustes (44-65% der Metaphasen) festgestellt.

Ca. 60% der Metaphasen mit #5-Verlust enthielten Dmin. Diese Kombination deutete darauf hin, dass die Dmin aus zuvor generierten azentrischen #5-Bruchstücken (mit *DHFR*-Sequenz) entstanden sein könnten. Dies kann z.B. nach Ausschluss der azentrischen Bruchstücke aus dem Zellkern in Form von Mikrokernen eintreten, wenn bei asynchroner Replikation von Zell- und Mikrokernen das im Mikrokern enthaltene Chromatin zur vorzeitigen Kondensation gezwungen und dadurch eine Pulverisierung dieses Chromatins ausgelöst wird. Durch weitere Rekombinationsereignisse können aus dem pulverisierten Chromatin Dmin entstehen (Hahn 1993; Sen et al. 1989).

Pulverisiertes Chromatin (Pvz) trat in einem Teil der Metaphasen (14-32%) der HeLa-1-MTX-Sublinien auf. Da es im Gegensatz zu den Dmin keine *DHFR*-Sequenz enthielt, war es nicht als Vorstufe der Dmin anzusehen, sondern bestand möglicherweise aus anderen Sequenzen eines #5-Bruchstücks. Das gleichzeitige Erscheinen von Pvz und Dmin wurde auch in einer anderen HeLa-Zelllinie während MTX-Selektion beobachtet (Delinassios and Talieri 1987).

Auf die gleiche Weise können auch Bruchereignisse am Der(5)sp, das in Metaphasen mit einem #5-Verlust vorlag, zur Generierung von Dmin geführt haben, da dieses Chromosom nach dem fünften Selektionsschritt in den MTX-Sublinien von Selektion 1 nur noch selten auftrat.

In den Metaphasen mit #5-Verlust ohne Dmin lagen möglicherweise submikroskopisch kleine Vorstufen von Dmin (Episomen; Von Hoff 1991; Carroll et al. 1988) vor.

Bei den HeLa-2-MTX-Sublinien setzte sich dagegen die Tendenz zur Anreicherung von intrachromosomalen *DHFR*-Kopien nach dem fünften Selektionsschritt fort. Diese erfolgte überwiegend durch #5- oder m5-Zugewinn (30% der Metaphasen). Daneben traten auch das Der(5)sp und andere derivative *DHFR*-haltige Chromosomen in erhöhtem Maß auf. Extrachromosomale *DHFR*-Kopien in Form von Dmin lagen im Gegensatz zur entsprechenden MTX-Sublinie aus Selektion 1 nur in wenigen Metaphasen (9%) vor.

Die MTX-Sublinie aus dem sechsten Selektionsschritt war dagegen durch einen hohen Gehalt von extrachromosomalen *DHFR*-Kopien in Dmin charakterisiert (78% der Metaphasen). Dieser war jedoch nicht wie bei Selektion 1 durch einen #5-Verlust begleitet. Daher kann bei dieser Sublinie eher eine Generierung von Dmin durch Bruchereignisse an einem zuvor hinzugewonnenen #5 oder derivativen *DHFR*-haltigen Chromosom angenommen werden.

In den MTX-Sublinien beider Selektionen wurde keine HSR-Entwicklung beobachtet. Dies steht im Gegensatz zur *DHFR*-Amplifikationsentwicklung in einer anderen HeLa-Zelllinie unter MTX-Selektion, bei

der die Bildung einer HSR mit *DHFR*-Kopien dem Auftreten von Dmin vorausging (Singer et al. 2000). Die HSR stellte bei dieser Linie offenbar ein Zwischenprodukt der Amplifikationsentwicklung dar, dem die derivativen *DHFR*-haltigen Chromosomen (Der(5)sp) in den hier selektionierten HeLa-MTX-Sublinien entsprechen könnten. Beide Formen von Zwischenprodukten waren instabil und daher vermutlich infolge von Bruchereignissen an der Generierung der Dmin beteiligt.

Nach dem letzten Selektionsschritt in 1.0 μ M MTX (Stadium 4) lagen keine signifikanten Unterschiede im 5q- und intrachromosomalen *DHFR*-Status mehr zwischen den erzeugten MTX-Sublinien von Selektion 1 und 2 vor. Beide MTX-Sublinien wiesen >75% Metaphasen mit extrachromosomalen *DHFR*-Kopien in Dmin auf und enthielten die gleiche 5q- und intrachromosomale *DHFR*-Kopienanzahl wie die Parentallinie. Die Anzahl der Dmin und entsprechend der extrachromosomalen *DHFR*-Kopien lag (bei Annahme von einer *DHFR*-Kopie pro Dmin) in >60% der Metaphasen beider MTX-Sublinien bei unter 20.

Der #5-Verlust, der bei den HeLa-1-MTX-Sublinien von Stadium 3 festgestellt wurde, war bei der letzten HeLa-1-MTX-Sublinie nur noch in einem kleinen Teil der Metaphasen nachweisbar. Dies weist auf eine Selektion zugunsten von Zellen mit dem 5q-Normalstatus in dieser Sublinie hin, der offenbar in den HeLa-Zellen besonders stabilisiert ist, da auch Metaphasen mit erhöhter 5q-Anzahl in den MTX-Sublinien aus diesem Selektionsschritt nur in geringer Anzahl auftraten.

Das durch CGH detektierte Amplicon in den letzten HeLa-MTX-Sublinien umfaßte eine ganze Chromosomenbande von ca. 6 Mb DNA (Strachan and Read 1996) und war damit wesentlich größer als das *DHFR*-Gen, das eine Gesamtgröße von ca. 29 kb aufweist (Yang et al. 1984). Dies lässt eine Coamplifikation von flankierenden Sequenzen des originalen *DHFR*-Locus innerhalb des Amplicons vermuten.

Die Langzeitkultivierung von HeLa-Zellen zeigte im Vergleich, dass die verwendete HeLa-Zelllinie unter den gegebenen Kultivierungsbedingungen keine der bei den MTX-Sublinien beobachteten Veränderungen spontan entwickelt und diese daher selektionsspezifische Veränderungen darstellen.

Die Unterschiede, die in Stadium 3 zwischen den HeLa-1- und HeLa-2-MTX-Sublinien auftraten, lassen auf verschiedene Wege bei der Entwicklung der *DHFR*-Amplifikation schließen. Offenbar ist der Verlauf der Genamplifikationsentwicklung in den HeLa-Zellen nicht festgelegt, obwohl die HeLa-1- und HeLa-2-MTX-Sublinien derselben Parentallinie entstammten und parallel mit den gleichen MTX-Konzentrationen selektioniert wurden.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen an Leukämiezellen und HeLa-Zellen, dass humane Zellen unterschiedliche Amplifikationsmechanismen entwickeln können und es vermutlich von den jeweils vorliegenden Umgebungsbedingungen abhängt, welcher Mechanismus zur Ausprägung kommt. In den untersuchten Zellen stellte wahrscheinlich ein Chromosomenbruch das initiiierende Ereignis der Genamplifikationsentwicklung dar, der in unterschiedlicher Weise zur Amplifikation des jeweiligen Zielgens führte. In den Leukämiezellen erfolgte dies unter Deletion einer Zielgenkopie aus dem chromosomalen Locus, während in den HeLa-MTX-Sublinien die ursprüngliche intrachromosomale *DHFR*-Kopienanzahl erhalten wurde.

Zusammenfassung

Die cytogenetische Manifestation von Genamplifikation in humanen Zellen wurde in einem Fall von akuter myeloischer Leukämie (AML) sowie an der humanen Cervixcarcinomzelllinie HeLa S3 untersucht.

In dem AML-Fall ergab die Karyotypisierung der Leukämiezellen neben dem Verlust eines X-Chromosoms das Vorliegen einer extrachromosomalen Genamplifikation in Form von Double Minutes. Mit Hilfe der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH) und der Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) wurde die Herkunft der amplifizierten Sequenz aus der chromosomalen Region 8q24 ermittelt und eine Amplifikation des Protoonkogens *MYC* in den Double Minutes nachgewiesen. Die FISH-Analyse zeigte zudem den Verlust von einem der beiden chromosomalen *MYC*-Loci an, der auf einen Deletionsmechanismus der Genamplifikationsentwicklung schliessen ließ.

Die Induktion der Amplifikation des Dihydrofolat-Reduktase-Gens (*DHFR*) durch Selektion mit Methotrexat (MTX) diente als Modellsystem zur Analyse der frühen Stadien der Genamplifikationsentwicklung. Durch mehrmonatige Mehrschrittselektionen von zwei HeLa-Zellpopulationen wurden unabhängig voneinander zwei HeLa-Sublinien mit jeweils extrachromosomaler *DHFR*-Amplifikation in Form von Double Minutes erzeugt.

Die Veränderungen der 5q-Trägerchromosomen und der intrachromosomalen *DHFR*-Kopienanzahl, die im Verlauf der MTX-Selektionen in den HeLa-Zellen auftraten, wiesen auf das Zusammenwirken unterschiedlicher Mechanismen zur *DHFR*-Amplifikation hin. Niedrige MTX-Konzentrationen wirkten in Richtung einer Anreicherung von intrachromosomalen *DHFR*-Kopien, die hauptsächlich auf den Zugewinn eines Chromosoms 5 zurückzuführen waren. Daneben wies das Auftreten von neuen derivativen *DHFR*-haltigen Chromosomen auf Bruchereignisse in Chromosom 5 hin. Das Erscheinen eines derivativen Chromosoms mit zwei invertiert angeordneten 5q und drei *DHFR*-Kopien ließ auf das Ablaufen von Breakage-Fusion-Bridge (BFB)-Zyklen schliessen. Bei höheren MTX-Konzentrationen (ab 0.25 μM) trat dagegen eine Anreicherung von extrachromosomalen *DHFR*-Kopien in Double Minutes bei gleichzeitigem Rückgang der derivativen *DHFR*-haltigen Chromosomen in den Vordergrund. Die Sublinien aus Selektion 1 waren in diesem Stadium durch den Verlust eines Chromosoms 5 gekennzeichnet, der auf eine Generierung von extrachromosomalen *DHFR*-Kopien aus 5q-Bruchstücken hinwies. Im Gegensatz dazu trat bei den Sublinien von Selektion 2 in diesem Stadium zunächst noch eine Zunahme von intrachromosomalen *DHFR*-Kopien auf, die nachfolgend durch eine sprunghafte Erhöhung von extrachromosomalen *DHFR*-Kopien in Double Minutes in der Zellpopulation abgelöst wurde. In den Sublinien von Selektion 2 kann daher eine Generierung von extrachromosomalen *DHFR*-Kopien durch Bruchereignisse an einem zuvor hinzugewonnenen Chromosom 5 angenommen werden. Die letzten Sublinien aus beiden Selektionen wiesen wieder den 5q-Trägerchromosomen- und intrachromosomalen *DHFR*-Status der Parentallinie auf, der offenbar in den HeLa-Zellen eine besondere Stabilität besitzt.

