

**Cytogenetische Charakterisierung von humanen Melanom-Zell-Linien
und ihrer Stabilität während der Propagierung *in vitro* und der
Passagierung *in vivo***

Dem Fachbereich Biologie
der Universität Kaiserslautern
zur Erlangung des akademischen Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"
eingereichte Dissertation

vorgelegt von
Diplom-Biologe **Ulrich Pascheberg**
aus Bonn

Kaiserslautern 1989

Betreuer: Prof. Dr. med. vet. Dr. rer. nat. Heinrich Zankl
Koreferent: Prof. Dr. med. Norbert E. Fusenig
Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 27. April 1989

Herzlich bedanken möchte ich mich bei **Herrn Prof. Dr. Dr. Zankl** für die Übernahme und Betreuung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Fusenig danke ich für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg. Hilfreiche Anregungen und Ideen führten dazu, die Arbeit in der vorgelegten Form entstehen zu lassen. Nicht unerwähnt bleiben sollte sein Einsatz um meine persönliche finanzielle Unterstützung, die mir die Anfertigung der Dissertation erst ermöglicht hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt **Frau Dr. Rule (Stamena) Petrusevska**, die mich in die zahlreichen Methoden der Cytogenetik einführte. Ihr großer Sachverstand und ihre Hilfsbereitschaft kamen mir gerade bei der Klärung komplizierter Chromosomenaberrationen sehr zu Nutzen.

Herrn **Dr. Siegfried Karjetta** danke ich für die Einführung in die Methoden der Molekularbiologie, sowie für seine Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeiten.

Frau Angelika Krischke danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung beim Ausschneiden der Chromosomen.

Bei **Frau Gaby Haffner** möchte ich mich für die histologische Aufarbeitung des Tumormaterials bedanken.

Allen anderen Mitarbeitern des Labors von Prof. Dr. Fusenig danke ich für ihre Kollegialität und Hilfsbereitschaft während der gesamten Zeit. Meine Untersuchungen konnten so in einem angenehmen Arbeitsklima durchgeführt werden.

Herrn Dr. Tilgen (Hautklinik Heidelberg) und **Herrn Prof. Dr. Schlag** (Chirurgische Klinik Heidelberg) danke ich für die "Versorgung" mit Patientenmaterial.

Meiner Lebensgefährtin **Heike Lischke** danke ich für die Mithilfe bei der Überarbeitung des Manuskriptes.

All meinen Freunden sei für ihre wie auch immer geartete Unterstützung während der Zeit meiner Doktorarbeit herzlich gedankt.

Meinen Eltern

Cytogenetische Charakterisierung von humanen Melanom-Zell-Linien und ihrer Stabilität während der Propagierung *in vitro* und der Passagierung *in vivo*

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
I a. Einleitung	7
1. Das maligne Melanom als eine bösartige Erkrankung	7
2. Melanom-Zell-Linien und Impftumoren als experimentelle Modellsysteme	8
3. Geschichtliche Entwicklung und Möglichkeiten der Tumorcytogenetik	9
I b. Aufgabenstellung	14
II. Abkürzungen	16
III. Material und Methoden	17
a. Material	17
1. Charakterisierung des erhaltenen Tumormaterials und daraus abgeleiteter Kulturen	17
2. Charakterisierung der etablierten Melanom-Zell-Linien	19
3. Verwendete Reagenzien und Geräte	20
b. Methoden	24
1. Anzucht humaner Melanome (Primärtumore und Metastasen)	24
A. Isolierung und Anzucht von Melanom-Zellen	24
B. Elimination bzw. Kontrolle der Stromazellen	26
2. Zellkultur	28
3. Chromosomenpräparation	28
4. Bänderungstechniken	30
5. Karyotypierung	33
6. Tierversuche	33

	Seite
7. Anzüchtung von Injektionstumoren	34
8. Southern- und Northern-Blot-Analyse	35
IV. Ergebnisse	44
1. Phänotypische Charakteristica der Melanomzellen <i>in vitro</i>	44
2. Histologische Begutachtung von Injektionstumoren	50
3. Cytogenetik humaner Melanom-Zell-Linien	53
3a. Ergebnisse eigener Melanom-Kulturen	54
A. MM-I-P	54
B. MM-II-M	58
C. MM-III-M	62
D. MM-IV-P	66
E. MM-V-M	70
F. MM-VI-P	74
3b. Zusammenfassung der Ergebnisse aus eigenen Melanom-Kulturen	78
3c. Ergebnisse etablierter Melanom-Zell-Linien anderer Herkunft	80
G. MeWo	80
H. A-375	84
J. Sk Mel 13	87
K. Sk Mel 25	91
L. Sk Mel 28	94
M. Sk Mel 93	98
N. COLO	101
O. MEL-JUSO	104
3d. Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse aller untersuchten Melanomkulturen	107
A. numerische (quantitative) Veränderungen	107
B. strukturelle Aberrationen	108
4. Verhalten des individuellen Karyotyps humaner Melanom-Zell-Linien im Laufe der Langzeitkultivierung	114
A. MM-I-P	115
B. MM-II-M	118
C. MM-V-M	128

	Seite
5. Einfluß eines <i>in vivo</i> -Systems auf den individuellen Karyotyp stabiler Melanom-Zell-Linien	136
A. MM-I-P	137
B. MM-II-M	152
C. MM-III-M	166
6. Das Tumorwachstum in Abhängigkeit von der Zahl der <i>in vivo</i> -Passagierungen	182
7. Southern- und Northern-Blot-Analyse verschiedener Oncogene an Melanom-Zell-Linien	184
V. Diskussion	187
1. Anzüchtung und phänotypische Charakterisierung humaner Melanome	188
2. Cytogenetik humaner Melanom-Zell-Linien	191
3. Genetische Stabilität im Kulturverlauf	196
4. Genetische Stabilität im <i>in vivo</i> -System	198
5. Auswirkung der Passagierung und der Chromosomenveränderungen auf die Tumorprogression	201
6. Molekularbiologische Untersuchungen an Melanom-Kulturen	203
7. Schlußbetrachtung	204
VI. Zusammenfassung	205
VII. Literaturverzeichnis	207
VIII. Lebenslauf	215

I a. Einleitung

1. Das maligne Melanom als eine bösartige Erkrankung

Das maligne Melanom gehört zu einer der bösartigsten Krebserkrankungen. Mit einem Anteil von 1 - 3% an der Gesamtheit aller Tumoren und 3 - 20% Anteil bei Tumoren der Haut ist die Inzidenz zwar relativ niedrig, trotzdem ist das Melanom die häufigste Todesursache von Patienten mit Tumoren der Haut oder Schleimhäute. In den letzten Jahrzehnten ist ein sprunghafter Anstieg der Melanomerkrankungen um 500 - 900% zu verzeichnen, mit einer Verdopplung der Erkrankungszahlen innerhalb von sechs bis 10 Jahren, so daß die Melanominzidenz heute bei neun pro 100.000 Einwohnern liegt (Tilgen W., 1987). Die genauesten Daten liegen uns aus der Giessener Hautklinik vor, die ganz Zentralhessen als Einzugsgebiet hat. Zwischen 1970 und 1984 haben sich hier die Erkrankungsfälle verfünffacht. Der relativ hohe Anstieg der Melanombefundung dürfte, neben einem realen Anstieg der Melanom-Inzidenz, auch die Folge eines Aufklärungsprogramms der Giessener Hautklinik sein. So ist die Mortalitätsrate der Morbiditätsrate nicht gefolgt, d.h. durch eine gestiegene Sensibilisierung der Bevölkerung konnten viele Melanome rechtzeitig erkannt und operiert werden (Rauh M. et al, 1987).

Das UV-Licht dürfte, neben einer genetischen Prädisposition, einer der Hauptfaktoren bei der Auslösung des malignen Melanoms sein. So weisen die Südstaaten der USA und Australien prozentual die meisten Erkrankungsfälle auf. Der hohe Anstieg der Erkrankungsrate dürfte somit unter anderem durch die veränderten Lebensgewohnheiten der Menschen, wie häufigere Kurzurlaube in sonnenreiche Gebiete oder Benutzung von Solarien, begründet sein.

Dieser Tumor ist so tückisch, da er bereits in frühem Stadium der Tumorentwicklung zur Metastasierung neigt, zu einem Zeitpunkt, wo die primäre Läsion vom Patienten subjektiv als harmlos eingeschätzt wird. Während die Heilungsmöglichkeiten des früh erkannten primären Melanoms sehr gut sind (85%), ist die Behandlung des metastasierenden Melanoms als eher palliativ anzusehen. Eine kurative Therapie ist nahezu ausgeschlossen, da die Ansprechrate auf Cytostatika (Mono- oder Polychemotherapie) sehr gering ist.

Seit kurzer Zeit werden neue Hoffnungen in die Experimente mit monoklonalen Antikörpern gegen Melanom-assoziierte Antigene gesetzt. Diese Antikörper lassen sich mit Cytostatika oder radioaktiven Isotopen koppeln. Da der angestrebte spezifische Antikörper nur das Tumorgewebe erkennt und dort zur Wirkung kommt, können wesentlich höhere Dosen an Therapeutika eingesetzt werden, als dies bei einer systemischen Therapie möglich wäre. Die Schädigung des Restorganismus ist, im Vergleich zu herkömmlichen Anwendungen, stark vermindert. Leider kann diese Antikörpertherapie klinisch noch nicht generell eingesetzt werden, da die bis heute entwickelten monoklonalen Antikörper lediglich bei 35 - 65% der Melanom-spezifischen Tumorzellen binden. Dies liegt überwiegend an der Heterogenität der Tumorzellpopulationen. Zudem binden manche bekannte Antikörper nur an einen Primärtumor oder seine Metastase, wogegen eine andere Metastase des gleichen Patienten nicht erkannt wird. Zurzeit ist noch nicht geklärt, ob diese Heterogenität bezüglich dieses Bindungsverhaltens "nur" auf einer Modulation der Tumorzellantigene beruht, oder ob sie genetisch fixiert ist.

2. Melanom-Zell-Linien und Impftumoren als experimentelle Modellsysteme

Als Testsystem für Cytostatika und Immuntherapeutika und insbesondere zur Entwicklung und Austestung monoklonaler Antikörper werden Zellkulturen, d.h. etablierte Zell-Linien aus Melanomen, als *in vitro*-Modelle verwandt. Da der Mensch verständlicherweise für solche Experimente nicht zur Verfügung steht, dient als *in vivo*-Korrelat zu den *in vitro*-Versuchen die immunsupprimierte Nacktmaus. Die meisten Melanomzellen sind in der Lage, nach Injektion in diesem heterologen *in vivo*-System Tumore zu formieren. Dieser Umstand wird sich gerade bei der Etablierung von Melanom-Zell-Linien zu Nutzen gemacht. Da Tumore bis zu 80% aus Stromazellen bestehen, und diese ein oft größeres Wachstumspotential als die Tumorzellen besitzen, ist es schwierig, reine Tumorzellpopulationen für die Anzucht zu bekommen. Durch eine der Anzucht vorgeschaltete Nacktmaus-Passagierung des Biopsiematerials läßt sich dieses weitgehend von Stromazellen befreien, da diese, weil nicht transformiert, in der Nacktmaus weniger gut wachsen.

Die Zellkultur wie die Heterotransplantation führten naturgemäß zur Selektion von Zellpopulationen, die unter den gegebenen Bedingungen *in vivo* oder *in vitro* besonders gut wachsen. Weiter ist es immer noch sehr schwierig aus Primärtumoren direkt Zell-Linien zu etablieren, weshalb die meisten etablierten Zell-Linien aus Metastasen stammen. Aus diesen Gründen stellt die Zellkultur ein sehr spezielles System dar, das nur bedingt der komplexen und heterogenen Situation des Tumors im Patienten entspricht (Tilgen W. et al, 1983). Daher ist eine detaillierte Analyse solcher Linien und ihrer Veränderungen während ihres Wachstums unter artifiziellen experimentellen Bedingungen immer erforderlich. Dies gilt für alle Zell-Linien, die über sehr lange Zeiträume *in vitro* oder *in vivo* gehalten werden. Als Beispiel sei hier die **HeLa**-Zell-Linie genannt, die 1952 etabliert wurde (Gey G.O. et al, 1952) und noch heute in vielen Labors für unterschiedliche Fragestellungen verwandt wird. Innerhalb dieser langen Zeiträume können diese Zell-Linien, aufgrund der nicht physiologischen *in vitro*- bzw. heterologen *in vivo*-Bedingungen, zusätzliche Veränderungen erfahren. Eine Möglichkeit dieser Frage nachzugehen, ist die Analyse von Zellen kurz nach der Entnahme aus dem Tumor und ihre Verfolgung über lange Zeiträume. Die phänotypischen Merkmale von Tumorzellen, dies gilt besonders für Melanomzellen, sind zum einen oft wenig spezifisch und zum anderen sehr variabel, mit unterschiedlichem Grad der Pigmentierung. Daher schien die Cytogenetik als Methode der Wahl, um die Frage der Stabilität von solchen Melanompopulationen unter experimentellen Bedingungen über längere Zeiträume zu verfolgen und die eintretenden Veränderungen zu erfassen. Während Karyotyp-Analysen von Tumoren und Zell-Linien aus Melanomen von verschiedenen Autoren vorliegen, sind meines Wissens bis heute keine systematischen cytogenetischen Verlaufskontrollen, weder von verschiedenen Kulturpassagen, noch nach mehrmaliger Heterotransplantation, durchgeführt worden.

3. Geschichtliche Entwicklung und Möglichkeiten der Tumorcytogenetik

Neben der Klärung der zuvor beschriebenen Problemstellungen liefert die Tumorcytogenetik wesentliche Beiträge zum Verständnis der Krebsentstehung, wie dies besonders in den letzten Jahren bei den Leukämien eindrucksvoll belegt werden konnte.

Die Anfänge der Tumorcytogenetik sind wohl auf das Jahr 1914 anzusetzen, als der Würzburger Zoologe Theodor Boveri aus seinen Beobachtungen von Mitosen an Schnittpräparaten von Tumorzellen postulierte, daß genetische Veränderungen für das Entstehen von Tumoren von Bedeutung seien (Boverie T., 1914). Um diese These der Karzinogenese zu untermauern mußten jedoch noch einige Jahrzehnte vergehen, denn erst 1956 wurde von Tjio und Levan die Chromosomenzahl des Menschen korrekt bestimmt (Tjio J.H. et al, 1956). Nach diesen Erkenntnissen war es dann möglich, die erste beschriebene Anomalie des Chromosomensatzes, ein überzähliges Chromosom # 21 (Trisomie 21) mit einer Erkrankung, dem Mongolismus, zu korrelieren (Lejeune J. et al, 1959). 1960 wurde dann zum ersten Mal für eine maligne Erkrankung, bei einem Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie, eine strukturelle Veränderung des Chromosomensatzes, das "Philadelphia Chromosom", entdeckt (Nowell P.C. et al, 1960). In den Folgejahren konnte das Auftreten dieses Markerchromosoms bei 90 - 95% dieser Patienten nachgewiesen werden. Die exakte Struktur und Herkunft des "Philadelphia-Chromosoms" konnte erst wesentlich später von Rowley (1983) aufgedeckt werden, nachdem es gelungen war, die Chromosomen nicht nur nach ihrer Größe, sondern aufgrund spezifischer Merkmale zu erkennen. Dieser Durchbruch der Tumorcytogenetik, und der Cytogenetik allgemein, kam mit der Entwicklung der Bänderungstechniken (Caspersson T. et al, 1970). Durch Anwendung der Bänderungstechnik erhält man eine differenzielle Anfärbung des Chromatins und somit ein Bandenmuster, das für ein jedes Chromosom charakteristisch ist. Als verschiedene Bänderungstechniken sind hier die G- und Q-Bänderung zu nennen, die auf den Chromosomen für sie spezifische Bandenmuster erzeugen und so eine individuelle Unterscheidung ermöglichen. Weiterhin lassen sich durch Färbeverfahren bestimmte chromosomale Bereiche anfärben. Die C-Bänderung färbt nur das zentromerane Heterochromatin an, die NOR-Färbung zeigt aktive Nucleolus-Organisator-Regionen. Durch die SCE-Färbung können Austausche der homologen Chromatiden sichtbar gemacht werden. Auf all diese Verfahren wird im Material- und Methoden-Teil detaillierter eingegangen werden. Erst diese Bänderungstechniken ermöglichten es, strukturelle Veränderungen, wie Deletionen, Translokationen, Inversionen, Duplikationen und Amplifikationen, zu erkennen und vom normalen Karyotyp her abzuleiten.

Aufgrund dieser Vorarbeiten war es jetzt möglich, bei bestimmten Erberkrankungen Chromosomenbruch-Syndrome nachzuweisen und diese mit einer Prädisposition für Krebserkrankungen zu korrelieren. Dazu gehören: Fanconis Panmyelopathie, Ataxia

Telangiectasia, Werners Syndrom und Blooms Syndrom, bei denen gehäuft Hämoblastosen und solide Tumoren auftreten (Stubblefield E., 1987).

Bis vor wenigen Jahren waren überwiegend Hämoblastosen Gegenstand tumorcytogenetischer Untersuchungen und es konnten inzwischen für nahezu alle Leukämieformen und ihre Subtypen spezifische und immer wiederkehrende Chromosomenanomalien nachgewiesen werden, die inzwischen auch zur diagnostischen Abklärung verwandt werden. Darüber hinaus konnten diese Veränderungen auch zur Aufklärung der Ätiologie von malignen Erkrankungen beitragen. Als Beispiel sei hier das Burkitt Lymphom genannt, das in der überwiegenden Mehrzahl der Patienten eine Translokation (8;14) aufweist (Zech L. et al, 1976). Durch molekularbiologische Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß durch diese chromosomale Veränderung das zelluläre Proto-Oncogen c-myc von seinem Ursprungsort auf Chromosom # 8 in die Nähe des differenzierungsbedingt aktiven Immunglobulins auf Chromosom # 14 gebracht und dadurch zu erhöhter oder fehlerhafter Expression veranlasst wird. Diese Fehlexpression von c-myc wird zumindest als eine Ursache für die Entstehung dieses Lymphoms und auch anderer Malignome interpretiert.

Aus den cytogenetischen Befunden bei Neoplasien lassen sich mittlerweile prognostische Aussagen über den Krankheitsverlauf machen. So haben Patienten mit CML, die das "Philadelphia-Chromosom" aufweisen, eine längere Überlebensdauer als Patienten ohne dieses Markerchromosom (Sandberg A.A., 1980).

Das Vorhandensein nicht-zufälliger Veränderungen in Tumorzellen wird durch die Ergebnisse aus Tierversuchen bestätigt. Spontane und induzierte murine Leukämien weisen oft eine Trisomie von Chromosom # 15 auf (Dofuku R. et al, 1975), in Ratten-Sarkomen findet sich häufig eine Trisomie von Chromosom # 12 (Levan G. et al, 1974). Alle diese klinischen und experimentellen Befunde führten dazu, daß in letzter Zeit auch verstärkt solide Tumore, die wesentlich schwerer zugänglich sind, cytogenetisch analysiert wurden.

Die Befunde bei soliden Tumoren sind schwerer zu deuten als bei Hämoblastosen, da die soliden Tumoren erst zu einem späten Zeitpunkt innerhalb der Tumorgenese und häufig nur als Metastase diagnostiziert werden bzw. experimentell zur Verfügung stehen.

Der Karyotyp ist hier oft sehr stark verändert und heterogen, so daß nicht mehr auszumachen ist, welche Aberrationen für das Transformationsgeschehen verantwortlich sind, welche "nur" einen Selektionsvorteil bieten oder welche ohne Belang sind. Als kleine Hilfe kann hier dienen, daß Markerchromosomen (strukturelle Chromosomenanomalien), die in polyploiden Metaphasen in zwei Kopien pro Metaphase vorliegen, als relativ frühe Veränderung angesehen werden können, d.h. der Zeitpunkt ihrer Entstehung muß vor der erfolgten Polyploidisierung liegen.

Weiterhin besteht ein solider Tumor nicht nur aus reinen Tumorzellen, sondern ist von einem mehr oder weniger großen Anteil verschiedener Stromazellen durchsetzt. Durch das oft größere Wachstumspotential dieser Stromazellen finden sich bei cytogenetischen Analysen von Tumoren oder abgeleiteten Primärkulturen oft nur normale diploide Metaphasen, die eben den Stromazellen zuzuordnen sind. Diese Befunde dürften dazu geführt haben, daß lange Zeit die Annahme galt, Neoplasien besäßen häufig einen normalen Karyotyp. Trotz der genannten Schwierigkeiten kann man mittlerweile sagen, daß nahezu alle detailliert analysierten Tumore sichtbare Chromosomenveränderungen aufweisen. Durch Auswertung großer Fallzahlen konnten zudem Übereinstimmungen im Aberrationsmuster innerhalb verschiedener Tumortypen gefunden werden, z.B. für:

Retinoblastome	del(13)(q14)	Francke U., 1983
Wilms Tumore	del(11)(p13)	Riccardi V. M. et al, 1978
kleinz. Lungen-Karz.	del(3)(p14p23)	Whang-Peng J. et al, 1982
Meningiome	- Chr. # 22	Zankl H. et al, 1972
Neuroblastome	del(1)(p11)	aus Stubblefield E., 1987
Colorectal-Tumore	del(7)(p11), - Chr. # 18	Muleris M. et al, 1987
Mesotheliome	del(3)(p14p21), del(7)(q11q22)	Popescu N.C., 1988
Gliome	+ Chr. # 5, + Chr. # 7, - Chr. # 10	Binger S.H., 1984
Speicheldr.-Tumore	del(6)(q16q25)	Stenma G. et al, 1986
Melanome	del(1)(p11), del(6)(q11), + Chr # 7	Becher R. et al, 1983

Über das Herausfinden von Gemeinsamkeiten hinaus war es möglich, an Tumoren mit besonderen familiären Belastungen, wie dem Retinoblastom und dem Wilm's Tumor, auch Beziehungen zur Kausalität der Tumorentstehung aufzustellen. Im Falle des Retinoblastoms führt die Deletion an Chromosom # 13 nur dann zur Tumorentstehung, wenn an dem normalen Chromosom # 13 ebenfalls Veränderungen auftreten. Somit konnte das erste Supressorgen der Humanpathologie postuliert werden (Ponder, P., 1988).

Das Studium tumortypischer Aberrationen gestaltet sich beim malignen Melanom, im Vergleich zu anderen soliden Tumoren, als besonders schwierig. Dieser Tumor besitzt, wenn er operiert wird, oft nur die Größe eines Reiskorns und bleibt so dem Pathologen vorbehalten. Aus diesem Grund liegen die meisten cytogenetischen Daten aus Melanom-Metastasen vor. Bei der Durchsicht der Literatur zeigt sich eine Übereinstimmung der meisten Autoren darin, daß es für das maligne Melanom zwar keine tumortypischen Markerchromosomen gibt, aber Veränderungen an den Chromosomen # 1, 6 und 7 melanomtypisch sind bzw. häufiger beobachtet werden (z.B. Bertrand S. et al, 1985; Richmond A. et al, 1986; Ohyashiki J.H. et al, 1986; Becher R. et al, 1983). Die umfangreichste Studie hierzu kam von Pathak und Mitarbeitern (1983). Neben neun eigenen Zell-Linien wurden auch die Ergebnisse von 47 anderen Zell-Linien aus der Literatur übernommen. Es ergab sich eine Aberrationsinzidenz von 80,8% bei Chromosom # 6. Neben diesen Übereinstimmungen für die Chromosomen # 1, 6 und 7, gibt es einige Arbeiten, in denen Veränderungen an anderen Chromosomen als Melanom-typisch angesehen werden. Zum Beispiel:

Chromosom # 2: Mukai S. und Dryja T.P. (1986); Pedersen M. et al (1986)

Chromosom # 9: Wang N. und Pedersen M. (1985)

Chromosom # 10: Parmiter A. et al (1988)

Chromosom # 19: Parmiter A. et al (1986)

Der vorbeschriebene Sachverhalt zeigt, daß, neben der Erstellung neuer Therapiekonzepte, der Tumorcytogenetik nicht allein für das Verständnis der Krebsentstehung eine entscheidende Bedeutung zukommt, wenngleich die Frage der Kausalität von Transformation und derangiertem Karyotyp zur Zeit nicht eindeutig beantwortet werden kann.

I b. Aufgabenstellung

Die vorliegende Arbeit sollte dazu beitragen, die vielfach verwandten Zell-Linien von Melanomen besser zu charakterisieren und zu klären, inwieweit sie dem Tumor vergleichbare, über längere Zeiten stabile Modellsysteme für experimentelle und klinik-relevante Untersuchungen darstellen. Dazu wurden folgende Fragestellungen angegangen:

1. In wie weit sind Melanom-Zell-Kulturen repräsentativ für den Ursprungstumor? Hierzu wurden cytogenetische Vergleiche von Primärkulturen bzw. frühesten Kulturpassagen mit späteren Passagen durchgeführt. Selbst etablierte Zell-Linien wurden mit solchen verglichen, die schon längere Zeit in anderen Labors in Kultur gehalten werden. Der Vergleich mit den Fremdlinien ist von Bedeutung, da diese Linien im Gegensatz zu den eigenen, überwiegend nach heterologer *in vivo*-Passagierung etabliert wurden.
2. Welche cytogenetischen Veränderungen treten in kultivierten Melanom-Zell-Linien während fortlaufender *in vitro*-Propagierung auf und welche Effekte haben zwischenzeitliche *in vivo*-Passagen? Durch Beantwortung dieser Frage, soll geklärt werden, inwieweit eine ältere Zellkultur vom cytogenetischen Standpunkt her noch mit einer frisch etablierten Kultur vergleichbar ist. Die Zellkulturen wurden alle 5 - 10 Passagen cytogenetisch analysiert und zusätzliche Veränderungen erfasst. Ferner wurden drei verschiedene Zell-Linien in drei Zyklen *in vivo* propagiert und anschließend *in vitro* analysiert.
3. Können gemeinsame cytogenetische Veränderungen für alle oder die Mehrzahl der Melanom-Linien identifiziert werden? Zu dieser Frage liegen bereits zahlreiche Publikationen von anderen Autoren vor. Hier lag, aufgrund der Befunde bei den Leukämien, das Hauptaugenmerk auf der strukturellen Veränderung, auch und gerade um hierdurch eine mögliche Oncogenaktivierung durch veränderte Positionseffekte zu postulieren. Über- und Unterrepräsentierungen von Genmaterial blieben im Allgemeinen wenig berücksichtigt. Die vorliegende Arbeit zielt insbesondere auf die Ermittlung des relativen Gehalts an Genmaterial, besonders auf die Unterrepräsentierungen, ab. Die Frage der Unterrepräsentierung von Genmaterial gewinnt im Hinblick auf die mögliche Beteiligung von Supressorgen an der

Tumorgenese an Bedeutung. Hierzu wurden alle Zell-Linien, aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit, in mittleren Passagen analysiert.

4. Schließlich sollte in molekularbiologischen Untersuchungen überprüft werden, ob in den etablierten Zell-Linien eine erhöhte Expression von einigen bekannten Oncogenen erfolgt und ob diese dann mit cytogenetischen Veränderungen korreliert werden kann.

II. Abkürzungen

cm	-	Zentimeter
CML	-	chronisch myeloische Leukämie
del	-	Deletion
der	-	derivatives Chromosom
dm	-	double minute
DNA	-	Desoxyribonucleinsäure
dup	-	Duplikation
EDTA	-	Ethylen Diamin Tetraessigsäure
EGTA	-	Ethylen Glycol Tetraessigsäure
FCS	-	fötales Rinderserum
g	-	Gravitationskonstante
HEPES	-	4-(2- Hydroxyethyl)-1-piperazineethane sulfonic acid
HSR	-	homogeniously staining region
i	-	Isochromosom
IBMX	-	Isobuthyl Methyl Xanthin
MEM	-	minimum essential medium
min.	-	Minute(n)
ml	-	Milliliter
nm	-	Nanometer
NOR	-	Nucleolus-Organisator-Region
PBS	-	phosphate buffered saline
RNA	-	Ribonucleinsäure
SCE	-	sister chromatide exchange
sec.	-	Sekunde(n)
t	-	Translokation
TPA	-	12-O-Tetradecanoyl Phorbol (13) Acetat
µm	-	Mikrometer

III. Material und Methoden

a. Material

1. Charakterisierung des erhaltenen Tumormaterials und daraus abgeleiteter Kulturen

Im Bearbeitungszeitraum standen fünf Primärtumore und 14 Metastasen (13 Lymphknotenmetastasen und eine Lungenmetastase) für die Aufarbeitung zur Verfügung. Die Primärtumore stammten aus der Hautklinik Heidelberg, die Metastasen aus der Chirurgischen Klinik Heidelberg.

Cytogenetische Analysen konnten aus sechs dieser Tumoren gewonnen werden. Die abgeleiteten Kulturen wurden nach folgendem Muster benannt:

MM steht für malignes Melanom

I - VI numeriert die Kulturen in der zeitlichen Reihenfolge ihrer Entstehung

P oder M steht für Primärtumor oder Metastase als Ausgangstumor

A. MM-I-P

MM-I-P wurde aus dem melanotischen Primärtumor eines Mannes etabliert. Der Tumor war am Rücken des Patienten lokalisiert und wurde als "superfiziell spreitend" klassifiziert. Die Läsion wies einen knotigen Anteil auf, der für die Kultivierung genutzt wurde. Die Primärkultur konnte erfolgreich in eine permanente Zell-Linie überführt werden. Die Zellen weisen *in vitro* einen "fibroblastoiden" Phänotyp auf und bilden bisweilen "Dome", Areale, in denen die Zellen vielschichtig übereinander wachsen. Die Splittung der Kultur erfolgte alle 10 Tage in einem Verhältnis von 1 : 20. Die Zell-Linie ist tumorigen in der Nacktmaus.

B. MM-II-M

MM-II-M wurde aus der Lymphknotenmetastase einer Frau etabliert. Die Metastase zeigte sich als amelanotisch. Klassifizierung und Lokalisation des Primärtumors war hier und bei den anderen Metastasen nicht auszumachen, da die Patienten nicht in Heidelberg vorbehandelt waren. Auch hier war die Entwicklung einer permanenten Zell-Linie möglich.

Die Zellen zeigen *in vitro* einen "fibroblastoiden" bis triangularen Phänotyp. Die Unterkultivierung der Kultur erfolgte alle 10 Tage bei einer Splittung von anfangs 1 : 3, später, in Folge eines besseren Wachstumsverhaltens, 1 : 10. Die Zellen sind tumorigen in der Nacktmaus.

C. MM-III-M

MM-III-M entstammt der Lymphknotenmetastase eines Mannes. Die Läsion war stark melanotisch. Die Zellen ließen sich nicht über die ersten Passagen hinaus kultivieren, da sie von Stromazellen rasch überwachsen wurden. Jedoch ließ sich über *in vivo*-Passagierung eine permanente Zell-Linie entwickeln. Die Zellen zeigen *in vitro* einen "fibroblastoiden" bis bipolaren Phänotyp. Die Zellen lassen sich alle 10 Tage in einem Verhältnis von 1 : 10 splitten.

D. MM-IV-P

MM-IV-P wurde aus einem "nodulären", melanotischen, primären Melanom eines Mannes kultiviert. Der Tumor war am linken Unterschenkel des Patienten lokalisiert. Die Kultur konnte nur über einige Passagen gehalten werden und ging dann an Stromazell-Überwuchs zugrunde. Wie bei MM-III-M ließ sich über Mauspassagierung eine permanente Zell-Linie entwickeln, welche alle 10 Tage in einem Verhältnis von 1 : 50 unterkultivierbar war.

E. MM-V-M

MM-V-M wurde aus einer amelanotischen Lymphknotenmetastase einer Frau kultiviert und ließ sich als permanente Zellkultur halten. Die Zellen besitzen *in vitro* einen "epitheloiden" Phänotyp. Die Kultur ist alle 10 Tage in einem Verhältnis von 1 : 20 unterkultivierbar. Die Zellen wurden wiederholt in die Nacktmaus injiziert, erwiesen sich jedoch als nicht tumorigen in diesem heterologen *in vivo*-System.

F. MM-VI-P

MM-VI-P entstammt einem primären, melanotischen Melanom eines Mannes, das an der linken Wange des Patienten lokalisiert war. Der Tumor wurde als "superfiziell spreitend" klassifiziert. Die Zellen dieses Tumors konnten nur kurze Zeit in Kultur gehalten werden und ließen sich auch nicht über Mauspassagierung von Stromazellen "reinigen", da sie in der Maus keine Tumoren bildeten. Die Zellen besaßen *in vitro* einen "fibroblastoiden" bis bipolaren Phänotyp.

2. Charakterisierung der etablierten Melanom-Zell-Linien

Neben den Kulturen, die selbst gewonnen wurden, kamen, aus Gründen besserer statistischer Absicherung, auch bereits etablierte Zell-Linien aus anderen Labors für die cytogenetische Analyse zur Anwendung.

Diese Linien sind alle metastatischen Ursprungs und schon längere Zeit in Kultur, so daß genauere Patientendaten nicht in Erfahrung zu bringen sind. Bis auf **MeWo** besitzen diese Zellen ein durchweg höheres Wachstumspotential als die selbst etablierten Kulturen, so daß sie alle 10 Tage bei einer Splittung von 1 : 50 unterkultivierbar waren. **MeWo** konnte nur 1 : 10 unterkultiviert werden, um nach 10 Tagen nahe konfluent zu sein. Die Zellen sind *in vitro* alle amelanotisch und tumorigen im *in vivo*-System. Im Einzelnen waren dies folgende Zell-Linien:

A. Colo-38

Colo-38 stammt aus dem Labor von Dr. Ferron von der Colorado University, Valhalla, USA. Der Name Colo leitet sich von Colorado University ab. Die Zellen besitzen *in vitro* einen "fibroblastoiden" bis triangularen Phänotyp. Im Mediumüberstand finden sich viele abgelöste, lebende Zellen. Bei diesen "schwimmenden" Zellen handelt es sich nicht um Subpopulationen, denn ab gespülte und wieder angesetzte Zellen ergeben nach kurzer Zeit das gleiche Bild aus anhaftenden und schwimmenden Zellen.

B. Mel-Juso

Mel-Juso stammt aus dem Labor von Dr. J. Johnson von der Universität München. Die Zellen besitzen *in vitro* einen "epitheloiden" Phänotyp.

Die Zell-Linien **MeWo**, **A 375** und **Sk Mel 13 - 93** stammen aus dem Labor von Dr. J. Fogh am Sloan Kettering Institute, New York.

C. MeWo

MeWo wurde 1974 aus der Lymphknotenmetastase eines Mannes etabliert. Die Zellen besitzen einen "fibroblastoiden" bis triangularen Phänotyp.

D. A-375

A-375 besitzt *in vitro* einen "epitheloiden" Phänotyp.

- serumfreies Medium: 1,5 µg/ml Insulin (Sigma, St. Louis)
5,0 µg/ml Transferrin (Serva, Heidelberg)
in 4X MEM ohne Serumanteil

B. Zellkultur

- Nährmedium: Die Basis dieses Mediums entspricht dem von Eagle (1959) beschriebenen "minimum essential medium" (MEM), das nach den Angaben von Fusenig und Worst (1975) modifiziert wurde. Zusätzlich zum Basismedium enthält es die vierfache Konzentration essentieller Aminosäuren und Vitaminen, 4% nicht essentielle Aminosäuren und 1% Glutamin (alle Seromed, München). Weiterhin enthält das Medium 10 - 15% hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum (FCS)(Boehringer, Mannheim), 100 E/ml Penicillin und 500 E/ml Streptomycin (beide Seromed, München).
- Kulturschalen: 6 oder 10 cm Durchmesser (Falcon, Becton Dickinson New Jersey)
- Brutschrank: Forma Scientific Modell 3029; justiert auf 37° C, 5% CO₂-Atmosphäre und 98% Luftfeuchtigkeit

C. Chromosomenpräparation:

- Arretieren der Metaphasen: 1-4 µg/ml Colcemid (Fluka AG, Neu Ulm), je nach Methode in Kulturmedium, EDTA/Trypsin-Lösung oder HEPES-Hypotonie
- Hypotonie:
 - a) 56 mM KCl (Merck, Darmstadt) in H₂O
 - b) 3 Teile 75 mM KCl in H₂O
1 Teil FCS
 - c) 3,0 g KCl
0,2 g EGTA (Ethylen Glycol Tetraessigsäure) (Serva, Heidelberg)
4,8 g HEPES (Hydroxyethylpiperazin Ethansulfon- säure)
(Sigma, St. Louis)
ad 1 l H₂O pH7,4

- Fixierung: a) 3 Teile Methanol (J.T. Baker Chemicals B.V., Derenter)
1 Teil Essigsäure (Serva, Heidelberg)
- b) 7 Teile Methanol
3 Teile Essigsäure

D. Bänderungsverfahren

- G-Bänderung: Trypsinierungslösung (zum Erzeugen der Bandenmuster)
0,0125 - 0,05% Trypsin (Boehringer, Mannheim oder Serva,
Heidelberg)
in PBS, pH 7,36, 35 oder 37° C

GNK - Lösung (zum Stoppen der Trypsinaktivität)

1,0 g Glucose
0,4 g KCl
8,0 g NaCl
0,35 g NaHCO₃ (alles Merck, Darmstadt)
ad 1 l H₂O

Färbungslösung

2% Giemsa (Merck, Darmstadt)
in Sörensenpuffer, pH 6,8

Sörensenpuffer

0,484 g KH₂PO₄
0,533 g Na₂HPO₄ (beides Merck, Darmstadt)
ad 1 l H₂O

- C-Bänderung: 1. Denaturierungsschritt
0,1 - 0,2 N HCL (Merck, Darmstadt)
2. Denaturierungsschritt
5,0 g Ba(OH)₂ (Merck, Darmstadt)
ad 1 ml H₂O

3. Denaturierungsschritt, 2X SSC

0,3 M NaCl

0,03 M Na-Citrat (Merck, Darmstadt)

Färbungslösung

8 - 15% Giemsa

in Sörensenpuffer, pH 6,8

- NOR-Färbung: 1. 50% AgNO₃ (Merck, Darmstadt)
in H₂O

2. 2% Giemsa

in Sörensenpuffer, pH 6,8

- SCE-Färbung: 1. Hoechstfärbung
1% Hoechstfarbstoff (Sigma, St. Louis)
in Sörensenpuffer, pH 6,8

2. Färbungslösung

% Giemsa

in Sörensenpuffer, pH 6,8

E. Karyotypierung

- Mikroskop: Leitz Orthoplan
- Photomaterial: AGFA Ortho 25
- Photopapier: AGFA Broviera Speed BW 310 PE, Härtegrad 1

Die speziellen Lösungen für die Molekularbiologie werden, aus Gründen der Übersichtlichkeit vor den einzelnen Prozeduren genannt.

b. Methoden

1. Anzüchten humaner Melanome

A. Isolierung und Anzuchtung von Melanom-Zellen

Zur Erhaltung größtmöglicher Zellvitalität wurde das Tumormaterial schnell der Aufarbeitung zugeführt. Bei der Aufarbeitung der Tumore, insbesondere der Primärtumore, besteht immer die Gefahr, Infektionen in die Folgekultur zu tragen; so wurde das Exodat 10 mal hintereinander in frischem PBS gespült, um mögliche Keime zu eliminieren.