Die unterschiedlichen Veränderungen im 5q- und *DHFR*-Status in den untersuchten HeLa-Sublinien zeigen, dass eine *DHFR*-Amplifikation in HeLa-Zellen unter MTX-Selektionsdruck auf verschiedenen Wegen erfolgen kann. In mehrmonatiger Kultivierung ohne Selektionsdruck entwickelte die verwendete HeLa-Zelllinie unter den vorliegenden Kultivierungsbedingungen keine der in den MTX-selektionierten Sublinien beobachteten Veränderungen, so dass diese als selektionsspezifische Prozesse angesehen werden können.

Veröffentlichungen

Publikation:

Bruckert P, Kappler R, Scherthan H, Link H, Hagmann F-G, Zankl H (2000):

Double minutes and *c-MYC* amplification in acute myelogenous leukemia: Are they prognostic factors? *Cancer Genetics and Cytogenetics* 120, 73-79.

Tagungsbeiträge:

Bruckert P, Kappler R, Scherthan H, Hagmann F-G, Zankl H (1997):

Identifikation und Charakterisierung der extrachromosomalen Genamplifikation in Double Minutes in einem Fall von AML. 10. Tumorzytogenetische Arbeitstagung, Friedrichsdorf/Taunus

Bruckert P, Kappler R, Scherthan H, Hagmann F-G, Zankl H (1998):

Untersuchung der extrachromosomalen Genamplifikation in einem Fall von akuter myeloischer Leukämie (AML) mittels comparativer genomischer und Fluoreszenz-in situ Hybridisierung. Posterpräsentation des Schwerpunktes MNT Medizin, Naturwissenschaft und Technik, Universität Kaiserslautern

Literatur

- Alitalo K (1985):
Amplification of cellular oncogenes in cancer cells. Trends in Biochemical Sciences (TIBS) 10, 194-197.
- Alitalo K, Winqvist R, Keski-Oja J, Ilvonen M, Saksela K, Alitalo R, Laiho M, Knuutila S, de la Chapelle A (1985):
Acute myelogenous leukaemia with c-myc amplification and double minute chromosomes. The Lancet ii, 1035-1039.
- Amin C, Wagner AJ, and Hay N (1993):
Sequence-specific transcriptional activation by Myc and repression by Max. Molecular and Cellular Biology 13, 383-390.
- Amler LC, Shibasaki Y, Savelyeva L and Schwab M (1992):
Amplification of the N-myc gene in human neuroblastomas: tandemly repeated amplicons within homogeneously staining regions on different chromosomes with the retention of single copy gene at the resident site. Mutation Research 276, 291-297.
- Anagnou NP, Antonarakis SE, O'Brien SJ, Modi WS, and Nienhuis AW (1988):
Chromosomal localization and racial distribution of the polymorphic human dihydrofolate reductase pseudogene (DHFRP1). Am. J. Hum. Genet. 42, 345-352.
- Anagnou NP, O'Brien SJ, Shimada T, Nash WG, Chen M-J, and Nienhuis AW (1984):
Chromosomal organization of the human dihydrofolate reductase genes: dispersion, selective amplification, and a novel form of polymorphism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5170-5174.
- Andrulis IL, Argonza R and Cairney AEL (1990):
Molecular and genetic characterization of human cell lines resistant to L-asparaginase and albiziin. Somatic Cell and Molecular Genetics 16, 59-65.
- Arens N (1993):
Vergleichende genomische in situ Hybridisierung an Tumoren und Zelllinien von Mensch und Maus. Diplomarbeit in der Abteilung für Humanbiologie und Humangenetik, Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern.
- Arfin SM, Gerken SC, Kontis KJ and Cruzen ME (1993):
Threonyl-tRNA synthetase gene amplification in borrelidin-resistant mammalian cells. In: Kellems RE (ed): Gene amplification in mammalian cells. Marcel Dekker, Inc., New York, 97-106.
- Ariyama Y, Fukuda Y, Okuno Y, Seto M, Date K, Abe T, Nakamura Y, and Inazawa J (1998):
Amplification on double-minute chromosomes and partial-tandem duplication of the *MLL* gene in leukemic cells of a patient with acute myelogenous leukemia. Genes, Chromosomes & Cancer 23, 267-272.
- Ash JF, Fineman RM, Kalka T, Morgan M and Wire B (1984):
Amplification of sodium- and potassium-activated adenosinetriphosphatase in HeLa cells by ouabain step selection. The Journal of Cell Biology 99, 971-983.
- Asker C, Mareni C, Coviello D, Ingvarsson S, Sessarego M, Origone P, Klein G, Sumeigi J (1988):
Amplification of c-myc and pvt-1 homologous sequences in acute nonlymphatic leukemia. Leukemia Research 12, 523-527.
- Ayer DE and Eisenman RN (1997):
c-myc Protooncogene. Encyclopedia of Cancer 1, 419-431.

- Banerjee D, Ercikan-Abali E, Waltham M, Schnieders B, Hochhauser D, Li WW, Fan J, Gorlick R, Goker E and Bertino JR (1995):
Molecular mechanisms of resistance to antifolates, a review. *Acta Biochimica Polonica* 42, 457-464.
- Bar-Am I, Mor O, Yeger H, Shiloh Y, and Avivi L (1992):
Detection of amplified DNA sequences in human tumor cell lines by fluorescence in situ hybridization. *Genes, Chromosomes & Cancer* 4, 314-320.
- Barker PE and Stubblefield E (1979):
Ultrastructure of double minutes from a human tumor cell line. *J. Cell Biology* 83, 663-666.
- Barker PE, Drwinga HL, Hittelman WN and Maddox AM (1980):
Double minutes replicate once during S phase of the cell cycle. *Experimental Cell Research* 130, 353-360.
- Barker PE (1982):
Double minutes in human tumor cells. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 5, 81-94.
- Baskin F, Rosenberg RN, and Dev V (1981):
Correlation of double-minute chromosomes with unstable multidrug cross-resistance in uptake mutants of neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3654-3658.
- Batley J, Moulding C, Taub R, Murphy W, Stewart T, Potter H, Lenoir G, and Leder P (1983):
The human *c-myc* oncogene: structural consequences of translocation into the IgH locus in Burkitt Lymphoma. *Cell* 34, 779-787.
- Benner SE, Wahl GM and Von Hoff DD (1991):
Double minute chromosomes and homogeneously staining regions in tumors taken directly from patients versus in human tumor cell lines. *Anti-Cancer Drugs* 2, 11-25.
- Bentz M, Döhner H, Cabot G, and Lichter P (1994):
Fluorescence *In Situ* Hybridization in leukemias: 'The FISH are spawning!'. Review. *Leukemia* 8, 1447-1452.
- Bernard O, Cory S, Gerondakis S, Webb E and Adams JM (1983):
Sequence of the murine and human cellular *myc* oncogenes and two modes of *myc* transcription resulting from chromosome translocation in B lymphoid tumours. *The EMBO Journal* 2, 2375-2383.
- Bertino JR, Göker E, Gorlick R, Li WW, Banerjee D (1996):
Resistance mechanisms to methotrexate in tumors. *The Oncologist* 1, 223-226.
- Biedler JL and Spengler BA (1976):
Metaphase chromosome anomaly: association with drug resistance and cell-specific products. *Science* 191, 185-187.
- Biedler JL and Spengler BA (1993):
Cytogenetic consequences of gene amplification: HSRs and DMs in antifolate-resistant and multidrug-resistant chinese hamster and mouse cells and in human neuroblastoma cells with amplified *N-myc* protooncogenes. In: Kellems RE (ed): *Gene amplification in mammalian cells*. Marcel Dekker, Inc., New York, 29-41.
- Biedler JL, Melera PW, and Spengler BA (1980):
Specifically altered metaphase chromosomes in antifolate-resistant chinese hamster cells that overproduce dihydrofolate reductase. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2, 47-60.
- Bird AP (1978):
A study of early events in ribosomal gene amplification. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42, 1179-1183.
- Birnboim HC (1983):
A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods in Enzymology* 100, 243-255.

- Blackwell TK, Kretzner L, Blackwood EM, Eisenman RN, Weintraub H (1990):
Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science* 250, 1149-1151.
- Brodeur GM (1993):
Biological and clinical significance of *MYCN* amplification in human neuroblastomas. In: Kellems RE (ed): *Gene amplification in mammalian cells*. Marcel Dekker, Inc., New York, 383-395.
- Bruckert P, Kappler R, Scherthan H, Link H, Hagmann F-G, Zankl H (2000):
Double minutes and c-MYC amplification in acute myelogenous leukemia: Are they prognostic factors? *Cancer Genetics and Cytogenetics* 120, 73-79.
- Büchner T, Hiddemann W (1990):
Treatment strategies in acute myeloid leukemia (AML). A First-line chemotherapy. *Blood* 60, 61-67.
- Burhans WC, Selegue JE, and Heintz NH (1986):
Isolation of the origin of replication associated with the amplified chinese hamster dihydrofolate reductase domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7790-7794.
- Caddle MS and Heintz NH (1990):
The replication timing of the amplified dihydrofolate reductase genes in the chinese hamster ovary cell line CHO 400. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 170, 134-139.
- Canute GW, Longo SL, Longo JA, Winfield JA, Nevaldine BH, Hahn PJ (1996):
Hydroxyurea accelerates the loss of epidermal growth factor receptor genes amplified as double-minute chromosomes in human glioblastoma multiforme. *Neurosurgery* 39, 976-983.
- Carman MD, Schornagel JH, Rivest RS, Srimatkandada S, Portlock CS, Duffy T, Bertino JR (1984):
Resistance to methotrexate due to gene amplification in a patient with acute leukemia. *J Clin Oncol* 2, 16-20.
- Carroll SM, DeRose ML, Gaudray P, Moore CM, Needham-VanDevanter DR, Von Hoff DD, and Wahl GM (1988):
Double minute chromosomes can be produced from precursors derived from a chromosomal deletion. *Molecular and Cellular Biology* 8, 1525-1533.
- Chen M-J, Shimada T, Moulton AD, Harrison M, and Nienhuis AW (1982):
Intronless human dihydrofolate reductase genes are derived from processed RNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 7435-7439.
- Chen TR (1988):
Re-evaluation of HeLa, HeLa S3, and HEp-2 karyotypes. *Cytogenet Cell Genet* 48, 19-24.
- Clare N, and Hansen K (1994):
Cytogenetics in the diagnosis of hematologic malignancies. *Diagnostic Hematology* 8, 785-807.
- Clauß, Ebner (1985):
Statistik. Für Soziologen, Pädagogen, Psychologen und Mediziner. Band 1. Grundlagen. 5., unveränderte Auflage. Verlag Harri Deutsch, Thun und Frankfurt am Main.
- Coffino P (1993):
Ornithine decarboxylase gene amplification. In: Kellems RE (ed): *Gene amplification in mammalian cells*. Marcel Dekker, Inc., New York, 141-147.
- Collart FR and Huberman E (1993):
Amplification of the IMP dehydrogenase gene in mammalian cells. In: Kellems RE (ed): *Gene amplification in mammalian cells*. Marcel Dekker, Inc., New York, 149-157.
- Coquelle A, Pipiras E, Toledo F, Buttin G and Debatisse M (1997):
Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons. *Cell* 89, 215-225.

- Cornforth MN and Bedford JS (1983):
High-resolution measurement of breaks in prematurely condensed chromosomes by differential staining. *Chromosoma* 88, 315-318.
- Corvi R, Amler LC, Savelyeva L, Gehring M, and Schwab M (1994):
MYCN is retained in single copy at chromosome 2 band p23-24 during amplification in human neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5523-5527.
- Cotter TG, Glynn JM, Echeverri F and Green DR (1992):
The induction of apoptosis by chemotherapeutic agents occurs in all phases of the cell cycle. *Anticancer Research* 12, 773-780.
- Cowell JK (1982):
Double minutes and homogeneously staining regions: gene amplification in mammalian cells. *Ann. Rev. Genet.* 16, 21-59.
- Cowell JK and Miller OJ (1983):
Occurrence and evolution of homogeneously staining regions may be due to breakage-fusion-bridge cycles following telomere loss. *Chromosoma* 88, 216-221.
- Cremer T, Jauch A, Ried T, Schröck E, Lengauer C, Cremer M, Speicher MR (1995):
Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). *Deutsches Ärzteblatt* 92, Heft 22, A-1593-1601.
- Cremer T, Lichter P, Borden J, Ward DC, and Manuelidis L (1988):
Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. *Human Genetics* 80, 235-246.
- Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM (1982):
Human *c-myc onc* gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 7824-7827.
- Dang CV (1999):
c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis and metabolism. Minireview. *Molecular and Cellular Biology* 19, 1-11.
- Deaven LL and Petersen DF (1973):
The chromosomes of CHO, an aneuploid chinese hamster cell line: G-band, C-band, and autoradiographic analyses. *Chromosoma* 41, 129-144.
- De Cicco DV and Spradling AC (1984):
Localization of a *Cis*-acting element responsible for the developmentally regulated amplification of *Drosophila* chorion genes. *Cell* 38, 45-54.
- Delinassios JG, Talieri MJ (1987):
Chromosomal aberrations in early stages of development of methotrexate resistance in HeLa cells. *Experimental Cell Biology* 55, 69-73.
- Desbarats L, Schneider A, Müller D, Bürgin A and Eilers M (1996):
Myc: a single gene controls both proliferation and apoptosis in mammalian cells. *Experientia* 52, 1123-1129.
- Dillon J-AR, Bezanson GS, and Yeung K-H (1985):
Basic Techniques. In: Dillon J-AR, Nasim A, Nestmann ER (eds.): *Recombinant DNA Methodology*. John Wiley & Sons, New York, Chapter 1, 1-126.
- Domin BA, Grill SP, and Cheng Y-C (1983):
Establishment of dihydrofolate reductase-increased human cell lines and relationship between dihydrofolate reductase levels and gene copy. *Cancer Research* 43, 2155-2158.
- Donner LR (1997):
Cytogenetics of lymphomas: a brief review of its theoretical and practical significance. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 94, 20-26.

- Du Manoir S, Schröck E, Bentz M, Speicher MR, Joos S, Ried T, Lichter P and Cremer T (1995):
Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 19, 27-41.
- Du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schröck E, Popp S, Döhner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P, Cremer T (1993):
Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Human Genetics* 90, 590-610.
- Eisenman RN (2001):
Deconstructing Myc. *Genes & Development* 15, 2023-2030.
- Esnault C, Lee H and Lai E (1994):
Structure and organization of a stable extrachromosomal element in human cells. *Gene* 144, 205-211.
- Fegan CD, White D, Sweeney M (1995):
C-MYC amplification, double minutes and homogenous staining regions in a case of AML. *British Journal of Haematology* 90, 486-488.
- Felsher DW and Bishop JM (1999):
Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3940-3944.
- Ford M and Fried M (1986):
Large inverted duplications are associated with gene amplification. *Cell* 45, 425-430.
- Freund M, Giller S, Hinrichs F, Baars A, Meran J, Korfer A, Link H, Poliwoda H (1991):
Five-day 4'-(9-acridinylamino)methanesulphon-m-aniside and intermediate-dose cytosine arabinoside in high-risk relapsing or refractory acute myeloid leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol (Germany)* 117, 489-492.
- Frick P (1995):
Blut- und Knochenmarksmorphologie. Ein Leitfaden. 18., vollständig überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Fröncke L (1993):
Vergleichendes *Chromosome Painting* auf Metaphasenpräparate des Menschen, der Maus, des Finnwals, des Chinesischen und des Indischen Muntjaks. Diplomarbeit in der Abteilung für Humanbiologie und Humangenetik, Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern.
- Funanage VL, Myoda TT, Moses PA and Cowell HR (1984):
Assignment of the human dihydrofolate reductase gene to the q11→q22 region of chromosome 5. *Molecular and Cellular Biology* 4, 2010-2016.
- Fugazza G, Bruzzone R, Puppo L, Patrone F and Sessarego M (1997):
Amplified c-myc sequences localized by fluorescence *in-situ* hybridization on double minute chromosomes in acute myeloid leukemias. *Leukemia Research* 21, 703-709.
- Gaudray P, Szepetowsky P, Escot C, Birnbaum D and Theillet C (1992):
DNA amplification at 11q13 in human cancer: from complexity to perplexity. *Mutation Research* 276, 317-328.
- George DL (1984):
Amplification of cellular proto-oncogenes in tumours and tumour cell lines. *Cancer Surveys* 3, 497-513.
- Gey GO, Coffman WD, and Kubicek MT (1952):
Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research* 12, 264-265.

- Gisselsson D, Höglund M, Mertens F, Mitelman F and Mandahl N (1998):
Chromosomal organization of amplified chromosome 12 sequences in mesenchymal tumors detected by fluorescence in situ hybridization. *Genes, Chromosomes & Cancer* 23, 203-212.
- Giulotto E, Knights C and Stark GR (1987):
Hamster cells with increased rates of DNA amplification, a new phenotype. *Cell* 48, 837-845.
- Greulich KM (1997):
Molekulargenetische und zytogenetische Untersuchungen semimaligner und maligner kutaner Tumore. Dissertation im Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern.
- Guan X-Y, Zhang H, Bittner M, Jiang Y, Meltzer P, Trent J (1996):
Chromosome arm painting probes. *Nature Genetics* 12, 10-11.
- Haaf T and Schmid M (1988):
Analysis of double minutes and double minute-like chromatin in human and murine tumor cells using antikinetochore antibodies. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 30, 73-82.
- Haber DA and Schimke RT (1981):
Unstable amplification of an altered dihydrofolate reductase gene associated with double-minute chromosomes. *Cell* 26, 355-362 (Part 1).
- Haferlach T, Löffler H (1996):
Akute myeloische Leukämien. *mta* 11, 532-540.
- Hahn PJ (1993):
Molecular biology of double-minute chromosomes. *BioEssays* 15, 477-484.
- Hamkalo BA, Farnham PJ, Johnston R and Schimke RT (1985):
Ultrastructural features of minute chromosomes in a methotrexate-resistant mouse 3T3 cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1126-1130.
- Hamlin JL, Milbrandt JD, Heintz NH, and Azizkhan JC (1984):
DNA sequence amplification in mammalian cells. *International Review of Cytology* 90, 31-82.
- Hammond DW, Hancock BW and Goyns MH (1994):
Identification of a subclass of double minute chromosomes containing centromere-associated DNA. *Genes, Chromosomes & Cancer* 10, 139-142.
- Hanahan D and Weinberg RA (2000):
The hallmarks of cancer. *Review. Cell* 100, 57-70.
- Hecht F, Ramesh KH and Lockwood DH (1990):
A guide to fragile sites on human chromosomes. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 44, 37-45.
- Heil G, Bunjes D, Arnold R, Goebel M, Heimpel H, Kurrle E (1992):
Idarubicin, Cytosine Arabinoside and Etoposide for relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Oncology* 15, 12-19.
- Heim S, Mitelman F (1995):
Cancer Cytogenetics. Chromosomal and Molecular Genetic Aberrations of Tumor Cells. 2nd Edition. Wiley-Liss, New York.
- Heiskanen M, Peltonen L and Palotie A (1996):
Visual mapping by high resolution FISH. *Trends in Genetics (TIG)* 12, 379-382.
- Hildebrand CE, Grady DL and Stallings RL (1993):
Organization and amplification of metallothionein genes in eukaryotic cells. In: Kellems RE (ed): Gene amplification in mammalian cells. Marcel Dekker, Inc., New York, 185-193.