Gerade bei der Anzüchtung von Melanomen ist es wichtig, möglichst reine Tumorzellpopulationen zu bekommen. Um dies zu erreichen, wurden die Tumoren erst von bindegewebigen Anteilen befreit und anschließend mit einer Schere grob zerkleinert. Sichtbare Gefäßanteile wurden entfernt und die Tumorstücke mit einem Skalpell auf eine Kantenlänge von ungefähr einem Millimeter zurechtgeschnitten. Um bei der Aufarbeitung keine Infektionen in das Material zu tragen, wurde das Präparationsbesteck häufig gewechselt. Die Arbeiten erfolgten, aus Gründen des Personenschutzes und zur Schaffung einer sterilen Umgebung, unter einer sterilen Werkbank (Biohazard Laminar Flow).

Für die weitere Aufarbeitung zur Kultivierung kamen 4 verschiedene Methoden zur Anwendung, um die Chancen für eine erfolgreiche Anzüchtung zu erhöhen. Je nach Größe des erhaltenen Tumormaterials wurden verschiedene Methoden gleichzeitig durchgeführt.

1. Die Explantatkultur der Tumorstücke
2. Die mechanische Dissoziation mit einem Metallsieb
3. Die Dissoziation durch EDTA/Trypsinbehandlung über Nacht bei 4° C
4. Eine Vereinzelung der Zellen durch Collagenasebehandlung über Nacht bei 37° C

- zu 1.) Die Tumorstückchen wurden in Kulturschalen von 6 cm Durchmesser gesetzt und ca. 10 min. antrocknen gelassen. Danach wurde jedes Stückchen mit einigen Tropfen FCS überschichtet, und für einige Stunden im Brutschrank belassen. Hierdurch haften die Tumorstückchen am Schalenboden an. Die Schalen wurden mit Kulturmedium gerade soweit beschichtet, daß die Stückchen nicht aufschwammen. Um ein vermehrtes Wachstum von Stromazellen zu verhindern, mußten die Stückchen nach Auswachsen der ersten Melanomzellen entfernt werden. Dies konnte in der Regel nach 5 - 7 Tagen erfolgen.
- zu 2.) Bei der mechanischen Dissoziation kamen die Tumorstückchen auf ein engmaschiges Metallsieb, durch das sie mit einem Einmalspritzenkolben gedrückt wurden. Zelltrümmer und -klumpen ließen sich durch zweimaliges Zentrifugieren eliminieren. Das Zellsediment wurde in Kulturmedium aufgenommen und jeweils 2×10^6 Zellen in 6 cm Kulturschalen angesetzt. Durch gründliches Spülen der Kulturschalen am nächsten Tag ließen sich tote Zellen entfernen.
- zu 3.) Bei dieser Methode erfolgte die Dissoziation der Zellen durch EDTA/Trypsin-Behandlung über Nacht im Kühlschrank bei 4° C. Durch starkes Pipettieren am nächsten Tag ließen sich die Zellen vereinzeln. Die Eliminierung von Zelltrümmern und Klumpen erfolgte durch Filtrieren mit einem Gazefilter und anschließendes zweimaliges Zentrifugieren. Die Zellen wurden wie in 2. beschrieben kultiviert.
- zu 4.) Hier kam statt der EDTA/Trypsin-behandlung die Behandlung mit Collagenase bei 37° C über Nacht im Brutschrank zur Anwendung. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie in 3. beschrieben.

Die verschiedenen Methoden wurden hinsichtlich der Zahl vitaler Zellen und ihrer Angangsrate verglichen. Generell ist zu sagen, daß keine Methode eindeutige Vorteile aufwies, sondern die jeweilige Angangsrate von dem Tumormaterial abhing, so daß sie entweder alle gute Ergebnisse brachten oder alle versagten.

B. Elimination bzw. Kontrolle der Stromazellen

Die Primär- und ersten Unterkulturen werden häufig schnell von Stromazellen überwachsen. Diese Stromazellen lassen sich nicht, wie etwa bei Kulturen epithelialen Ursprungs, durch differentielle Trypsinierung entfernen, da Melanocyten und Stromazellen ähnlich sensitiv auf eine Trypsinbehandlung reagieren. Aus diesem Grund wurden verschiedene Kulturbedingungen daraufhin getestet, ob sie möglicherweise das Wachstum von Stromazellen selektiv, zugunsten der Melanomzellen, hemmen oder diese in ihrem Wachstum stimulieren. Dazu wurden verwandt:

1. Die Beschichtung der Kulturschalen mit einer Kollagenlösung
2. Die Verwendung von "feeder layer" letal-bestrahlter 3T3-Zellen
3. Die Verwendung eines spezifischen Mediums (TIC)
4. Die Verwendung serumfreien Mediums mit Wachstumsfaktoren
5. Die Anwendung von konditioniertem Medium aus Melanom-Kulturen

Zu 1.) Die Idee bei dieser Methode war, den Melanomzellen, die präparationsbedingt in der Überzahl sein sollten, durch günstigere Milieubedingungen einen Wachstumsvorteil gegenüber den Stromazellen zu verschaffen. Die Kulturschalen wurden mit Typ I Kollagen (nach essigsaurer Extraktion aus Rattenschwänzen) beschichtet. Dazu wurden 2 ml Kollagenlösung (0,1 mg/ml Kollagen in 0,1% Essigsäure) pro 6 cm Schale gegeben und für 2 Stunden bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgenommen und die Schalen zweimal mit PBS gespült. Die Schalen konnten direkt verwendet werden oder aber mit PBS überschichtet einige Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden. Die Melanomzellen zeigten zwar ein deutlich verbessertes Anwachsverhalten, jedoch ließ sich das Fibroblastenwachstum nicht unterdrücken.

zu 2.) 3T3-Zellen, die mit 5000 rd letal bestrahlt wurden, sollen das Wachstum von nicht transformierten Fibroblasen selektiv hemmen, wie dies von Rheinwald und Green (1975) für die Kultivierung von Keratinocyten beschrieben wurde. 3T3-Zellen, die mit der angegebenen Dosis bestrahlt sind, können zwar in Kultur überleben, sind aber nicht mehr zur Zellteilung befähigt, so daß sie die Primärkultur nicht überwachsen können. Deshalb wurden die isolierten Melanomzellen mit 3×10^5 (pro 6 cm

Kulturschale) bestrahlten 3T3-Zellen kokultiviert. Diese Bedingungen vermochten das Fibroblastenwachstum ebenfalls nicht einzuschränken.

- zu 3.) Nach Halaban, R. et al (1986) soll TIC-Medium selektiv das Wachstum von Melanocyten begünstigen. Dieses Medium wurde entsprechend den Angaben zusammengestellt. Bereits mit Fibroblasten "kontaminierte" Kulturen ließen sich in diesem Medium nicht "reinigen", auch hatte dieses Medium keinen hemmenden Einfluß auf das Fibroblastenwachstum in Primärkulturen. Steter Anstieg der IBMX-Konzentration führt schließlich zum Absterben von Fibroblasten als auch der Melanom-Zellen und Fibroblasten. Anzumerken bleibt hier, daß die Gabe von TPA, aufgrund seines clastogenen Effektes, für cytogenetische Untersuchungen nicht ratsam erschien.
- zu 4.) Nichttransformierte Fibroblasten und Melanocyten sind zum Wachstum auf Serumkomponenten angewiesen, wogegen nach Dennis, M. et al (1986) zumindest die NEL-M1 Melanom-Zell-Linie ohne Zugabe von fötalem Rinderserum, aber in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren wachsen kann. Ein entsprechendes Medium wurde zuerst an bereits etablierten Melanom-Zell-Linien getestet, was zu deutlicher Wachstumshemmung führte. Fibroblasten-kontaminierte Kulturen kamen unter solchen Bedingungen zum Wachstumsstillstand und die Zellzahl nahm kontinuierlich ab.
- zu 5.) Zur Testung eines möglichen Einflusses von Wachstumsfaktoren aus Melanom-Zell-Linien auf Primärkulturen wurde 2 Tage altes Medium einer subkonfluenten Kultur der Zell-Linie **MM-I-P** für die Kultivierung einer Primärkultur verwendet. Zur Verhinderung von Kreuzkontaminationen wurde das Medium sterilfiltriert. Die Gabe dieses Mediums zu Primärkulturen führte, bei täglichem Wechsel, zu keinem für Melanomzellen selektiven Wachstumsschub. Fibroblastenüberwuchs machte das Weiterverfolgen des Versuchs über eine Woche hinaus unmöglich.

2. Zellkultur

Der Ansatz der Zellen aus Primär- und Unterkultur erfolgte in Kulturschalen von 6 oder 10 cm Durchmesser. Als Nährmedium diente 4x MEM (bei 6 cm-Schalen 5ml, bei 10 cm-Schalen 10 ml). Das Medium wurde zweimal in der Woche erneuert.

Die Passagierung der Dauerkulturen erfolgte in nahe konfluentem Zustand, d.h. der Zellrasen sollte noch nicht den ganzen Schalenboden bedeckt haben. Das Splittungsverhältnis der Kulturen wurde bei der Passagierung so eingestellt, daß dieser Zustand nach ca. 10 Tagen erreicht war.

Für die Passagierung wurde der Mediumüberstand aus den Schalen abgezogen und diese einmal mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit EDTA/Trypsin-Lösung für 1 bis 2 min. inkubiert (bei 6 cm Schalen 1 ml, bei 10 cm Schalen 2,5 ml), um diese vom Schalenboden abzulösen. Die jeweilige Trypsinierungszeit wurde durch phasenoptische Kontrolle bestimmt und die Zellen nach dem Ablösen durch Pipettieren suspendiert. Je nach Splittungsverhältnis wurde die entsprechende Menge an Zellsuspension in vorbereitete Kulturschalen gegeben und die Trypsinreaktion durch Mediumzugabe gestoppt.

Die eigenen Dauerkulturen wurden bis zur 30. Passage alle 5 Passagen, später alle 10 Passagen, auf cytogenetische Veränderungen hin untersucht.

3. Chromosomenpräparation

Zu Beginn der Studien wurden Präparationsmethoden, wie sie in unserer Arbeitsgruppe für Keratinocyten gebräuchlich sind, auf die Melanomkulturen übertragen.

Methode a: Die mitotischen Zellen werden durch Zugabe von Colcemid in das Medium in der Metaphase arretiert. Die Colcemidkonzentration beträgt 0,01 - 0,05 µg/ml. Die Dauer der Colcemid-Einwirkung (2-5 Std.) hängt von der Mitosehäufigkeit der Kultur ab, die durch phasenoptische Beobachtung ermittelt wird. Die Ablösung der Zellen aus der Kulturschale erfolgt durch Behandlung mit 0,2% EDTA (5 min.) und 0,1% EDTA/0,1% Trypsin (5 min.) (Jeweils bei 37° C im

Brutschrank). Die Zellen werden anschließend durch Pipettieren vereinzelt und die Trypsinaktivität durch Mediumzugabe gestoppt. Die Zellsuspension wird in 12 ml graduierte Glaszentrifugenröhrchen (Schott) überführt und herunterzentrifugiert (8 min., 800-1000 U/min., Heraeus Laborzentrifuge). Die Spreitung der Chromosomen erfolgt durch Behandlung mit hypotonischer Lösung (56 mM KCl). Hierzu verwirft man den Überstand bis auf 1,5 - 2,0 ml und suspendiert das Zellsediment. Die Zentrifugenröhrchen werden schrittweise auf 6 ml mit hypotonischer Lösung (Zimmertemperatur) aufgefüllt und vorsichtig pipettiert, damit keine Luftblasen entstehen, die beim Zerplatzen die Zellen schädigen könnten. Man läßt die Zellen für 10 min. schwellen und zentrifugiert sie anschließend ab. Nach der hypotonischen Behandlung erfolgt die Fixierung der Zellen. Der Überstand wird wieder bis auf 1,5 - 2,0 ml verworfen und das Zellsediment suspendiert. Das Fixierungsgemisch (3 Teile Methanol, 1 Teil Essigsäure) (Zimmertemperatur) gibt man in Schritten von einem Milliliter bis insgesamt 6 ml zu und verschließt die Röhrchen, um Verdunstung zu verhindern. An die erste Fixierung schließt sich nach Zentrifugation eine 2., evtl. eine 3., für jeweils 30 min. an.

Methode b: Diese Prozedur erfolgt in Anlehnung an die von Atkins (1979) beschriebene Methode. Hierbei werden die Zellen gleichzeitig vom Schalenboden abgelöst und die Mitosen arretiert. Nach Abziehen des Mediumüberstandes werden die Zellen mit 0,2% EDTA mit 1 µg/ml Colcemid (2,5 ml) für 15 min. im Brutschrank vorinkubiert, hiernach werden 2,5 ml 0,2% Trypsin mit 1 µg/ml Colcemid hinzugegeben und weitere 15 min. inkubiert. Durch Pipettieren lassen sich die Zellen suspendieren, die Trypsinaktivität wird durch Mediumgabe gestoppt. Nach Überführung in Zentrifugenröhrchen und Zentrifugation erfolgt die hypotonische Behandlung (3 : 1, 75mM KCl : FCS) für 10 min. Hieran schließt sich die Fixierung wie oben beschrieben an (Verhältnis Methanol : Essigsäure, 7 : 3).

Bei beiden Methoden werden die Zellen schließlich auf Objektträgern ausgeblasen, die vorab mit Äthanol gereinigt wurden.

Da beide Methoden für die Analyse der Melanomzellen keine befriedigenden Ergebnisse lieferten, wurde eine neue Prozedur, in Anlehnung an die von Gibas et al (1984) beschriebene, entwickelt:

Methode c: Die Zellen werden für 20 min. im Nährmedium mit Colcemid vorbehandelt (1 - 6 µg/ml). Nach Abziehen des Mediums werden 5 ml einer HEPES-stabilisierten hypotonischen Lösung in die Schalen gegeben und diese für 30 min. im Brutschrank bei 37° C inkubiert. Durch den EGTA-Anteil in der hypotonischen Lösung erfolgt neben der Schwellung der Zellen auch deren Ablösung vom Schalenboden. Nach der hypotonen Behandlung werden die Zellen vorsichtig pipettiert und in Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation erfolgt die Fixierung wie oben beschrieben (Methanol : Essigsäure, 7 : 3). Hiernach wurden die Zellen auf 4° C kalte, nasse (H₂O bidest.) Objektträger aufgetropft.

Die kurze Behandlungszeitzeit mit hoher Colcemidkonzentration führt zu hoher Metaphasenausbeute, mit gut getrennten Chromosomen. Durch die HEPES-Hypotonie wird der zellschädigende Einfluß von Trypsin beim Ablösen der Zellen verhindert. Es resultieren lange, gerade Chromosomen, die sich in der Regel gut bändern lassen.

4. Bänderungstechniken

a) G-Bänderung

Das wichtigste Bänderungsverfahren ist die G-Bänderung, da sie, durch Erzeugung eines für jedes Chromosom spezifischen Bandenmusters, die individuelle Identifizierung von Chromosomen und Chromosomenaberrationen ermöglicht. Das Verfahren beruht auf einer unterschiedlichen Sensitivität gegenüber Trypsin in den verschiedenen Chromosomenbereichen. Je nach Mitosestadium (späte Prophase bis späte Metaphase) ist eine unterschiedliche maximale Bandenzahl möglich (1600 - 450

pro normalem diploiden Genom). Im Durchschnitt wird eine maximale Bandenzahl von 450 - 650 erhalten.

Vor Anwendung des Bänderungsverfahrens müssen die Chromosomen auf den Objektträgern "altern", in der Regel mehr als eine Woche. Alternativ ist ein "altern" durch Inkubation der Objektträger bei 60° C für 1 - 3 Tage möglich. Das "Altern" ist erforderlich, um die Trypsinsensitivität zu erniedrigen, und um klarere Banden zu erhalten.

Nach "Alterung" erfolgt eine Trypsinbehandlung (0,0125 - 0,05% Trypsin in PBS pH 7,36) für 20 sec. bis 3 min. bei 35 oder 37° C. Die Trypsinreaktion läßt sich durch GNK-Behandlung (15 sec.) stoppen. Anschließend erfolgt die Färbung der Objektträger mit 2 - 3% Giemsa (Merck, Darmstadt) in Sörensenpuffer pH 6,8 für 4-8 min. Die genauen zeitlichen Bedingungen erwiesen sich als unterschiedlich, je nach Ausgangsmaterial und mußten für die jeweiligen Kulturen vorher durch Probebänderungen ermittelt werden.

b) C-Bänderung

Bei der C-Bänderung wird nur das zentromer-nahe Heterochromatin der Chromosomen gefärbt. Dies ist z.B. wichtig zum Erkennen multizentrischer Chromosomen oder pericentrischer Inversionen. Die Prozedur beruht auf der selektiven Denaturierung des Euchromatins, die in mehreren Schritten erfolgt:

1. Inkubation für 1/2 Std. in 0,1 - 0,2 N HCl, anschließend Spülen mit Leitungswasser und Trocknen.
2. Eintauchen für 8 - 20 sec. (je nach Alter der Objektträger) in eine gesättigte Ba(OH)₂ -Lösung, bei 87° C, anschließend gründlich mit Leitungswasser spülen.
3. Inkubation für 1- 2 Std. in 2x SSC bei 60° C.
4. Färbung in 8 - 15% Giemsa in Sörensenpuffer pH 6,8 für 8 - 20 min..

c) NOR-Färbung

Bei der NOR-Färbung wird die Nucleolus-Organisator-Region (NOR), die auf den acrocentrischen Chromosomen (13, 14, 15, 21, 22) liegt markiert. Die Methode beruht auf der Affinität der NORs für Silbernitrat und dient dem Erkennen der Beteiligung von acrocentrischen Chromosomen an strukturellen Aberrationen.

1. Überschichtung der Objektträger mit AgNO_3 -Lösung für 20 Std. in einer feuchten Kammer, um Austrocknung zu vermeiden, bei 37°C oder 1/2 - 6 Std. bei $60 - 80^\circ\text{C}$.
2. Färbung für 1 - 2 min. in 2% Giemsa in Sörensenpuffer pH 6,8.

d) SCE-Färbung

Durch die SCE (sister chromatid exchange) - Färbung läßt sich die Austauschrate homologer Chromatiden ermitteln. Über die Häufigkeit des Vorkommens solcher Austausche, können Rückschlüsse auf die genomische Stabilität einer Zellkultur gezogen werden. Eine Austauschrate von 5% (5 Austausche auf 100 untersuchte Chromosomen) gilt als normal.

Man läßt die Zellen für zwei Zellcyclen (ca. 44 Std.) in Anwesenheit von Bromdesoxyuridin (Serva, Heidelberg) wachsen und nimmt anschließend eine Chromosomenpräparation vor. Bromdesoxyuridin wird als Strukturanalogon für Thymidin in der S-Phase des ersten Zellzyklusses in die DNA eines DNA-Stranges eingebaut. Während des zweiten Zellzyklusses erhält man so pro Chromosom eine doppelsträngig markierte und eine einsträngig markierte Chromatide, die sich unterschiedlich stark färben.

Die Objektträger werden nach der Präparation für 15 min. mit Hoechstfarbstoff (Sigma, St Louis) (1,5 ml auf 150 ml Sörensenpuffer pH 6,8) behandelt und anschließend mit H_2O gespült. Hieran schließt sich eine 45 minütige UV-Bestrahlung an, um den Farbstoff zu binden, die Objektträger sind dabei mit Sörensenpuffer pH 6,8 bedeckt. Hierauf folgt eine 60 minütige Denaturierung mit 2x SSC bei 59°C . Nach Färbung (4% Giemsa in Sörensenpuffer, 15 min.) erhält man Chromatiden mit unterschiedlicher Farbintensität (die Chromatide mit

Bromdesoxyuridin erscheint heller), und Chromatidaustausche werden sichtbar. Eine Austauschrate von 5% (5 Austauschereignisse auf 100 untersuchte Chromosomen) gilt als "normal".

Eine sehr gute Zusammenfassung aller Präparations- und Bänderungstechniken findet sich in: Sharma A. K. and Sharma A., Chromosome Technics - Theory and Practice, Butterworths, 1986.

5. Karyotypierung

Metaphasen, die eine gute Bänderung, keine oder wenige Überkreuzungen und lange, gerade Chromosomen aufweisen, werden bei 1000-facher Mikroskopvergrößerung unter Verwendung von Ölimmersion photographiert. Anschließend werden sie fotografisch auf eine Endvergrößerung von ca. 2500 gebracht und unter Standardbedingungen entwickelt und fixiert. Nach dem Ausschneiden der einzelnen Chromosomen erfolgt das Arrangieren von Karyogrammen nach Maßgabe der "ISCN" (1985) (An International System for Human Cytogenetics Nomenklatur). Für jede Analyse wurden mindestens 20 Karyogramme gefertigt und im Hinblick auf numerische und strukturelle Veränderungen ausgewertet. Die Berechnung der Über- bzw. Unterrepräsentierungen erfolgte durch Summation der jeweiligen p- oder q-Arme aus normalen und aberranten Chromosomen. Alles, was um mehr als 25% vom arithmetischen Mittel abwich, wurde als Über- bzw. Unterrepräsentierung festgehalten.

6. Tierversuche

Zur Testung der Einflüsse eines heterologen *in vivo*-Systems auf die cytogenetische Stabilität der Melanomlinien wurden 3 verschiedene Linien (**MM-I-P**, **MM-II-M** und **MM-III-M**) in die thymuslose Balb/c (nu/nu) Nacktmaus gespritzt. Nach jeweiliger Rekultivierung der Injektionstumoren wurden die entstandenen Sublinien in zwei weiteren Zyklen ins Tier gegeben. Jeweils 1×10^6 Zellen wurden in 50 μ l Kulturmedium subcutan unter die Rückenhaut der Tiere gespritzt. Vergleichsweise wurden auch Zellen intracutan injiziert, was aber keinen Einfluß auf das Tumorwachstum hatte. Das Tumorwachstum wurde durch Palpation verfolgt. Die Tiere wurden so lange als möglich beobachtet, in der Regel 6 - 8 Wochen. Die Latenzzeit, bis zum Auftreten eines erkennbaren Tumors betrug ca. 10 - 14 Tage. Für die Entnahme der

Tumoren wurden die Tiere in einer Äther-Atmosphäre getötet. Leber und Lunge wurden makroskopisch auf Metastasen inspiziert und Teile des Tumors für die histologische Aufarbeitung in 2,5% Formalin fixiert.

7. Anzucht von Injektionstumoren

Die Anzucht von Zellen aus Injektionstumoren ist im Vergleich zur Etablierung neuer Zell-Linien aus Humantumoren problemlos. Der entnommene Tumor wird zur Wahrung der Sterilität 10 mal hintereinander in frischem PBS gespült, sorgfältig von Bindegewebe und Gefäßen befreit und mit einer Schere zerkleinert. Da das Injektionstumorgewebe sehr weich ist, läßt es sich leicht mit einem Einmalspritzenkolben durch ein Metallsieb drücken, wodurch eine Zellsuspension entsteht. Die Entfernung von Zellklumpen und -trümmern erfolgt durch Filtration durch Gaze und anschließendes zweimaliges Zentrifugieren. Pro 6 cm Schale wurden 2×10^6 Zellen angesetzt und am nächsten Tag gründlich gespült.

Zwischen der 1. und 5. *in vitro*-Passage erfolgte erneut eine *in vivo*-Propagierung durch subcutane Injektion und folgende erneute Entnahme des Tumors und Wiederanzüchten in Kultur. Dieser Zyklus wurde insgesamt dreimal bei den drei Zell-Linien durchgeführt.

8. Southern- und Northern-Blot-Analyse

Die Southern-Blot-Analyse zeigt die Anwesenheit bestimmter genomischer DNA und anhand der relativen Stärke des Signals kann man auf deren Quantität rückschließen. Überrepräsentierungen von Genmaterial können z.B. durch Polysomien, Duplikationen oder Amplifikationen hervorgerufen werden. Durch Northern-Blot-Analyse kann die mögliche RNA-Expression und der jeweilige Grad der Expression nachgewiesen werden. Beide Methoden beruhen auf dem gleichen Prinzip, nämlich der Hybridisierung von DNA bzw. RNA mit radioaktiv markierten Genstücken und anschließender Autoradiographie. Zur Durchführung der Analyse muß die DNA und RNA aus den Zellen herauspräpariert und in wässrige Lösung gebracht werden. Hierzu ist die Phenolextraktion die Methode der Wahl. Bei der Linie **MM-III-M** konnte diese Methode jedoch nicht angewandt werden, da hier die DNA und RNA aufgrund einer unerklärlich hohen Dichte im ersten Zentrifugationsschritt in die Phenolphase überführt wurden und somit verloren gingen. Aus diesem Grund kam hier die Extraktion durch Guanidiniumisothiocyanat mit anschließender Trennung der Nucleinsäuren im CsCl-Gradienten zur Anwendung. Beide Methoden werden im Folgenden aufgeführt:

a) Phenolextraktion

- Lösungen:
- PBS
 - Lysispuffer: 0,3 M Na-Acetat (Serva, Heidelberg)
0,5% SDS (Na-Dodecylsulfat, Serva, Heidelberg)
2 mM EDTA
 - Phenol (äquilibriert mit 0,5 M Na-Acetat pH 7,5)
 - Sevag: 24 Teile Chloroform
1 Teil Isoamylalkohol
 - H₂O bidest steril
 - Ethanol abs. -20° C
4 M LiCl
 - TE: 20 mM Tris/HCl pH 7,4
1 mM EDTA

1. Das Medium wird aus den Schalen pipettiert, und diese zweimal mit isotonischem Puffer (PBS) gespült, um tote Zellen und mögliche Serumreste zu entfernen.

2. Die Zellen werden durch Zugabe von 1,5 ml Lysispuffer aufgebrochen. Die gleichzeitige Zugabe von 3,5 ml Phenol führt zur Denaturierung der RNAsen und DNAsen. Die Zellen lösen sich hierauf vom Schalenboden ab und werden in 50 ml-Kunststoffzentrifugenröhrchen (Falcon, Becton Dickinson) überführt und für 18 min. geschüttelt.
3. Die Zugabe des gleichen Volumens "Sevag" und anschließendes 15-minütiges Schütteln überführt DNA und RNA in die Chloroformphase (Isoamylalkohol verhindert die Schaumbildung der Proteine).
4. Nach dem Schütteln schließt sich ein Zentrifugationsschritt (10 min., 2500 g, 4° C, Heraeus Variofuge RF) an. Die Unterphase (Phenolphase) wird verworfen.
5. Es wird erneut das gleiche Volumen "Sevag" zugegeben, 10 min. geschüttelt und zentrifugiert.
6. Die Oberphase wird vorsichtig abgenommen und in ein neues Zentrifugenröhrchen gegeben. Durch Zugabe des doppelten Volumens Ethanol abs. erfolgt die Fällung von DNA und RNA bei -20° C über Nacht.
7. Am folgenden Tag wird für 20 min. zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet für 30 - 60 min. getrocknet.
8. Das Pellet wird in 0,5 ml sterilem H₂O bidest aufgenommen, das gleiche Volumen 4 M LiCl zugegeben und in 15-ml-Corex-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Röhrchen verbleiben über Nacht bei 4° C im Kühlschrank. Durch die 2 M LiCl-Lösung erfolgt ein selektives Ausfällen der RNA.
9. Die RNA läßt sich durch 40-minütige Zentrifugation (27.000 g, Sorvall RC 2 B, Rotor SS34) abtrennen. Der Überstand (DNA) wird in ein neues Zentrifugenröhrchen gegeben und durch Zugabe von 2 Teilen Ethanol abs. über Nacht bei -20° C gefällt. Das Pellet (RNA) läßt man 1 - 2 Std. auf Eis trocknen und löst es in ca. 500 µl sterilem H₂O bidest. Die RNA-Lösung wird bei -80° C aufbewahrt.

10. Die DNA wird am folgenden Tag herunterzentrifugiert, das Pellet in 500 µl TE gelöst und bei -20° C aufbewahrt.

b) Extraktion mit Guanidiniumisothiocyanat

- Lösungen:
- CsCl-Kissen: 95,97 g CsCl (Serva, Heidelberg)
2,5 ml 1 M Na-Acetat, pH 5,4
ad 100 ml H₂O
 - GTC-Puffer: 50 g GTC (Guanidiniumisothiocyanat)
0,5 g N-Laurylsarcosin, Na-Salz
2,5 ml 1 M Na-Citrat, pH 7,0
0,7 ml 14 M Mercaptoethanol
0,33 ml Antifoam 30%
ad 100 ml H₂O
mit NaOH auf pH 7,0 einstellen
 - H₂O bidest steril
 - Ethanol abs. -20° C
 - PBS

1. Die Zellen werden zweimal mit PBS gespült.
2. Jede 10 cm Schale erhält 4 ml GTC-Puffer zum Denaturieren von DNAsen und RNAsen.
3. Die Zellen werden mit einem Gummispatel vom Schalenboden geschabt und 5-6 mal durch Aufziehen in eine Spritze mit Edelstahlkanüle geschert, um die Viskosität zu vermindern.
4. In 12 ml Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) legt man ein 3,5 ml CsCl-Kissen vor und gibt darauf vorsichtig 6,5 ml Zellsuspension. Um ein Kollabieren der Röhrchen zu verhindern wird die Zellsuspension mit Paraffinöl überschichtet, die Röhrchen austariert und verschlossen.

5. Nach 20- bis 24-stündigem Zentrifugieren (31.000 U/min., 20° C, Beckmann Ultrazentrifuge L5'65, Rotor Beckman SW 40) haben sich DNA, RNA und Proteine im Dichtegradienten getrennt. Die Proteine finden sich zuoberst, etwa in der Mitte des Röhrchens, in einer scharfen Bande. Die DNA befindet sich in wolkiger Form etwa im unteren Drittel des Röhrchens. Der Überstand wird bis hierhin verworfen. Die DNA-Fraktion wird in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit doppeltem Volumen H₂O verdünnt, um ein Ausfallen des CsCl im nächsten Schritt zu verhindern. Die DNA läßt man im Weiteren durch Zugabe von 2 Teilen Ethanol über Nacht fällen.

Die RNA befindet sich im Pellet des Ultrazentrifugenröhrchens. Sie löst man sorgfältig in 200 µl H₂O und bewahrt es bei -80° C auf. Anschließend wird die DNA durch Zugabe von 2 Teilen Ethanol über Nacht bei -20° C gefällt.

6. Die DNA wird am nächsten Tag abzentrifugiert (Heraeus Variofuge RF, 20 min., 2.500 g), das Pellet getrocknet und in H₂O gelöst.

Um vergleichende Aussagen über DNA- und RNA-Gehalt machen zu können, ist es notwendig, die Konzentration der Lösungen zu kennen. Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA erfolgt photometrisch (LKB Ultrospec II). Hierbei wird die Absorption der Lösung bei 260 nm gegenüber dem Lösungsmedium (H₂O bzw. TE) gemessen.

1 OD entspricht 40 µg/ml RNA bzw. 50 µg/ml DNA. Gleichzeitig läßt sich die Proteinverunreinigung durch Messung der Absorption bei 280 nm messen. Bei einer sauberen Präparation liegt der Quotient aus der Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm über 1,8.

A. Northern-Blot-Analyse

1. Gelelektrophorese

Lösungen:

- Laufpuffer (FAE): Ansatz 10-fach konzentriert
0,4 M MOPS (Morpholinopropansulfonsäure, Serva, Heidelberg)
100 mM Na-Acetat
10 mM EDTA
pH 7,0
- Formaldehyd (Serva, Heidelberg)
- FA-Mix: 2 ml FAE (5-fach konzentriert)
3 ml Formaldehyd (37%)
10 ml Formamid
- Sample buffer: 50% Glycerin (80%)
1 mM EDTA
0,4% Bromphenolblau

Zu Beginn der Analyse erfolgt eine elektrophoretische Auftrennung der Gesamt-RNA in Flachgelen.

Für ein Gel mit 2x 20 Taschen benötigt man 200 ml Lösung. 2,8 g Agarose werden in 143 ml H₂O im Mikrowellenherd geschmolzen und nach Abkühlung auf etwa 60° C mit 20 ml 10-fach konzentriertem Laufpuffer und 37 ml Formaldehyd sorgfältig gemischt. Formaldehyd verhindert die Schleifenbildung der RNA.

Pro Tasche werden 20 µg RNA mit dem 3-fachen Volumen FA-Mix versetzt und für 15 min. bei 55° C inkubiert. Nach Zugabe von 4 µl sample buffer läßt man die RNA für 15 - 16 Std. bei 20 V auftrennen.

Nach der Auftrennung erfolgt das Waschen des Geles:

1. 5x 1 min. in H₂O
2. 1x 5 min. in H₂O + 50 µl Ethidiumbromid (Färbung der RNA)
3. Photographieren des Geles unter UV-Licht zur Dokumentation

4. 1x 45 min. 50 mM NaOH/10 mM NaCl
5. 2x 20 min. 0,1 M Tris/HCl pH 7,5
6. 1x 10 min. 0,1 M Tris/HCl pH 7,5
7. 2x 30 min. 20x SSC

2. Blotten

Unter Blotten versteht man die Übertragung von DNA oder RNA auf eine Trägersubstanz (z.B. Nitrocellulose, Schleicher & Schüll BA 85).

Das Blotten erfolgt in Gelwannen, die als Transferpufferreservoir (2 x SSC) dienen. Beide Enden einer Bahn Whatman 3MM-Papier ragen über den Gelträger hinaus und nehmen die Flüssigkeit auf. Auf das 3MM-Papier legt man in dieser Reihenfolge das Gel, die Nitrocellulose, drei Lagen 3MM-Papier und mehrere Lagen Papierhandtücher. Beide Seiten der Gelwanne werden mit 10x SSC aufgefüllt. Unter Ausnutzung der Kapillarkräfte wird die RNA in den folgenden 24 Stunden mit dem Flüssigkeitsstrom auf die Nitrocellulose übertragen. Anschließend wird der Filter kurz in 6x SSC gespült und auf Papier getrocknet. Die kovalente Bindung von RNA an die Nitrocellulose erfolgt durch 4-stündiges Backen bei 100° C.

3. Hybridisierung

Hybridisiert wurde gegen die zellulären Proto-Oncogene **H-ras**, **K-ras**, **myc**, **mos**, **src** und **fos**.

Lösungen:

-Prähybridisierungslösung:

5 g Ficoll

5 g PVP 40 (Polyvinylpyrrolidon MG 40.000, Sigma, St. Louis)

5 g BSA (Rinderserumalbumin, Merck, Darmstadt)

25 ml 1 M TRIS pH 8,0 (Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Sigma St. Louis)

5 ml EDTA 0,5 M

100 µg/ml SSD (Lachssperma-DNA, Serva, Heidelberg)

ad 500 ml H₂O

-Hybridisierungslösung

1% SDS

1 M NaCl

10% Dextransulfat

100 µg/ml SSD

10 ng/ml radioaktive Proben-DNA, unmittelbar vorher denaturiert bei 95° C für 10 min.

Die gebackenen Filter werden in Plastikfolie eingeschweißt und je nach Filtergröße mit 5-10 ml Prähybridisierungslösung befüllt. Die Prähybridisierungslösung läßt man 24 Std. bei 68° C im Wasserbad inkubieren. Die Prähybridisierung dient der Absättigung des Nitrocellulosefilters ohne die spezifische Probe, um unspezifische Bindungen mit Fremd-DNA zu minimieren.

Nach abgeschlossener Prähybridisierung schneidet man die Folie an einer Kante auf und presst den Inhalt heraus. Die Filter werden mit Hybridisierungslösung beschickt und verschweißt. Die Hybridisierungslösung läßt man weitere 24 Std. bei 68° C im Wasserbad inkubieren.

Nach erfolgter Hybridisierung müssen die Filter gewaschen werden, um überschüssige und unspezifische Bindung zu entfernen.

-Waschen der DNA-Filter:

2xSSC/0,5% SDS einmal kurz spülen

2xSSC/0,1% SDS 15 min. schwenken

0,1xSSC/0,5% SDS 2x 60 min., 1x 30 min., bei 68° C im Wasserbad schwenken

-Waschen der RNA-Filter

2xSSC/0,5% SDS einmal kurz spülen

2xSSC/0,1% SDS 15 min. schwenken

1xSSC/0,5% SDS 2x 30 min., bei 68° C im Wasserbad schwenken

0,1xSSC/0,5% SDS 1x 30 min, bei 68° C im Wasserbad schwenken (den letzten

Schritt nur, wenn die mutmaßlich unspezifische Strahlung der Filter nach dem letzten

Waschgang eine Erhöhung der Stringenz erforderlich machten.)

Für DNA-, wie RNA-Filter gilt, daß man durch die Erniedrigung der Salz- (SSC-) Konzentration bzw. Erhöhung der Stringenz beim Waschen hochspezifische Proben-DNA-Bindungen selektiert.

Die Auftrennung erfolgt in einem 1%igen Agarose-TAE-Gel. Pro Tasche werden der Verdauansatz plus 1/6 des Gesamtvolumens 6x "sample buffer" aufgetragen, das Gel für 15 - 16 Std. bei einer Spannung von 20 V laufen gelassen und anschließend wie folgt gewaschen:

1. 15 min. Laufpuffer + 50 µl Ethidiumbromid
 2. unter UV-Licht photographieren
 3. 1x 15 min 0,25 M HCl (fragmentiert die DNA, Depurination)
 4. 2x kurz H₂O
 5. 2x 15 min. 0,2 M NaOH/0,6 M NaCl (Denaturierung)
 6. 2x 30 min. 1 M Tris/0,6 M NaCl pH 7,0 (Neutralisierung)
3. Blotten, Hybridisieren und Autoradiographie erfolgen wie bei A) beschrieben. Hybridisiert wurde gegen das zelluläre Proto-Oncogen **H-ras**.