- Hittelman WN (1986):
The technique of premature chromosome condensation to study the leukemic process: review and speculations. *CRC Critical Reviews in Oncology/Hematology* 6, 147-221.
- Hoffman B, Liebermann DA, Selvakumaran M and Nguyen HQ (1996):
Role of c-myc in myeloid differentiation, growth arrest and apoptosis. In: Wolff L and Perkins AS (eds.): *Molecular aspects of myeloid stem cell development*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 17-27.
- Hori T-A, Takahashi E-I, Ayusawa D, Takeishi K, Kaneda S, and Seno T (1990):
Regional assignment of the human thymidylate synthase (TS) gene to chromosome band 18p11.32 by nonisotopic in situ hybridization. *Human Genetics* 85, 576-580.
- Horns RC Jr, Dower WJ, Schimke RT (1984):
Gene amplification in a leukemic patient treated with methotrexate. *J Clin Oncol* 2, 2-7.
- Hyrien O, Debatisse M, Buttin G and Robert de Saint Vincent B (1988):
The multicopy appearance of a large inverted duplication and the sequence at the inversion joint suggest a new model for gene amplification. *The EMBO Journal* 7, 407-417.
- James L and Varley J (1996):
Preparation, labelling and detection of DNA from archival tissue sections suitable for comparative genomic hybridization. *Chromosome Research* 4, 163-164.
- Johnson LF (1993):
Thymidylate synthetase gene amplification in drug-resistant mammalian cells. In: Kellems RE (ed): *Gene amplification in mammalian cells*. Marcel Dekker, Inc., New York, 195-205.
- Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992):
Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258, 818-821.
- Kallioniemi O-P, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW and Pinkel D (1994):
Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes, Chromosomes & Cancer* 10, 231-243.
- Kallioniemi O-P, Kallioniemi A, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F and Pinkel D (1993):
Comparative genomic hybridization: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors. *Seminars in Cancer Biology* 4, 41-46.
- Kanalas JJ, Hutton JJ and Suttle DP (1985):
Characterization of pyrazofurin-resistant HeLa cells with amplification of UMP synthase gene. *Somatic Cell and Molecular Genetics* 11, 359-369.
- Kappler R (1998):
Charakterisierung genomischer und genetischer Veränderungen in neuroektodermalen Tumoren der Ratte. Dissertation im Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern.
- Kaul MLH, Scherthan H (1990):
Efficient and rapid method for midi-scale preparation of purified plasmid DNA. *The Nucleus* 33, 107-110.
- Kellems RE (1993):
Introduction to gene amplification: historical background and biological perspective. In: Kellems RE (ed): *Gene amplification in mammalian cells*. Marcel Dekker, Inc., New York, 1-26.
- Kellems RE, Leys EJ, Harper ME, and Smith LM (1982):
Control of dihydrofolate reductase DNA replication and mRNA production. In: Schimke RT (ed.): *Gene Amplification*. Cold Spring Harbor Laboratory, 81-88.

- Kellems RE, Lin R and Chinault AC (1993):
Adenosine deaminase: a dominant amplifiable genetic marker. In: Kellems RE (ed): Gene amplification in mammalian cells. Marcel Dekker, Inc., New York, 207-221.
- Knuutila S, Aalto Y, Autio K, Björkqvist A-M, El-Rifai W, Hemmer S, Huhta T, Kettunen E, Kiuru-Kuhlefelt S, Larramendy ML, Lushnikova T, Monni O, Pere H, Tapper J, Tarkkanen M, Varis A, Wasenius V-M, Wolf M, and Zhu Y (1999):
DNA copy number losses in human neoplasms. Review. American Journal of Pathology 155, 683-694.
- Knuutila S, Björkqvist A-M, Autio K, Tarkkanen M, Wolf M, Monni O, Szymanska J, Larramendy ML, Tapper J, Pere H, El-Rifai W, Hemmer S, Wasenius V-M, Vidgren V and Zhu Y (1998):
DNA copy number amplifications in human neoplasms. Review of comparative genomic hybridization studies. American Journal of Pathology 152, 1107-1123.
- Kopnin BP (1981):
Specific karyotypic alterations in colchicine-resistant cells. Cytogenet Cell Genet 30, 11-14.
- Kopnin BP, Sokova OI and Demidova NS (1992):
Regularities of karyotypic evolution during stepwise amplification of genes determining drug resistance. Mutation Research 276, 163-177.
- Koskinen PJ, Mäkelä TP, Västriik I and Alitalo K (1993):
myc amplification: regulation of Myc function. Clinica Chimica Acta 217, 57-62.
- Le Beau MM (1991):
Cytogenetic analysis of hematological malignant diseases. In: Barch MJ (ed): The ACT Cytogenetics Laboratory Manual. Second Edition, Raven Press, Ltd., New York, Chapter 9, 395-449.
- Lee LA and Dang CV (1997):
C-Myc transrepression and cell transformation. In: Potter M and Melchers F (eds.): C-Myc in B-Cell Neoplasia. 14th Workshop on Mechanisms in B-Cell Neoplasia. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 131-135.
- Levan G, Stahl F and Wettergren Y (1992):
Gene amplification in the murine SEWA system. Mutation Research 276, 285-290.
- Lewis JA, Biedler JL and Melera PW (1982):
Gene amplification accompanies low level increases in the activity of dihydrofolate reductase in antifolate-resistant chinese hamster lung cells containing abnormally banding chromosomes. The Journal of Cell Biology 94, 418-424.
- Li JC and Kaminskas E (1984):
Accumulation of DNA strand breaks and methotrexate cytotoxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5694-5698.
- Li YS (1983):
Double minutes in acute myeloid leukemia. Int J Cancer 32, 455-459.
- Lichter P and Cremer T (1992):
Chromosome analysis by non-isotopic *in situ* hybridization. In: Rooney DE and Czepulkowski BH (eds.): Human Cytogenetics. A Practical Approach. Vol. I. 2nd Edition. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, Chapter 6, 157-192.
- Lichter P and Ried T (1994):
Molecular analysis of chromosome aberrations. In: Gosden JR (ed): Chromosome Analysis Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ, Chapter 25, 449-478.
- Lichter P, Bentz M, Du Manoir S, and Joos S (1995):
Comparative Genomic Hybridization. In: Verma RS and Babu A (eds.): Human Chromosomes. Principles and Techniques. Second Edition. McGraw-Hill Inc., New York, 191-210.

- Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, and Ward DC (1988):
Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Human Genetics* 80, 224-234.
- Lindl T und Bauer J (1994):
Zell- und Gewebekultur. Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. 3., überarbeitete und erweiterte Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York.
- Livingstone LR, White A, Sprouse J, Livanos E, Jacks T and Tlsty TD (1992):
Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* 70, 923-935.
- Lotem J and Sachs L (1995):
A mutant p53 antagonizes the deregulated *c-myc*-mediated enhancement of apoptosis and decrease in leukemogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9672-9676.
- Lottspeich F, Zorbas H (Hrsg.) (1998):
Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Ma C, Looney JE, Leu T-H, and Hamlin JL (1988):
Organization and genesis of dihydrofolate reductase amplicons in the genome of a methotrexate-resistant chinese hamster ovary cell line. *Molecular and Cellular Biology* 8, 2316-2327.
- Ma C, Martin S, Trask B, and Hamlin JL (1993):
Sister chromatid fusion initiates amplification of the dihydrofolate reductase gene in chinese hamster cells. *Genes & Development* 7, 605-620.
- Madhavi R, Guntur M, Ghosh R, and Ghosh PK (1990):
Double minute chromosomes in the leukocytes of a young girl with breast carcinoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 44, 203-207.
- Mäkelä TP, Saksela K and Alitalo K (1992):
Amplification and rearrangement of *L-myc* in human small-cell lung cancer. *Mutation Research* 276, 307-315.
- Mai S, Hanley-Hyde J and Fluri M (1996):
c-Myc overexpression associated DHFR gene amplification in hamster, rat, mouse and human cell lines. *Oncogene* 12, 277-288.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982):
Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Mariani BD and Schimke RT (1984):
Gene amplification in a single cell cycle in chinese hamster ovary cells. *The Journal of Biological Chemistry* 259, 1901-1910.
- Masters J, Keeley B, Gay H, and Attardi G (1982):
Variable content of double minute chromosomes is not correlated with degree of phenotype instability in methotrexate-resistant human cell lines. *Molecular and Cellular Biology* 2, 498-507.
- Maurer BJ, Carlock L, Wasmuth J and Attardi G (1985):
Assignment of human dihydrofolate reductase gene to band q23 of chromosome 5 and of related pseudogene Ψ HD1 to chromosome 3. *Somatic Cell and Molecular Genetics* 11, 79-85.
- McAteer JA and Davis J (1994):
Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines. In: Davis JM (ed): *Basic Cell Culture. A Practical Approach*. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, Chapter 4, 93-148.

- Meinkoth J, Killary AM, Fournier REK and Wahl GM (1987):
Unstable and stable CAD gene amplification: importance of flanking sequences and nuclear environment in gene amplification. *Molecular and Cellular Biology* 7, 1415-1424.
- Meyers MB, Spengler BA, Chang T-D, Melera PW, and Biedler JL (1985):
Gene amplification-associated cytogenetic aberrations and protein changes in vincristine-resistant chinese hamster, mouse, and human cells. *The Journal of Cell Biology* 100, 588-597.
- Milbrandt JD, Heintz NH, Carlton White W, Rothman SM and Hamlin JL (1981):
Methotrexate-resistant chinese hamster ovary cells have amplified a 135-kilobase-pair region that includes the dihydrofolate reductase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6043-6047.
- Mitelman F (ed) (1995):
ISCN (1995): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. S. Karger, Basel.
- Mohamed AN, Macoska JA, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Waldman F, Ratanatharathorn V, Wolman SR (1993):
Extrachromosomal gene amplification in acute myeloid leukemia; characterization by metaphase analysis, comparative genomic hybridization, and semi-quantitative PCR. *Genes Chrom Cancer* 8, 185-189.
- Nagl W (1980):
Chromosomen. Organisation, Funktion und Evolution des Chromatins. 2., neubearbeitete und erweiterte Auflage. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.
- Nagl W (1990):
Gene amplification and related events. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 11, 153-201.
- Neel BG, Jhanwar SC, Chaganti RSK, Hayward WS (1982):
Two human *c-onc* genes are located on the long arm of chromosome 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 7842-7846.
- O'Malley F, Rayeroux K, Cole-Sinclair M, Tong M, Campbell LJ (1999):
MYC amplification in two further cases of acute myeloid leukemia with trisomy 4 and double minute chromosomes. *Cancer Genet Cytogenet* 109, 123-125.
- Pandita A, Godbout R, Zielenska M, Thorner P, Bayani J, and Squire JA (1997):
Relational mapping of *MYCN* and *DDXI* in band 2p24 and analysis of amplicon arrays in double minute chromosomes and homogeneously staining regions by use of free chromatin FISH. *Genes, Chromosomes & Cancer* 20, 243-252.
- Pauletti G, Lai E, and Attardi G (1990):
Early appearance and long-term persistence of the submicroscopic extrachromosomal elements (amplisomes) containing the amplified *DHFR* genes in human cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2955-2959.
- Pelengaris S, Khan M, and Evan GI (2002):
Suppression of Myc-induced apoptosis in β cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell* 109, 321-334.
- Pierce JC and Sternberg NL (1992):
Using bacteriophage P1 system to clone high molecular weight genomic DNA. *Methods in Enzymology* 216, 549-574.
- Pipiras E, Coquelle A, Bieth A and Debatisse M (1998):
Interstitial deletions and intrachromosomal amplification initiated from a double-strand break targeted to a mammalian chromosome. *The EMBO Journal* 17, 325-333.
- Potter M and Marcu KB (1997):
The *c-myc* story: where we've been, where we seem to be going. In: Potter M and Melchers F (eds.): *C-Myc in B-Cell Neoplasia*. 14th Workshop on Mechanisms in B-Cell Neoplasia. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1-17.