IV. Ergebnisse

1. Phänotypische Charakteristika der Melanomzellen *in vitro*

Cytogenetische Direktpräparationen von soliden humanen Tumoren liefern, im Gegensatz zu den Hämoblastosen, bei denen dies leicht möglich ist, keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Da ein Tumor zu 80% aus Stromazellen bestehen kann, wird man hier überwiegend "normale", diploide Metaphasen erhalten, die eben diesen Zellen zuzurechnen sind. Auch ist die Qualität der Chromosomen, bedingt durch die lange, zellschädigende Aufarbeitung des Materials, oft so schlecht, daß komplizierte strukturelle Aberrationen nicht aufzudecken sind. Oft reicht es gerade zum Auszählen der Chromosomen. Aus diesem Grund wurden die cytogenetischen Analysen ausschließlich an abgeleiteten *in vitro*-Systemen durchgeführt. Im Untersuchungszeitraum konnten sechs solcher Systeme etabliert und analysiert werden (**MM-I-P** - **MM-VI-M**). Auf die Bezeichnung dieser Kulturen wurde bereits im Material- und Methoden-Teil eingegangen.

Aufgrund der bereits bei Material und Methoden geschilderten Problematik beim Anzüchten von Melanomen, bedingt durch die den Tumor begleitenden Stromazellen, war die Zahl der analysierbaren Kulturen beschränkt.

Im Vergleich zu diesen von uns etablierten Melanomkulturen, wurden acht weitere, in anderen Labors entwickelte Zell-Linien analysiert, die uns dankenswerterweise von Dr. Tilgen (Hautklinik Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurden. Hierbei ist jedoch besonders hervorzuheben, daß es sich bei den Fremmlinien ausschließlich um aus Metastasen gewonnene Kulturen handelt, wogegen bei den eigenen Kulturen drei aus Primärtumoren stammen. Zwei dieser Kulturen konnten jedoch nicht weiter verfolgt werden, da sie schnell an Stromazellüberwuchs zugrunde gingen.

Auf die wichtigsten Charakteristika der untersuchten Tumoren wurde bereits im Material- und Methoden-Teil detaillierter eingegangen.

Das phänotypische Erscheinungsbild der Melanomzellen in Kultur ist nicht einheitlich. Vielmehr können diese Zellen *in vitro* sehr unterschiedliche Formen annehmen. Es finden

sich alle Übergänge eines rein "epitheloiden" (**MM-V-M**) bis hin zu einem rein "fibroblastoiden" (**MeWo**) Phänotyp, wie dies in Abb. 1a-d stellvertretend für alle anderen wiedergegeben ist.

Abb. 1a zeigt das fibroblastoide Aussehen von **MeWo**. Die Zellen sind von bipolarer bis triangularer Gestalt und weisen an ihren Endigungen lange Zellausläufer auf. Kontaktinhibition ist nicht nachweisbar, d.h. die Zellen können, je nach Grad der Konfluenz, mehrschichtig wachsen. Mitotische Zellen sind, wie für Melanomzellen üblich, kreisrund und im Phasenkontrast hell aufleuchtend.

Abb. 1b zeigt eine Kultur von **Colo-38**. Die Zellen besitzen eine überwiegend bipolare Gestalt, ihre Endigungen tragen nur selten und wenn nur kurze Zellausläufer. Eine große Zahl lebender Zellen findet sich abgerundet, in Ketten zusammenhängend im Mediumüberstand. Hierbei handelt es sich nicht um verschiedene Subpopulationen, sondern lediglich um eine Variante der Zellmorphologie. Re kultivierte Zellen aus dem Mediumüberstand ergaben in Kürze das gleiche Bild wie die Ausgangskultur, d.h. anhaftende und schwimmende Zellen.

In Abb. 1c ist eine Kultur von **Sk Mel 93** wiedergegeben. Die Zellen bilden fischzugartige Muster und legen sich in konzentrischen Ringen mit ihren Breitseiten zueinander. Insgesamt entspricht das Bild dem einer humanen Fibroblasten-Kultur.

Abb. 1d zeigt eine Kultur von **MM-V-M**. Die Zellen weisen hier einen rein epitheloiden Phänotyp auf, d.h. sie zeigen radial keine erkennbare Polarität. Die Zellen liegen lückenlos aneinander und wahren strenge Einschichtigkeit.

Die Melanomkulturen geben in unterschiedlicher Menge stetig granuläre Zellbestandteile in das Medium ab, wie z.B. auf Abb. 1d zu sehen ist. Dies könnte im Sinne der normalen Funktion dieser Zellen mit Rudimenten der Exocytose von Melaningranula an umgebende Keratinocyten in der Epidermis verglichen werden. Andererseits kann eine Herkunft dieses Materials aus abgestorbenen und lysierten Zellen nicht ausgeschlossen werden. Es finden sich nämlich bei allen Kulturen, insbesondere bei **Colo-38** (siehe Abb. 1b), viele lebende Zellen und Zellfragmente im Mediumüberstand. Diese sind in den meisten Abbildungen nicht ersichtlich, da die Kulturen vor dem Fotografieren gründlich gespült wurden.

Abb. 1a-d: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von Melanomkulturen

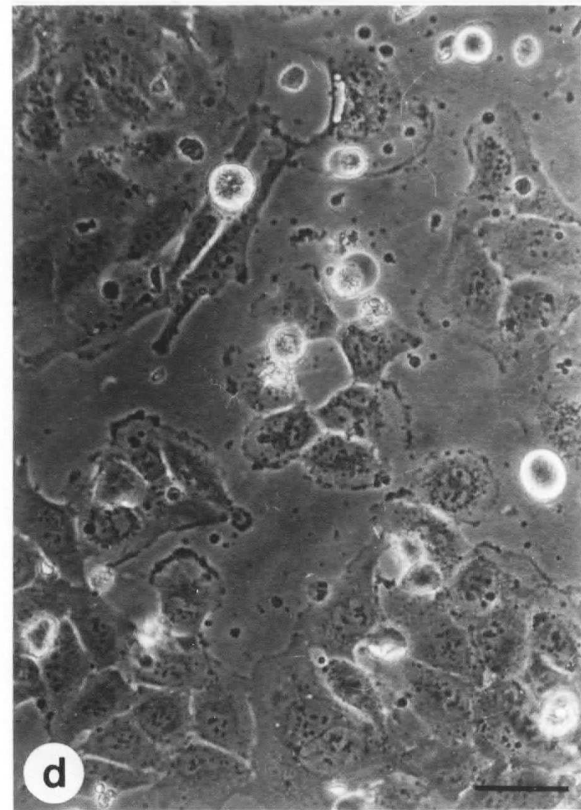
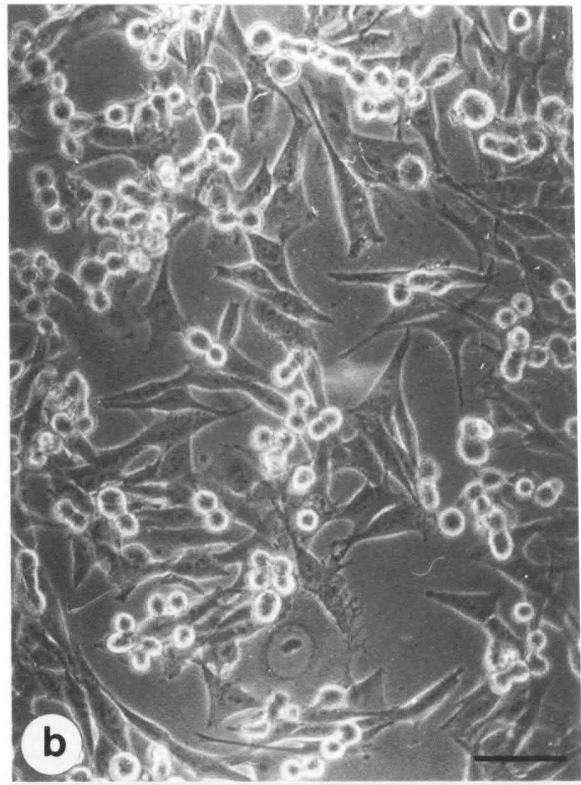
1a: **MeWo**

1b: **Colo-38**

1c: **Sk Mel 93**

1d: **MM-V-M**

Der Balken entspricht 50 μm



Die meisten Melanomkulturen sind amelanotisch, d.h. zumindest *in vitro* nicht zur vollständigen Melaninsynthese befähigt. Bei **MM-I-P** und **MM-V-M** kommt es unter Streßbedingungen, wie z. B. nach länger unterlassenen Mediumwechsel (>1 Woche) spontan zur Melaninsynthese, was durch Schwärzung der Zellen und auch des Mediums erkennbar wird. Da die Stimulierung zur Melaninsynthese in der Regel zum Absterben der Zellen führt, dürfte diese "Induktion der Differenzierung" eher einem unspezifischen, präfinalen Ereignis, als einer physiologischen Differenzierungsleistung gleichzusetzen sein.

Die phänotypische Variabilität von Melanomzellen, insbesondere die oft große Ähnlichkeit zu Stromazellen, macht die Anzucht dieser Tumoren, besonders aus Primärtumoren, schwierig, da Fibroblastenüberwuchs erst spät erkannt wird.

In Abb. 2a-b sind zwei Primärkulturen gegenübergestellt. Abb. 1a zeigt eine frühe Kultur von **MM-VI-P**. Es finden sich hier große unregelmäßige Zellen, die Zellgrenzen sind oft nicht klar erkennbar. Das Cytoplasma weist keine auffälligen Strukturen auf. Mitotische Zellen (Pfeil) sind, wie bei Melanomkulturen üblich, stark abgerundet. Abb. 2b zeigt eine von Stromazellen überwachsene Primärkultur. Die große Ähnlichkeit zu Abb. 1a wird deutlich. Aufgrund des Fehlens spezifischer phänotypischer Kriterien - außer der Melaninproduktion - und des variablen Erscheinungsbildes beider Zelltypen *in vitro* ist eine morphologische eindeutige Identifizierung von Fibroblasten und Melanomzellen in Zellkultur nicht möglich. Aufschluß über den Ursprung dieser Zellen gibt hier die Karyotypanalyse. **MM-VI-P** zeigt den für Neoplasien typischen aberranten Karyotyp, auf den später noch im Detail eingegangen wird. Im Gegensatz hierzu weist die überwachsene Kultur einen normalen diploiden Chromosomensatz auf.

Bei Dauerkulturen konnte keine Änderung des Phänotyps, in Abhängigkeit zur Passagenzahl oder dem Alter der Kultur, festgestellt werden. Selbst eine zwischenzeitliche *in vivo*-Propagierung und anschließende Rekultivierung hatten keinen erkennbaren Einfluß auf den Phänotyp der Melanom-Zellen.

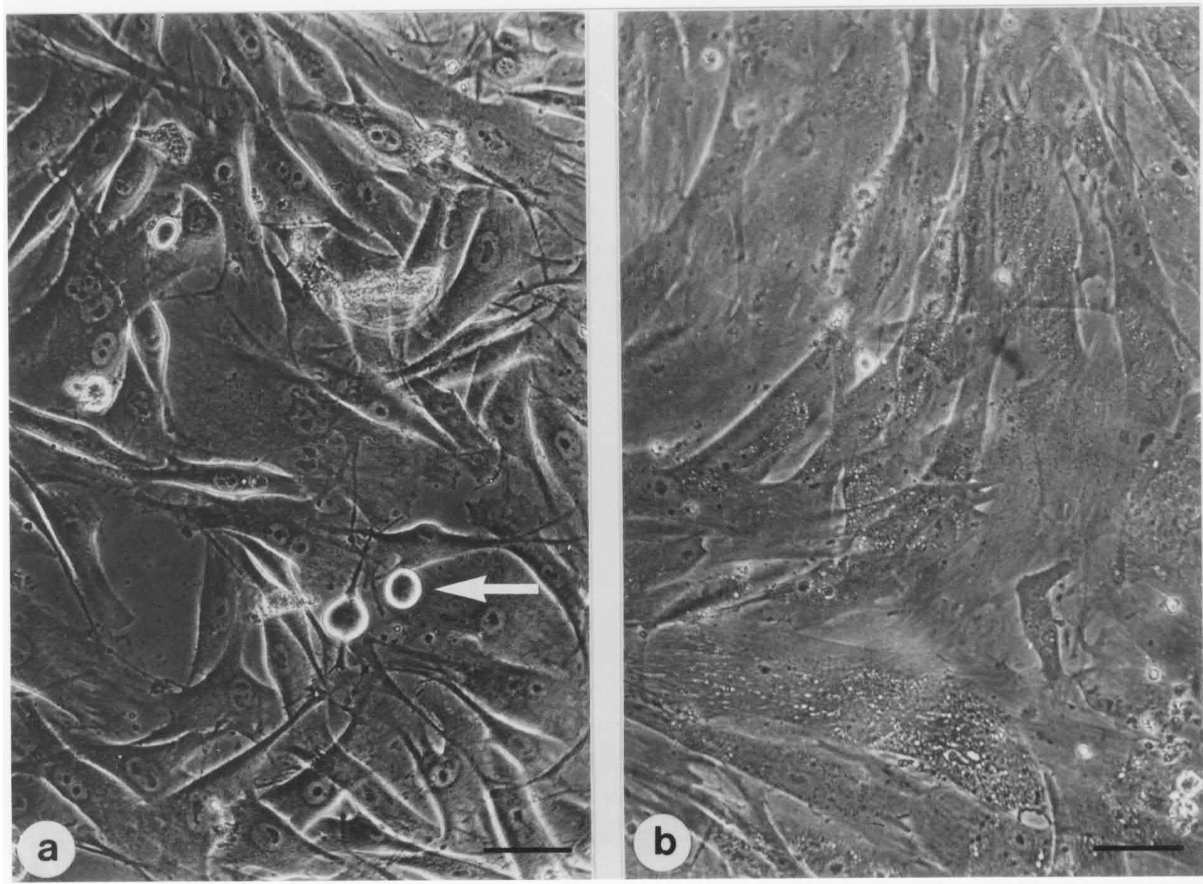


Abb. 2a-b: Phasenoptische Darstellung zweier Melanomkulturen

Abb. 2a: frühe Unterkultur von **MM-VI-P** der Pfeil weist auf eine mitotische Zelle

Abb. 2b: von Stromazellen überwachsene Primärkultur eines Melanoms

Der Balken entspricht 50 μm

2. Histologische Begutachtung von Injektionstumoren

Zur Bestätigung der Malignität und zur Austestung des Einflusses eines *in vivo*-Systems auf die genetische Stabilität von Zellkulturen wurden die Linien **MM-I-P**, **MM-II-M** und **MM-III-M** wie beschrieben in drei Zyklen in die thymuslose Balb/c nu/nu Nacktmaus gegeben.

Bei ca. 30% der Tumore von **MM-I-P** kam es während der Tumorentwicklung zu einem Wachstum *per continuitatem*, d.h. zu einem Aufbrechen der Tumorkapsel mit anschließender Aussaat und Wachstum der Melanomzellen im gesamten Bauchraum der Tiere. Die inneren Organe selbst wurden nicht befallen, so daß eine echte, hämatogene Metastasierung nicht nachweisbar war. Bei den anderen Zell-Linien lagen die Tumore stets abgekapselt unter der Rückenhaut der Tiere (Abb. 3a).

Eine Unterscheidung der Tumore aus verschiedenen Zell-Linien ist auf der Basis histologischer Schnitte nicht möglich, so daß also die reine Morphologie kaum Unterscheidungsmöglichkeiten der einzelnen Zell-Linien in ihrer Stabilität oder Variabilität bietet. Eine Ausnahme macht hier die Zell-Linie **MM-III-M**, die melanotische (schwarze) Tumoren ausbildet (Abb. 3b). Die Zellen differenzieren unter dem Einfluß dieses *in vivo*-Systems ihrem Ursprung gemäß. Die Melaningranula liegen an der Peripherie der Zellen oder zwischen ihnen. In der Nähe von Blutgefäßen kommt es zu einer Häufung dieser Melaningranula (Pfeil).

Das Tumorgewebe ist bei allen Kulturen sehr gut durchblutet (Abb. 3c), der gesamte Tumor ist von zahlreichen großen und kleinen Gefäßen durchzogen. Trotzdem finden sich im Tumor Bereiche, die nekrotisieren (Abb. 3d). Diese Bereiche sind durch große blasige Zellen mit amorphen Kernen gekennzeichnet.

Auf das Wachstumsverhalten der Tumore im Laufe der Tumorentwicklung und auf das Verhalten in Abhängigkeit von der Zahl der *in vivo*-Propagierungen wird im Anschluß an die cytogenetische Charakterisierung der nach Mauspassagierung entstandenen Sublinien detaillierter eingegangen werden.

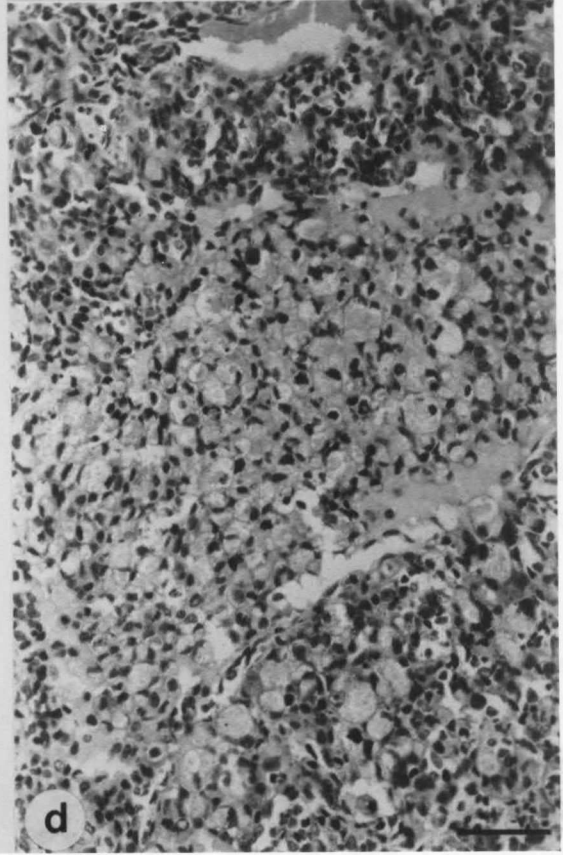
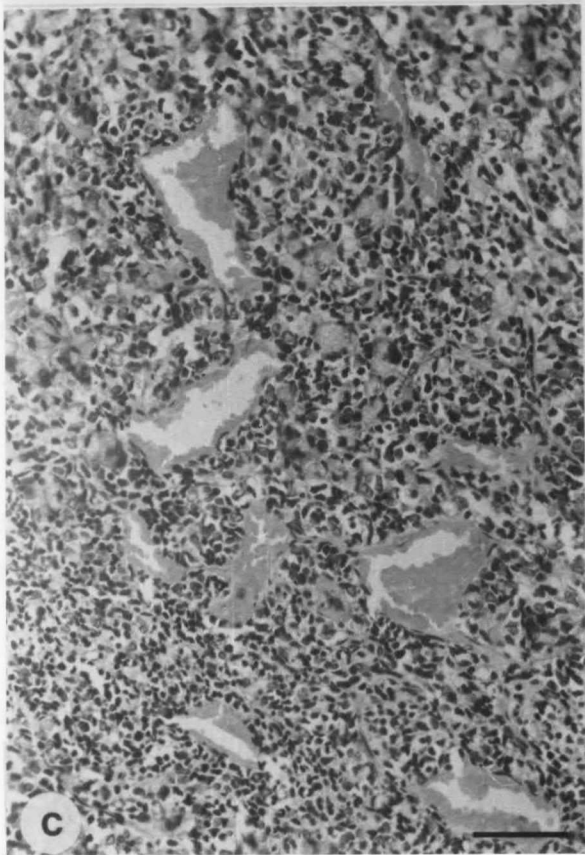
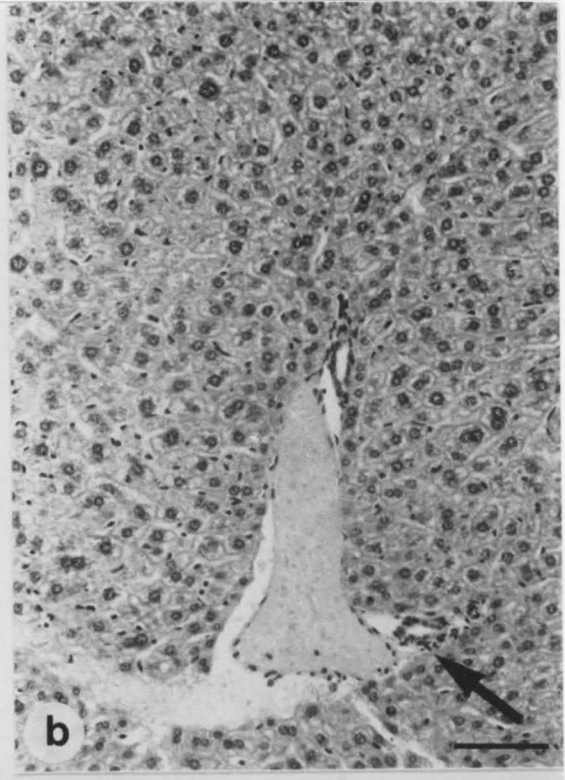
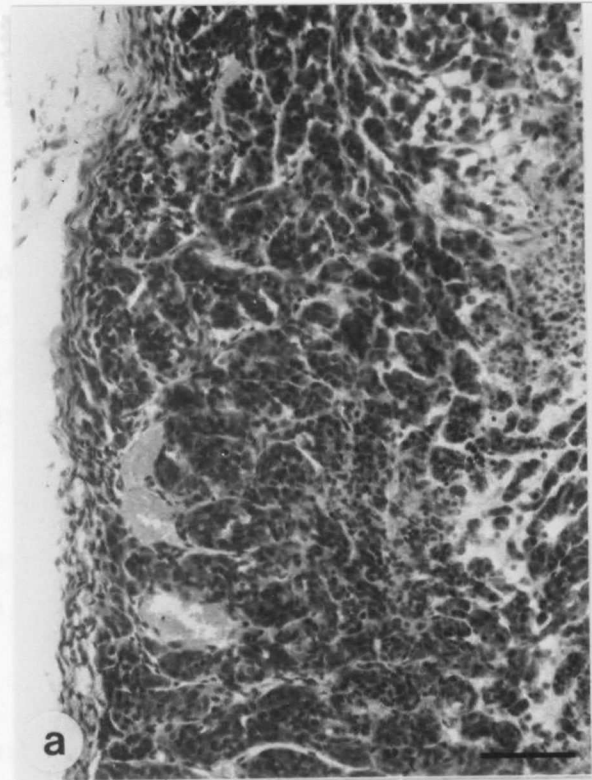
Abb.3: Histologische Schnitte durch Injektionstumore von Melanom-Zell-Linien.

Abb.3a: Tumorrandbereich von **MM-I-P**. Der Tumor ist von einer mehrschichtigen Kapsel abgeflachter Zellen umgeben. Der Balken entspricht 100 μm .

Abb. 3b: Tumorgewebe von **MM-III-M**. An der Zellperipherie und zwischen den Zellen finden sich zahlreiche Melaningranula (Pfeil). In der Nähe von Blutgefäßen kommt es zu einer Häufung dieser Granula. Der Balken entspricht 100 μm .

Abb. 3c: Tumorgewebe von **MM-II-M**. Die Tumore sind gut durchblutet, es finden sich zahlreiche große und kleine Gefäße (Pfeil). Der Balken entspricht 100 μm .

Abb. 3d: Tumorgewebe von **MM-II-M**. Im Tumor finden sich nekrotische Bereiche, welche durch große blasige Zellen mit amorphen Kernen gekennzeichnet sind. Der Balken entspricht 100 μm .



3. Cytogenetik humaner Melanom-Zell-Linien

In diesem Abschnitt werden die cytogenetischen Charakteristika von 14 analysierten Melanom-Zell-Linien vorgestellt. Bevor damit begonnen wird, sollen erst einige Begriffe der Cytogenetik erklärt werden, mit denen strukturelle Veränderungen der Chromosomen bezeichnet werden:

Unter einer Deletion (del) versteht man den Verlust von Chromosomenteilen. Dieser Verlust kann sich auf ganze Chromosomenarme, terminale Stücke oder interstitielle Teile beziehen.

Eine Translokation (t) bedeutet den Transfer von Chromosomen, Chromosomenarmen oder -stücken auf ein anderes Chromosom oder dessen Teile. Oft findet auch ein reziproker Austausch von Chromosomenstücken zwischen zwei Chromosomen statt.

Eine Duplikation (dup) ist die Verdopplung oder Vervielfachung von Chromosomenbanden.

Eine Inversion (inv) kommt durch 2 Brüche innerhalb eines Chromosoms zustande, wobei dasselbe Chromosom unter Umkehrung der Orientierung eines Bruchstücks neu arrangiert wird.

Unter einem Isochromosom (i) versteht man ein Chromosom, das auf beiden Seiten der Zentromere identisch ist. Meist beinhaltet ein Isochromosom zwei ganze p- oder q-Arme.

Alle vorgenannten Aberrationen führen zur Formierung neuer Chromosomen, sogenannter Markerchromosomen (M).

Die Lokalisation der jeweiligen strukturellen Veränderungen erfolgt durch die numerische Bezeichnung der einzelnen Chromosomenbereiche, beginnend mit dem Ende des p-Armes und fortlaufender Numerierung bis zum Ende des q-Armes.

3a. Ergebnisse eigener Melanom-Kulturen

Im ersten Teil werden die cytogenetischen Charakteristika der selbst etablierten Kulturen aufgeführt und, aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit, im Anschluß, ohne Hinzuziehung der Daten aus den Fremdlinien, zusammen ausgewertet. Aufgrund der genannten Schwierigkeiten bei Direktpräparationen beziehen sich die genannten Daten alle auf Primärkulturen oder frühe *in vitro*-Passagen. Bei den Kulturen, die in eine permanente Zell-Linie überführbar waren, wurden hier, aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit mit den etablierten Zell-Linien aus anderen Labors, mittlere Passagenzahlen herangezogen. Auf die Frühveränderungen und die Entwicklung im Kulturverlauf dieser Zell-Linien wird im Kapitel "Verhalten des individuellen Karyotyps im Laufe der *in vitro*-Kultivierung" eingegangen werden.

A. MM-I-P

Die mittlere Chromosomenzahl pro Zelle dieser Linie beträgt 55 (53 - 58). Die Linie besitzt drei verschiedene stabile Markerchromosomen (Abb. 4).

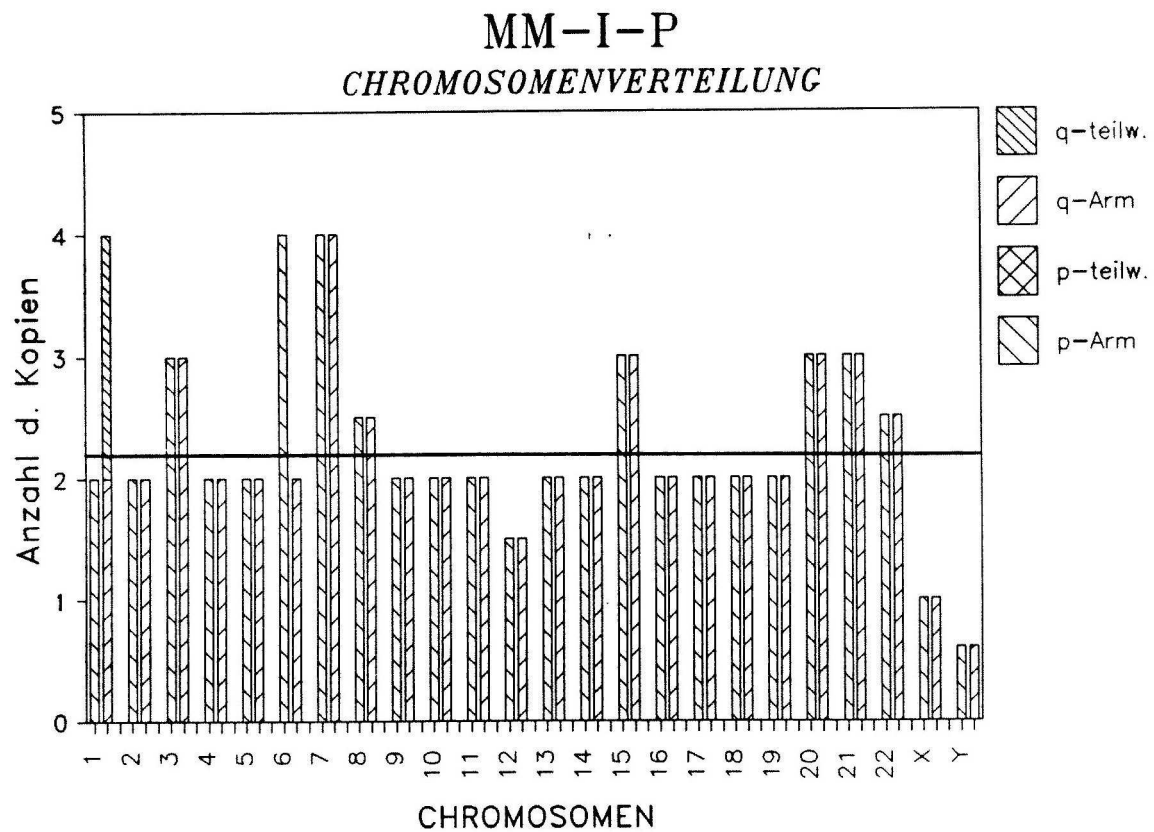
Die strukturell unveränderten Chromosomen sind wie folgt verteilt:

Chr. #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Anzahl pro Metaphase	1	2	3	2	2	2	4	2,5	1	2	2	1,5

Chr. #	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
Anzahl pro Metaphase	2	2	3	2	2	2	2	3	3	2,5	1	0,6

Auffällig ist eine Überrepräsentierung der normalen Chromosomen # 3, 7, 15, 20 und 21. Die Verteilung von chromosomalem Material aus normalen und aberranten Chromosomen ist in nachfolgendem Balkendiagramm, getrennt nach p- und q-Arm, wiedergegeben. Die Querlinie in diesem und den folgenden Diagrammen, bei der Vorstellung der weiteren Kulturen, markiert die für die jeweilige modale Chromosomenzahl sich rechnerisch ergebende

durchschnittliche Anzahl pro Chromosom in einer Metaphase. Werte, die um mehr als 25% von diesem arithmetischen Mittel abweichen, wurden als Über- bzw. Unterrepräsentierung angesehen.

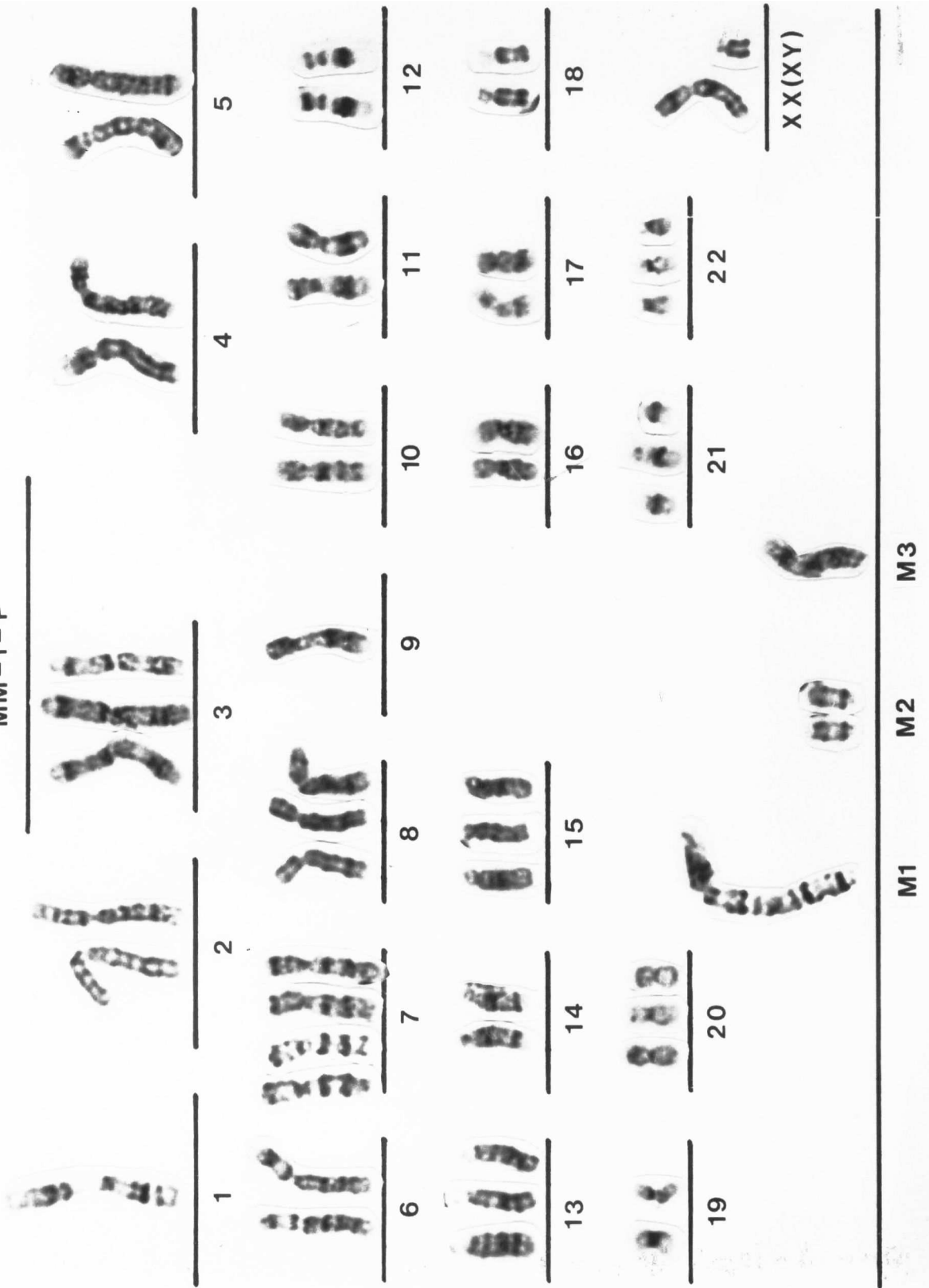


Für eine hyperdiploide Zellpopulation zeigt sich eine leichte Unterrepräsentierung für Chromosom # 12 und ein Überrepräsentierung der Chromosomenarme 6p; 7p,q; 15p,q; 20p,q; 21p,q und Teilen von 1q.

Abb.4: Repräsentatives Karyogramm der Zelllinie **MM-I-P** (66. Passage). Die durchschnittliche Chromosomenzahl pro Zelle beträgt 55 (53 - 58). Die Linie weist drei charakteristische, stabile Markerchromosomen auf:

M1: dup(1)(pter→q43::q25→q43::q31→qter)	100%	1 Kopie
M2: del(6)(pter→q11:)	100%	2 Kopien
M3: inv(9)(pter→p24::q13→p24::q13→qter)	100%	1 Kopie

MM-I-P



B. MM-II-M

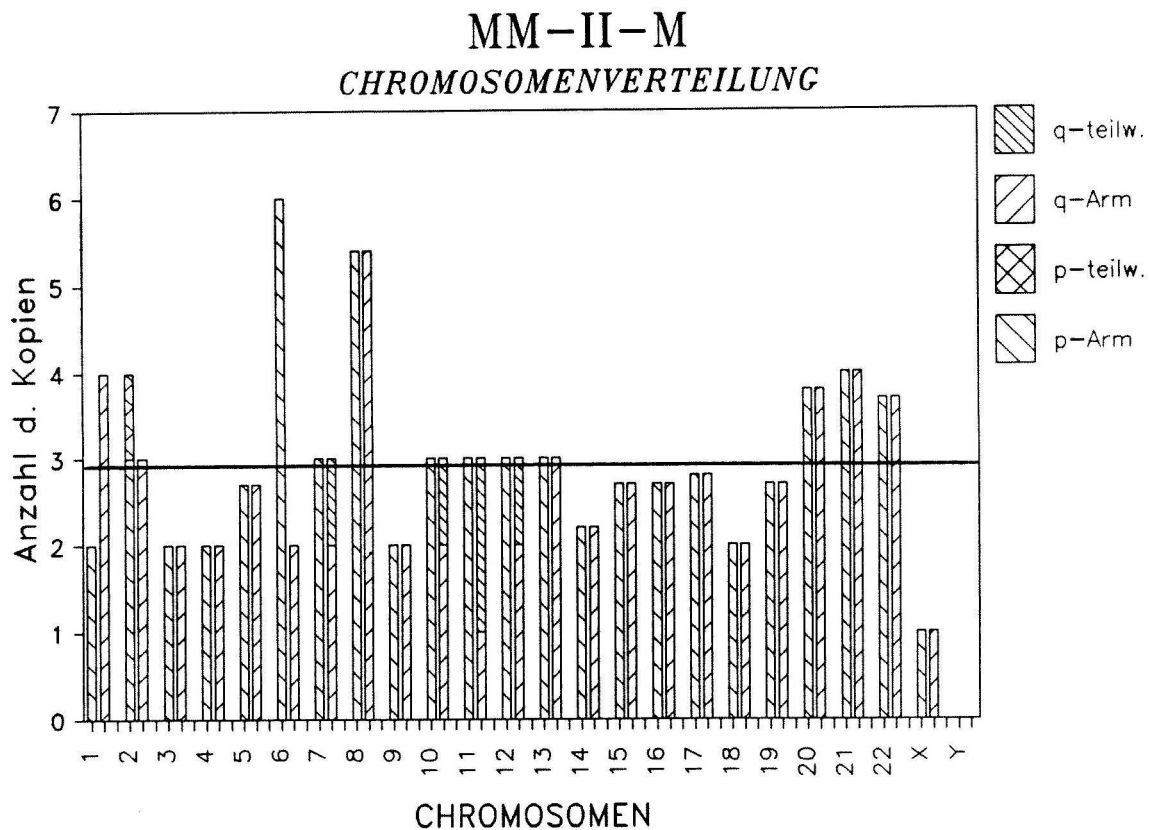
Die Zelllinie besitzt im Durchschnitt 67 (64 - 69) Chromosomen pro Zelle und weist sieben verschiedene, stabile Markerchromosomen auf (Abb. 5).

Die strukturell unveränderten Chromosomen sind wie folgt verteilt:

Chr. #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Anzahl pro Metaphase	2	2	2	2	2,7	2	2	5,4	2	2	1	2

Chr. #	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
Anzahl pro Metaphase	3	2,2	2,7	2,2	2,8	2	2,7	3,8	4	3,7	1	-

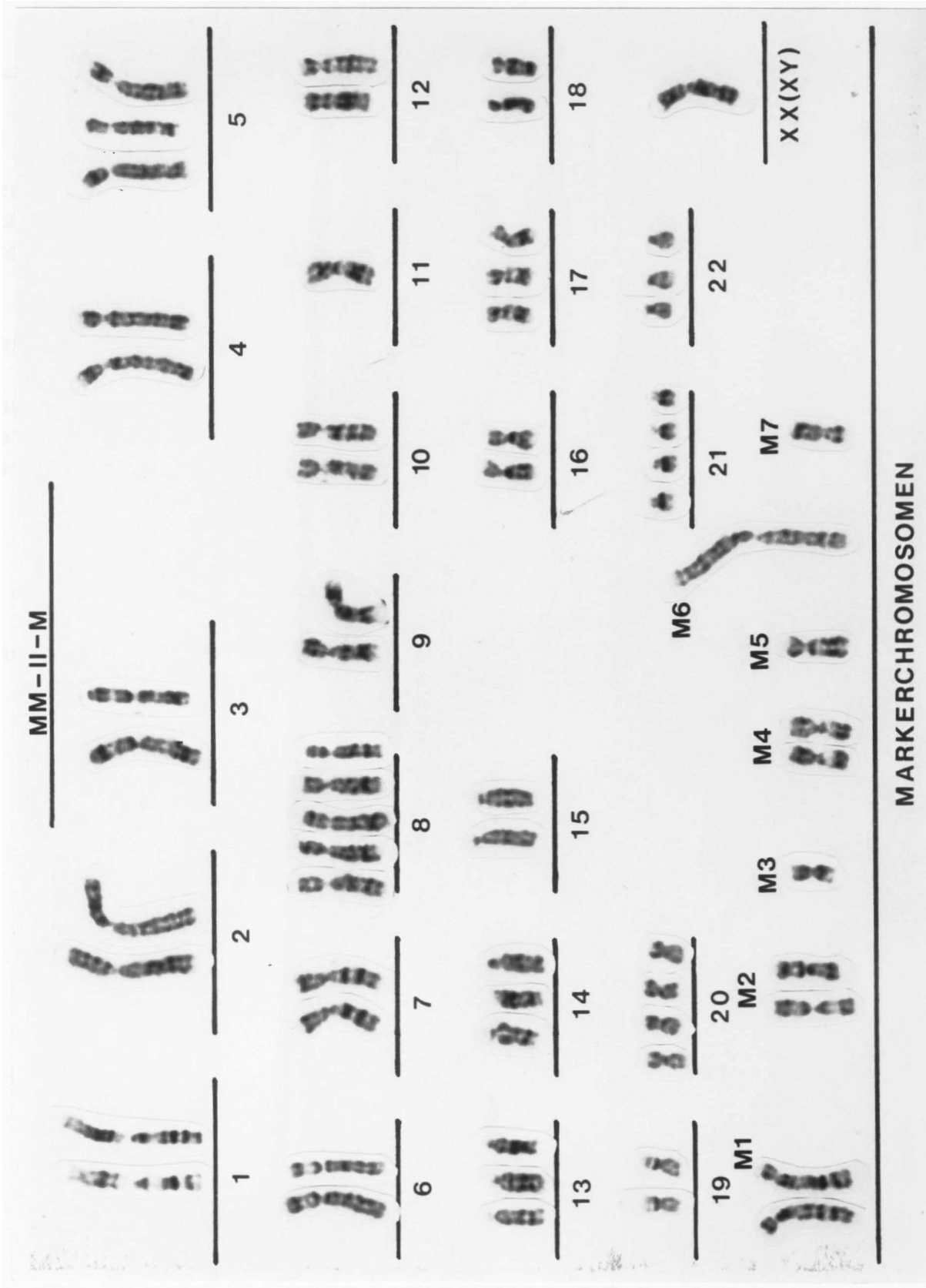
Auffällig ist eine Überrepräsentierung der normalen Chromosomen # 8, 20, 21 und 22. Das nachfolgende Balkendiagramm zeigt die Gesamtverteilung chromosomalen Materials getrennt nach p- und q-Arm.



Für eine nahe triploide Zelle sind die Chromosomenarme 1p; 3p,q; 4p,q; 6q; 9p,q; 14p,q; 18p,q; und Teile der Chromosomenarme 7q; 10q; 11q und 12q unterrepräsentiert. Die Chromosomenarme 1q; 6p; 8p,q; 20p,q; 21p,q und 22p,q sind überrepräsentiert.

Abb. 5: Repräsentatives Karyogramm der Zelllinie **MM-II-M** (50. Passage). Die durchschnittliche Chromosomenzahl pro Metaphase beträgt 67 (64 - 69). Die Linie weist sieben charakteristische Markerchromosomen auf:

M1: del(1)(p11→qter:)	100% 2 Kopien
M2: i(6)(pter→p10::p10→pter)	100% 2 Kopien
M3: del(10)(pter→q22:)	100% 1 Kopie
M4: del(11)(pter→q22:)	100% 2 Kopien
M5: del(12)(pter→q21::q23→qter)	100% 1 Kopie
M6: dup(2)(pter→p13::p21→qter)	100% 1 Kopie
M7: del(7)(pter→q22:)	90% 1 Kopie



C. MM-III-M

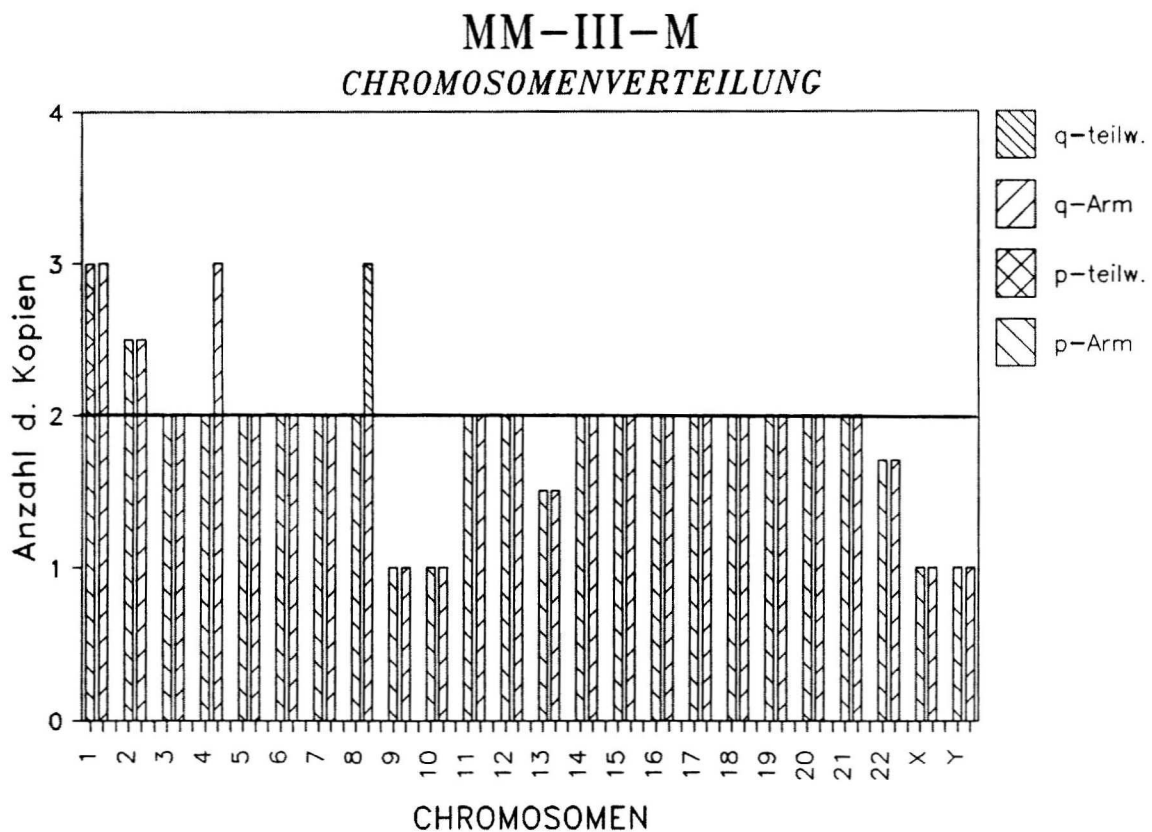
Die durchschnittliche Zahl von Chromosomen pro Metaphase beträgt 45 (43 - 46). Die Kultur weist sieben verschiedene Markerchromosomen auf (Abb. 6), die in unterschiedlich großen Populationen vorhanden sind.

Die strukturell unveränderten Chromosomen sind wie folgt verteilt:

Chr. #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Anzahl pro Metaphase	2	2,5	2	2	1	2	2	1	1	1	2	2

Chr. #	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
Anzahl pro Metaphase	1,5	2	2	2	2	2	2	2	1	1,7	1	1

Das nachfolgende Balkendiagramm zeigt die Gesamtverteilung chromosomalen Materials getrennt nach p- und q-Arm.



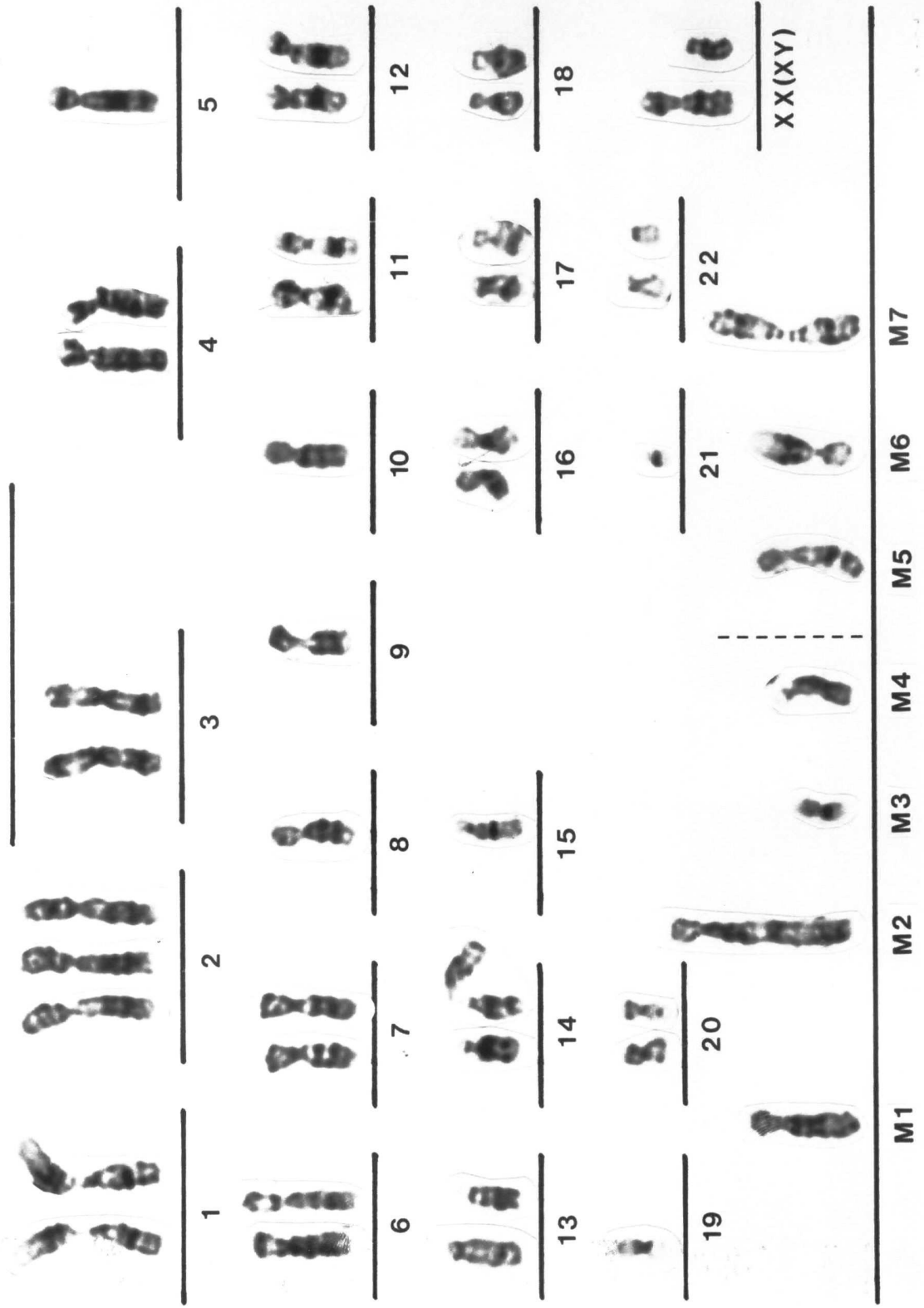
Für eine nahe diploide Zellpopulation sind die Chromosomenarme 9p,q und 10p,q unterrepräsentiert. Die Chromosomenarme 1q; 2p,q; 4q; sowie Teile von 1p und 8q sind überrepräsentiert.

Abb. 6: Repräsentatives Karyogramm der Explantatkultur von **MM-III-M**. Die Zellen besitzen eine durchschnittliche Chromosomenzahl von 45 (43 - 46). Die Kultur weist sieben verschiedene Markerchromosomen auf.

M1: der(4;5)(4pter→4p10::5q10→5qter)	100%	1 Kopie
M2: der(8)t(5;8)(5qter→5q13::8q24→8pter)dup(5)(q21→q24)	100%	1 Kopie
M3: der(21)t(21;?)(qter →p11:?)	75%	1 Kopie
M4: N.D.	35%	1 Kopie
M5: del(1)(:p22→qter)	35%	1 Kopie
M6: del(1)(pter→q22:)	12%	1 Kopie
M7: i(1)(qter →q10::q10 →qter)	12%	1 Kopie

Die Markerchromosomen M5 - M7 wurden nicht in der abgebildeten Metaphase gefunden.

MM - III - M



D. MM-IV-P

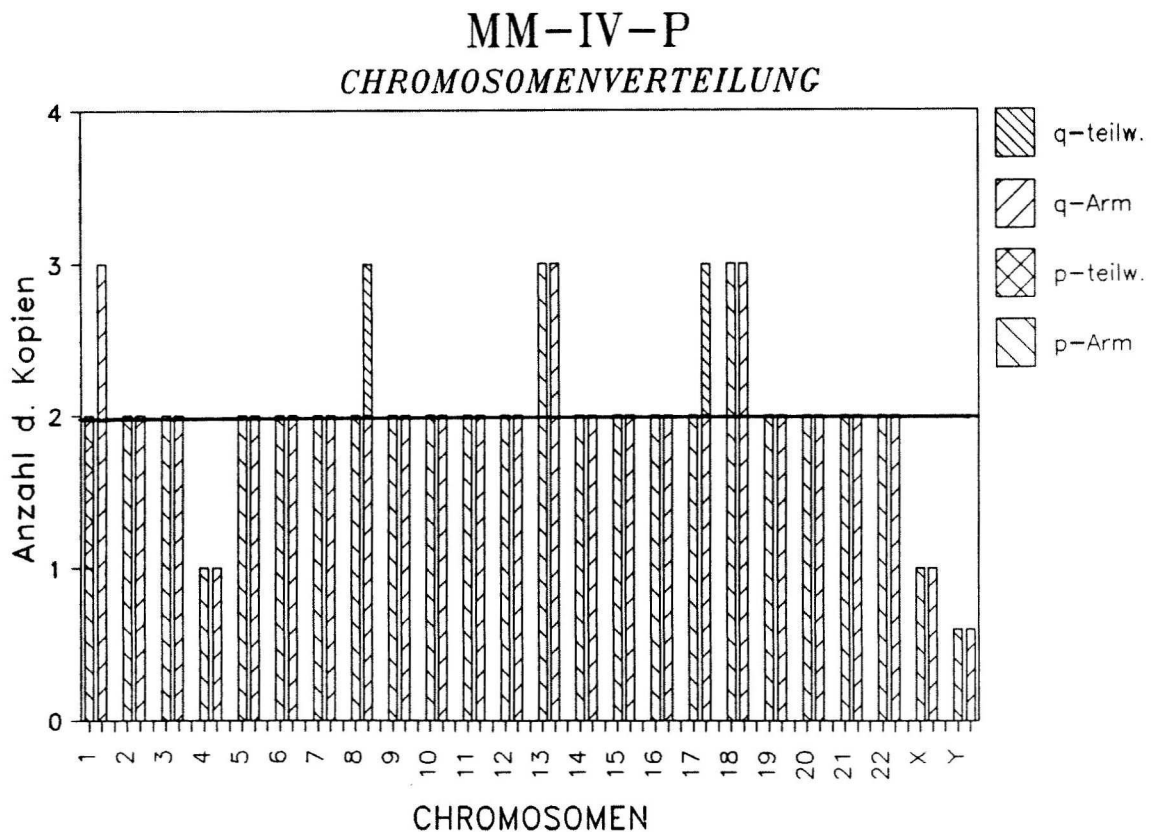
Die Kultur hat eine mittlere Chromosomenzahl von 45 (44 -47) pro Zelle und weist vier charakteristische, stabile Markerchromosomen auf (Abb. 7).

Die strukturell unveränderten Chromosomen sind wie folgt verteilt:

Chr. #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Anzahl pro Metaphase	1	1,6	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1

Chr. #	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
Anzahl pro Metaphase	3	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	0,5

Die Verteilung chromosomalen Materials aus normalen und aberranten Chromosomen ist in nachfolgendem Balkendiagramm, getrennt nach p- und q-Arm wiedergegeben.

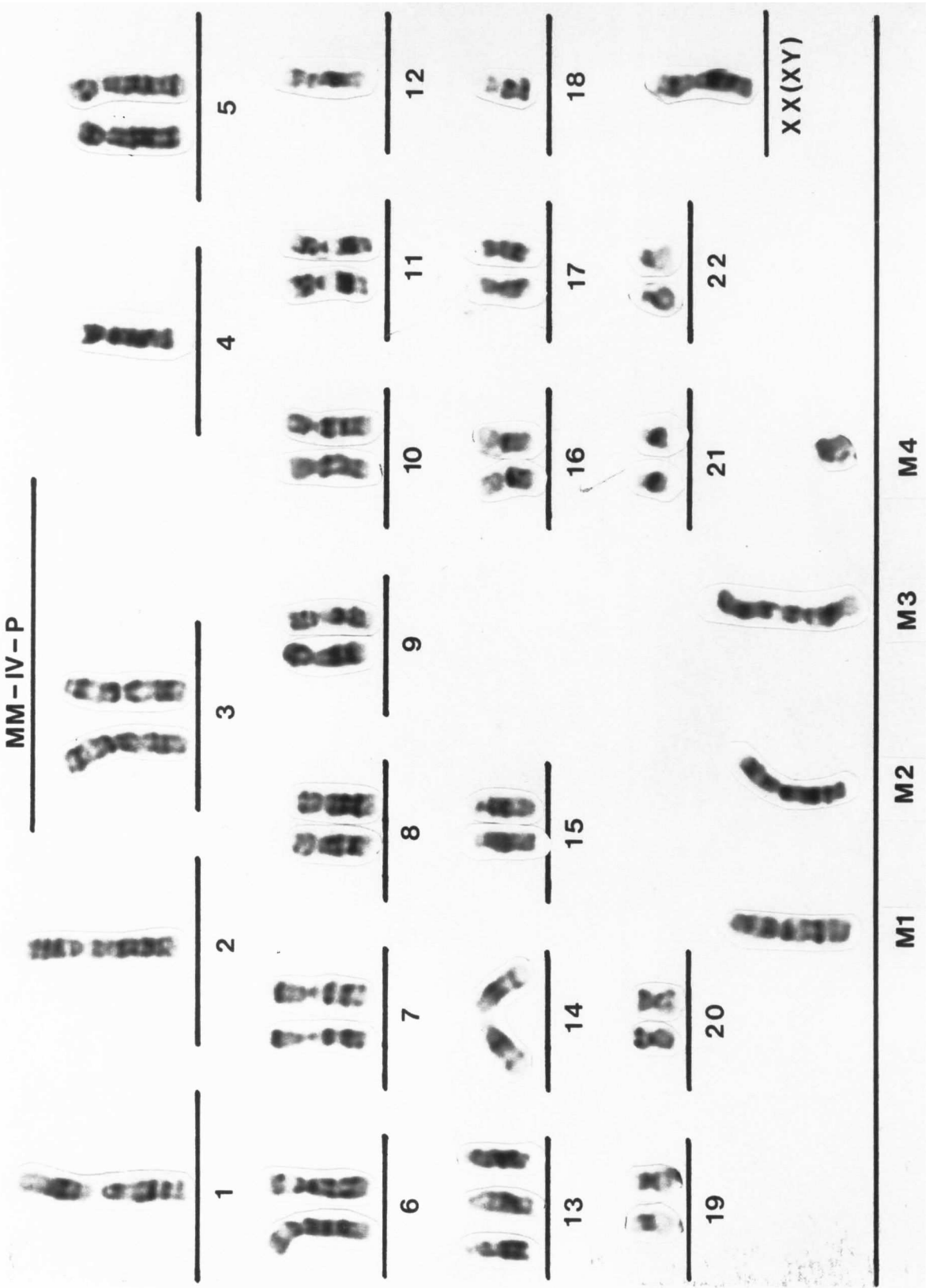


Für eine nahe diploide Zelle ist Chromosom # 4 und der terminale Teil von 1p unterrepräsentiert. Die Chromosomenarme 1q; 13p,q; 18p,q und der terminale Teil 17q sind überrepräsentiert.

Abb. 7: Repräsentatives Karyogramm der Explantatkultur von **MM-IV-P**. Die Kultur besitzt eine mittlere Chromosomenzahl von 45 (44 - 47) pro Zelle und weist vier charakteristische Markerchromosomen auf.

M1: der(18)t(1;18)(1qter→1q11::18q23→18pter)	100%	1 Kopie
M2: der(1)t(1;17)(1qter→1p22::17q21→17qter)	100%	1 Kopie
M3: dic(12;18)(12qter→12p13::18q23→18pter)	100%	1 Kopie
M4: N.D. (Ringchromosom)	40%	1 Kopie

MM-IV-P



E. MM-V-M

Die Zelllinie besitzt eine mittlere Chromosomenzahl pro Zelle von 43 (41 - 44) und weist 13 verschiedene, stabile Markerchromosomen auf (Abb. 8).

Weiterhin weisen beide Chromosomen # 1 elongierte sekundäre Konstriktionen (qh+) auf. Auffällig ist, daß keine normalen Chromosomen # 4 und 15 vorhanden sind. Die Nummerierung der Markerchromosomen ist in diesem Fall nicht durchgängig, da im Kulturverlauf Markerchromosomen verloren gingen. Hierauf wird im nächsten Kapitel im Detail eingegangen.

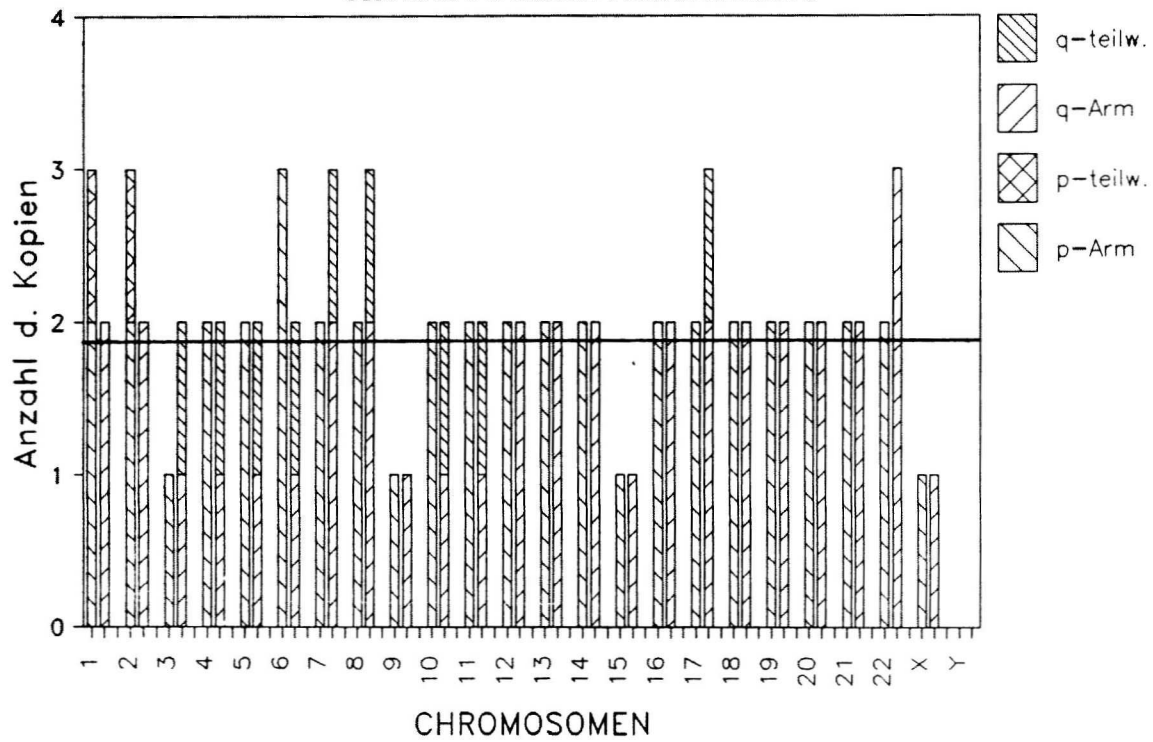
Die strukturell unveränderten Chromosomen sind wie folgt verteilt:

Chr. #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Anzahl pro Metaphase	2	1	1	-	1	1	1	1	1	1	1	2

Chr. #	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X
Anzahl pro Metaphase	2	2	-	2	1	2	2	2	2	1	1

Die Gesamtverteilung chromosomalen Materials aus normalen und aberranten Chromosomen ist in nachfolgendem Balkendiagramm, getrennt nach p- und q-Arm, wiedergegeben.

MM-V-M CHROMOSOMENVERTEILUNG

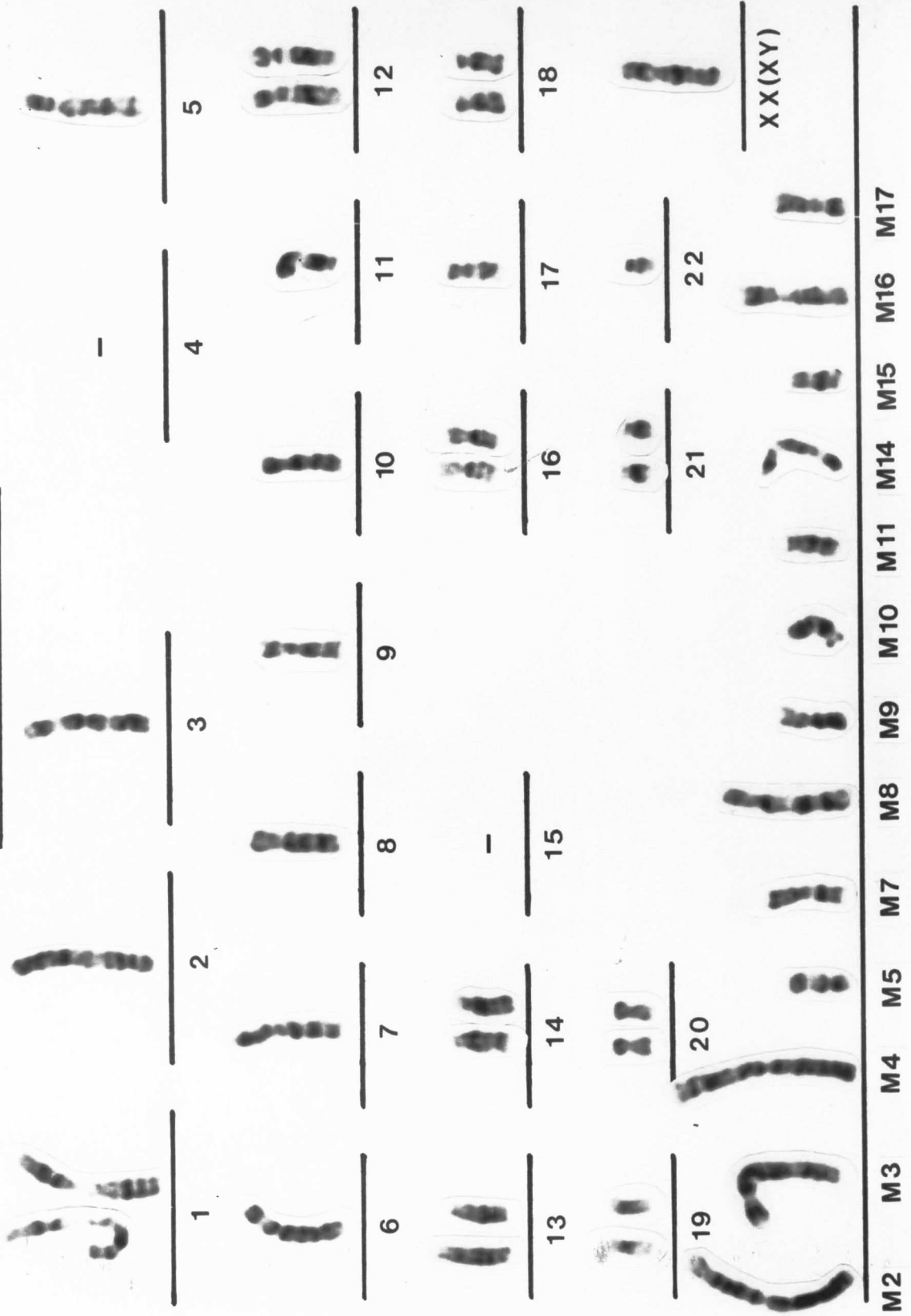


Für eine nahe diploide Zelle sind die Chromosomenarme 3p; 9p,q; 15p,q und Teile der Chromosomenarme 3q; 4q; 5q; 6q; 10q und 11q unterrepräsentiert. Die Chromosomenarme 6p,q; 21p,q und Teile von 2p; 7q und 8q sind überrepräsentiert.

Abb. 8: Repräsentatives Karyogramm der Zell-Linie **MM-V-M** (50.Passage). Die Linie besitzt im Durchschnitt 43 (41 - 44) Chromosomen pro Metaphase und weist 13 charakteristische Markerchromosomen auf, die in jeweils einer Kopie vorliegen:

M2: dup(2)(pter→p13::p21→qter)	100%
M3: der(4)t(3;4)(3qter→3q21::4q31→4pter)	100%
M4: der(4)t(4;8)(4qter→4p16::8q11→8qter)	100%
M5: del(6)(pter→q13:)	100%
M7: del(7)(pter→q22:)	100%
M8: der(7)t(7;10)(7qter→7p11::10q12→10qter)	100%
M9: del(8)(pter→q22:)	100%
M10: del(11)(pter→q23:)inv(:q23→q11:)	100%
M11: dup(22)(pter→q13::q11→qter)	100%
M14: del(5)(pter→q11::q13→qter)	100%
M15: del(6)(pter→q11:)	80%
M16: der(15)t(15;?)(15qter→15p11::?)	100%
M17: der(17)t(17;?)(17qter→17p13::?)	90%

MM - V - M



F. MM-VI-P

MM-VI-P entstammt einem primären Melanom, das an der linken Wange eines Mannes lokalisiert war. Die Zellen dieses Tumors konnten nur kurze Zeit in Kultur gehalten werden und ließen sich auch nicht über Tierpassagierung von Stromazellen "reinigen", da sie dort keine Tumoren bildeten. Die Chromosomenpräparation erfolgte bereits am Tag nach der Kultivierung und lieferte qualitativ und quantitativ keine guten Ergebnisse, so daß für das Erkennen numerischer und struktureller Aberrationen nur eine Metaphase zur Verfügung stand, weshalb die Befunde mit dieser Einschränkung zu verstehen sind.

Die Metaphase weist 72 Chromosomen auf und besitzt sechs verschiedene Markerchromosomen, die auch identifizierbar waren (Abb. 9).

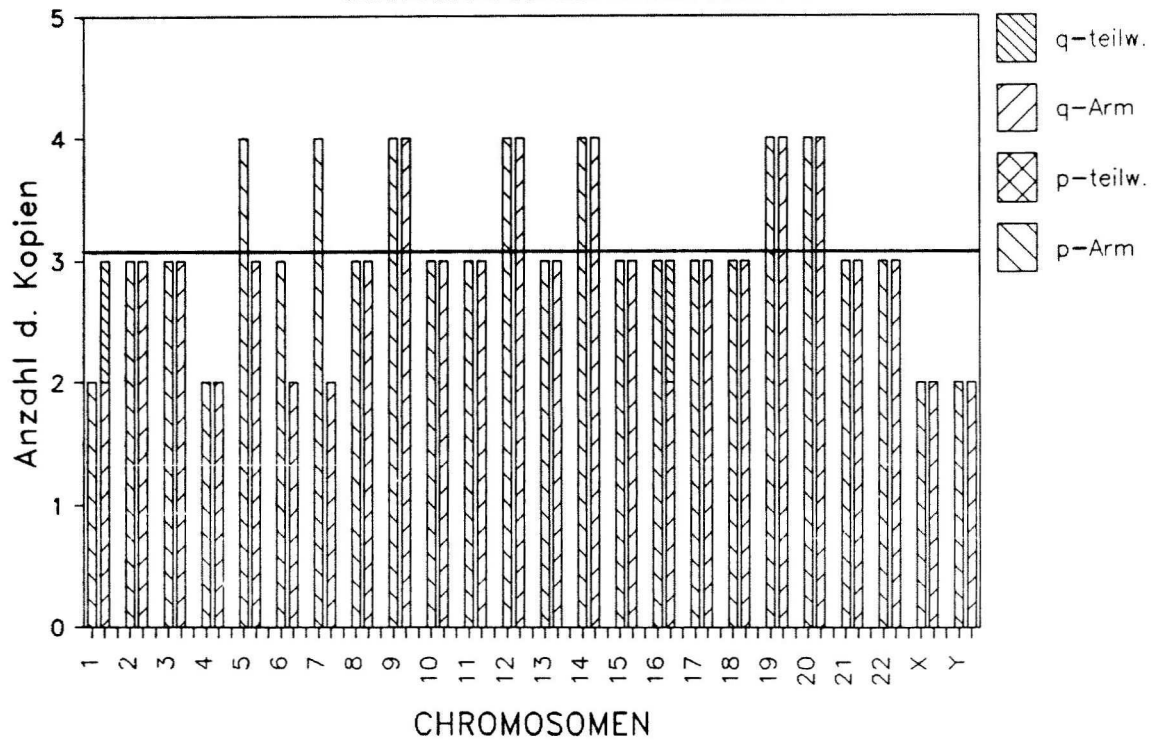
Die strukturell unveränderten Chromosomen sind wie folgt verteilt:

Chr. #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Anzahl pro Metaphase	1	3	3	2	2	2	2	3	4	3	3	4

Chr. #	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
Anzahl pro Metaphase	3	4	3	2	3	3	4	4	3	3	2	2

Aus normalen und aberranten Chromosomen ergibt sich folgende Verteilung für die jeweiligen p- und q-Arme.

MM-VI-P CHROMOSOMENVERTEILUNG



Für eine nahe triploide Zelle sind die Chromosomenarme 1p; 4p,q; 6q; 7q und Teile von 1q und 16q unterrepräsentiert. Die Chromosomenarme 5p; 7p; 9p,q; 12p,q; 14p,q und 20p,q sind überrepräsentiert.