- Poupon M-F, Smith KA, Chernova OB, Gilbert C, and Stark GR (1996):
Inefficient growth arrest in response to dNTP starvation stimulates gene amplification through bridge-breakage-fusion cycles. *Molecular Biology of the Cell* 7, 345-354.
- Preisler HD, Raza A, Larson R, LeBeau M, Browman G, Goldberg J, Grunwald H, Volger R, Verkh L, Singh P, Block AM, and Sandberg A (1989):
Protooncogene expression and the clinical characteristics of acute nonlymphocytic leukemia: a leukemia intergroup pilot study. *Blood* 73, 255-262.
- Prody CA, Dreyfus P, Zamir R, Zakut H and Soreq H (1989):
De novo amplification within a "silent" human cholinesterase gene in a family subjected to prolonged exposure to organophosphorous insecticides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 690-694.
- Raabe-Meyer G (1990):
Zellzyklus-Studien an menschlichen Chorionzellen des ersten Schwangerschaftstrimenons. Dissertation im Fachbereich Biologie der Universität Hannover.
- Rajcan-Separovic E, Wang H-S, Speevak MD, Janes L, Korneluk RG, Wakasa K, Ikeda J-E (1995):
Identification of the origin of double minutes in normal human cells by laser-based chromosome microdissection approach. *Human Genetics* 96, 39-43.
- Reddy KS and Sulcova V (1997):
c-myc amplification in a preleukemia patient with trisomy 4 and double minutes: review of the unique coexistence of these two chromosome abnormalities in acute myelogenous leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 95, 206-209.
- Ried T, Heselmeyer-Haddad K, Blegen H, Schröck E, and Auer G (1999):
Genomic changes defining the genesis, progression, and malignancy potential in solid human tumors: a phenotype/genotype correlation. *Genes, Chromosomes & Cancer* 25, 195-204.
- Riva P, De Giuli Morghen C and Larizza L (1989):
Involvement of unstable chromosomal regions containing C-heterochromatin and fragile sites in the integration of amplified *dhfr* domains. *Somatic Cell and Molecular Genetics* 15, 377-385.
- Rizwana R and Hahn PJ (1998):
CpG islands and double-minute chromosomes. *Genomics* 51, 207-215.
- Roninson IB (1992):
From amplification to function: the case of the *MDR1* gene. *Mutation Research* 276, 151-161.
- Rothberg PG, Erisman MD, Diehl RE, Rovigatti UG, and Astrin SM (1984):
Structure and expression of the oncogene *c-myc* in fresh tumor material from patients with hematopoietic malignancies. *Molecular and Cellular Biology* 4, 1096-1103.
- Sachs L (1996):
The control of hematopoiesis and leukemia: from basic biology to the clinic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 4742-4749.
- Sait SNJ, Qadir MU, Conroy JM, Matsui S-I, Nowak NJ, and Baer MR (2002):
Double minute chromosomes in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome: identification of new amplification regions by fluorescence in situ hybridization and spectral karyotyping. *Genes, Chromosomes & Cancer* 34, 42-47.
- Scappaticci S, Fossati GS, Valenti L, Scabini M, Tateo S, Nastasi G, Spina MP, and Capra E (1995):
A search for double minute chromosomes in cultured lymphocytes from different types of tumors. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 82, 50-53.
- Schimke RT (1984):
Gene amplification in cultured animal cells. *Cell* 37, 705-713.

- Schimke RT (1986):
Methotrexate resistance and gene amplification. Mechanisms and implications. *Cancer* 57, 1912-1917.
- Schimke RT, Brown PC, Kaufman RJ, McGrogan M, and Slate DL (1981):
Chromosomal and extrachromosomal localization of amplified dihydrofolate reductase genes in cultured mammalian cells. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 45, 785-797.
- Schimke RT, Sherwood SW, Hill AB, and Johnston RN (1986):
Overreplication and recombination of DNA in higher eukaryotes: potential consequences and biological implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2157-2161.
- Schwab M (1995):
Onkogene und Tumorsuppressorgene. *Onkologie* 1, 517-525.
- Schwab M (1998):
Amplification of oncogenes in human cancer cells. *BioEssays* 20, 473-479.
- Schwab M (1999):
Human Neuroblastoma: from basic science to clinical debut of cellular oncogenes. *Naturwissenschaften* 86, 71-78.
- Schweitzer BI, Dicker AP, and Bertino JR (1990):
Dihydrofolate reductase as a therapeutic target. Review. *The FASEB Journal* 4, 2441-2452.
- Schweizer D and Ambros PF (1994):
Chromosome Banding - Stain Combinations for specific regions. In: Gosden JR (ed.): *Chromosome Analysis Protocols. Methods in Molecular Biology*, Vol. 29. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 97-112.
- Scocca JR and Krag SS (1993):
Amplification of the gene for N-Acetylglucosaminyl phosphate transferase, an enzyme catalyzing an early step in Asn-linked glycosylation, in chinese hamster ovary cells resistant to tunicamycin. In: Kellems RE (ed): *Gene amplification in mammalian cells*. Marcel Dekker, Inc., New York, 233-242.
- Sen S, Hittelman WN, Teeter LD, and Kuo MT (1989):
Model for the formation of double minutes from prematurely condensed chromosomes of replicating micronuclei in drug-treated chinese hamster ovary cells undergoing DNA amplification. *Cancer Research* 49, 6731-6737.
- Sharma AK and Sharma A (1980):
Chromosome Techniques. Theory and Practice. Third Edition, Butterworth & Co (Publishers) Ltd., London, Boston, Sydney, Wellington, Durban, Toronto.
- Sharma RC and Schimke RT (1994):
The propensity for gene amplification: a comparison of protocols, cell lines, and selection agents. *Mutation Research* 304, 243-260.
- Shen D-W, Fojo A, Chin JE, Roninson IB, Richert N, Pastan I, Gottesman MM (1986):
Human multidrug-resistant cell lines: increased *mdr1* expression can precede gene amplification. *Science* 232, 643-645.
- Singer MJ, Mesner LD, Friedman CL, Trask BJ, and Hamlin JL (2000):
Amplification of the human dihydrofolate reductase gene via double minutes is initiated by chromosome breaks. *PNAS* 97, 7921-7926.
- Slovak ML, Pelkey Ho J, Pettenati MJ, Khan A, Douer D, Lal S, Traweek ST (1994):
Localization of amplified *MYC* gene sequences to double minute chromosomes in acute myelogenous leukemia. *Genes Chrom Cancer* 9, 62-67.
- Smith KA, Gorman PA, Stark MB, Groves RP, and Stark GR (1990):
Distinctive chromosomal structures are formed very early in the amplification of CAD genes in syrian hamster cells. *Cell* 63, 1219-1227.

- Smith KA, Stark MB, Gorman PA and Stark GR (1992):
Fusions near telomeres occur very early in the amplification of *CAD* genes in syrian hamster cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5427-5431.
- Smith KA, Agarwal ML, Chernov MV, Chernova OB, Deguchi Y, Ishizaka Y, Patterson TS, Poupon M-F and Stark GR (1995):
Regulation and mechanisms of gene amplification. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 347, 49-56.
- Snapka RM (1992):
Gene amplification as a target for cancer chemotherapy. *Oncology Research* 4, 145-150.
- Snapka RM and Varshavsky A (1983):
Loss of unstably amplified dihydrofolate reductase genes from mouse cells is greatly accelerated by hydroxyurea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7533-7537.
- Solomon E, Borrow J, Goddard AD (1991):
Chromosome aberrations and cancer. *Science* 254, 1153-1160.
- Speicher MR, Ballard SG and Ward DC (1996):
Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genetics* 12, 368-375.
- Spencer CA and Groudine M (1991):
Control of *c-myc* regulation in normal and neoplastic cells. *Advances in Cancer Research* 56, 1-48.
- Srimatkandada S, Medina WD, Cashmore AR, Whyte W, Engel D, Moroson BA, Franco CT, Dube SK, and Bertino JR (1983):
Amplification and organization of dihydrofolate reductase genes in a human leukemic cell line, K-562, resistant to methotrexate. *Biochemistry* 22, 5774-5781.
- Stark GR (1986):
DNA amplification in drug resistant cells and in tumours. *Cancer Surveys* 5, 1-23.
- Stark GR (1993):
Amplification of *CAD* genes. In: Kellems RE (ed): *Gene amplification in mammalian cells*. Marcel Dekker, Inc., New York, 243-253.
- Stark GR, Debatisse M, Giulotto E, and Wahl GM (1989):
Recent progress in understanding mechanisms of mammalian DNA amplification. *Cell* 57, 901-908.
- Stenner-Liewen F and Reed JC (2003):
Apoptosis and cancer: basic mechanisms and therapeutic opportunities in the postgenomic era. *Cancer Research* 63, 263-268.
- Strachan T and Read AP (1996):
Molekulare Humangenetik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Stryer L (1990):
Biochemie. Völlig neubearbeitete Auflage. Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg.
- Sumner AT (1982):
The nature and mechanisms of chromosome banding. Review. *Cancer, Genetics and Cytogenetics* 6, 59-87.
- Sumner AT (1990):
G-banding. In: Sumner AT: *Chromosome banding*. Unwin Hyman Ltd, London, 70-104.
- Sutherland GR and Richards RI (1995):
The molecular basis of fragile sites in human chromosomes. *Current Opinion in Genetics and Development* 5, 323-327.