Abb. 9: Karyogramm der Explantatkultur von **MM-VI-P**. Die Zelle besitzt 72 Chromosomen, von denen sechs als Markerchromosomen in jeweils einer Kopie vorliegen:

M1: del(1)(pter→q22:)

M2: der(1;5)(1qter→1q10::5q10→5qter)

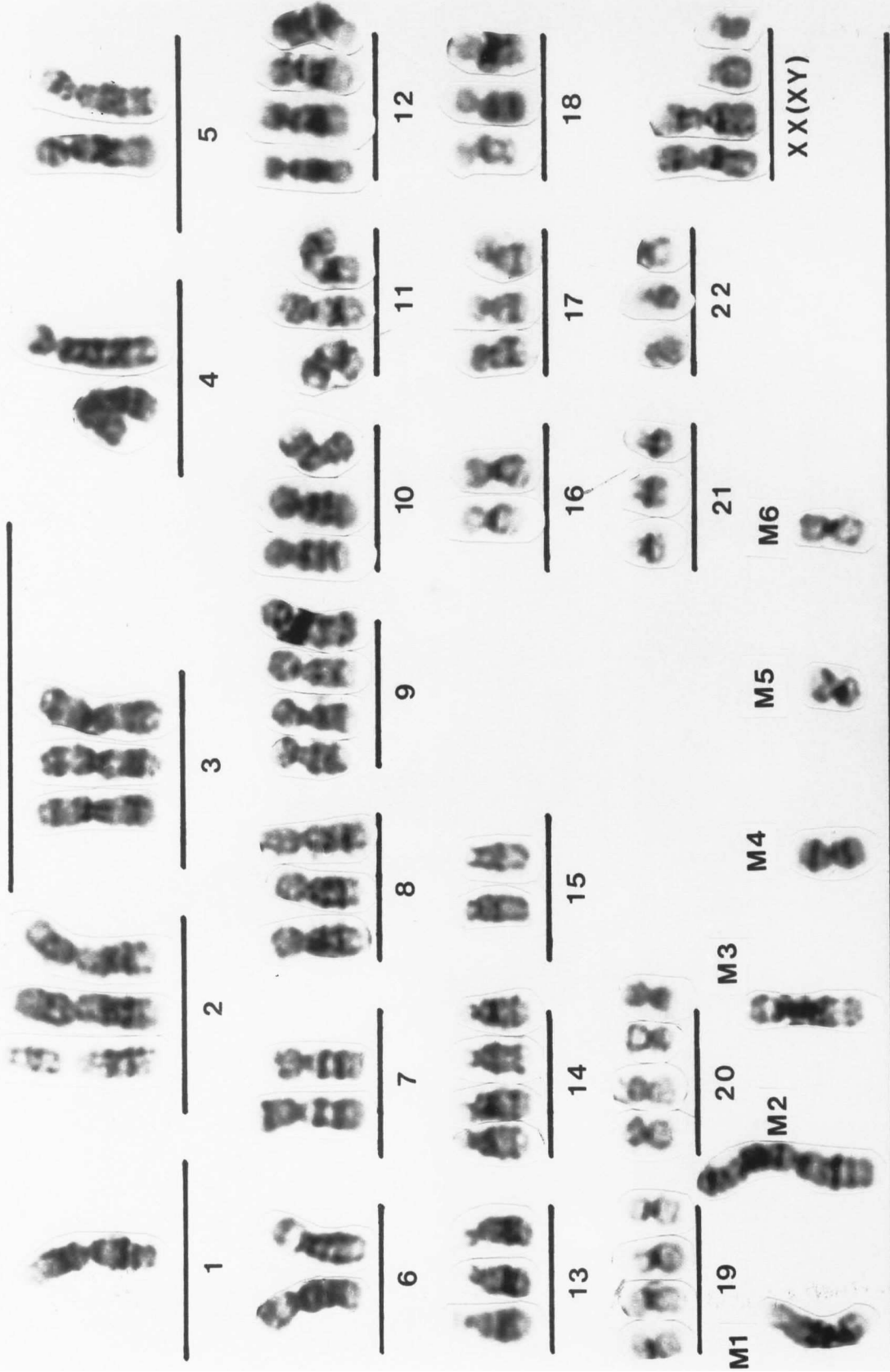
M3: der(3;6)(3pter→3p10::6p10→6pter)

M4: i(5)(pter→p10::p10→pter)

M5: del(16)(pter→q21:)

M6: i(7)(pter→p10::p10→pter)

MM-VI-P

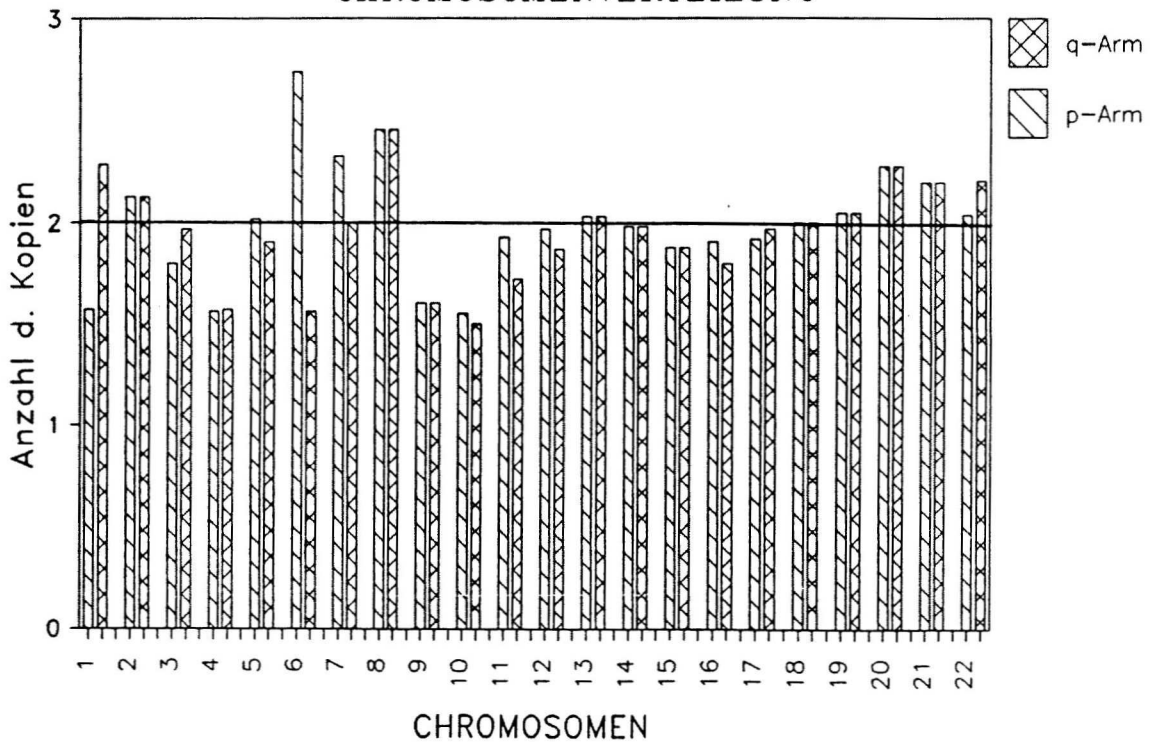


MARKERCHROMOSOMEN

3b. Zusammenfassung der Ergebnisse aus eigenen Melanom-Kulturen

Bei den "Heidelberger Melanomkulturen" sind, im Gegensatz zu den Linien aus Fremdlabors, alle Parameter der Kultivierung bekannt. Zudem stammen alle Patienten aus der gleichen Region, dem Heidelberger Raum. Aus diesem Grund sollen diese Kulturen einmal für sich zusammengestellt werden. Für folgendes Balkendiagramm mußte der Chromosomensatz einer jeden Kultur auf 46 Chromosomen pro Zelle berechnet werden, um, abhängig von der jeweiligen modalen Chromosomenzahl, jeder Zell-Linie die gleiche Wertigkeit zukommen zu lassen. Ausgehend von der jeweiligen modalen Chromosomenzahl wurde das Verhältnis von aktueller Chromosomenzahl und normaler, diploider Chromosomenzahl gebildet und so die Anzahl eines jeden Chromosomenarmes neu berechnet. Für den p- und q-Arm eines jeden Chromosoms wurde das arithmetische Mittel berechnet. Diese Darstellung kann aufgrund der niedrigen Fallzahl nicht für Melanome verallgemeinert werden und soll lediglich einen ersten Überblick verschaffen.

GESAMTÜBERSICHT HEIDELBERGER ZELLINIEN CHROMOSOMENVERTEILUNG



Es zeigt sich hier eine Unterrepräsentierung der Chromosomenarme 1p; 4p,q; 6q; 9p,q und 10p,q. Die Chromosomenarme 1q; 6p; 7q und 8p,q sind überrepräsentiert. Bei der Überrepräsentierung von Chromosom # 8 macht sich der Einfluß der Linie **MM-II-M** bemerkbar. Die Überrepräsentierungen von 1q, 6p und 7q, sowie die Unterrepräsentierung von 6q gehen mit den Literaturdaten konform.

Bezüglich der strukturellen Veränderungen gibt es folgende Übereinstimmungen:

Chromosom # 1:

Die Linien **MM-II-M** und **MM-III-M** weisen jeweils eine Deletion des p-Armes auf. Läßt man die komplexere Veränderung außer acht, so zeigen auch **MM-IV-P** und **MM-VI-P** Veränderungen, die den Verlust des p-Armes von Chromosom # 1 beinhalten.

MM-II-M und **MM-VI-P** zeigen die gleiche Deletion des q-Armes von Chromosom # 1.

Chromosom # 2:

MM-II-M und **MM-V-M** weisen beide eine Duplikation im p-Arm von Chromosom # 2 auf.

Chromosom # 6:

Bei **MM-I-P** und **MM-V-M** finden sich Deletionen des q-Arms von Chromosom # 6. Unter Nichtberücksichtigung der komplexeren Veränderung zeigt auch **MM-VI-P** eine Aberration, die den Verlust des q-Arms beinhaltet. **MM-II-M** weist 2 Kopien eines Isochromosoms von 6p auf, eine Veränderung, die ebenfalls unter Verlust des q-Armes zustande kommt.

Chromosom # 7:

MM-II-M und **MM-V-M** zeigen eine Deletion des terminalen Teils des Chromosomenarmes 7q.

Chromosom # 11:

MM-II-M und **MM-V-M** weisen beide eine Deletion des terminalen Teils des q-Armes auf.

Auffällig ist weiterhin, daß die Linien **MM-III-M**, **MM-IV-P** und **MM-V-M** eine modale Chromosomenzahl im nahe diploiden Bereich (43 - 45) haben. Eine für andere humane Zellen oft beschriebene Polyploidisierung in Kultur ist bei diesen Linien nicht erfolgt.

3c. Ergebnisse etablierter Melanom-Zell-Linien anderer Herkunft

Bei der Vorstellung der "Fremdlinien" ist zu sagen, daß hier nicht alle Parameter bekannt sind. Diese Linien werden standardmäßig für die Austestung therapeutischer und diagnostischer Antikörper, Chemotherapeutika oder für andere Fragestellungen benutzt und sind schon längere Zeit in Kultur. So waren exakte Passagenzahl, Kultivierungsbedingungen und Patientendaten nicht in Erfahrung zu bringen. Sicher ist, daß sie alle aus Metastasen stammen. Cytogenetische Analysen dieser Linien liegen, bis auf **MeWo**, meines Wissens nicht vor. Für die Zell-Linie **MeWo** wurden Genamplifikationen in Korrelation zur möglichen Metastasierung in *in vivo*-Systemen gebracht.

G. MeWo

Die Zell-Linie **MeWo** stammt, wie die nachfolgenden Linien **A-375** und **Sk Mel 13 - 93** aus dem Labor von Dr. J. Fogh am Sloan-Kettering - Institut, New York.

MeWo wurde 1974 aus dem Tumor eines Mannes etabliert. Die Zell-Linie besitzt eine mittlere Chromosomenzahl von 81 (75 - 84) pro Metaphase und weist acht charakteristische Markerchromosomen auf (Abb. 10).

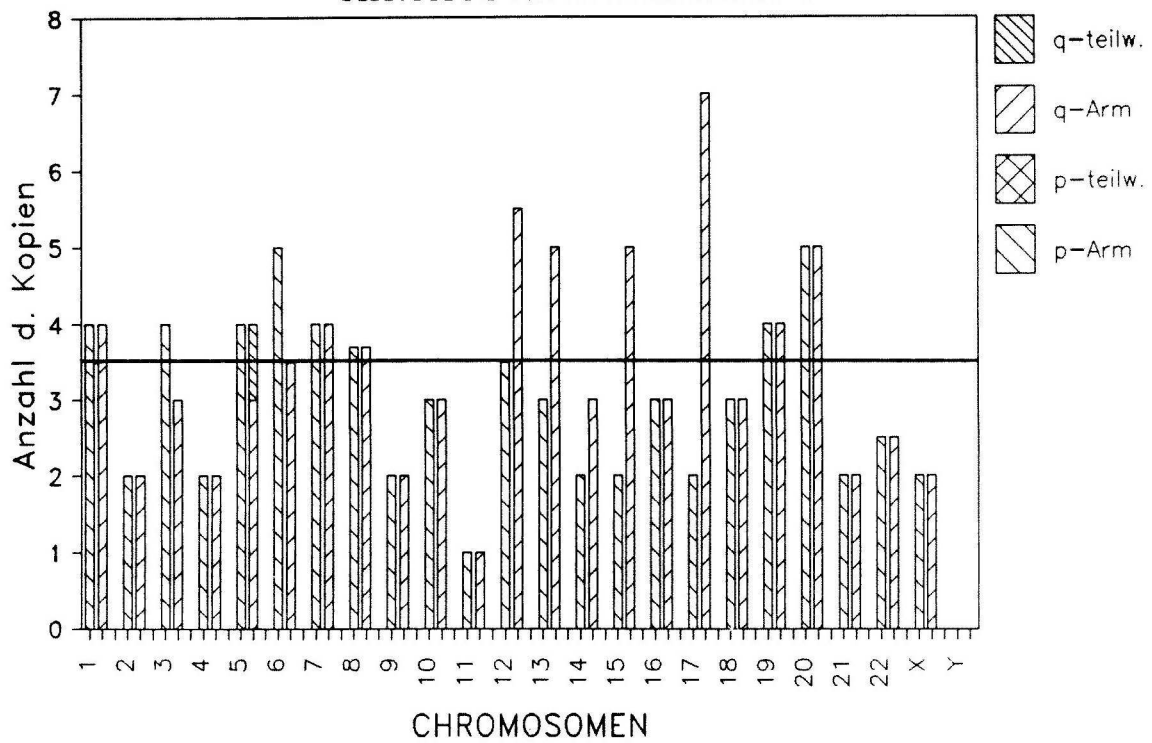
Die strukturell unveränderten Chromosomen sind wie folgt verteilt:

Chr. #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Anzahl pro Metaphase	3	2	2	2	3	3,5	3	3,7	2	3	1	2,5

Chr. #	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
Anzahl pro Metaphase	3	2	2	3	1	3	4	5	2	2,5	1,5	-

Auffällig ist eine Unterrepräsentierung der normalen Chromosomen # 11 und 17, sowie eine Überrepräsentierung von Chromosom # 20. Die Gesamtverteilung chromosomalen Materials aus normalen und aberranten Chromosomen ist in nachfolgendem Diagramm wiedergegeben:

MEWO CHROMOSOMENVERTEILUNG



Für eine nahe tetraploide Zelllinie sind die Chromosomenarme 2p,q; 4p,q; 9p,q; 11p,q; 17p und 21p,q unterrepräsentiert. Die Chromosomenarme 12q; 13q; 15q; 17q und 20p,q sind überrepräsentiert.

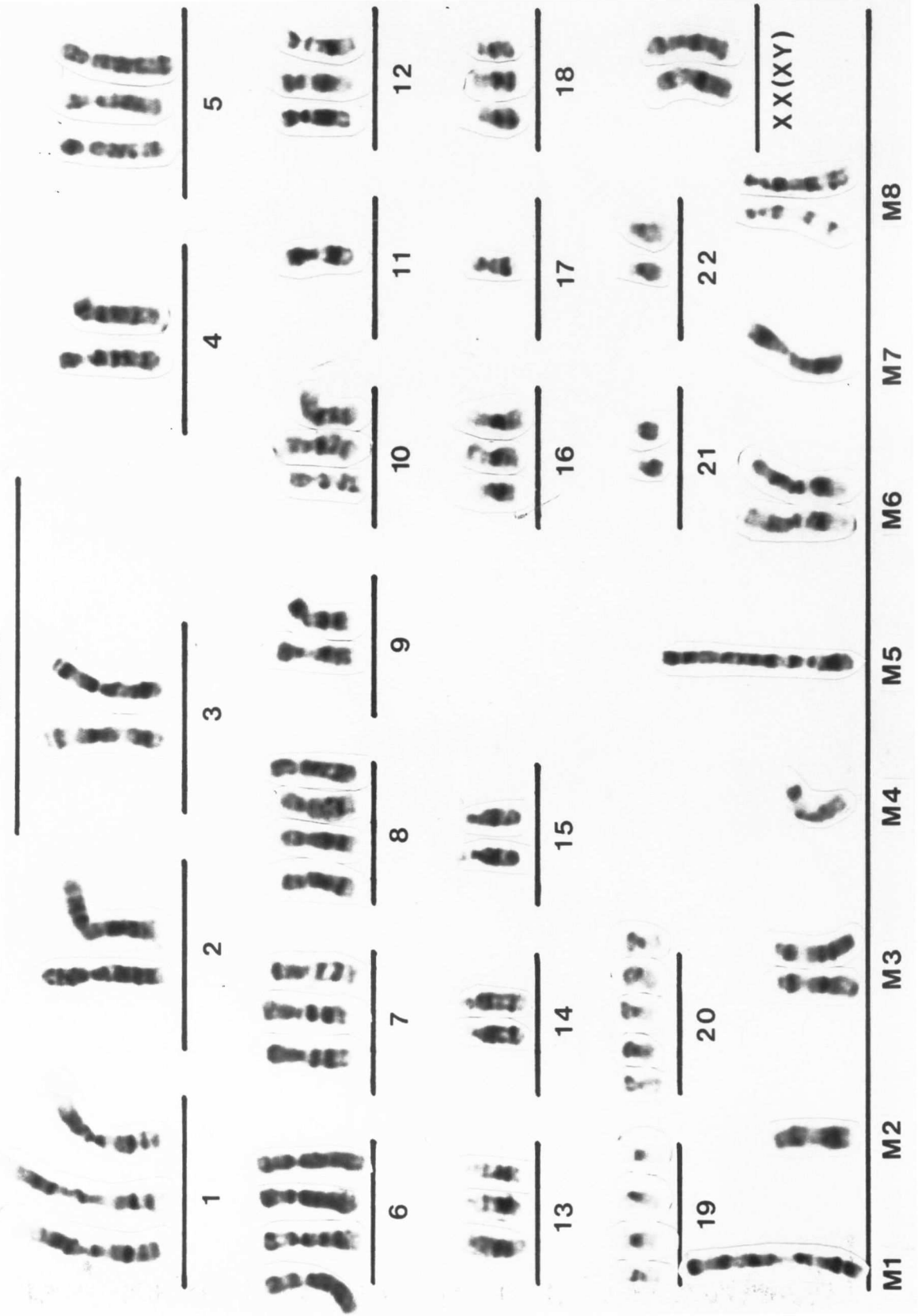
Abb. 10: Repräsentatives Karyogramm der Zell-Linie **MeWo**. Die Linie besitzt eine mittlere Chromosomenzahl von 81 (75 - 84) pro Metaphase und weist acht charakteristische Markerchromosomen auf:

M1: der(1)t(1;14)(1qter→1p33::14q11→14qter)	30%	1 Kopie
M2: del(3)(:p1→qter)	40%	1 Kopie
M3: der(3)t(3;?)(3pter→3q11::?)	100%	2 Kopien
M4: der(6;15)(6pter→6p10::15q10→15qter)	60%	1 Kopie
M5: hsr(12)(p?)	100%	1 Kopie
M6: der(12;15)(12qter→12q10::15q10→15qter)	100%	teilw. 2 Kop.
M7: i(13)(qter→q10::q10→qter)	80%	1 Kopie
M8: dup(17)(:q11→qter)	100%	teilw. 2 Kop.

Als weitere, nicht typische Veränderungen (<30%) finden sich:

del(1)(:p11→qter)
 del(1)(pter→q32:)
 del(2)(pter→q11:)
 del(4)(pter→q14:)
 del(7)(pter→q22:)
 der(13)t(13;?)(13qter→13p11::?)
 der(14;21)(14qter→14q10::21q10→21qter)
 del(18)(:p11→qter)

MEWO



H. A-375

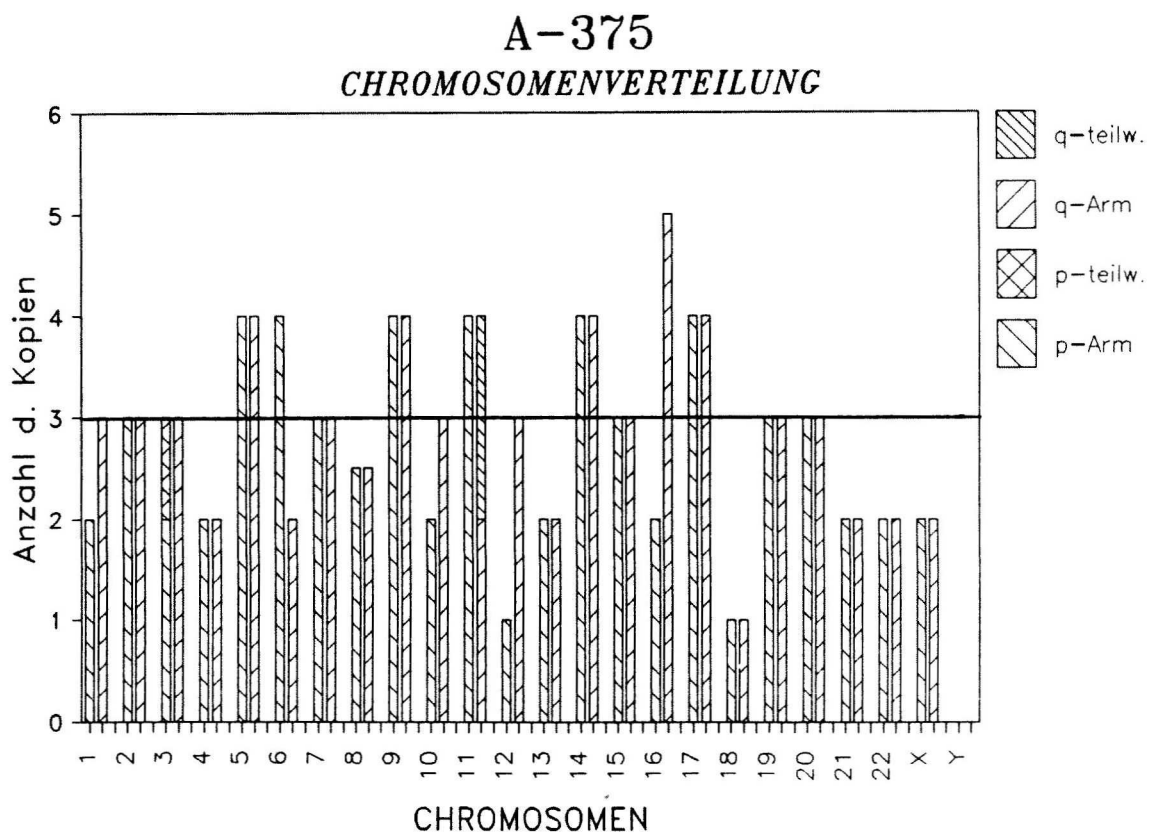
Die Zellen dieser Linie weisen eine mittlere Chromosomenzahl von 69 (56 - 74) auf und besitzen 10 charakteristische Markerchromosomen (Abb. 11).

Die strukturell unveränderten Chromosomen sind wie folgt verteilt:

Chr. #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Anzahl pro Metaphase	2	3	2	1	3	1	3	2,5	3	2	2	1

Chr. #	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X
Anzahl pro Metaphase	2	4	3	3	4	1	3	3	2	2	2

Die Gesamtverteilung chromosomalen Materials ist, getrennt nach p- und q-Arm, in nachfolgendem Balkendiagramm wiedergegeben:



Für eine nahe triploide Zell-Linie sind die Chromosomenarme 5p,q; 6p,q; 9p,q; 11p; 14p,q; 16q und 17p,q überrepräsentiert, die Chromosomenarme 1p; 4p,q; 6q; 10p; 12p; 13pq; 21pq und 22p,q sind unterrepräsentiert.

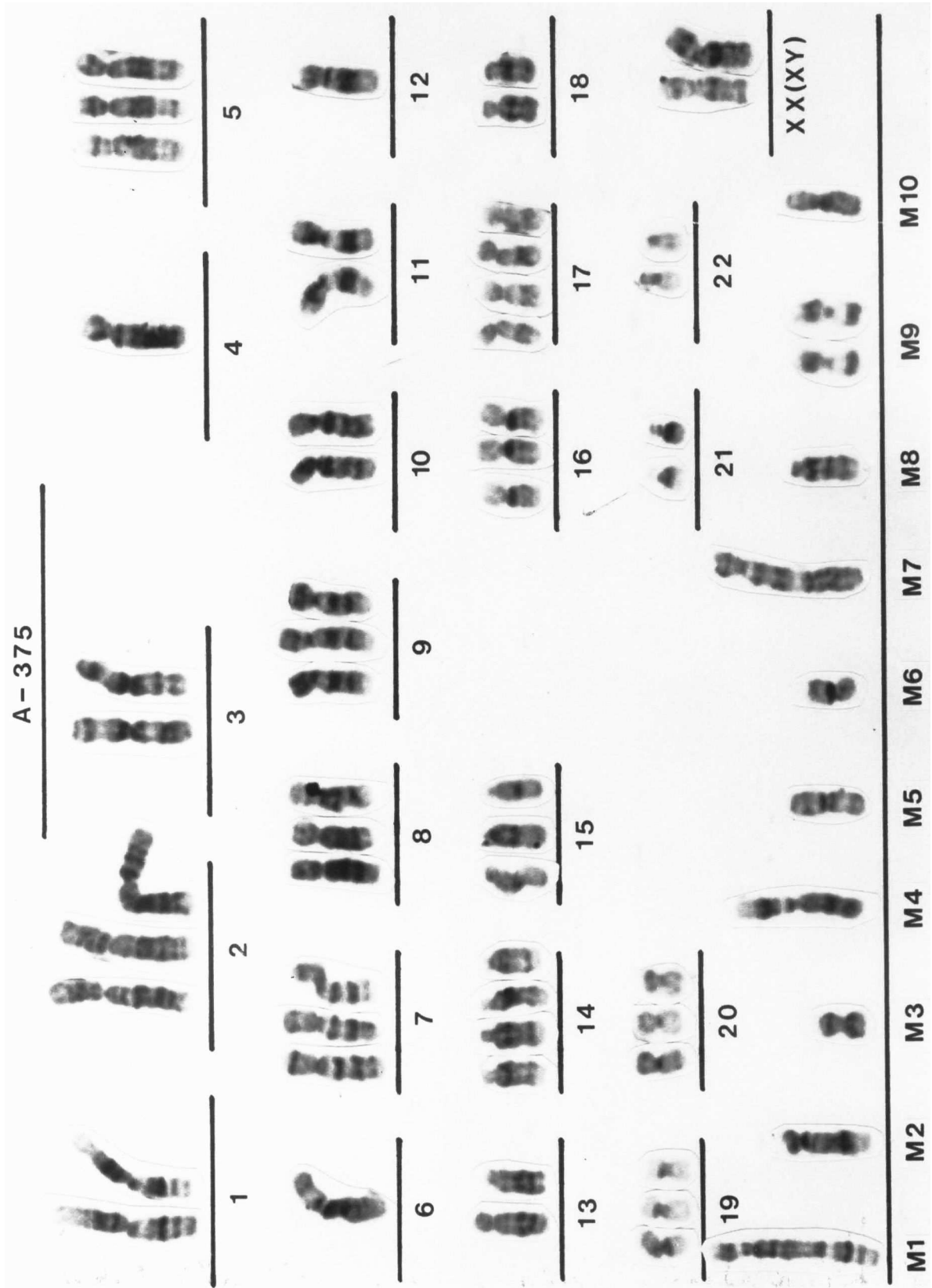
Abb. 11: Repräsentatives Karyogramm der Zell-Linie **A-375**. Die Zellen besitzen eine mittlere Chromosomenzahl von 69 (56 - 74) pro Zelle und weisen 10 verschiedene Markerchromosomen auf:

M1: der(1;4;12)(1qter→1q10::4q35→4q10::12q10→12qter)	100%	1 Kopie
M2: del(3)(:p21→qter)	55%	1 Kopie
M3: der(4;5)(4pter→4p10::5p10→5pter)	100%	1 Kopie
M4: der(5;12)(5qter→5q10::12q10→12qter)	100%	1 Kopie
M5: i(6)(pter→p10::p10→pter)	100%	1 Kopie
M6: del(6)(pter→q14:)	35%	1 Kopie
M7: der(9)t(6;9)(6qter→6q11::9q34→9pter)	100%	1 Kopie
M8: del(10)(:p11→qter)	100%	1 Kopie
M9: del(11)(pter→q23:)	100%	2 Kopien
M10: i(16)(qter→q10::q10→qter)	70%	1 Kopie

Als weitere, nicht typische Veränderung (<30%) konnte erkannt werden:

der(3;10)(3pter→3p10::10q10→10qter)

A-375



J. Sk Mel 13

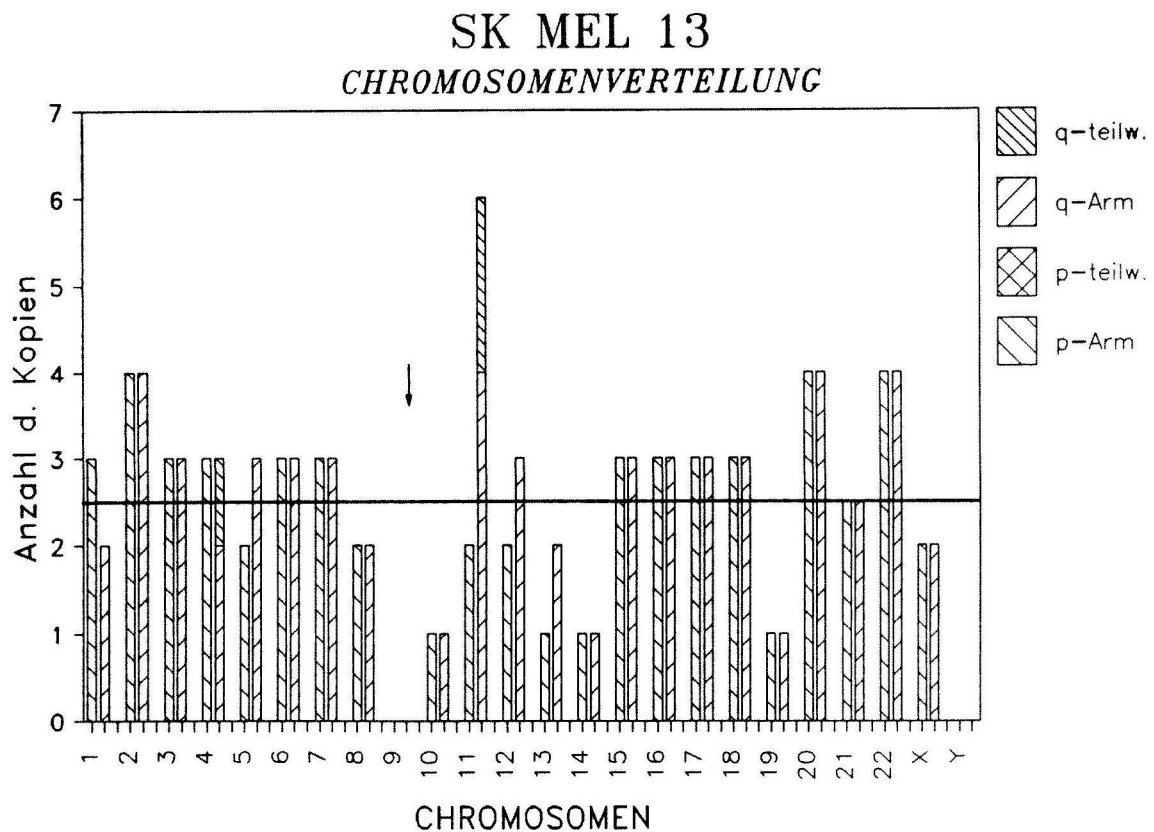
Sk Mel 13 besitzt eine mittlere Chromosomenzahl von 58 (56 - 62) pro Metaphase und weist sechs charakteristische Markerchromosomen auf (Abb. 12).

Die strukturell unveränderten Chromosomen sind wie folgt verteilt:

Chr. #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Anzahl pro Metaphase	3	3	3	2	2	3	3	2	-	1	2	2

Chr. #	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X
Anzahl pro Metaphase	-	1	3	3	3	3	1	4	3	4	2

Auffällig ist, daß keine normalen Chromosomen # 9 und 13 existieren. Die Verteilung chromosomalen Materials aus normalen und aberranten Chromosomen ist in nachfolgendem Diagramm wiedergegeben.



Für eine hyperdiploide Zelle sind die Chromosomenarme 2p,q; 11q; 20p,q und 22p,q überrepräsentiert. Die Chromosomenarme 10p,q; 14p,q und 19p,q sind unterrepräsentiert. Chromosom # 9 ließ sich weder ganz, noch teilweise auffinden.

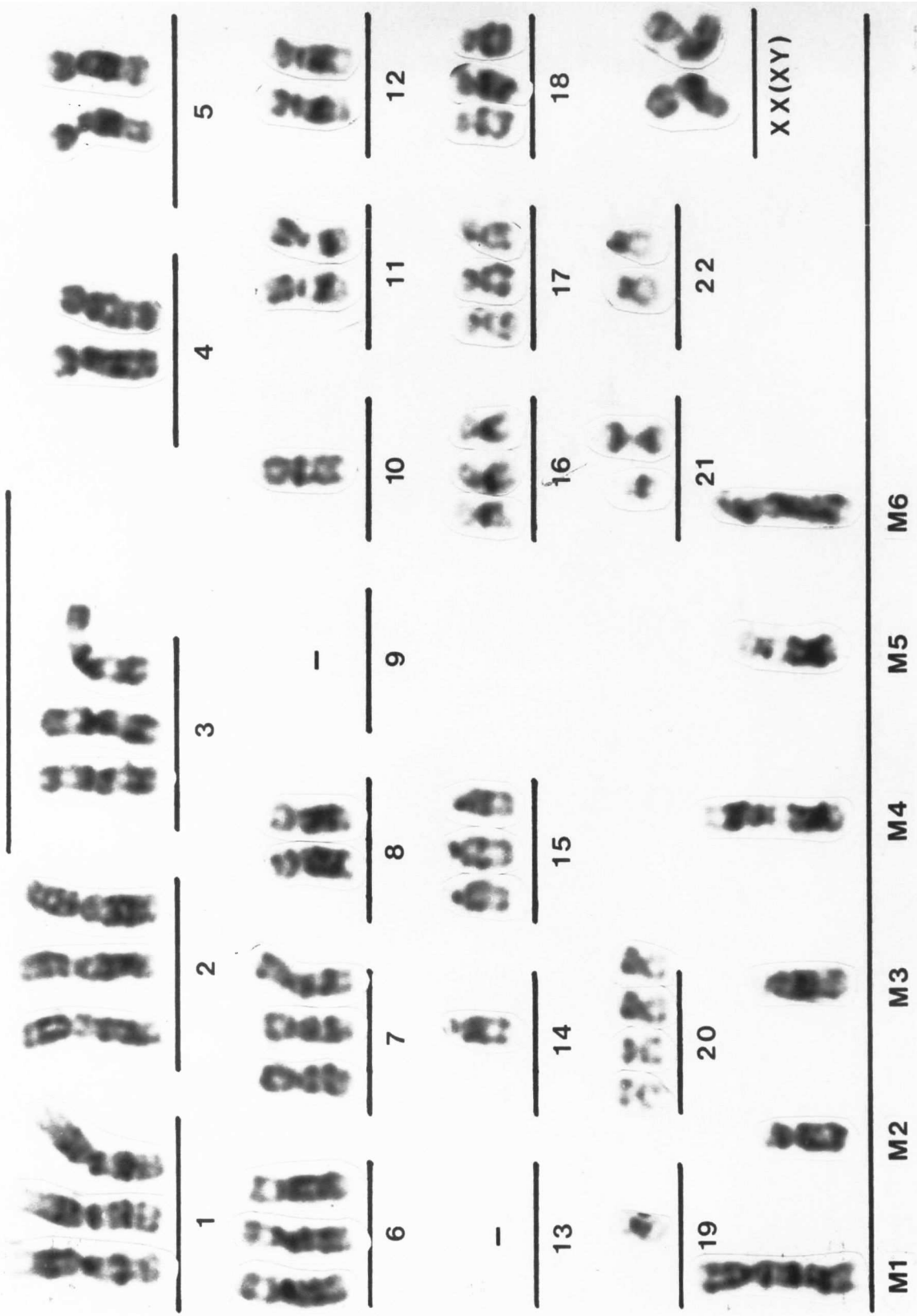
Abb. 12: Repräsentatives Karyogramm der Zell-Linie **Sk Mel 13**. Die Zellen besitzen eine mittlere Chromosomenzahl von 58 (56 - 62) pro Metaphase und weisen sechs verschiedene Markerchromosomen auf:

M1: dup(2)(pter→q31::q13→qter)	100% 1 Kopie
M2: del(4)(pter→q28:)	100% 1 Kopie
M3: del(5)(:p11→qter)	100% 1 Kopie
M4: der(12)t(11;12)(11qter→11q14::12q23→12q10::12q10→12qter)	100% 1 Kopie
M5: der(12)t(11;12)(11qter→11q14::12q23→12q10:) („del(M4)“)	100% 1 Kopie
M6: dup(13)(pter→q34::q11→qter)	100% 1 Kopie

Als weitere, nicht typische Veränderungen (<30%) finden sich:

i(3)(qter→q10::q10→qter)
t(5;?)(5qter→5p15::?)
dup(10)(pter→q22::q11→qter)

SK-MEL 13



K. Sk Mel 25

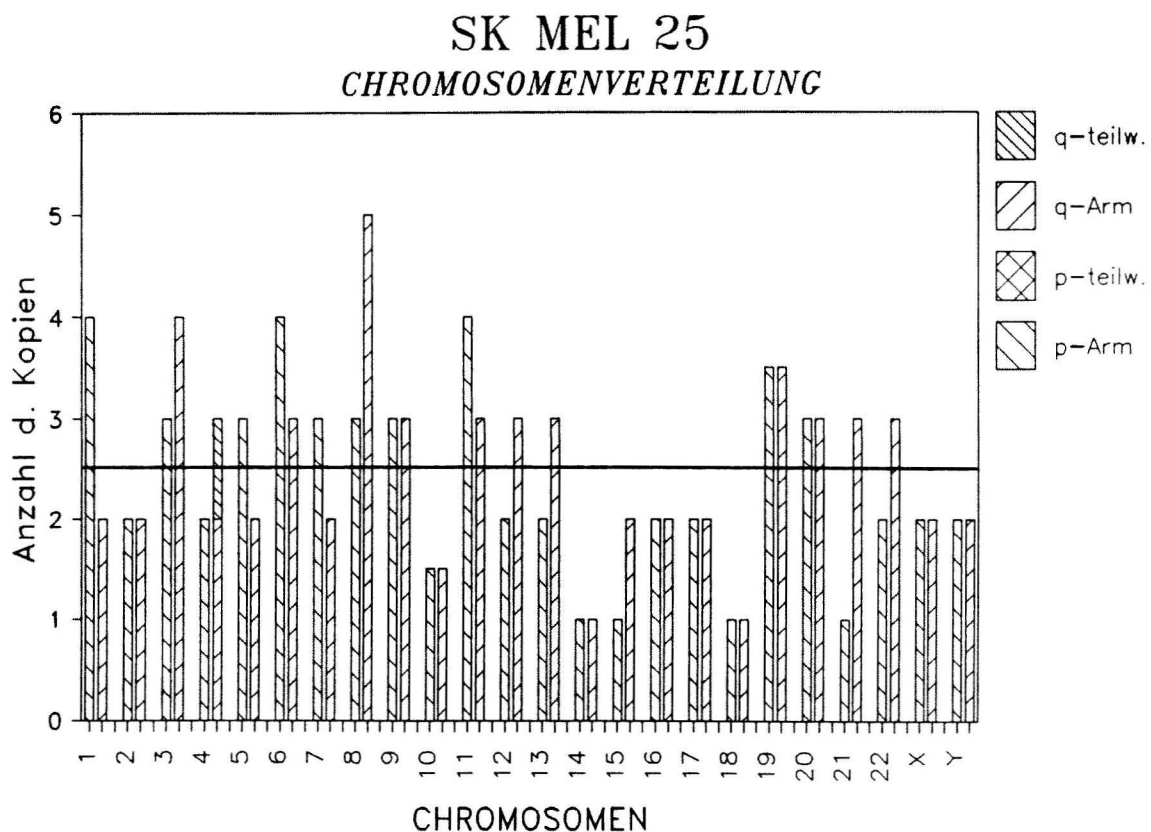
Diese Zell-Linie besitzt eine mittlere Chromosomenzahl von 57 (50 - 60) pro Metaphase und weist 17 verschiedene Markerchromosomen auf (Abb. 13).

Die strukturell unveränderten Chromosomen sind wie folgt verteilt:

Chr. #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Anzahl pro Metaphase	-	2	3	2	1	2	2	2	2	1,5	2	2

Chr. #	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
Anzahl pro Metaphase	-	1	-	2	2	1	3,5	3	1	2	1	2

Auffällig ist, daß keine normalen Chromosomen # 1, 13 und 15 existieren. Die Verteilung chromosomalen Materials aus normalen und aberranten Chromosomen ergibt sich, getrennt nach p- und q-Arm aus nachfolgendem Balkendiagramm:



Für eine hypotetraploide Zelle sind die Chromosomenarme 1p; 3q; 6p; 8q; 11p und 19p,q überrepräsentiert. Die Chromosomenarme 10p,q; 14p,q; 15p; 18p,q und 21p sind unterrepräsentiert.

Abb. 13: Repräsentatives Karyogramm der Zell-Linie **Sk Mel 25**. Die Zellen haben eine mittlere Chromosomenzahl von 57 (50 - 60) und weisen 17 charakteristische Markerchromosomen auf:

M1: del(1)(:p12→qter)	100%	1 Kopie
M2: der(1;22)(1pter→1p10::22q10→22qter)	100%	1 Kopie
M3: der(1;5)(1pter →1p10::5p10→5pter)	100%	teilw. 2 Kop.
M4: der(1;6)(1pter→1p10::6p10→6pter)	100%	1 Kopie
M5: der(9)t(1;9)(1qter→1q11::9q34→9pter)	90%	1 Kopie
M6: der(3;8)(3qter→3q10::8q10→8qter)	100%	1 Kopie
M7: der(11)t(5;11)(5qter→5q25::11q25→11pter)	100%	1 Kopie
M8: der(8;13)(8pter→8p10::13q10→13qter)	90%	1 Kopie
M9: der(13;21)(13qter→13q10::21q10→21qter)	100%	1 Kopie
M10: del(12)(:p11→qter)	100%	1 Kopie
M11: del(8)(:p11→qter)	80%	1 Kopie
M12: del(5)(pter→q25:)	80%	1 Kopie
M13: der(7;15)(7q22→7q10::15q10→15qter)	90%	1 Kopie
M14: der(6)t(6;13)(6pter→6q27::13q11→13qter)	100%	1 Kopie
M15: der(15)t(15;?)(15qter→15q10::?)	90%	1 Kopie
M16: i(21)(qter→q10::q10→qter)	100%	1 Kopie
M17: der(X)t(X;?)(Xqter→Xp22::?)	100%	1 Kopie

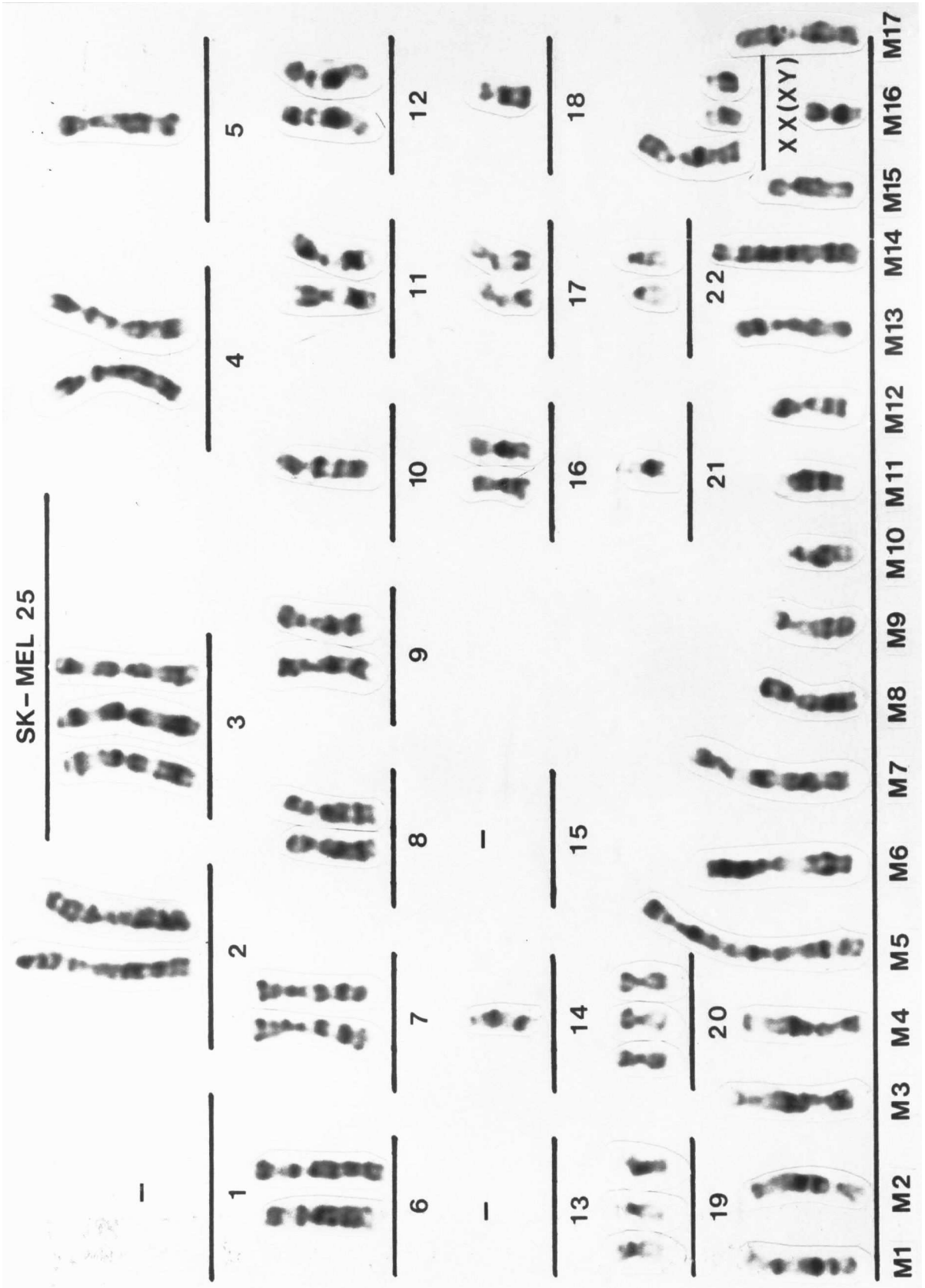
Als weitere, nicht typische Veränderungen (<30%) finden sich:

der(10)t(8;10)(8qter→8q11::10q26→10pter)

del(2)(pter→q11:)

del(4)(pter→q27:)

SK-MEL 25



L. Sk Mel 28

Die Zell-Linie **Sk Mel 28** besitzt eine mittlere Chromosomenzahl von 75 (60 - 83) pro Zelle und weist 21 verschiedene Markerchromosomen auf (Abb. 14).

Diese Zell-Linie ist sehr heterogen, so daß sich noch zahlreiche nicht typische Aberrationen (<30%) finden, die zum Teil nicht identifizierbar waren.

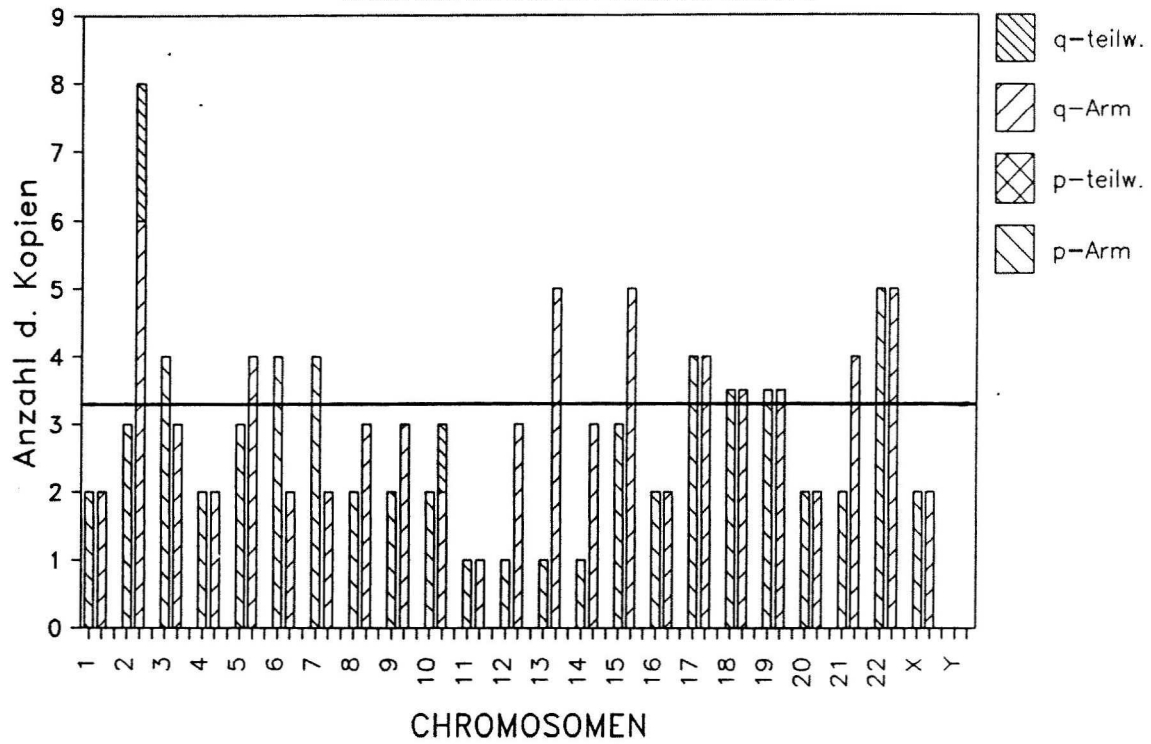
Die strukturell unveränderten Chromosomen sind wie folgt verteilt:

Chr. #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Anzahl pro Metaphase	-	2	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1

Chr. #	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X
Anzahl pro Metaphase	-	1	3	2	4	3,5	3,5	2	2	5	2

Auffällig ist, daß keine normalen Chromosomen 1 und 13 existieren. Die Verteilung chromosomalen Materials aus normalen und aberranten Chromosomen geht aus nachfolgendem Diagramm, getrennt nach p- und q-Arm, hervor.

SK MEL 28 CHROMOSOMENVERTEILUNG

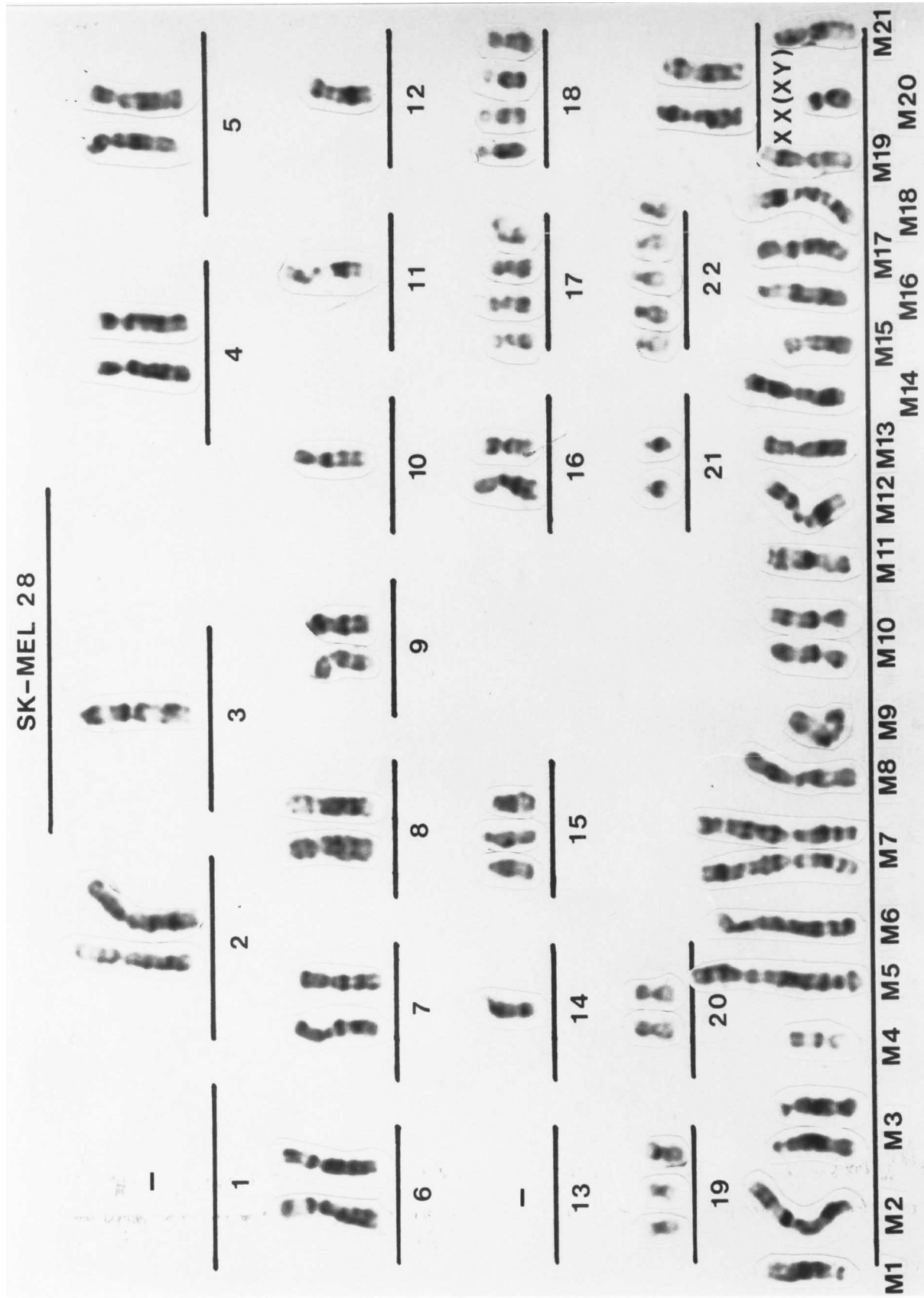


Für eine hypotetraploide Zell-Linie sind die Chromosomenarme 2q; 13q; 15q und 22p,q überrepräsentiert. Die Chromosomenarme 11p,q; 12p; 13p und 14p sind unterrepräsentiert.

Abb. 14: Repräsentatives Karyogramm der Zell-Linie **Sk Mel 28**. Die Zellen besitzen im Durchschnitt 75 (60 - 83) Chromosomen und weisen 21 verschiedene Markerchromosomen auf:

M1: del(1)(pter→q11:)	100%	1 Kopie
M2: i(3)(qter→q10::q10→qter)	100%	1 Kopie
M3: del(5)(:p11→qter)	100%	2 Kopien
M4: del(6)(pter→q11:)	100%	1 Kopie
M5: dup(2)(pter→q37::q31→qter)	100%	1 Kopie
M6: del(2)(:p11→q37::q31→qter) (del(M5))	100%	1 Kopie
M7: der(1;2)(1qter→1q10::2q10→2qter)	100%	teilw. 2 Kop.
M8: der(9;14)(9qter→9q10::14q10→14qter)	100%	1 Kopie
M9: del(3)(pter→q13:)	100%	1 Kopie
M10: der(3;5)(3pter→3p10::5p10→5pter)	100%	teilw. 2 Kop.
M11: der(3;7)(3pter→3p10::7p10→7pter)	100%	1 Kopie
M12: der(12;6)(12qter→12q10::6p10→6pter)	100%	1 Kopie
M13: der(7;13)(7pter→7p10::13q10→13qter)	100%	1 Kopie
M14: der(8;13)(8qter→8q10::13q10→13qter)	100%	1 Kopie
M15: der(13)t(13;?)(13qter→13q10::?)	70%	1 Kopie
M16: dup(13)(p11→q34::q11→qter)	100%	1 Kopie
M17: dup(10)(pter→q26::q24→qter)	100%	1 Kopie
M18: der(12;14)(12qter→12q10::14q10→14qter)	100%	1 Kopie
M19: i(15)(qter→q10::q10→qter)	100%	1 Kopie
M20: i(21)(qter→q10::q10→qter)	60%	1 Kopie
M21: der(15)t(15;?)(15qter→15p11::?)	50%	1 Kopie

SK-MEL 28



M. Sk Mel 93

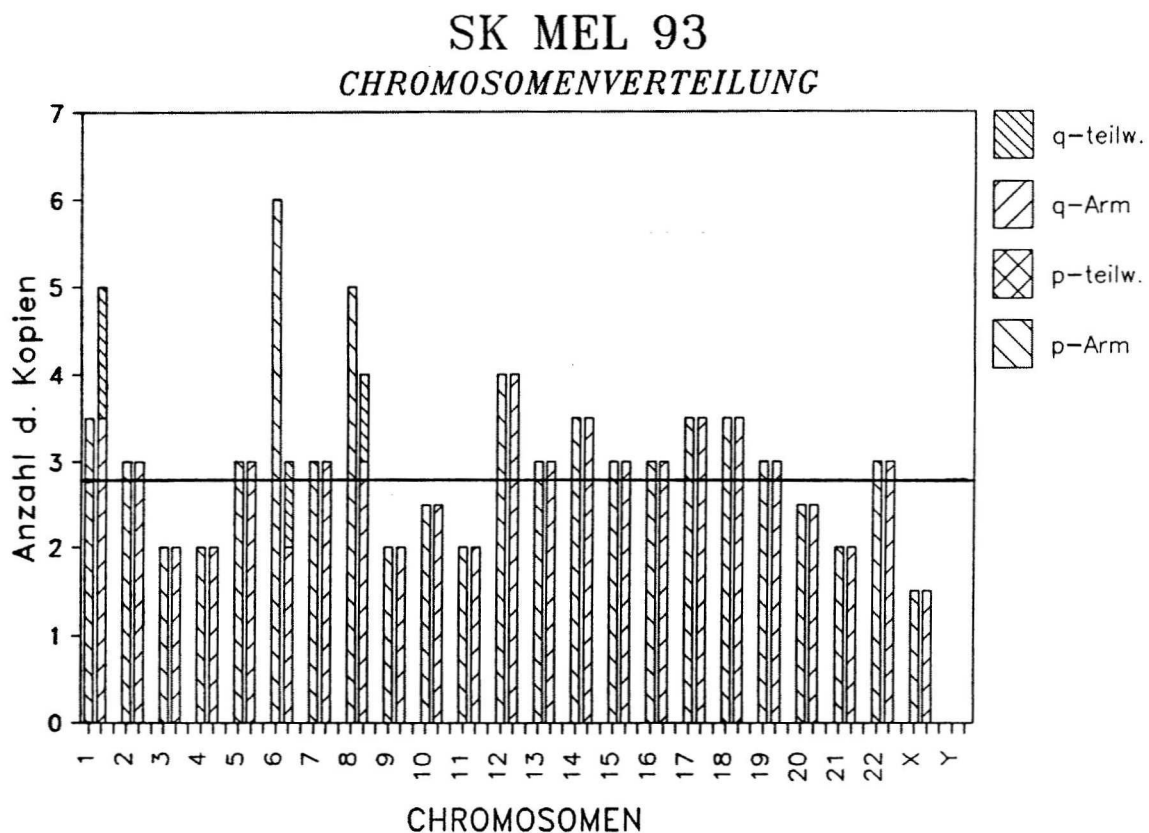
Sk Mel 93 besitzt eine mittlere Chromosomenzahl von 64 (60 -74) pro Zelle und weist acht charakteristische Markerchromosomen auf (Abb. 15).

Die strukturell unveränderten Chromosomen sind wie folgt verteilt:

Chr. #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Anzahl pro Metaphase	2,5	2	2	2	3	3	3	3	2	2,5	2	3

Chr. #	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X
Anzahl pro Metaphase	3	3,5	3	3	3,5	3,5	3	2,5	2	3	1,5

Die Gesamtverteilung chromosomalen Materials ist in nachfolgendem Balkendiagramm wiedergegeben:

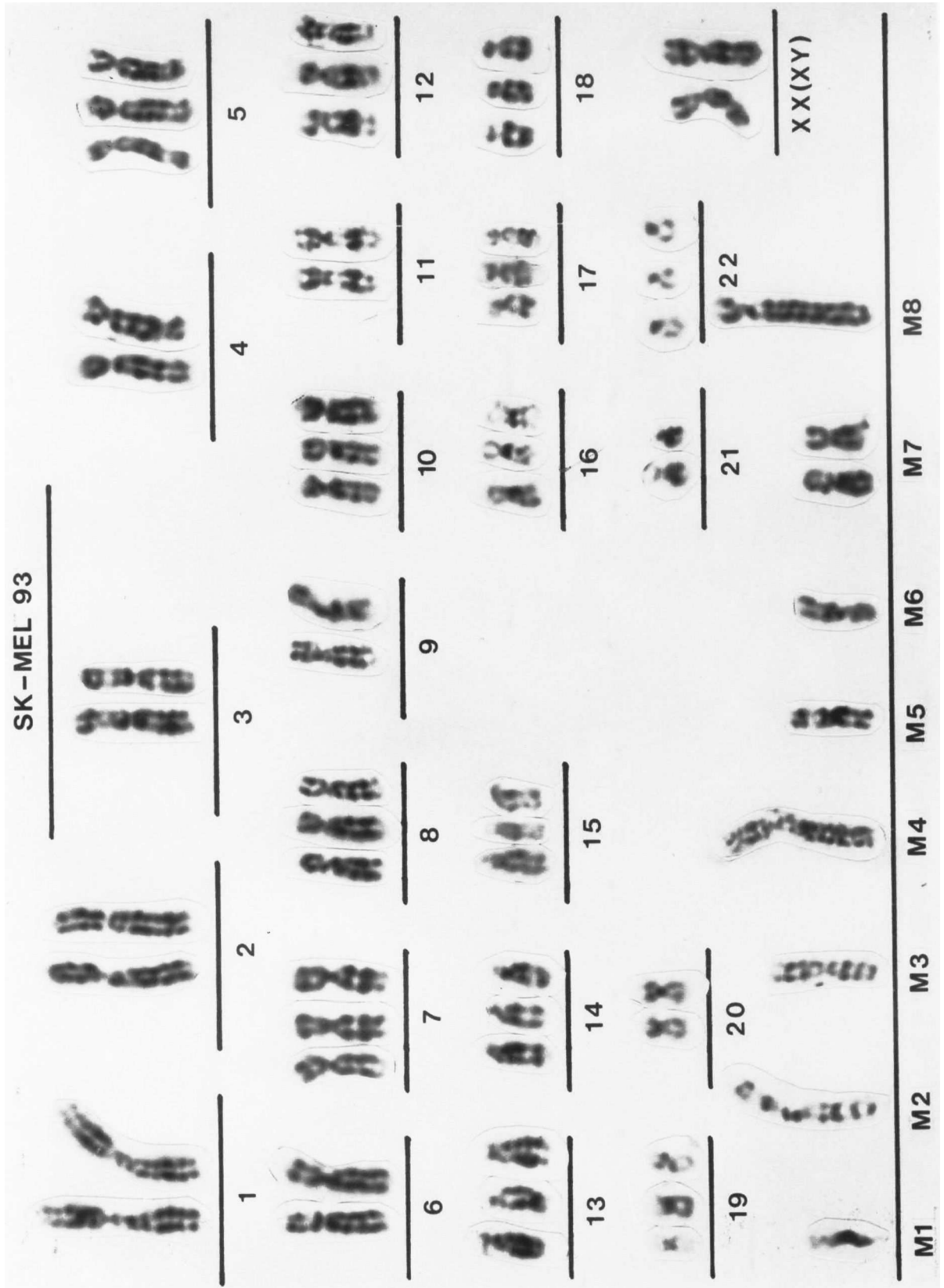


Für eine nahe triploide Zelle sind die Chromosomenarme 1qter; 6p und 8p überrepräsentiert. Eine eindeutige Unterrepräsentierung von Chromosomenarmen ist nicht auszumachen.

Abb. 15: Repräsentatives Karyogramm der Zell-Linie **Sk Mel 93**. Die Zellen besitzen eine mittlere Chromosomenzahl von 64 (60 - 74) und weisen acht charakteristische Markerchromosomen auf:

M1: del(1)(pter→q11:)	50%	1 Kopie
M2: der(1;6)(1qter→1q10::6p10→6pter)	100%	1 Kopie
M3: i(1)(qter→q23::q23→qter)	32%	1 Kopie
M4: der(2)t(2;?)(2pter→2q37::?)	57%	1 Kopie
M5: i(6)(pter→p10::p10→pter)	100%	1 Kopie
M6: del(6)(pter→q21:)	76%	1 Kopie
M7: del(8)(pter→q22:)	38%	2 Kopien
M8: hsr(12)(q?)	100%	1 Kopie

SK-MEL 93



N. Colo-38

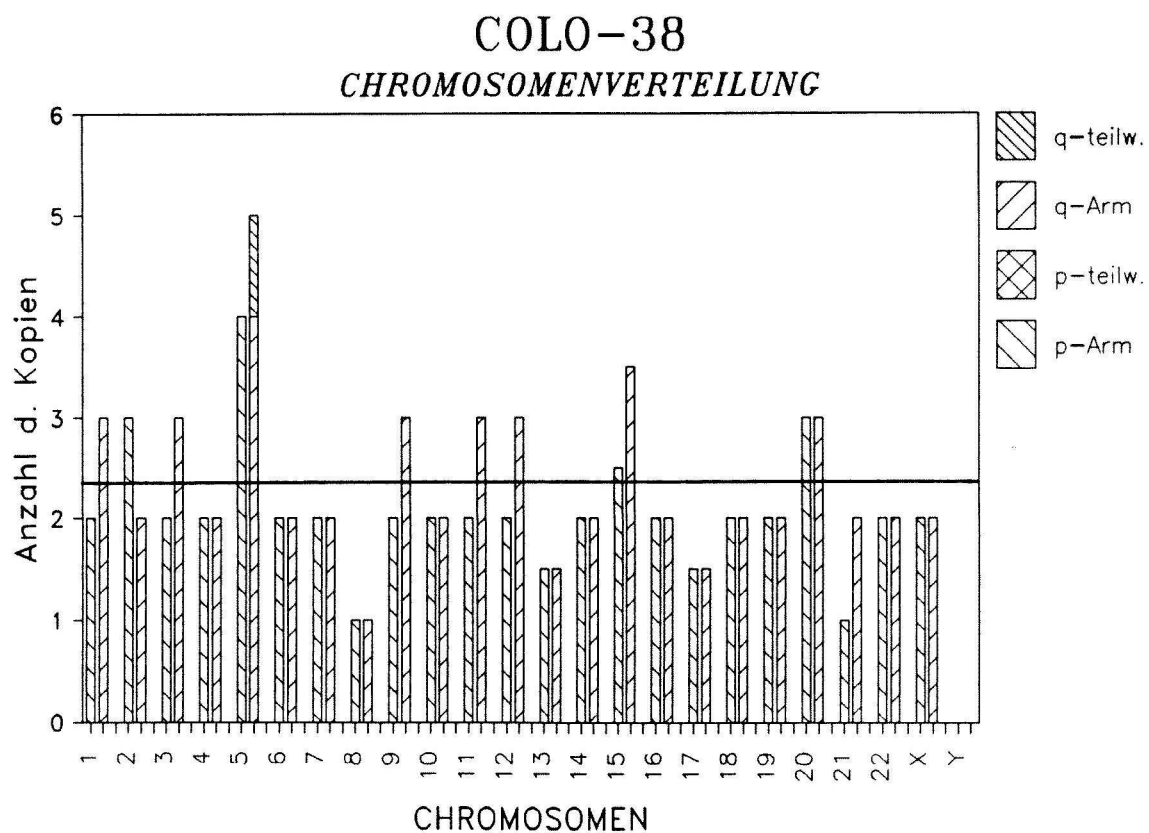
Die Zell-Linie besitzt eine mittlere Chromosomenzahl von 54 (48 - 57) pro Zelle und weist sechs verschiedene Markerchromosomen auf (Abb. 16).

Die strukturell unveränderten Chromosomen sind wie folgt verteilt:

Chr. #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Anzahl pro Metaphase	2	2	2	2	4	2	2	1	2	2	2	2

Chr. #	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
Anzahl pro Metaphase	1,5	2	2,5	2	1,5	2	2	1	1	2	2	1

Die Verteilung chromosomalen Materials aus aberranten und normalen Chromosomen, getrennt nach p- und q-Arm, geht aus nachfolgendem Balkendiagramm hervor.

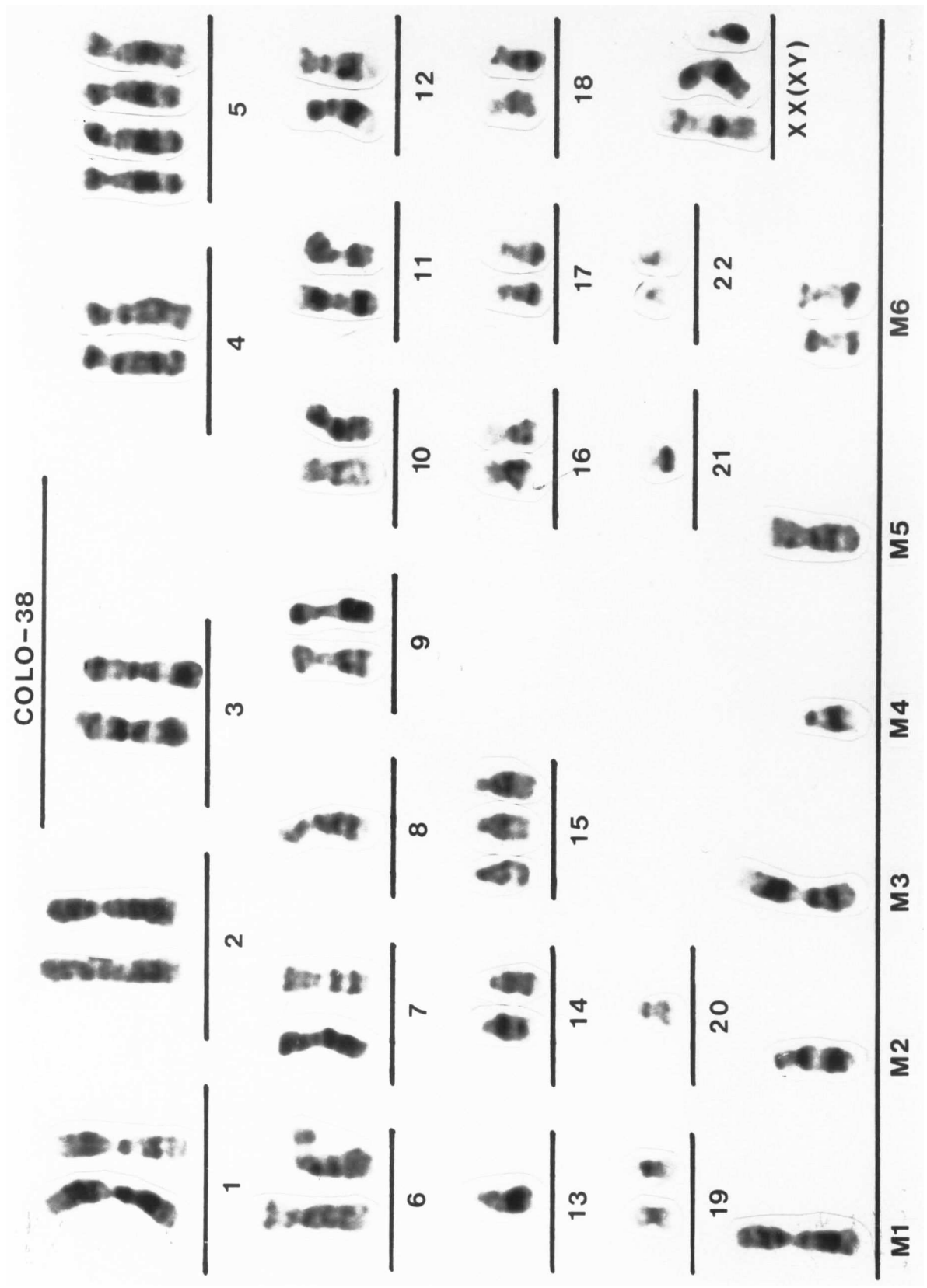


Für eine hyperdiploide Zelle sind die Chromosomenarme 5p,q und 15q überrepräsentiert, die Chromosomenarme 8p,q und 21p sind unterrepräsentiert.

Abb.16: Repräsentatives Karyogramm der Zell-Linie **Colo-38**. Die Zellen besitzen im Mittel 54 (48 - 57) Chromosomen pro Zelle und weisen sechs charakteristische Markerchromosomen auf, die in jeweils einer Kopie vorliegen:

M1: der(1;2)(1qter→1q10::2p10→2pter)	50%
M2: del(3)(:p13→qter)	100%
M3: der(9;12)(9qter→9q10::12q10→12qter)	60%
M4: del(11)(:p11→qter)	100%
M5: der(15)t(15;?)(15qter→15q10::?)	50%
M6: der(20)t(20;21)(20pter→20q13.3::21q11→21qter)	100%

COLO-38



O. Mel-Juso

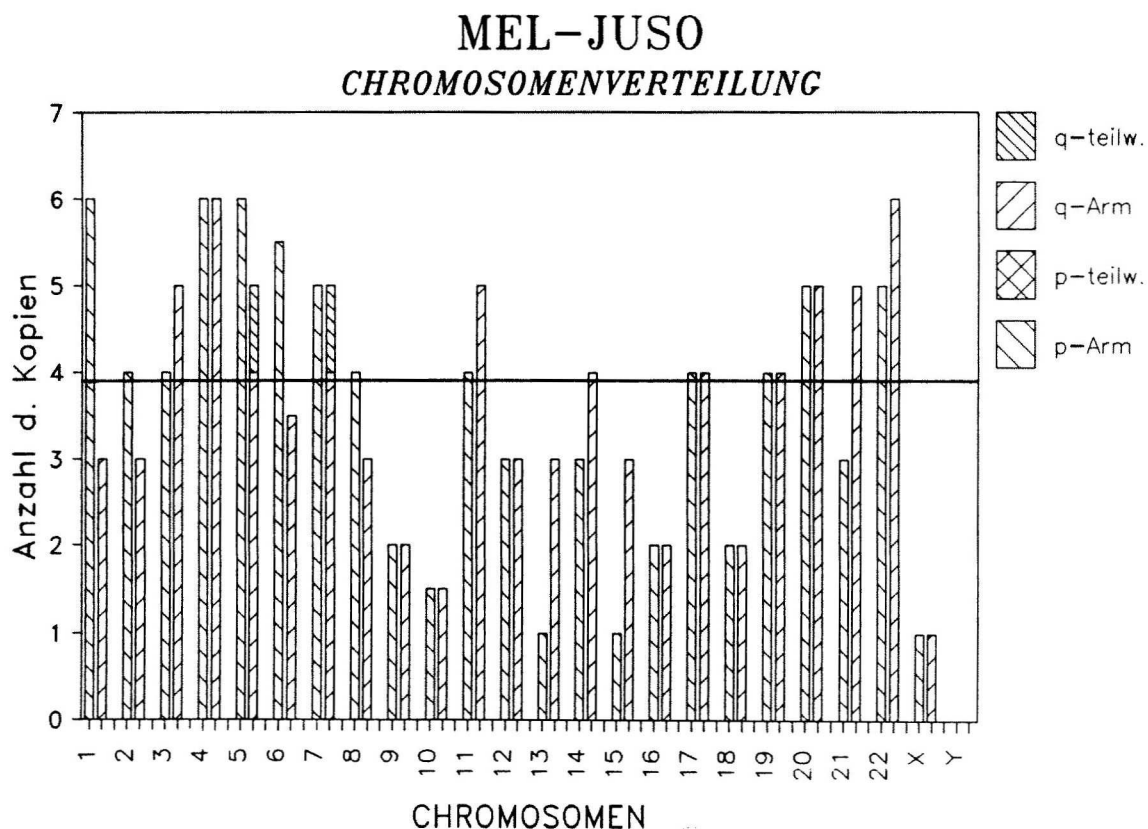
Mel-Juso besitzt im Mittel 89 (78 - 93) Chromosomen pro Zelle und weist 17 charakteristische Markerchromosomen auf (Abb. 17).

Die strukturell unveränderten Chromosomen sind wie folgt verteilt:

Chr. #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Anzahl pro Metaphase	-	3	4	4	4	3,5	4	3	2	1,5	4	3

Chr. #	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X
Anzahl pro Metaphase	1	3	1	2	4	2	4	5	3	5	1

Auffällig ist, daß kein normales Chromosom # 1 existiert. Die Gesamtverteilung chromosomalen Materials ist, getrennt nach p- und q-Arm, in nachfolgendem Balkendiagramm wiedergegeben:



Für eine hypotetraploide Zelle sind die Chromosomenarme 1p; 4pq; 5p; 6p und 22q überrepräsentiert, die Chromosomenarme 9p,q; 10p, q; 13p; 15p; 16p,q und 18 p,q sind unterrepräsentiert.