- Suttle DP and Qumsiyeh MB (1993):
A reversible selection system for UMP synthase gene amplification and deamplification. In: Kellems RE (ed): Gene amplification in mammalian cells. Marcel Dekker, Inc., New York, 255-264.
- Takahashi E, Hori T, O'Connell P, Leppert M, and White R (1991):
Mapping of the MYC gene to band 8q24.12→q24.13 by R-banding and distal to fra(8)(q24.11), FRA8E, by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 57, 109-111.
- Tanaka K, Takechi M, Nishimura S, Oguma N, and Kamada N (1993):
Amplification of c-MYC oncogene and point mutation of N-RAS oncogene point mutation in acute myelocytic leukemias with double minute chromosomes. *Leukemia* 7, 469-471.
- Tano K, Dunn WC, Darroudi F, Shiota S, Preston RJ, Natarajan AT and Mitra S (1997):
Amplification of the DNA repair gene O⁶-Methylguanine-DNA Methyltransferase associated with resistance to alkylating drugs in a mammalian cell line. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 13250-13254.
- Taylor C, Jalava A and Mai S (1997):
c-Myc dependent initiation of genomic instability during neoplastic transformation. In: Potter M, Melchers F (eds.): C-MYC in B-Cell Neoplasia. 14th Workshop on Mechanisms in B-Cell Neoplasia. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 201-207.
- Thompson EB (1998):
The many roles of c-Myc in apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 575-600.
- Tittelbach H (1992):
Die vorzeitige Chromosomenkondensation in Forschung und Diagnostik. Dissertation im Institut für Humangenetik der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg.
- Tlsty TD (1990):
Normal diploid human and rodent cells lack a detectable frequency of gene amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3132-3136.
- Tlsty TD and Adams P (1990):
Replication of the dihydrofolate reductase genes on double minute chromosomes in a murine cell line. *Experimental Cell Research* 188, 164-168.
- Toledo F, Le Roscouet D, Buttin G and Debatisse M (1992):
Co-amplified markers alternate in megabase long chromosomal inverted repeats and cluster independently in interphase nuclei at early steps of mammalian gene amplification. *The EMBO Journal* 11, 2665-2673.
- Trask BJ and Hamlin JL (1989):
Early dihydrofolate reductase gene amplification events in CHO cells usually occur on the same chromosome arm as the original locus. *Genes & Development* 3, 1913-1925.
- Traut W (1991):
Chromosomen. Klassische und molekulare Cytogenetik. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Tsui FWL and Siminovitch L (1993):
DNA amplification in histidinol-resistant chinese hamster ovary cells. In: Kellems RE (ed): Gene amplification in mammalian cells. Marcel Dekker, Inc., New York, 275-286.
- UniGene (1999):
Expressed Sequence Tags-(EST-)Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI). Erreichbar im World Wide Web unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>
- Van der Bliek AM, Lincke CR and Borst P (1988):
Circular DNA of 3T6R50 double minute chromosomes. *Nucleic Acids Research* 16, 4841-4851.

- Varshavsky A (1981):
On the possibility of metabolic control of replicon "misfiring": relationship to emergence of malignant phenotypes in mammalian cell lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3673-3677.
- Viegas-Péquignot E (1992):
In situ hybridization to chromosomes with biotinylated probes. In: Wilkinson DG (ed): *In Situ Hybridization. A Practical Approach*. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, Chapter 10, 137-158.
- Von Hoff DD (1991):
New mechanisms of gene amplification in drug resistance (the episome model). In: Ozols RF (ed): *Molecular and clinical advances in anticancer drug resistance*. Kluwer Academic Publishers, Boston, 1-11.
- Von Hoff DD, McGill JR, Forseth BJ, Davidson KK, Bradley TP, Van Devanter DR, and Wahl GM (1992):
Elimination of extrachromosomally amplified *MYC* genes from human tumor cells reduces their tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8165-8169.
- Von Hoff DD, Needham-VanDevanter DR, Yucel J, Windle BE, and Wahl GM (1988):
Amplified human *MYC* oncogenes localized to replicating submicroscopic circular DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4804-4808.
- Von Hoff DD, Waddelow T, Forseth B, Davidson K, Scott J, and Wahl G (1991):
Hydroxyurea accelerates loss of extrachromosomally amplified genes from tumor cells. *Cancer Research* 51, 6273-6279.
- Wagner AJ, Small MB, and Hay N (1993):
Myc-mediated apoptosis is blocked by ectopic expression of Bcl-2. *Molecular and Cellular Biology* 13, 2432-2440.
- Weier H-UG, Lucas JN, Poggensee M, Segraves R, Pinkel D, and Gray JW (1991):
Two-color hybridization with high complexity chromosome-specific probes and a degenerate alpha satellite probe DNA allows unambiguous discrimination between symmetrical and asymmetrical translocations. *Chromosoma* 100, 371-376.
- Wettergren Y, Arnason U, Haaf T, Levan A and Levan G (1995):
C-band-positive double minutes have kinetochore proteins. *Cytogenet Cell Genet* 68, 54-56.
- Wettergren Y, Kullberg A and Levan G (1994):
Drug-specific rearrangements of chromosome 12 in hydroxyurea-resistant mouse SEWA cells: support for chromosomal breakage model of gene amplification. *Somatic Cell and Molecular Genetics* 20, 267-285.
- Williams GT (1991):
Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. Minireview. *Cell* 65, 1097-1098.
- Williams JW, Morrison JF, and Duggleby RG (1979):
Methotrexate, a high-affinity pseudosubstrate of dihydrofolate reductase. *Biochemistry* 18, 2567-2573.
- Wilson RH (1993):
Glutamine synthetase gene amplification in chinese hamster ovary cells. In: Kellems RE (ed): *Gene amplification in mammalian cells*. Marcel Dekker, Inc., New York, 301-311.
- Windle B, Draper BW, Yin Y, O'Gorman S, and Wahl GM (1991):
A central role for chromosome breakage in gene amplification, deletion formation, and amplicon integration. *Genes & Development* 5, 160-174.
- Windle BE and Wahl GM (1992):
Molecular dissection of mammalian gene amplification: new mechanistic insights revealed by analyses of very early events. *Mutation Research* 276, 199-224.

- Wolman SR, Craven ML, Grill SP, Domin BA, and Cheng Y-C (1983):
Quantitative correlation of homogeneously stained regions on chromosome 10 with dihydrofolate reductase enzyme in human cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 807-809.
- Wright JA, Smith HS, Watt FM, Hancock MC, Hudson DL and Stark GR (1990):
DNA amplification is rare in normal human cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1791-1795.
- Yang JK, Masters JN, and Attardi G (1984):
Human dihydrofolate reductase gene organization. J. Mol. Biol. 176, 169-187.
- Zakut H, Lapidot-Lifson Y, Beeri R, Ballin A and Soreq H (1992):
In vivo gene amplification in non-cancerous cells: cholinesterase genes and oncogenes amplify in thrombocytopenia associated with lupus erythematosus. Mutation Research 276, 275-284.
- Zou X, Lin Y, Rudchenko S and Calame K (1997):
Positive and negative regulation of *c-Myc* transcription. In: Potter M and Melchers F (eds.): *C-Myc in B-Cell Neoplasia*. 14th Workshop on Mechanisms in B-Cell Neoplasia. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 57-66.

Anhang

Chemikalien, Lösungen, Geräte und weiteres Material

1.) Chemikalien

Die Bezugfirmen der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt. Salze und organische Lösungen wurden in p.A.-Qualität und die Lösungen für die Zellkultivierung in steriler Form bezogen. Chemikalien von Roche Molecular Biochemicals wurden zum Teil noch von der Vorgängerfirma Boehringer Mannheim bezogen.

Agarose	FMC Bio Products
AMD (Actinomycin D)	Serva
Ampicillin-Natrium-Salz	Biomol
Anti-Digoxigenin-Rhodamin, Fab-Fragmente (Schaf-Antikörper)	Roche Molecular Biochemicals
Bacto Peptone (Pepton)	Serva
Bactotrypsin-Lyophilisat (für G-Bänderung)	Difco Laboratories
Bacto Yeast Extract (Hefeextrakt)	Serva
Ba(OH) ₂ ·8H ₂ O (Bariumhydroxid-Octahydrat)	Merck
BdU (5-Bromo-2'-Deoxyuridin)	Sigma
BioNick Labelling System (Dieser Kit weist mittlerweile eine veränderte Zusammensetzung und eine kürzere Reaktionszeit als der hier verwendete Kit auf, so dass die Angaben unter Methoden für den jetzt erhältlichen Kit nicht mehr gelten.)	Gibco BRL
Biotin-11-dUTP, 5mM	Gibco BRL
Blue/Orange Loading Dye, 6x	Promega
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma
Chloroform (Trichlormethan)	Riedel-de Haën
Colcemid (10 µg Demecolcin/ml in PBS)	Serva
Cot1-DNA, human, 1 mg/ml	Gibco BRL
DAPI (4'-6'-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma
dATP, Lithiumsalz, 25 µmol in 250 µl, 100 mM Lösung	Roche Molecular Biochemicals
dCTP, Lithiumsalz, 25 µmol in 250 µl, 100 mM Lösung	Roche Molecular Biochemicals
Dextransulfat	Pharmacia
D(+)-Glucose	Sigma
dGTP, Lithiumsalz, 25 µmol in 250 µl, 100 mM Lösung	Roche Molecular Biochemicals
Dig-Nick Translation Mix	Roche Molecular Biochemicals
Digoxigenin-11-dUTP = Digoxigenin-11-2'-desoxy-uridin-5'-triphosphat, Tetralithiumsalz, 25 nmol in 25 µl, 1 mM Lösung	Roche Molecular Biochemicals
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
DNA-Polymerase I aus E. coli, 10 units/µl	Promega
DNase I, RNase-frei, 10 units/µl	Roche Molecular Biochemicals
D-Sorbit	Sigma
dTTP, Lithiumsalz, 25 µmol in 250 µl, 100 mM Lösung	Roche Molecular Biochemicals
EDTA (EDTA-Di-Natrium-Salz)	Sigma
Eisessig (konzentrierte Essigsäure), 99.7%	Roth
Ethanol abs.	Riedel-de Haën
Ethidiumbromid	Sigma
ExtrAvidin-FITC Konjugat	Sigma
FKS (fötale Kälberserum)	Bio Whittaker
Fluorescein-11-dUTP = FluoroGreen, 30 nmol in 30 µl, 1 mM	Amersham

Fortsetzung s. nächste Seite

Fortsetzung von vorheriger Seite:

Formamid (deionisiert)	Merck
Gentamycin (10 mg/ml)	Gibco BRL
Giensa (Farbstofflösung)	Merck
Glycerin, 86-88%	Riedel-de Haën
HBSS	Bio Whittaker
HCl, 38%	Roth
Histopaque-1077 (Lösung aus Polysaccharose und Natriumdiatrizoat mit einer Dichte von 1.077 g/cm)	Sigma
Immersionsöl für Mikroskopie	Merck
Isopropanol abs.	Riedel-de Haën
Kanamycin A-Monosulfat	Sigma
KCl	Merck
KHCO ₃	Merck
KH ₂ PO ₄	Riedel-de Haën
Lambda-Marker: λ Hind III-Längenstandard, 250 ng/ μ l	Promega
Leucomax 150	Sandoz AG/Essex Pharma
L-Glutaminlösung (200 mM)	Gibco BRL
Lysozym	Sigma
β -Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Riedel-de Haën
Methotrexat (MTX) = (+)Amethopterin, 4-Amino-10-Methylfolsäure, Hydrat (MG 454.4)	Sigma
MgCl ₂	Merck
Mouse-Anti-Digoxigenin-Cy2-AK, 1 mg/ml	Dianova
Natriumacetat	Merck
NaCl	Roth
NaHCO ₃	Merck
NaH ₂ PO ₄	Riedel-de Haën
Na ₂ HPO ₄	Riedel-de Haën
NaOH	Merck
Natrium-Pyruvat	Merck
NH ₄ Cl	Merck
PBS (1x PBS-CMF-Lösung)	Bio Whittaker
Penicillin/Streptomycin-Mischung	Bio Whittaker
Phenol (Roti-Phenol), äquibriert	Roth
Phytohämagglutinin (reagent grade)	Murex Diagnostics Limited
Polyethylenglykol: PEG 1500, 50% (w/v) in HBSS	Roche Molecular Biochemicals
Proteinase K	Sigma
Rabbit-Anti-Mouse-FITC-AK	Sigma
Rhodamin-4-dUTP = FluoroRed, 30 nmol in 30 μ l, 1 mM	Amersham
Ribonuclease A	Sigma
RPMI 1640 mit L-Glutamin (Flüssigmedium)	Bio Whittaker
Schwarz-Weiß-Fotopapier Ilfospeed 5.1M, 10.5x14.8 cm, glänzend	Ilford
Schwarz-Weiß-Papierentwickler	Ilford
Schwarz-Weiß-Papierfixierer	Ilford
SDS (Dodecylhydrogensulfat-Natrium-Salz)	Merck
Sucrose	Merck
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck
Tris-HCl	Sigma
Triton-X-100	Sigma
Trizma Base (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Sigma
Trypsin, 2.5% (1:250) in Hanks' BSS ohne Calcium und Magnesium	Bio Whittaker
Tween 20	Sigma
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories
Versen (0.02% EDTA-Lösung)	Bio Whittaker
Xylol	Riedel-de Haën

2.) Lösungen

Zusätzlich benötigte Lösungen wurden entsprechend den folgenden Angaben angesetzt. Für die Zellkultivierung und für CGH und FISH wurden, wenn nicht anders angegeben, sterile Lösungen verwendet. Der Ansatz der Lösungen für CGH und FISH erfolgte nach Maniatis et al. 1982.

Temperaturangaben werden nur bei Fehlen von entsprechenden Angaben in der Methode und Abweichung von der Raumtemperatur (RT) aufgeführt und geben, wenn nicht anders vermerkt, die Temperaturen der Lösungen bei Gebrauch an.

2a) Lösungen für Zellkultivierung, Metaphasenpräparation und Chromosomenbänderung

- Bactotrypsin-Lösung: Bactotrypsin-Lyophilisat in 10 ml sterilem A. dest. lösen
- 5% Ba(OH)₂-Lösung:
5% (w/v) Ba(OH)₂·8H₂O in A. dest.; ca. 60 min in verschlossenem Gefäß rühren lassen, bis die Substanz weitgehend gelöst ist (leichte Trübung bleibt); abfiltrieren und sofort verwenden; kurz vor Gebrauch ansetzen
- BdU-Stocklösung:
1x10⁻² M 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BdU) in sterilem A. dest., sterilfiltriert, in kleinen Aliquots lichtgeschützt bei -20°C lagern
- BdU-Stammlösung:
1x10⁻⁴ M BdU in sterilem A. dest.; ansetzen durch Verdünnen der BdU-Stocklösung, lichtgeschützt bei 4°C lagern; maximal 14 Tage verwendbar
- Einfrierlösung A (für mitotische CHO-Zellen):
26 mM KCl, 3.8 mM KH₂PO₄, 13.1 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM MgCl₂, 5 mM D(+)-Glucose, 200 mM D-Sorbit, 1 mM Natrium-Pyruvat; sterilfiltriert, pH 6.9-7.2; 4°C
- Einfrierlösung B (für mitotische CHO-Zellen): 80% Einfrierlösung A + 20% (v/v) DMSO; 4°C
- Einfriermedium für HeLa-Zellen:
Medium für HeLa-Zellen (s.u.) mit 10% (v/v) DMSO, ohne MTX; 1.5 ml pro einzufrierendem Cryotube; vor Gebrauch frisch ansetzen, sterilfiltrieren; 4°C
- 1% Essigsäure in A. dest., unsteril
- 70% Ethanol abs. in A. dest.
- Fixans:
3 Teile Methanol + 1 Teil Eisessig mischen; kurz vor Gebrauch ansetzen, maximal 24 h verwendbar
- Giemsa-Gebrauchslösung für C-Bänderung:
4 ml Giemsa + 96 ml Soerensenpuffer pH 6.8, mischen und abfiltrieren; wegen Bildung von Farbstoffniederschlägen maximal 24 h verwendbar
- Giemsa-Gebrauchslösung für G-Bänderung:
7 ml Giemsa + 30 ml Soerensenpuffer pH 6.8, auf 100 ml mit A. dest. auffüllen, abfiltrieren; wegen Bildung von Farbstoffniederschlägen maximal 24 h verwendbar
- 0.2 N HCl in A. dest.
- 0.56% (w/v; = 0.075 M) KCl in A. dest.; 37°C

- Medium für CHO-Zellen:
90% RPMI 1640 mit L-Glutamin + 10% (v/v) FKS, mit Zusatz von 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin-Mischung; 37°C
- Medium für HeLa-Zellen:
90% RPMI 1640 mit L-Glutamin + 10% (v/v) FKS, mit Zusatz von 1% (v/v) 200 mM L-Glutaminlösung und 0.5% (v/v) Gentamycin; 37°C
- Medium für KM und PB:
80% RPMI 1640 mit L-Glutamin + 20% (v/v) FKS, mit Zusatz von 1% (v/v) 200 mM L-Glutaminlösung und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin-Mischung; 37°C
- Medium+Colcemid (für HeLa-Zellen):
Medium für HeLa-Zellen + 1% (v/v) Colcemid; kurz vor Gebrauch ansetzen; 37°C
- MTX-Stocklösung (550 µM):
25 mg MTX unter leichtem Erwärmen und Durchmischen in 100 ml sterilem A. dest. lösen und sterilfiltrieren; Stocklösung in kleine Aliquots aufteilen und lichtgeschützt bei -20°C lagern
- MTX-Stammlösung (110 µM):
MTX-Stocklösung 1:5 mit sterilem A. dest. verdünnen, in 1 ml-Aliquots aufteilen und lichtgeschützt bei -20°C lagern; zum Gebrauch ein Aliquot auftauen und lichtgeschützt bei 4°C lagern; maximal 14 Tage verwendbar
- 0.9% (w/v) NaCl in A. dest.
- Leucomax-Gebrauchslösung mit 5 µg Molgramostim (=rh GM-CSF)/ml:
Leucomax 150-Trockensubstanz unter sterilen Bedingungen mit 1 ml sterilem Wasser für Injektionszwecke aus beiliegender Ampulle rekonstituieren;
rekonstituierte Lösung mit sterilem PBS 1:30 verdünnen = Leucomax-Gebrauchslösung; bis zum Gebrauch bei -20°C lagern; nach dem Auftauen maximal 24 h bei 4°C haltbar; Leucomax-Lösungen nicht öfter als 2x auftauen
- Phytohämagglutinin-Lösung: gefriergetrocknetes Phytohämagglutinin in 5 ml sterilem A. dest. lösen
- Schwarz-Weiß-Papierentwickler: Verdünnung und Verwendung nach Angaben des Herstellers
- Schwarz-Weiß-Papierfixierer: Verdünnung und Verwendung nach Angaben des Herstellers
- Soerensenpuffer pH 6.8: durch Mischen zweier Lösungen wie folgt herstellen:
Lösung 1: 4.95 g KH_2PO_4 in 500 ml A. dest. lösen; Lösung 2: 5.94 g Na_2HPO_4 in 500 ml A. dest. lösen;
Lösung 2 durch Zugabe von Lösung 1 auf pH 6.8 einstellen = Soerensenpuffer pH 6.8
- 2xSSC: 1.753 g NaCl + 0.882 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat in 100 ml A. dest. lösen; 60°C
- Trypsinierungslösung:
0.6 ml Bactotrypsin-Lösung in 70 ml 0.9% NaCl geben; maximal 24 h verwendbar; 37°C
- Trypsin-Versen-Gebrauchslösung: 0.25% Trypsin in Versen; kurz vor Gebrauch ansetzen; 37°C
- Versen+Colcemid (für HeLa-Zellen): Versen + 1% (v/v) Colcemid; kurz vor Gebrauch ansetzen; 37°C
- Zusatzfreies Medium für KM: RPMI 1640 mit L-Glutamin; 37°C
- Zusatzfreies Medium+Colcemid (für mitotische CHO-Zellen):
RPMI 1640 mit L-Glutamin, mit Zusatz von 1% (v/v) Colcemid; 37°C

2b) Lösungen für CGH und FISH

- Alkali-SDS-Lösung: 0.2 N NaOH, 1% SDS; maximal 2 Tage verwendbar
- Blocking-Lösung: 2% (w/v) BSA in Waschpuffer; kurz vor Gebrauch herstellen; 37°C
- Denaturierungslösung: 70% (v/v) Formamid / 2x SSC
- Detektionslösung 1:
ExtrAvidin-FITC Konjugat, 1:250 + Anti-Digoxigenin-Rhodamin, Fab-Fragmente, 1:500 in Waschpuffer; kurz vor Gebrauch herstellen
- Detektionslösung 2: Mouse-Anti-Digoxigenin-Cy2-AK, 1:200 in Waschpuffer; kurz vor Gebrauch herstellen
- Detektionslösung 3: Rabbit-Anti-Mouse-FITC-AK, 1:250 in Waschpuffer; kurz vor Gebrauch herstellen
- 10x dNTP-Mix: 0.2 mM dATP, 0.2 mM dCTP, 0.2 mM dGTP in sterilem A.dest.
- 0.2 mM dTTP: 0.2 mM dTTP in sterilem A.dest.
- 0.5 M EDTA in A. dest., pH 8.0
- Eindecklösung: Vectashield Mounting Medium mit Zusatz von 1.5 µg/ml DAPI + 8.8 µg/ml AMD
- 70% Ethanol: 70% (v/v) Ethanol abs. in A. dest.; -20°C
- Ethidiumbromid-Färbelösung: 2 µg Ethidiumbromid / ml 1x TAE-Puffer
- Hypotonischer Puffer: 155 mM NH₄Cl, 0.1 mM EDTA, 10 mM KHCO₃ in A. dest., pH 7.4
- Kalium-Acetat-Lösung: 3 M K⁺, 5 M Acetat, pH 4.8 (Maniatis et al. 1982)
- LB-Medium mit Kanamycin:
1 g Bacto Peptone + 0.5 g Bacto Yeast Extract + 1 g NaCl in 100 ml A. dest., pH 7.5, + 50 µg/ml Kanamycin A-Monosulfat; ohne Kanamycin A-Monosulfat autoklavieren, Kanamycin A-Monosulfat kurz vor Gebrauch zugeben
- LB-Medium mit Ampicillin:
1 g Bacto Peptone + 0.5 g Bacto Yeast Extract + 1 g NaCl in 100 ml A. dest., pH 7.5, + 50 µg/ml Ampicillin-Natrium-Salz; ohne Ampicillin-Natrium-Salz autoklavieren, Ampicillin-Natrium-Salz kurz vor Gebrauch zugeben
- 2x Loading-Puffer: 6x Blue/Orange Loading Dye 1:3 verdünnen mit 0.5 M EDTA pH 8.0
- Lysozymlösung für alkalische Lyse:
50 mM D(+)-Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Trizma Base pH 8.0, 1 mg/ml Lysozym; Lysozym kurz vor Gebrauch zugeben
- Lysozymlösung für Boiling-Verfahren:
10 mg/ml Lysozym in 20% (v/v) Triton-X-100 in A. dest.; Lysozym kurz vor Gebrauch zugeben
- Master Mix:
50% (v/v) deionisiertes Formamid, 10% (w/v) Dextransulfat, 10% (v/v) 10x Phosphat-Puffer, 10% (v/v) 20x SSC
- 0.1 M β-Mercaptoethanol in A. dest.; lichtgeschützt bei 4°C lagern, maximal 14 Tage verwendbar
- 5 M NaCl
- 3 M Natriumacetat in A. dest., pH 5.2

- 10x Nick-Puffer + BSA: 0.5 M Tris-HCl pH 8.0, 50 mM MgCl₂, 0.5 mg/ml BSA
- RNase-Stammlösung: 10 mg Ribonuclease A / ml A. dest., DNase-frei (Maniatis et al. 1982)
- 10x Phosphat-Puffer: 100 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaH₂PO₄, pH 7.4
- Proteinase K-Stammlösung: 10 mg Proteinase K / ml A. dest.
- RNase-Stammlösung: 10 mg Ribonuclease A / ml A. dest., DNase-frei (Maniatis et al. 1982)
- 20% (w/v) SDS in A. dest.
- SE-Puffer: 75 mM NaCl, 25 mM EDTA in A. dest., pH 8.0
- 20x SSC: 3 M NaCl, 0.3 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, pH 7.0
- 0.05x SSC, aus 20x SSC kurz vor Gebrauch herstellen; 42°C
- 1x TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA in A. dest.
- TE-Puffer: 10 mM Trizma Base, 1 mM EDTA in A. dest., pH 7.5
- TSE-Puffer: 60 mM Trizma Base pH 8.0, 60 mM EDTA, 10% Sucrose
- Waschpuffer:
0.15 M NaHCO₃, 0.6 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 0.1% (v/v) Tween 20, pH 8.0; kurz vor Gebrauch herstellen; 37°C

3.) Geräte und weiteres Material

Die folgende Aufstellung enthält die verwendeten Geräte und weiteres Material mit den Herstellerfirmen:

Blutkulturtopfe für KM- und PB-Kulturen: Kunststoffgefäße mit flachem Boden, verschliessbar, 50 ml, steril	Greiner
Brutschrank für eukaryontische Zellkulturen: CO ₂ -Inkubator, Modell 3028	Forma Scientific
Cryotubes mit Schraubverschluß, 2 ml Gesamtvolumen, steril	Nunc
Dampfdrucktopf	Sitram
Deckgläser, klein, 18x18 mm	Menzel
Deckgläser, lang, 24x60 mm	Menzel
Einmalpipetten, 5 und 10 ml, steril	Sarstedt
Elektrophoreseapparatur	Hoefer Scientific Instruments
Eppendorfpipetten für Volumina von 0.5 µl bis 1000 µl, mit sterilen Pipettenspitzen	Abimed
Eppendorftubes, 1.5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
Feuchte Kammer: Metallbox mit angefeuchtetem Filterpapier	—*
Filterpapierblock	Schleicher & Schuell
Fixogum	Marabu
Fluoreszenzmikroskop mit angeschlossenem Bildanalysesystem: Axioskop, 10fache Okularvergrößerung, Fluoreszenz-Objektive: 10x, 63x, 100x, 3 Single Band Pass-Filter für DAPI-, FITC- und Rhodamin-Fluoreszenz, 1 Double Band Pass-Filter zur simultanen Visualisierung von FITC- und Rhodamin-Fluoreszenz, angeschlossene gekühlte CCD-Kamera, PC mit Bildanalyseprogramm für FISH und CGH: ISIS 3, Version 2.41	Zeiss Zeiss Chroma Technology Chroma Technology Hamamatsu MetaSystems
Heizblock	Bachofer
Heizplatte	Bachofer

Fortsetzung s. nächste Seite

Fortsetzung von vorheriger Seite:

Hellfeldlichtmikroskop mit Fotoaufsatz: Dialux 22, 10fache Okularvergrößerung, Objektive: 10x, 63x, 100x, Grünfilter, Fotoaufsatz und angeschlossene Belichtungsanlage für automatische Belichtung	Leitz Leitz Orthomat
Hellfeldlichtmikroskop mit Thermoprintsystem: Hellfeldlichtmikroskop, 10fache Okularvergrößerung, Objektive: 10x, 63x, 100x, Grünfilter, angeschlossenes Thermoprintsystem	Zeiss Zeiss
Injektionskanülen für Spritzen, pyrogenfrei, steril	Rose GmbH
Karyotypisierungssystem: Axioskop, 10fache Okularvergrößerung, Objektive: 10x, 63x, 100x, Grünfilter, angeschlossene CCD-Kamera, PC mit Karyotypisierungsprogramm: Ikaros3, V3.86	Zeiss Zeiss Hamamatsu MetaSystems
Lichtmikroskop mit Phasenkontrast: Umkehrlichtmikroskop, 10fache Okularvergrößerung, Phasenkontrast-Objektiv: 10x	Olympus Olympus
Metall- oder Plastikbox für Hybridisierung	—*
Neubauer Zählkammer	Brand
Objektträger mit Mattrand, 76x26 mm	Menzel
Röhrchen mit Schraubverschluß, 15 ml und 50 ml, steril	Sarstedt
Schwarz-Weiß-Fotopapier: Ilfospeed 5.1M, 10x15 cm	Ilford
Schwarz-Weiß-Kleinbildfilm (24x36 mm): Ilford Pan F mit ISO 50 /18 DIN	Ilford
Spritzen, 5 ml, steril (Discardit)	Becton Dickinson
Spritzen, 1 ml, steril (Omnifix)	Braun Melsungen
Sterile Werkbank: Laminar Flow, Typ BSB 6	Gelaire Flow Laboratories
Sterilfilter mit 0.22 µm Porengröße	Schleicher & Schuell
Stromaggregat für Elektrophoreseapparatur (Elektrophorese Powersupply)	Renner
Transferpipetten, 3.5 ml, steril	Sarstedt
Transilluminator mit Thermoprintsystem	Bachofer
Umkehrlichtmikroskop: s. unter Lichtmikroskop mit Phasenkontrast	Olympus
Zellkulturflaschen für CHO-Zellen: 175 cm ² , mit Kontaminationsverschluß (Filterkappe), steril	Greiner
Zellkulturflaschen für HeLa-Zellen: 75 cm ² , mit Kontaminationsverschluß (Filterkappe), steril	Greiner
Zentrifuge für Eppendorftubes	Heraeus Sepatech
Zentrifuge für 15 ml- und 50 ml-Röhrchen: Minifuge RF	Heraeus Sepatech

*Metallboxen aus Werkstattanfertigung, Plastikboxen variabel

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die eingereichte Dissertation selbständig verfaßt, die für die Arbeit benutzten Hilfsmittel genannt und die Ergebnisse etwa beteiligter Mitarbeiter sowie anderer Autoren klar gekennzeichnet habe.

Kaiserslautern, im November 2003

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Zankl danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Abteilung Humanbiologie und Humangenetik, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dem Graduiertenkolleg Biotechnologie danke ich für die finanzielle Unterstützung und die Weiterbildung in verwandten Fachgebieten.

Den Herren Prof. Dr. Dr. H. Zankl und Prof. Dr. M. Schwab danke ich für die Übernahme der Begutachtung der Arbeit und Herrn Prof. Dr. J. A. Cullum für die Übernahme des Vorsitzes der Promotionskommission.

Lebenslauf

Name: Petra Bruckert
Geburtsdatum: 04.03.1963
Geburtsort: Jülich

Schulbildung:

August 1969 - Juli 1973 Städtische Grundschule in Jülich
August 1973 - Juni 1982 Gymnasium St.-Josef-Schule in Jülich
Abschluss: Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife

Berufsbildung:

August 1982 - Juni 1984 Ausbildung zur Biologisch-technischen Assistentin an der Berufsfachschule für technische Assistenten der Rheinischen Akademie e.V. Köln
Abschluss: staatlich geprüfte Biologisch-technische Assistentin

Studium:

Oktober 1985 - März 1988 Grundstudium Biologie (Diplom) an der RWTH Aachen
Abschluss: Vordiplom
April 1988 - April 1996 Hauptstudium Biologie (Diplom) an der Universität Kaiserslautern
Abschluss: Diplom
Mai 1996 - August 1998 Doktorandenstipendium des Graduiertenkollegs Biotechnologie in der Abteilung Humanbiologie und Humangenetik der Universität Kaiserslautern
seit Mai 1996 Anfertigung einer Doktorarbeit in der Abteilung Humanbiologie und Humangenetik der Universität Kaiserslautern

Berufstätigkeit:

August 1984 - Januar 1985 Biologisch-technische Assistentin am Botanischen Institut der Universität zu Köln
September 1998 - Dezember 2000 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Humanbiologie und Humangenetik der Universität Kaiserslautern