Abb. 17: Repräsentatives Karyogramm der Zell-Linie **Mel-Juso**. Die Zellen besitzen im Mittel 89 (78 - 93) Chromosomen und weisen 17 verschiedene Markerchromosomen auf:

M1: i(1)(pter→p10::p10→pter)	100%	1 Kopie
M2: del(1)(pter→q11:)	100%	1 Kopie
M3: der(1;21)(1pter→1p10::21q10→21qter)	100%	1 Kopie
M4: der(1;22)(1pter→1p10::22q10→22qter)	100%	1 Kopie
M5: der(1;6)(1pter→1p10::6p10→6pter)	100%	1 Kopie
M6: del(1)(:p12→qter)	100%	1 Kopie
M7: der(1;4;8)(1qter→1q10::4q35→4q10::8p10→8pter)	100%	2 Kopien
M8: der(2;3)(2pter→2p10::3q10→3qter)	50%	1 Kopie
M9: del(4)(pter→q21:)	80%	1 Kopie
M10: der(4;5)(4pter→4p10::5p10→5pter)	100%	1 Kopie
M11: del(7)(pter→q22:)	50%	1 Kopie
M12: del(11)(:p13→qter)	80%	1 Kopie
M13: der(6;13)(6pter→6p10::13q10→13qter)	70%	1 Kopie
M14: der(13;21)(13qter→13q10::21q10→21qter)	100%	1 Kopie
M15: der(5;14)(5pter→5p10::14q10→14qter)	40%	1 Kopie
M16: dup(15)(pter→q26::q11→qter)	70%	1 Kopie
M17: der(15;21)(15qter→15q10::21q10→15qter)	100%	1 Kopie

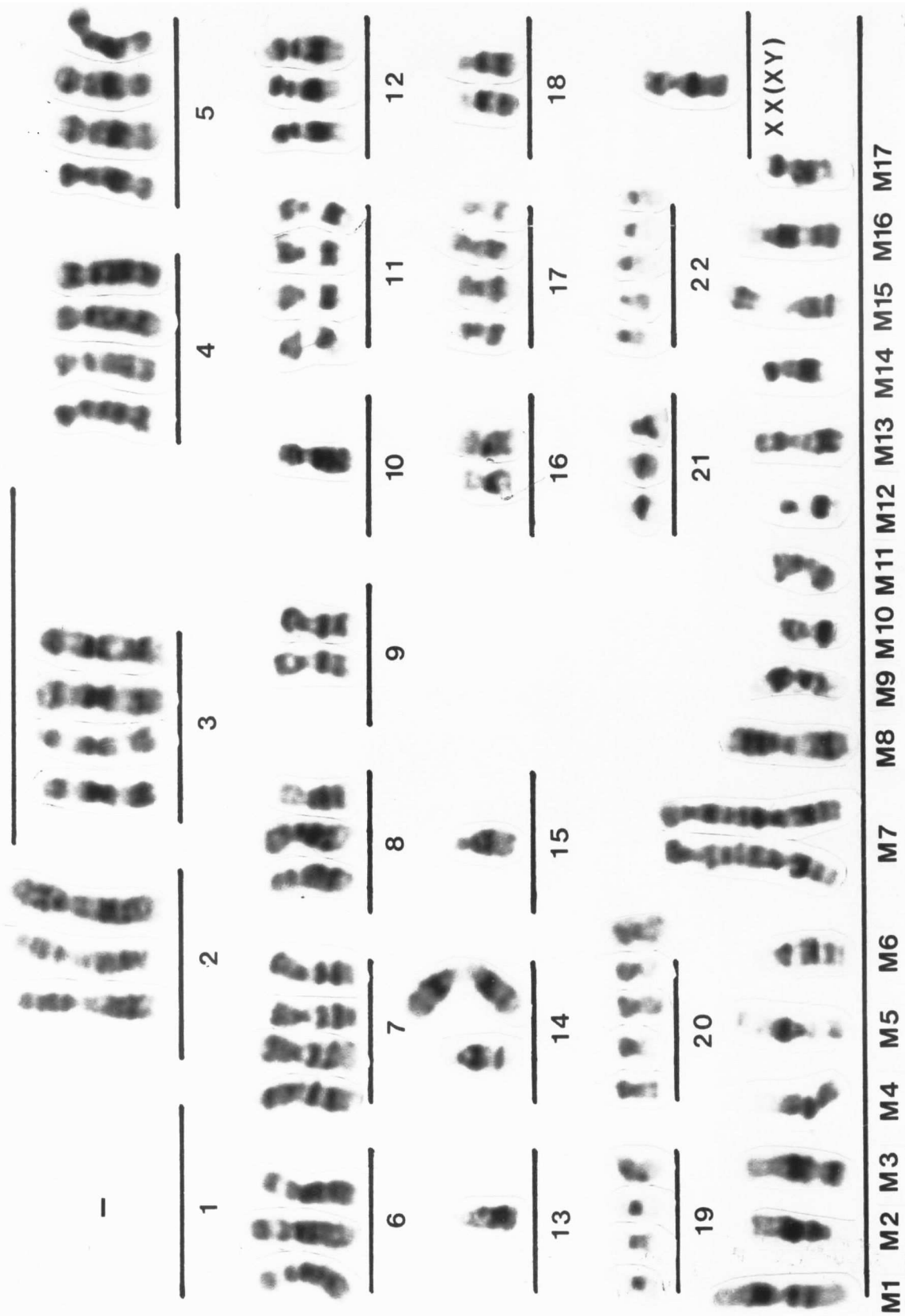
Als weitere, nicht typische Veränderungen (<30%) konnten erkannt werden:

del(5)(:p11→qter)

del(6)(pter→q15:)

der(20)t(20;?)(20pter→20q13.3::?)

MEL - JUSO



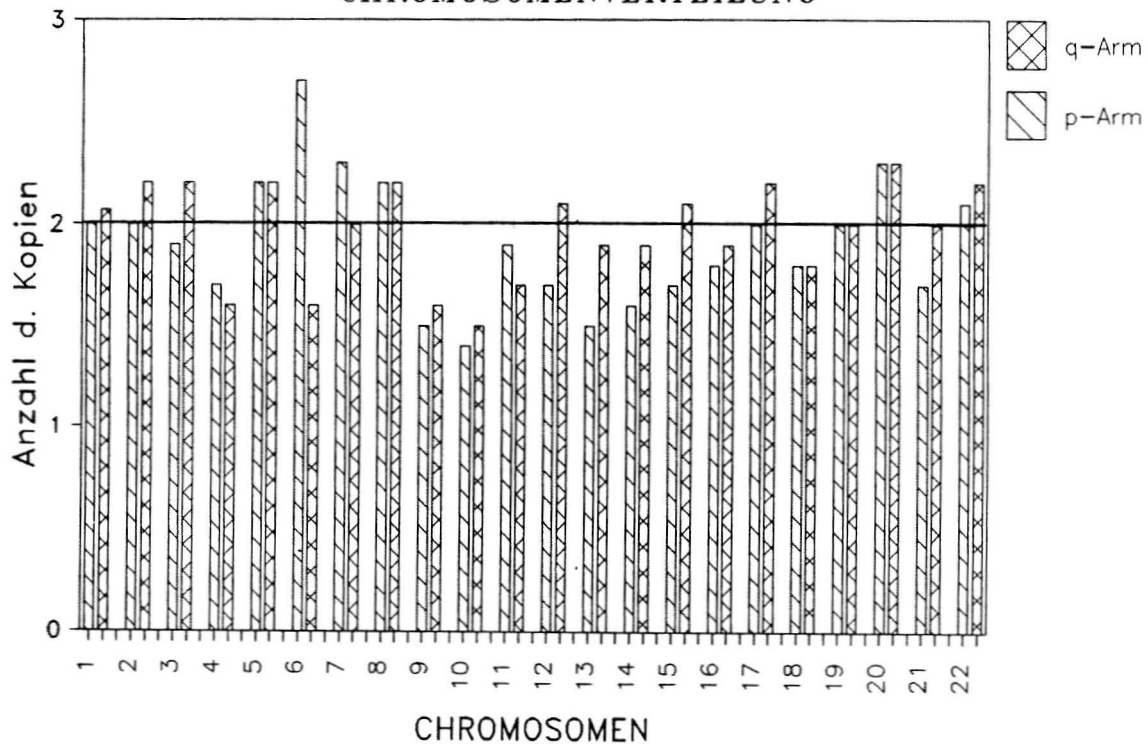
3d. Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse aller untersuchten Melanom-Kulturen

A. numerische (quantitative) Veränderungen

Ein Ziel der Untersuchungen war, Gemeinsamkeiten numerischer Art bei den verschiedenen Linien herauszufinden. An dieser Stelle werden die Ergebnisse aus eigenen, sowie anderen Zell-Kulturen zusammengefasst. Um eine zusammenfassende Aussage bezüglich der Über- bzw. Unterrepräsentierung von Chromosomenarmen machen zu können, wurde, um jeder Kultur die gleiche Wertigkeit zu geben überall die Chromosomenzahl auf 46 pro Zelle berechnet (wie vorher beschrieben). Anschließend wurde das arithmetische Mittel für jeden Chromosomenarm berechnet und in nachfolgendem Diagramm wiedergegeben. Da der Verlust eines Geschlechtschromosoms in ausdifferenziertem Gewebe altersbedingt als durchaus normal anzusehen ist, erscheinen diese in der Berechnung nicht.

Für die Ermittlung struktureller, wie numerischer Veränderungen wurden pro Zell-Linie, je nach verwertbarer Metaphasenausbeute mindestens 20, maximal 35, gebänderte Metaphasen arrangiert. Die zum Teil erheblichen Varianzen, sowie die geringe Fallzahl, gestatten keine statistischen Berechnungen. Die Aussage dieses Diagramms ist somit als Trendmeldung zu sehen. Eine Über- oder Unterrepräsentierung von mehr als 25% wurde hier als signifikant angesehen und in die Bewertung einbezogen.

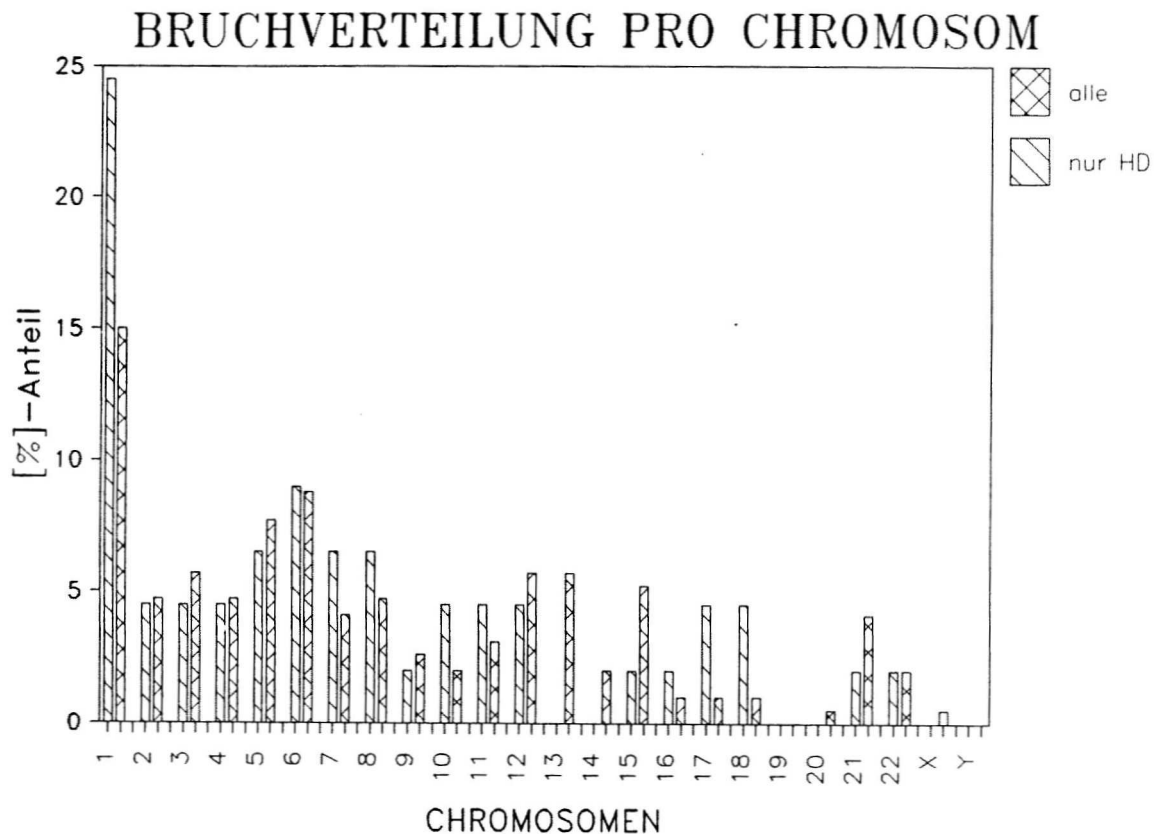
GESAMTÜBERSICHT CHROMOSOMENVERTEILUNG



Das Diagramm zeigt eine Überrepräsentierung der Chromosomenarme 6p; 7p und 20p,q, sowie eine Unterrepräsentierung der Chromosomen # 4, 9 und 10.

B. strukturelle Aberrationen

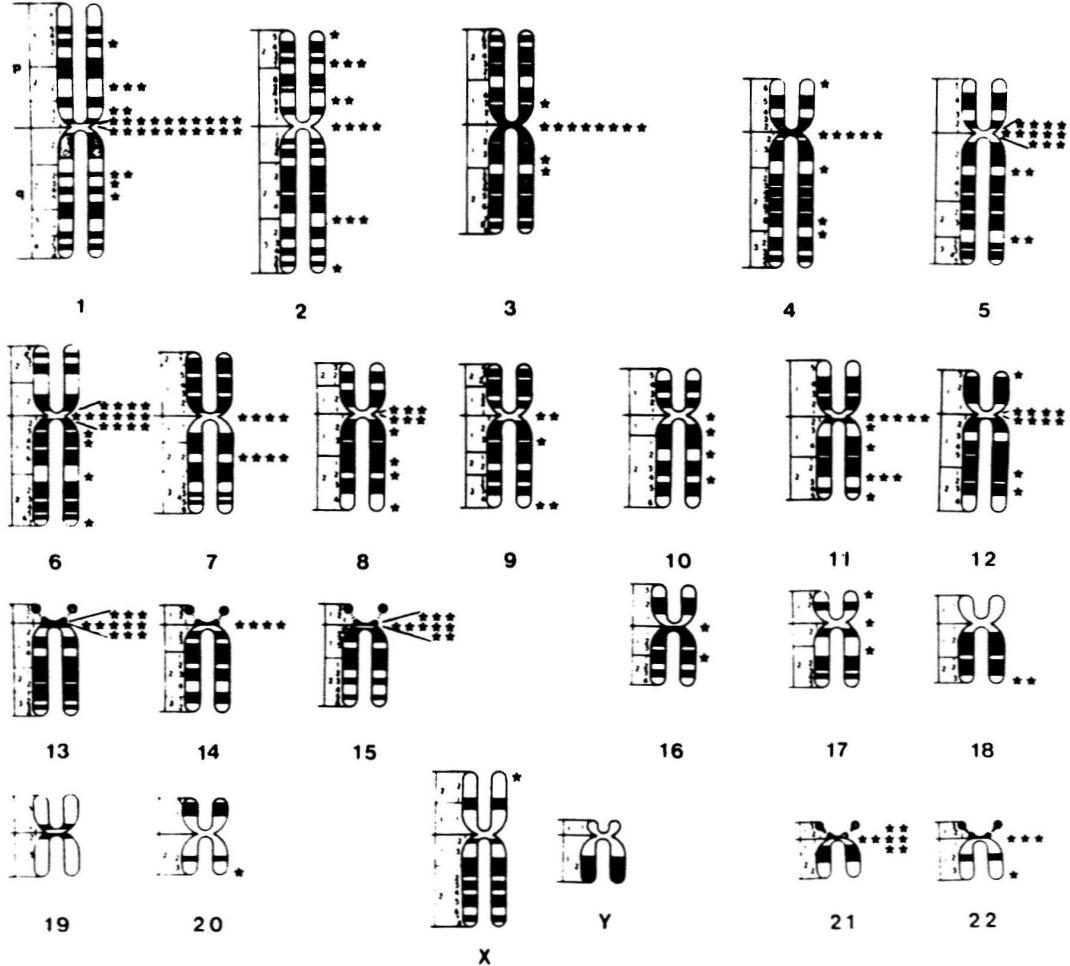
Betrachtet man die Bruchhäufigkeit pro Chromosom, so zeigt sich, daß unter Berücksichtigung der jeweiligen Größe, nicht jedes Chromosom für Mutationsereignisse gleich anfällig ist. Die prozentuale Beteiligung eines jeden Chromosoms an Bruchereignissen ist in nachfolgendem Diagramm wiedergegeben. Erfasst wurden hier nur die Brüche, die auch Spätfolgen hatten, d.h. die im Weiteren zur Formierung von Markerchromosomen führten. Chromatidbrüche oder "gaps" waren in den Kulturen eher selten zu finden. Der jeweils linke Balken bezieht sich nur auf die "Heidelberger Kulturen", der rechte Balken auf alle analysierten Kulturen.



Es zeigt sich, bei Betrachtung der "Heidelberger Kulturen", daß Chromosom # 1 in besonderem Maße in Mitleidenschaft gezogen ist, Die Chromosomen # 5, 6, 7 und 8 heben sich ebenfalls vom Hintergrund ab. Bei Hinzuziehung der "Fremdkulturen" und hier bei Berücksichtigung der unterschiedlichen Größe, weisen die Chromosomen # 1, 13, 15 und 22 eine etwa gleich große Bruchhäufigkeit auf. Da Chromosom # 21 etwa siebenmal kleiner als Chromosom # 1 ist, zeigt es mit acht Ereignissen eine relativ doppelt so hohe Bruchhäufigkeit wie Chromosom # 1. Auffällig ist die relativ niedrige Beteiligung der Chromosomen # 9, 10, 14, 16, 17, 18, 19 und X.

Bezüglich der Lokalisation auf den einzelnen Chromosomenbereichen, finden sich die Bruchereignisse, die im Weiteren zu Deletionen, Translokationen oder Inversionen führen, zu etwa 65% in der zentromerischen Region und nur zu etwa 35% innerhalb eines Chromosomenarmes. Die zentromerische Region muß also als besonders empfindlich angesehen werden.

Die Bruchstellen innerhalb der Chromosomenarme decken sich nur selten mit den bekannten Oncogenloci oder den sogenannten "fragile sites". "Fragile sites" sind definierte Punkte auf den Chromosomen, die bei einem Wachstum der Zellen in Streßmedien eine gewisse Präferenz für Bruchereignisse oder partielle Entspiralisierungen aufweisen. Die Verteilung von insgesamt 193 gefundenen und identifizierten Chromosomenbrüchen in den 14 untersuchten Melanom-Kulturen ist in nachfolgendem Ideogramm dargestellt und jeder Bruch mit einem Sternchen markiert.



Genamplifikationen, die mikroskopisch sichtbar sind, wie "double minutes" oder "homogenously staining regions" (hsr), waren, bis auf die hsr(12p) bei **MeWo** und die hsr(12q) bei **Sk Mel 93**, nicht nachweisbar.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Suche nach gemeinsamen Aberrationen. Es fällt auf, daß sich die meisten Übereinstimmungen bei Chromosom # 1 und 6 finden. Lediglich die Zell-Linien **MM-V-M** und **Sk Mel 13** weisen keine Veränderungen an Chromosom # 1 auf, wobei anzumerken ist, daß **MM-V-M** zumindest in der Explantatkultur zwei Populationen mit Aberrationen an Chromosom # 1 aufwies. Hierauf wird im nächsten Kapitel eingegangen. Veränderungen an Chromosom # 6 finden sich in 10 der 14 untersuchten Kulturen.

Bei den karyotypischen Untersuchungen konnte keine definierbare strukturelle Aberration gefunden werden, die bei mehr als drei Linien gleichzeitig auftrat. Die für zwei und mehr Linien gemeinsamen definierbaren Aberrationen waren im Einzelnen:

del(1):(p22→qter) bei **MM-II-M** und **MM-III-M**
del(1):(p12→qter) bei **Mel Juso** und **Sk Mel 25**
del(1)(pter→q22:) bei **MM-III-M** und **MM-VI-P**
del(1)(pter→q11:) bei **Mel Juso**, **Sk Mel 93** und **Sk Mel 28**
der(4,5)(4pter→4p10::5p10→5pter) bei **Mel Juso** und **A-375**
i(6)(pter→p10::p10→pter) bei **MM-II-M**, **Sk Mel 93** und **A-375**
del(6)(pter→q11:) bei **MM-I-P** und **MM-V-M**
del(7)(pter→q22:) bei **MM-II-M**, **MM-V-M** und **Mel Juso**
del(11)(pter→q22:) bei **MM-II-M** und **A-375**

Darüber hinaus sind aber Gemeinsamkeiten bezüglich der Beteiligung bestimmter Chromosomenbereiche, bzw. ihrer dadurch bedingten Über- oder Unterrepräsentierung, zu sehen.

Chromosom # 1:

Deletionen des p-Armes finden sich in 12 von 14 untersuchten Kulturen. Bei **MM-II-M**, **MM-III-M** und **Sk Mel 25** bleibt die Deletion unverändert erhalten, bei allen anderen geht das aberrante Chromosom # 1 Translokationen mit anderen Chromosomen ein. Lediglich **MM-I-P** und **MeWo** zeigen keine Deletion am p-Arm von Chromosom # 1. Betroffen ist hier meist die zentromerische Region und die Region p22.

Deletionen des q-Armes finden sich in sechs von 14 Kulturen, welche bei **MM-II-M**, **MM-IV-P**, **Sk Mel 28** und **Sk Mel 93** unverändert erhalten bleiben. **Sk Mel 25** und **Mel Juso** zeigen Translokationen, die mit dem Verlust des q-Armes einhergehen.

Chromosom # 3:

Eine Deletion des kurzen Armes (p11) findet sich in sechs von 14 Kulturen. Bei **Colo**, **MeWo** und **A-375** bleibt sie unverändert erhalten. **Sk Mel 25**, **Sk Mel 28** und **Juso** zeigen Translokationen unter Verlust des p-Armes.

Bei **Sk Mel 28** ist eine Deletion des q-Armes nachzuweisen, **MM-VI-P** und **MeWo** besitzen Translokationen, die den Verlust des q-Armes beinhalten.

Chromosom # 4:

Juso und **A-375** besitzen die gleiche Translokation (4p,5p). Zwei von 14 Kulturen (**Sk Mel 13** und **Mel Juso**) weisen jeweils eine Deletion des terminalen Teiles des q-Armes auf.

Chromosom # 5:

Zwei von 14 Kulturen (**Sk Mel 13** und **Sk Mel 28**) zeigen jeweils eine Deletion des kurzen Armes von Chromosom # 5.

Chromosom # 6:

Bei den Aberrationen von Chromosom # 6 fällt auf, daß sie, mit Ausnahme der Translokation t(13q,6q) bei **Sk Mel 25**, alle den Verlust des q-Armes zur Folge haben. Die häufige Formierung von Isochromosomen führt zur weiteren Überrepräsentierung des p-Armes.

Isochromosomen für den p- Arm von Chromosom # 6 sind bei drei von 14 Kulturen (**MM-II-M**, **Sk Mel 93** und **A-375**), Deletionen des q-Armes bei vier von 14 Kulturen (**MM-I-P**, **MM-V-M**, **Sk Mel 93** und **A-375**), nachzuweisen. sechs von 14 Kulturen (**MM-VI-P**, **Sk Mel 25**, **Sk Mel 28**, **Sk Mel 93**, **Juso** und **MeWo**) zeigen Translokationen unter Verlust des q-Armes von Chromosom # 6.

Chromosom # 7:

Drei von 14 Kulturen (**MM-II-M**, **MM-V-M** und **Mel Juso**) besitzen jeweils eine Deletion des terminalen Teiles des q-Armes von Chromosom # 7.

Chromosom # 8:

Der q-Arm von Chromosom # 8 ist bei vier von 14 Kulturen an Translokationsereignissen beteiligt (**MM-III-M**, **MM-V-M**, **Sk Mel 25**, **Sk Mel 28**), bei gleichzeitigem Verlust des p-Armes.

Chromosom # 11:

MM-II-M und **A-375** besitzen die gleiche Deletion (pter→q22:) an Chromosom # 11.

Chromosom # 12:

Wie bei Chromosom # 8 ist auch hier der q-Arm häufig in verschiedenen Veränderungen zu finden (sechs von 14 Kulturen) (**Sk Mel 13**, **Sk Mel 25**, **Sk Mel 28**, **Mewo**, **A-375** und **Colo**).

Wie vorstehende Auflistung zeigt, können, mit gewissen Einschränkungen, beim malignen Melanom keine spezifischen Aberrationen festgestellt werden. Jedoch läßt sich feststellen, daß bestimmte Chromosomen oder Chromosomenarme häufig an Chromosomenmutationen beteiligt sind, was zur Über- bzw. Unterrepräsentierung von Chromosomenteilen führen kann.

4. Verhalten des individuellen Karyotyps humaner Melanom-Zell- Linien im Laufe der Langzeit-Kultivierung

Für die Untersuchungen zur genetischen Stabilität humaner Melanom-Zell-Linien sind im Wesentlichen drei Gesichtspunkte relevant:

1. Die meisten cytogenetischen Daten von humanen Melanomen, sowohl in den eigenen Untersuchungen, wie auch in den Studien anderer Autoren, wurden aus Explantatkulturen oder etablierten Zell-Linien gewonnen. Es konnte somit bis dato nicht gesagt werden, inwieweit diese Ergebnisse auf die Situation im Ausgangstumor übertragbar sind.
2. Zell-Kulturen werden oft über lange Zeit für die verschiedensten *in vitro*-Studien genutzt, weshalb es wichtig ist zu wissen, inwieweit eine späte Zell-Linie mit ihren frühen Passagen vergleichbar ist.
3. Die eigenen cytogenetischen Untersuchungen wurden außer an den selbst etablierten Zell-Linien auch an Zell-Linien aus anderen Labors durchgeführt. Genaue Passagenzahlen waren hier nicht mehr zu ermitteln. Es galt somit zu zeigen, inwieweit diese Befunde die Ergebnisse der eigenen Zell-Linien stützen können, d.h. ob sie noch der Ausgangssituation entsprechen.

Das Verhalten des individuellen Karyotyps wurde an den Kulturen **MM-I-P**, **MM-II-M** und **MM-V-M** studiert, bei denen die Etablierung einer permanenten Zell-Linie direkt aus dem Tumormaterial möglich war. Die ausführlichsten Untersuchungen wurden an der Zell-Linie **MM-II-M** durchgeführt, die ausgehend von der Explantatkultur, bis zur 40. Passage alle fünf Passagen, später alle 10 Passagen karyotypiert wurde. **MM-V-M** wurde in der Explantatkultur, wie in den Passagen 5, 10, 17, 30, 35 und 50 analysiert. Bei **MM-I-P** wurden die Untersuchungen in der 2. und 66. Passage durchgeführt. Eine Änderung des Phänotyps der Zellen *in vitro* konnte im jeweiligen Untersuchungszeitraum nicht festgestellt werden.

A. MM-I-P

Bei dieser Zelllinie war eine Karyotypierung der Explantatkultur nicht möglich, so daß die ersten Ergebnisse hier ab der 2. Passage vorliegen (Abb. 18). Eine Aussage, ob bei der Primäranzucht mehrere Zellpopulationen aus dem gleichen Tumor vorlagen, kann im Nachhinein mit Sicherheit nicht mehr gemacht werden. Da aber aus den insgesamt vorliegenden Befunden eine sehr hohe genetische Stabilität dieser Zell-Linien abzuleiten ist, kann geschlossen werden, daß es eine relativ homogene Population war, die in Kultur angewachsen ist.

MM-I-P weist nur wenige Veränderungen auf, was daran liegen mag, daß es sich hier bei dem Ausgangsmaterial um einen Primärtumor handelte. Es finden sich drei Markerchromosomen, die in jeder analysierten Metaphase zu finden waren.

Auffällig ist die Polysomie von Chromosomenarm 6p (4 Kopien) und Chromosom # 7 (4 Kopien). Die Zellen besitzen im Durchschnitt 55 (53 - 58) Chromosomen.

Der Karyotyp dieser Zelllinie bleibt bis zur zuletzt untersuchten, 66. Passage unverändert erhalten (Abb. 4), d.h. alle drei Markerchromosomen waren in 100% der analysierten Metaphasen zu finden. Neue Veränderungen, struktureller wie numerischer Art, waren nicht festzustellen.

Abb. 18: Repräsentatives Karyogramm der 2. Passage von **MM-I-P**. Die Zellen besitzen im Durchschnitt 55 (53 - 58) Chromosomen und weisen drei stabile Markerchromosomen auf:

M1: dup(1)(pter→q43::q25→q43::q31→qter)	100% 1 Kopie
M2: del(6)(pter→q11:)	100% 2 Kopien
M3: inv(9)(pter→p24::q13→p24::q13→qter)	100% 1 Kopie

B. MM-II-M

Die Analyse dieser Zell-Linie begann bereits ab der Explantatkultur, so daß hier Schlüsse auf die cytogenetischen Veränderungen im Tumor möglich sind. Neben vielen "normalen" Metaphasen (46,XX), die den Stromazellen zuzurechnen sind, fanden sich auch zwei Tumormetaphasen, die bereits alle Charakteristika der späteren Passagen aufwiesen. Aufgrund der nur geringen Metaphasenausbeute ist nicht zu sagen, ob es sich bei dem aufgearbeiteten Tumormaterial um eine homogene Zellpopulation handelte, oder ob der Tumor aus verschiedenen Subpopulationen klonalen Ursprungs bestand. In der Explantatkultur waren fünf verschiedene Markerchromosomen (M1 - M5) nachzuweisen (Abb. 19).

Auffällig ist die für eine hypotetraploide Zelle erhebliche Polysomie der Chromosomen # 8 und 22. Weiterhin ist bemerkenswert, daß bis auf M3 alle Markerchromosomen in zwei Kopien vorliegen. Entweder ist eine Kopie von M3 im Laufe der Tumorentwicklung verlorengegangen, oder es handelt sich bei M3 um eine späte Veränderung, die also nach der erfolgten Polyploidisierung der Tumorzellen auftrat. Bezüglich der Polysomie von Chromosom # 8 ist die Linie sehr heterogen, es finden sich Metaphasen mit 4 bis 10 Kopien dieses Chromosoms.

Die Zellen der Primärkultur wuchsen sehr langsam, so daß es ein $\frac{3}{4}$ Jahr dauerte, um von der Explantatkultur bis zur 3. Passage zu gelangen. Ab der 5. Passage zeigte sich ein deutlich verbessertes Wachstumsverhalten, das mit dem Auftreten eines neuen Markerchromosoms (M6) korreliert. Hierbei handelt es sich um eine Duplikation eines Teiles des p-Armes von Chromosom # 2 (dup(2)(p13p21)) (Abb. 20). Ab jetzt konnte die Linie alle 10 bis 14 Tage mit einer Aufteilung von 1 : 3 bis 1 : 4 unterkultiviert werden.

Der Karyotyp bleibt bis zur 20. Passage unverändert, d.h. neue Veränderungen waren in diesem Zeitraum nicht auszumachen. Ab hier bis zur 25. Passage wurden gehäuft sogenannte "sticky chromosomes" und Chromosomenbrüche gefunden. "sticky chromosomes" sind Gebilde, die aus zwei oder mehreren ganzen Chromosomen bestehen, welche mit ihren Enden aneinander kleben. Diese Veränderungen sind häufig in Virus-infizierten oder Virus-transfizierten Zellen zu finden (Boukamp P., 1987). In Abb. 21 ist ein Beispiel hierfür gegeben. In dieser Metaphase finden sich als zusätzliche Veränderungen ein gebrochenes

Chromosom # 1, eine Inversion von Chromosom # 12 und eine sogenannte "stickyness" der Chromosomen # 6 und 13.

Ab der 40. Passage kommt in einigen Metaphasen eine Deletion des q-Armes von Chromosom # 7 (del(7)(q22)) (M 7) hinzu. Eine Kopie von M 5 geht verloren. Die Splittung der Kultur erfolgte ab jetzt in einem Verhältnis von 1 : 6 bis 1 : 10.

Ab der 60. Passage geht M 3 verloren, einige Metaphasen zeigen eine Deletion des q-Armes von Chromosom # 4 (del (4)(q25)) (M8).

Die Abb. 22 zeigt die Kultur in der zuletzt untersuchten, 85. Passage. Neue Veränderungen waren bis hierhin nicht mehr auszumachen.

Die Linie **MM-II-M** konnte über eine Spanne von 3 ½ Jahren cytogenetisch verfolgt werden. Ausgehend von der Explantatkultur bis hin zur 85. Passage, machte die Kultur etwa 200 Populationsverdopplungen durch. In diesem Zeitraum entstanden lediglich drei neue Veränderungen, während zwei vorher vorhandene verloren gingen. Die Polysomie von Chromosom # 8 ist von anfangs ca. sieben Kopien auf ca. fünf zurückgegangen, die durchschnittliche Chromosomenzahl von anfangs 71 auf 67 gesunken. Diese Befunde sprechen für eine hohe *in vitro*-Stabilität dieser Zell-Linie.

Abb.19: Karyogramm der Explantatkultur von **MM-II-M**. Die Zellen besitzen 72 Chromosomen und weisen 5 verschiedene Markerchromosomen auf:

M1: del(1)(:p11→qter)	100% 2 Kopien
M2: i(6)(pter→p10::p10→pter)	100% 2 Kopien
M3: del(10)(pter→q22:)	100% 1 Kopie
M4: del(11)(pter→q22:)	100% 2 Kopien
M5: del(12)(pter→q21::q23→qter)	100% 2 Kopien

MM-II - M/EK

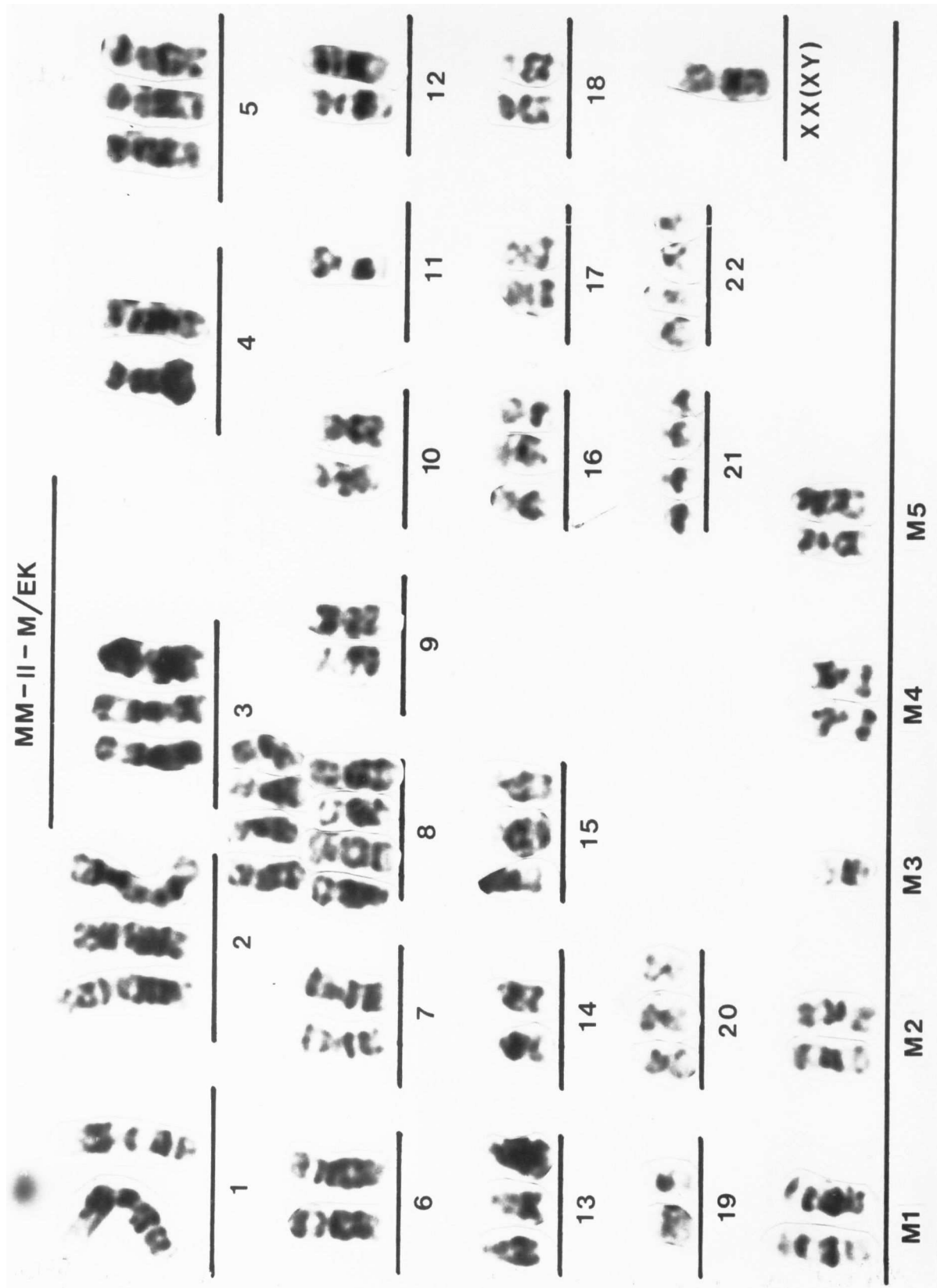


Abb. 20: Karyogramm der 5. Passage von **MM-II-M**. Ein neues Markerchromosom (M6) konnte identifiziert werden:

M1: del(1)(:p11→qter)	100%	2 Kopien
M2: i(6)(pter→p10::p10→pter)	100%	2 Kopien
M3: del(10)(pter→q22:)	100%	1 Kopie
M4: del(11)(pter→q22:)	100%	2 Kopien
M5: del(12)(pter→q21::q23→qter)	100%	2 Kopien
neu: M6:dup(2)(pter→p13::p21→qter)	100%	1 Kopie

MM-II - M/5

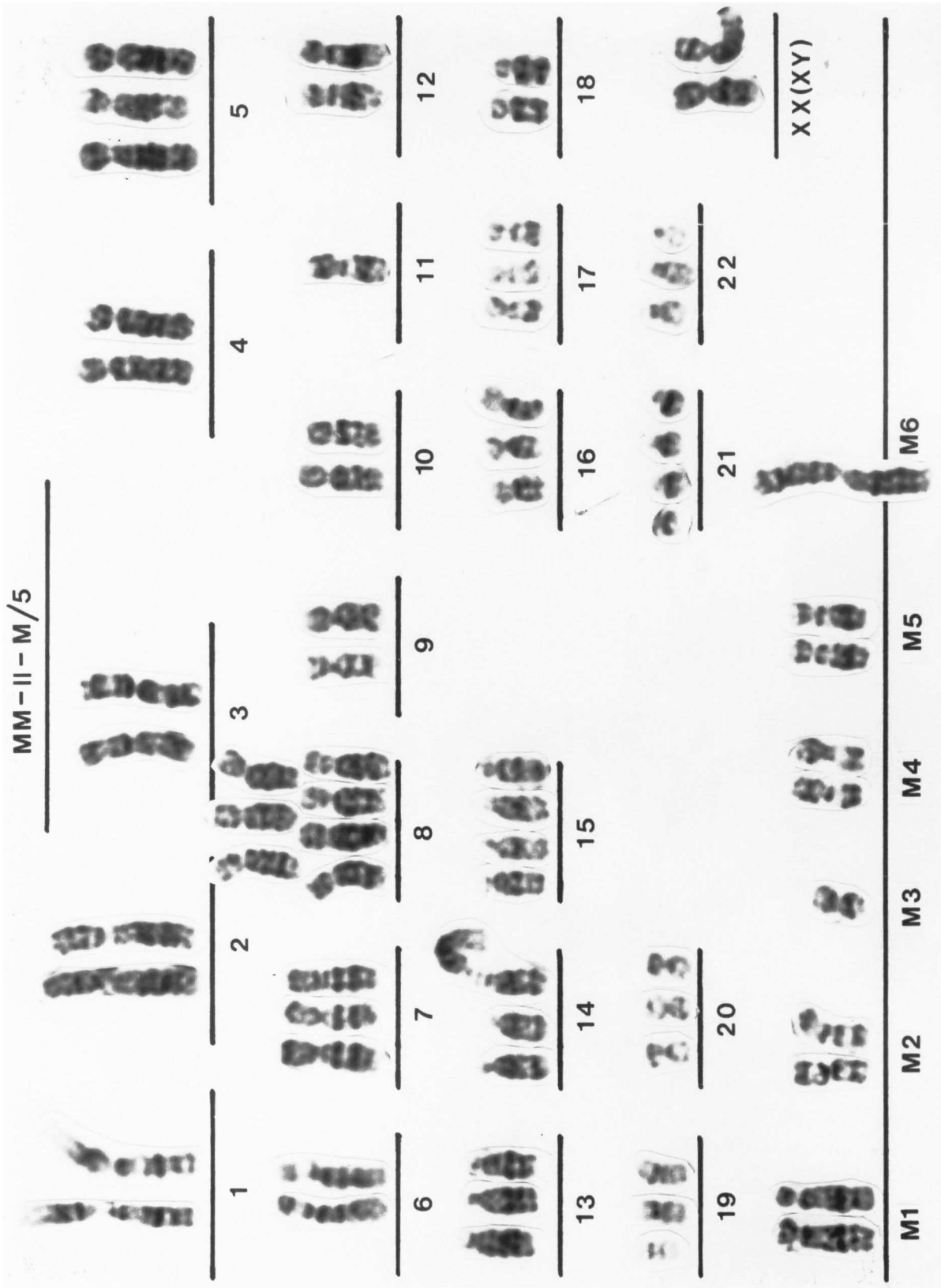


Abb. 21: Karyogramm der 25. Passage von **MM-II-M**. Sogenannte "sticky Chromosomes" und Chromosomenbrüche deuten auf eine mögliche virale Infektion. Neben den charakteristischen Markerchromosomen finden sich weitere nicht typische Veränderungen:

M1: del(1)(:p11→qter)	100% 2 Kopien
M2: i(6)(pter→p10::p10→pter)	100% 2 Kopien
M3: del(10)(pter→q22:)	100% 1 Kopie
M4: del(11)(pter→q22:)	100% 2 Kopien
M5: del(12)(pter→q21::q23→qter)	100% 1 Kopie
M6: dup(2)(pter→p13::p21→qter)	100% 1 Kopie

+ Chromosom # 1 in der Zentromere gebrochen

+ inv(12)(:p11→q11::p11→p13::q11→qter)

+ "chromosomal stickyness" der Chromosomen # 6 und 13

MM-II-M/25

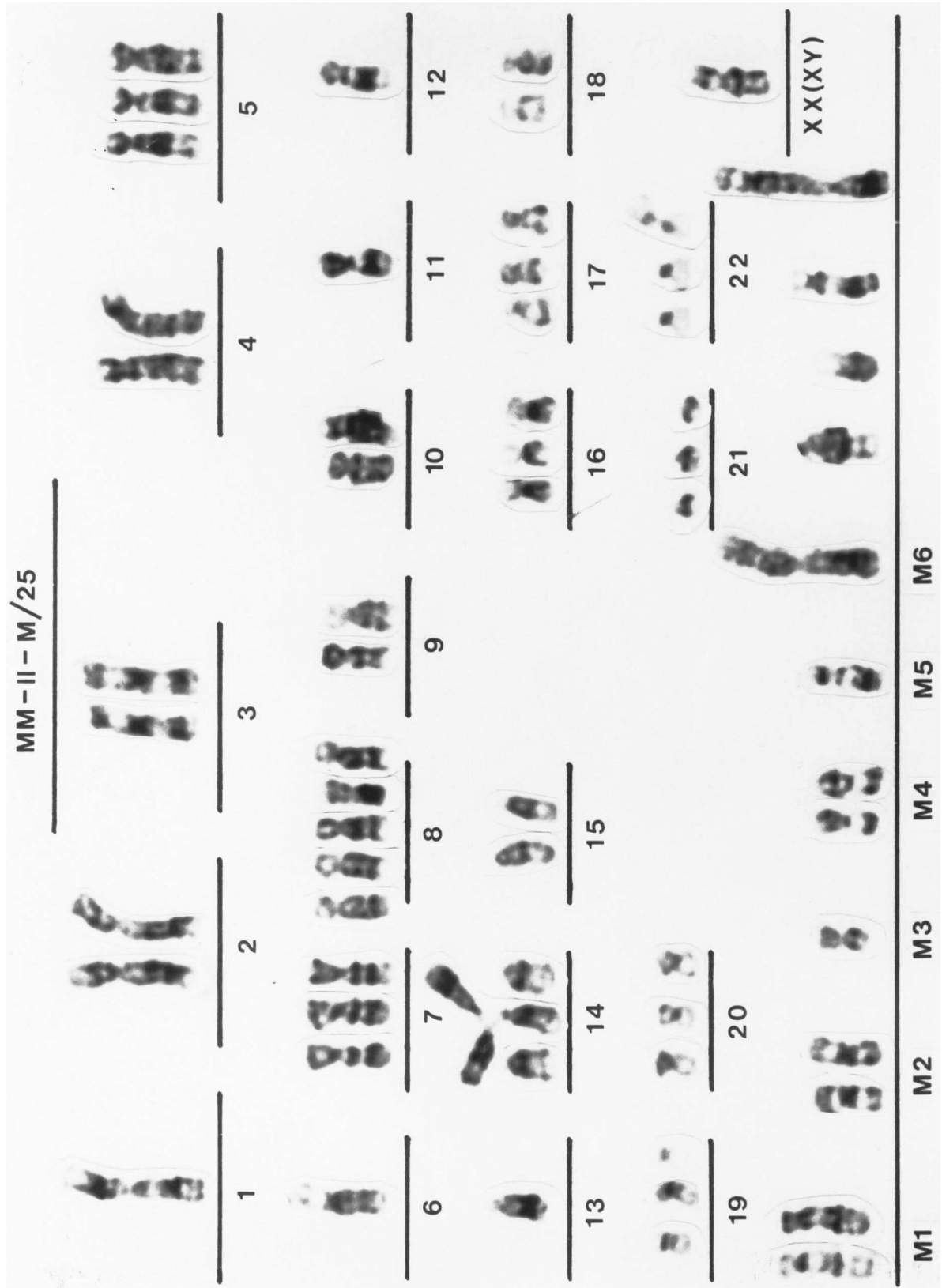
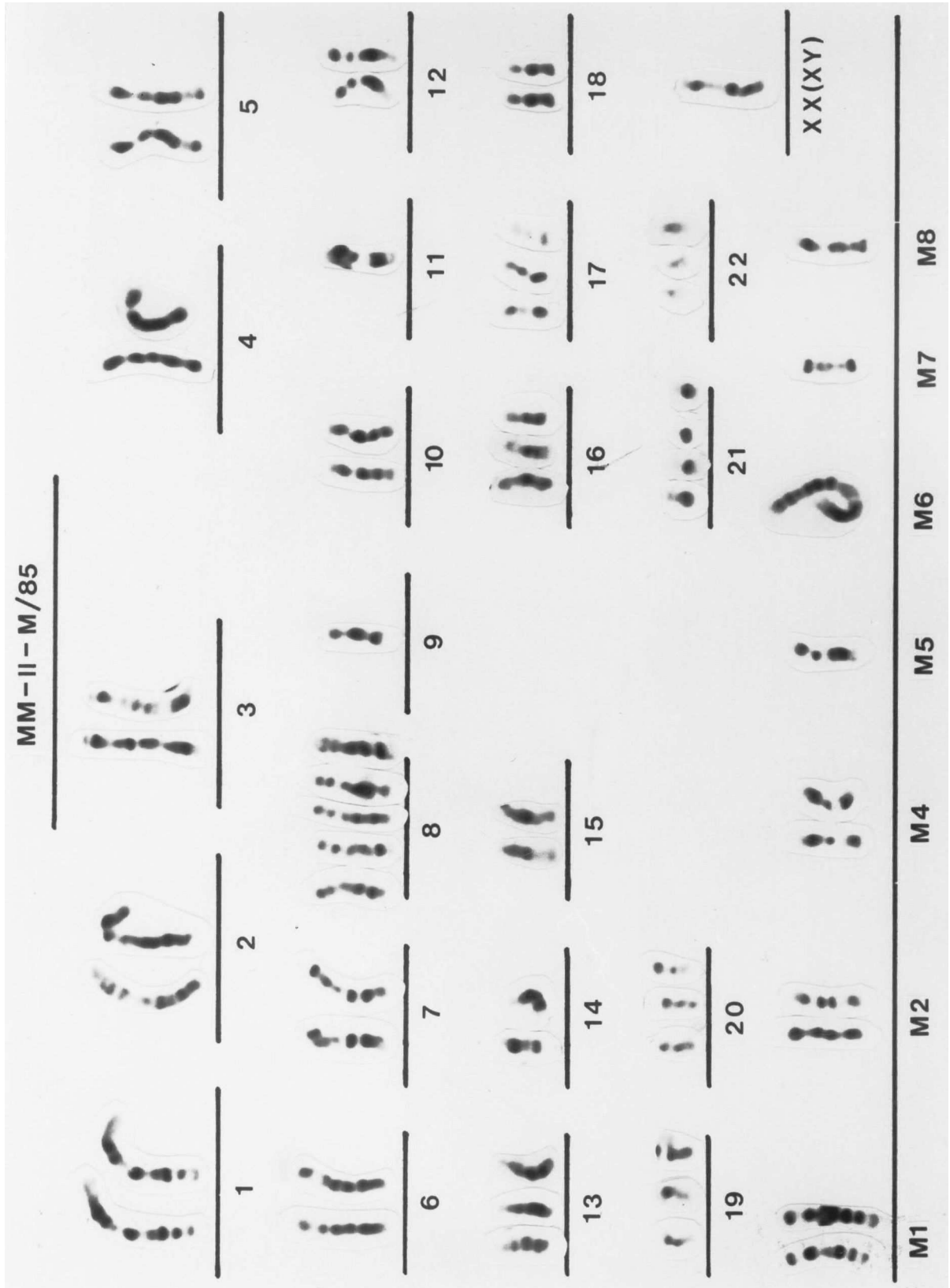


Abb. 22: Karyogramm der zuletzt untersuchten, 85. Passage von **MM-II-M**. Die Linie weist zwei neue Veränderungen (M7 und M8) auf, M3 und eine Kopie von M5 sind verlorengegangen.

	M1: del(1)(:p11→qter)	100% 2 Kopien
	M2: i(6)(pter→p10::p10→pter)	100% 2 Kopien
	M4: del(11)(pter→q22:)	100% 2 Kopien
	M5: del(12)(pter→q21::q23→qter)	100% 1 Kopie
	M6: dup(2)(pter→p13::p21→qter)	100% 1 Kopie
neu:	M7: del(7)(pter→q22:)	100% 1 Kopie
	M8: del(4)(pter→q25:)	100% 1 Kopie

MM-II - M/85



B. MM-V-M

Diese ebenfalls von einer Metastase stammende Linie konnte auch ab der Explantatkultur untersucht und über 50 Passagen verfolgt werden. Sie weist hier zwei verschiedene Zellpopulationen auf. Die Hauptmarkerchromosomen kommen in beiden Populationen gemeinsam vor, so daß der monoklonale Ursprung gesichert ist.

Ein Karyogramm der 1. Population ist in Abb. 23 wiedergegeben. Population 2 (Abb. 24) unterscheidet sich von Population 1 durch zwei zusätzliche Markerchromosomen. Somit dürfte Population 2 in der Tumorgenese aus Population 1 entstanden sein.

Die geringe Zahl auswertbarer Metaphasen aus der Explantatkultur ließ es nicht sinnvoll erscheinen, die prozentualen Anteile der beiden Populationen zu ermitteln.

In der 5. Passage kommt es in Anpassung an veränderte Milieubedingungen zum Durchsetzen entweder der 1. Population, die weitere Veränderungen erfahren hat, oder einer 3. Population, die vorher nicht erkannt wurde. Im Unterschied zu Population 1 finden sich folgende zusätzliche Veränderungen (Abb. 25):

M14: del(5)(pter→q15::q23→qter)

M15: del(6)(pter→q11:)

M16: der(15)t(15;?)(15qter→15q11::?)

M1 und M6 waren nicht mehr zu beobachten, was vermuten läßt, daß M16 aus M1 entstanden ist, „?“ hier also Teile von Chromosom # 1q beinhaltet. Ebenso dürfte M 15 durch Deletion aus M6 entstanden sein. Ein verbessertes Wachstumsverhalten, d.h. kürzere Passagezeiten, als Folge dieses Selektionsvorgangs, waren nicht festzustellen. Um die Wachstumsdynamik der Zellen besser zu charakterisieren, wäre es sinnvoll gewesen, in Abständen Wachstumskurven zu erstellen. Solche Untersuchungen hätten jedoch den Rahmen der vorliegenden Arbeit gesprengt.

Die 17. Passage zeigt als neue Veränderung eine Translokation zwischen Chromosom # 17 und einem nicht identifizierbaren Chromosomenteil (der(17)t(17;?)(17qter→17p13::?)) (M 17). Im Weiteren bleibt die Population bis zur zuletzt untersuchten 50. Passage stabil (Abb. 8).

Abb. 23: Karyogramm der 1. Population aus der Explantatkultur von **MM-V-M**. Es finden sich hier 11 verschiedene Markerchromosomen in jeweils einer Kopie:

M1: der(1;15)(qter→q10::q10→qter)

M2: dup(2)(pter→p14::p22→qter)

M3: der(4)t(3;4)(3qter→3q11::4q28→4pter)

M4: der(4)t(4;8)(4qter→4p16::8q11→8qter)

M5: del(6)(pter→q13:)

M6: i(6)(pter→p10::p10→pter)

M7: del(7)(pter→q31:)

M8: der(10)t(7;10)(7qter→7q11::10q22→10pter)

M9: del(8)(pter→q22:)

M10: del(11)(pter→q23:)inv(11)(pter→q11::q23→q11:)

M11: dup(22)(pter→q13::q11→qter)

Eine Kopie von Chromosom # 1 zeigt elongierte sekundäre Konstriktionen (qh^+) in der zentromerischen Region.

MM - V - M / EK

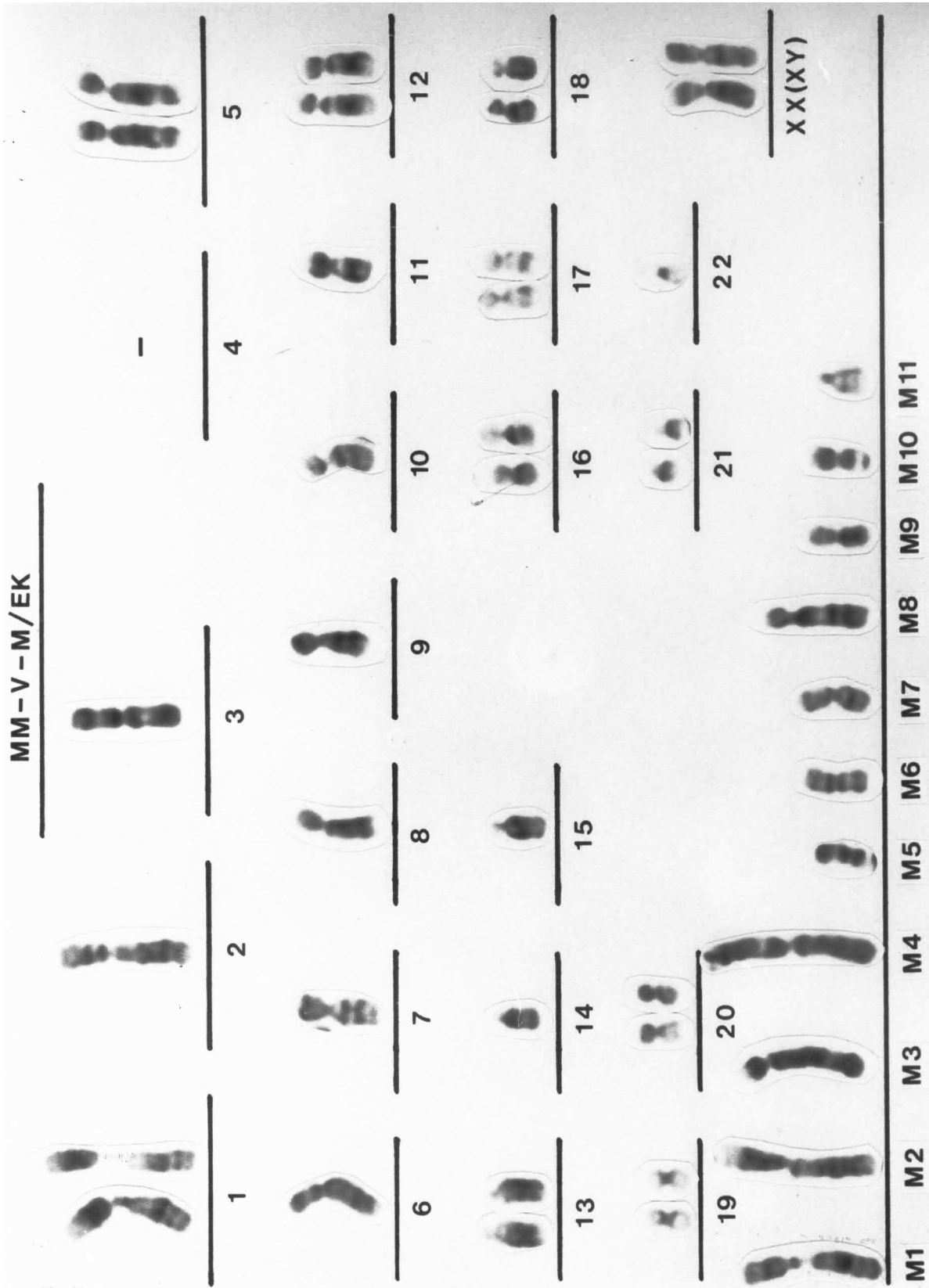


Abb. 24: Karyogramm der 2. Population aus der Explantatkultur von **MM-V-M**. Zu den Markerchromosomen in der 1. Population finden sich zwei weitere Markerchromosomen:

M1: der(1;15)(1qter→1q10::15q10→15qter)

M2: dup(2)(pter→p14::p22→qter)

M3: der(4)t(3;4)(3qter→3q11::4q28→4pter)

M4: der(4)t(4;8)(4qter→4p16::8q11→8qter)

M5: del(6)(pter→q13:)

M6: i(6)(pter→p10::p10→pter)

M7: del(7)(pter→q31:)

M8: der(10)t(7;10)(7qter→7q11::10q22→10pter)

M9: del(8)(pter→q22:)

M10: del(11)(pter→q23:)inv(11)(pter→q11::q23→q11:)

M11: dup(22)(pter→q13::q11→qter)

zusätzlich zu Population 1:

M12: del(1)(:p13→qter)

M13: del(1)(pter→q12)

MM-V-M/EK

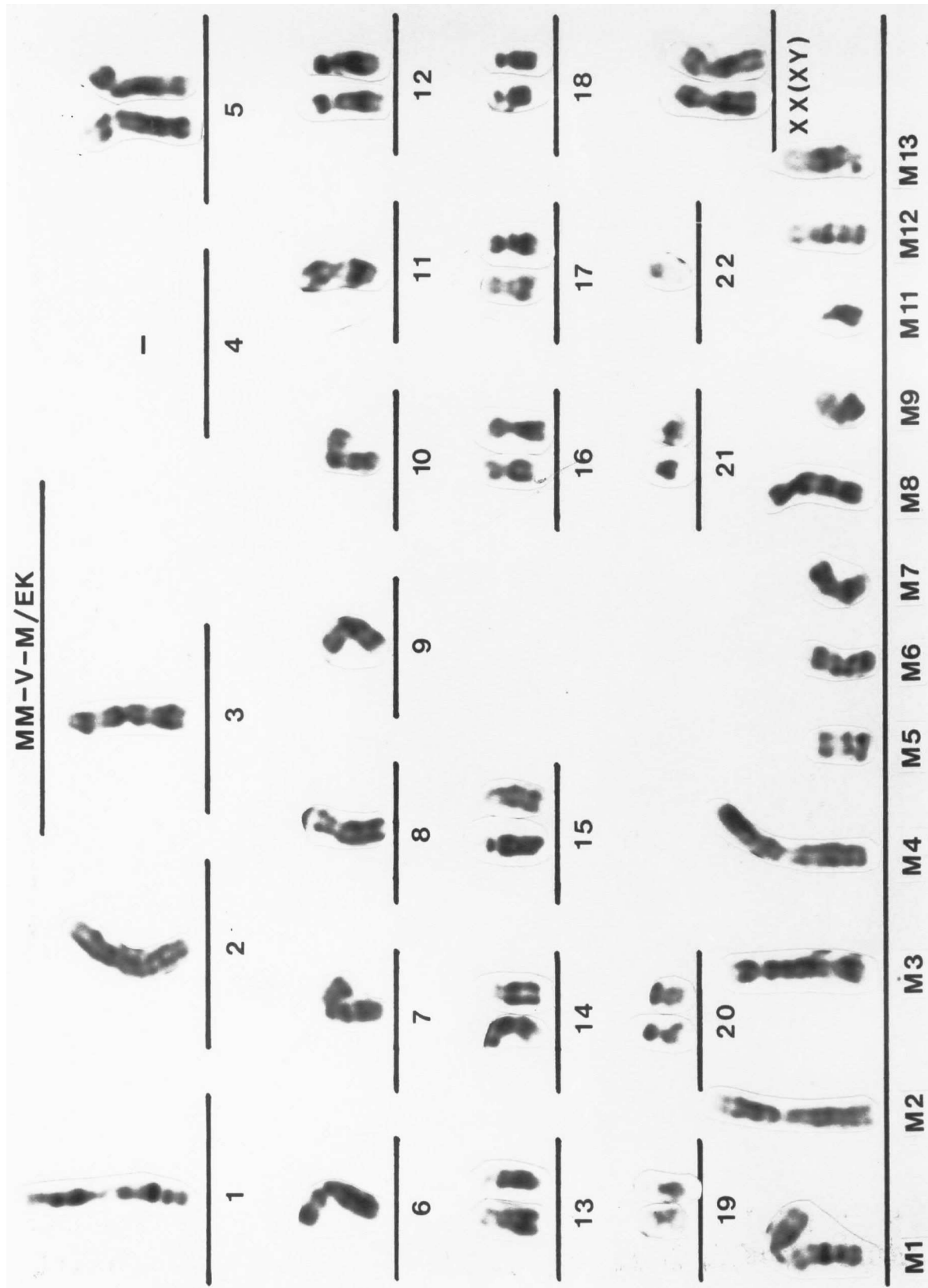


Abb.25: Karyogramm der 5. Passage von **MM-V-M**. Zu den Veränderungen in der 1. Population finden sich drei weitere Aberrationen (M14 - M16), M1 und M6 sind verlorengegangen:

M2: dup(2)(pter→p14::p22→qter)

M3: der(4)t(3;4)(3qter→3q11::4q28→4pter)

M4: der(4)t(4;8)(4qter→4p16::8q11→8qter)

M5: del(6)(pter→q13:)

M7: del(7)(pter→q31:)

M8: der(10)t(7;10)(7qter→7q11::10q22→10pter)

M9: del(8)(pter→q22:)

M10: del(11)(pter→q23:)inv(11)(pter→q11::q23→q11:)

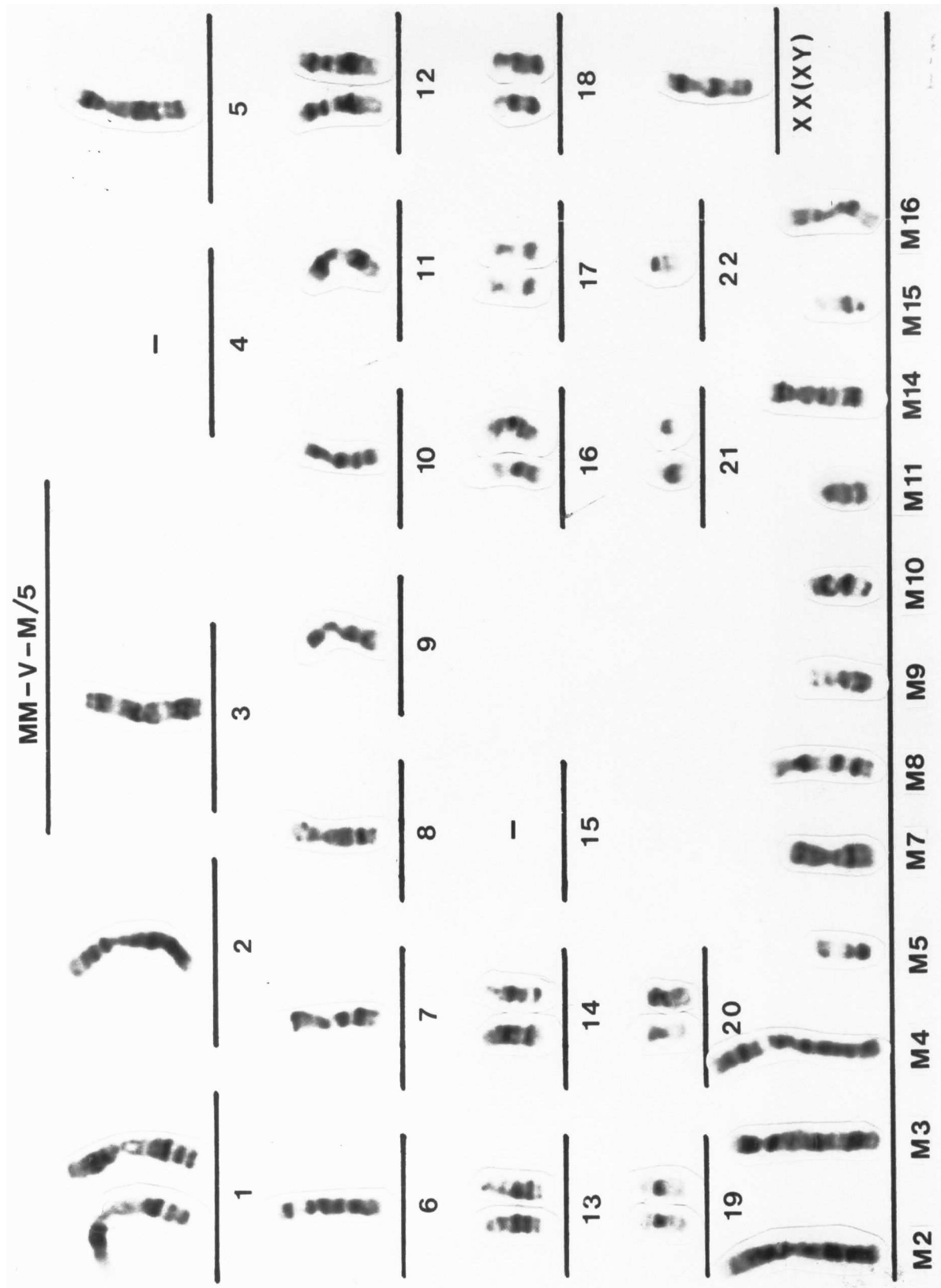
M11: dup(22)(pter→q13::q11→qter)

neu: M14: del(5)(pter→q15::q23→qter)

M15: del(6)(pter→q11:)

M16: der(15)t(15;?)(15qter→15q10::?)

MM - V - M/5



Die vorliegenden Befunde belegen eine hohe genetische Stabilität der untersuchten Melanom-Zell-Linien, die auch durch den jeweils konstanten Phänotyp während der *in vitro*-Propagation angezeigt wird.

Die Linie **MM-I-P** blieb über 66 Passagen vom Karyotyp her gänzlich unverändert. **MM-II-M** bildete in 85 Passagen drei neue Markerchromosomen aus, wogegen zwei, bereits vorher existente, verloren gingen. Bei der Linie **MM-V-M** trat aus drei zu beobachtenden Subpopulationen in früher Zeit eine in den Vordergrund. Die Folgekultur bildete bis zur 50. Passage lediglich ein neues Markerchromosom aus. Interessanterweise ist es gerade die Kultur, die aus einem Primärtumor etabliert wurde, die gänzlich unverändert die lange *in vitro*-Propagierung durchmachte. Vorbehaltlich der Tatsache, daß nur eine Zell-Linie aus einem Primärtumor über längere Zeit *in vitro* verfolgt wurde, könnte man aus diesem Befund auf eine generell höhere Stabilität von Zell-Linien aus Primärtumoren schließen.

Betrachtet man die neu erworbenen Veränderungen, so fällt auf, daß es sich hierbei, mit Ausnahme von M6 bei **MM-II-M** und M17 bei **MM-V-M**, ausschließlich um Deletionen handelt. Deletionen stellen sich als die einfachste Art der Chromosomenaberration dar, da hier nur ein Chromosom involviert ist und keine Rearrangierung zu erfolgen hat. Eine Beteiligung der gleichen Chromosomen an den Sekundäraberrationen war nicht zu beobachten, so daß hieraus kein gemeinsamer Mechanismus für die *in vitro*-Selektion abzuleiten ist.

5. Einfluß eines *in vivo*-Systems auf den individuellen Karyotyp stabiler Melanom-Zell-Linien

Im vorherigen Kapitel konnte gezeigt werden, daß sich die untersuchten Melanom-Zell-Linien erstaunlicherweise cytogenetisch als sehr stabil erwiesen haben. Demgegenüber ist es bekannt, daß Tumore unter *in vivo*-Bedingungen oft sehr heterogene Zellpopulationen besitzen (Nicolson G.L, 1987). Somit war es interessant zu untersuchen, ob diese Zell-Linien in einem, dem Patienten vergleichbaren *in vivo*-System, nämlich der Thymus-aplastischen Nacktmaus, wieder heterogene Populationen ausbilden, oder ob sie weiterhin stabil bleiben. Für die Untersuchungen wurden drei Zell-Linien herangezogen, eine, die aus einem Primärtumor etabliert wurde (**MM-I-P**) und zwei, die aus Lymphknotenmetastasen stammen (**MM-II-M** und **MM-III-M**). Zwei dieser Linien (**MM-I-P** und **MM-II-M**) wurden auch fortlaufend *in vitro* untersucht. Diese Zell-Linien waren zum Zeitpunkt der subcutanen Injektion in die Nacktmaus bereits ausführlich cytogenetisch analysiert. Die Zell-Kulturen **MM-V-M** und **MM-VI-P** konnten für diese Untersuchungen leider nicht herangezogen werden, da sie sich, trotz wiederholter Versuche, als nicht tumorigen in der Nacktmaus erwiesen. Die Kultur **MM-IV-P** wurde bereits in der Primärkultur von Fibroblasten überwachsen und stand somit für diese Untersuchungen nicht mehr zur Verfügung.

Nach der Injektion wurden die Tiere für 6 - 8 Wochen beobachtet. Während dieser Zeit wurde die Latenzzeit erfasst und die Tumorausdehnung durch Palpation regelmäßig gemessen. Die Tumoren konnten nicht länger im Tier belassen werden, da die Tiere sonst, aufgrund der Tumorgöße, starke Morbiditätserscheinungen gezeigt hätten. Die entnommenen Tumoren wurden wieder angezüchtet und schnellstmöglich cytogenetisch analysiert. In der Regel erfolgte dies zwischen der 1. und 3. *in vitro*-Passage nach Wiederanzüchten. Auf Direktpräparationen wurde verzichtet, da diese, die von Patiententumoren her bekannte, ungenügende Qualität von Chromosomenspreitung und Bänderung aufwiesen. Weiterhin wurden die rekultivierten Subzell-Linien sofort wieder in die Nacktmaus gegeben. Dieser Vorgang wurde jeweils noch zweimal wiederholt, so daß die Gesamtverweildauer der Ursprungszell-Linien im *in vivo*-System jeweils 20 - 22 Wochen betrug.

Um zu schauen, ob sich *in vitro* weitere kleine Zellpopulationen selektieren, die bei der ersten Untersuchung nicht erfasst werden konnten, wurden die Maustumor-Linien über 20 Passagen *in vitro* gehalten und erneut karyotypiert. Wenn im Folgenden die Ergebnisse der verschiedenen Tumoren einer Linie untereinander verglichen werden, so bezieht sich dieser Vergleich jeweils auf die frühe und späte *in vitro*-Passage.

Die Analysen zeigten, daß die *in vitro* so stabilen Melanom-Zell-Linien schon nach der ersten *in vivo*-Passage zusätzliche Markerchromosomen aufwiesen und mit jeder weiteren *in vivo*-Passagierung neue hinzukamen. Diese neuen Markerchromosomen waren zum großen Teil auch stabil in der jeweiligen späten *in vitro*-Kultur. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß sich in den späten *in vitro*-Kulturen häufig weitere Subpopulationen selektierten.

A. MM-I-P

Die Zellen der Linie **MM-I-P** wurden in der 66. Passage in die Nacktmaus gegeben. Die für jeden Tumor und die anschließende *in vitro*-Kultur charakteristischen Markerchromosomen sind in der nachfolgenden Tabelle mit ihren jeweiligen prozentualen Anteilen wiedergegeben:

MM-I-P Tumoren

	Linie	Tu 1/2	Tu 1/10	Tu 2/3	Tu 2/20	Tu 3/1	Tu 3/20
	Abb. 4	Abb. 26	Abb. 27	Abb. 28	Abb. 29	Abb. 30	Abb. 31
M1: dup(1)(q43q25)(q31q41)	100%	100%	95%	73%	15%	91%	86%
M2: del(6)(q11)	100% ¹⁾	100% ²⁾	70%	87%	15% ²⁾	100% ²⁾	90% ²⁾
M3: inv(9)(p24q13)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
M4: del(3)(p23)	-	50%	22%	27%	85%	27%	57%
M5: del(3)(p12)	-	10%	33%	60%	15%	-	-
M6: der(3;6)(q10;p10)	-	15%	-	-	-	-	-
M7: dup(13)(q22)	-	13%	-	+	-	9%	76%
M8: del(10)(q24)	-	+	-	+	+	-	-
M9: „i(M1)(q10→qter)“	-	-	+	-	-	-	+
M10: dup(1)(q43q25)	-	-	-	27%	85%	9%	10%
M11: del(4)(q22)	-	-	-	33%	-	+	75%
M12: del(3)(p14p21)	-	-	-	-	-	68%	20%
M13: inv(7)(p15q22)	-	-	-	-	-	-	33%
M14: i(5)(p10)	-	-	-	-	-	+	10%
		+i(6)(p10)	+der(3q;15q)		+i(12)(q10)	del(3)(q13)	der(8q;7q)
		+del(4)(q23)	+del(3)(q12)				i(2)(q10)
		+i(7)(p10)					
		+del(1)(q11)					
		+del(1)(p11)					
		+del(4)(q13)					

Veränderungen, die in der vorstehenden Tabelle mit einem "+" gekennzeichnet sind, konnten nur in jeweils einer Metaphase eindeutig nachgewiesen werden.

Auffällig ist, daß die meisten Veränderungen während der ersten Tierpassagierung auftraten. So zeigt die 2. *in vitro*-Passage des 1. Tumors (Abb.26) vier zusätzliche Veränderungen (M4 - M7), die in der Ursprungslinie nicht zu sehen waren. Zwei dieser Aberrationen (M4 und M5) konnten sich in der anschließenden 10. *in vitro*-Passage (Abb.27) erhalten. Weiterhin trat hier ein neues interessantes aberrantes Chromosom (M9) in einer Metaphase auf, das ebenfalls in der 20. *in vitro*-Passage des 3. Tumors (Abb. 31) zu sehen war. Hierbei handelt es sich um ein Isochromosom des langen Armes von Markerchromosom # 1.

Bei der 3. *in vitro*-Passage des 2. Tumors (Abb. 28) kommen zwei weitere Veränderungen (M10 und M11) hinzu, von denen sich eine (M10) in der Folgekultur stabilisiert, wogegen sich die andere (M11) nicht behaupten kann. M10 ist offensichtlich durch Deletion aus M1 hervorgegangen, denn ihre jeweiligen Prozentanteile ergänzen sich zu 100%, auch konnten M1 und M10 nie in einer Metaphase gemeinsam gefunden werden. In der 20. *in vitro*-Passage des 2. Tumors (Abb. 29) finden sich zwei deutlich getrennte Populationen. Die erste mit einem Anteil von 15% an der Gesamtpopulation weist die Markerchromosomen M1 und M5, sowie zwei Kopien von von M2 und Chromosom # 18 auf. Die 2. Population mit einem Anteil von 85% weist kein Markerchromosom # 2 auf, dafür aber die Markerchromosomen # 4 und 8, sowie drei Kopien von Chromosom # 18. M3 ist in beiden Populationen zu 100% vertreten.

In der 1. *in vitro*-Passage des 3. Tumors (Abb. 30) finden sich zwei weitere zusätzliche Veränderungen (M12 und M14), die auch in der Folgekultur stabil blieben. In der 20. *in vitro*-Passage des 3. Tumors (Abb. 31) kommt noch ein weiteres Markerchromosom (M13) hinzu.

Insgesamt sind bei der Linie **MM-I-P** durch die *in vivo*-Passagierung, ohne Berücksichtigung der Veränderungen, die nur in jeweils einer Metaphase gefunden wurden, 11 neue Markerchromosomen entstanden, von denen acht bis zum Abschluß der Untersuchungen nachweisbar waren. Auffällig stark involviert in diesen Sekundäraberrationen war Chromosom # 3, das in vier verschiedenen strukturellen Veränderungen zu finden war. Wie bereits für die Melanome generell beschrieben, waren auch hier wieder die Chromosomen # 1, 6 und 7 an der Formierung von neuen Markerchromosomen beteiligt. Änderungen in der Zellmorphologie oder beim *in vitro*-Wachstumsverhalten waren bei den jeweiligen Subzell-Linien im Vergleich zur

Ursprungszell-Linie nicht festzustellen. Signifikante Änderungen numerischer Art waren nach Tierpassagierung nicht zu sehen. Waren ursprünglich unveränderte Chromosomen an neuen Veränderungen beteiligt, so verringerte sich ihr Anteil entsprechend in der betreffenden Population.

Die cytogenetischen Charakteristika der jeweiligen Transplantat-Tumoren, d. h. ihrer abgeleiteten frühen und späten *in vitro*-Kulturen werden in den nachfolgenden Karyogrammen (Abb. 26 - 31) vorgestellt.

Abb. 26: Repräsentatives Karyogramm der 2. *in vitro*-Passage des 1. Tumors von **MM-I-P**. Neben den für die Linie **MM-I-P** typischen Aberrationen finden sich fünf weitere tumortypische Veränderungen:

M1: dup(1)(pter→q43::q25→q43::q31→qter)	100%
M2: del(6)(pter→q11:)	100% 1 Kopie
M3: inv(9)(pter→p24::q31→p24::q31→qter)	100%

Als neue Veränderungen konnten erkannt werden:

M4: del(3)(:p23→qter)	50%
M5: del(3)(:p12→qter)	10%
M6: der(3;6)(3qter→3q10::6p10→6pter)	16%
M7: dup(13)(pter→34::q22→qter)	13%
M8: del(10)(pter→q24:)	+

In jeweils nur einer Metaphase konnten folgende zusätzliche Veränderungen ausgemacht werden:

i(6)(pter→p10::p10→pter)
del(4)(pter→q23:)
i(7)(pter→p10::p10→pter)
del(1)(pter→q11:)
del(1)(:p11→qter)
del(4)(pter→q13:)

Abb. 27: Karyogramm der 10. *in-vitro*-Passage des 1. Tumors von **MM-I-P**. Gegenüber der 2. *in vitro*-Passage sind M6 - M8 verlorengegangen.

M1: dup(1)(pter→q43::q25→q43::q31→qter)	95%
M2: del(6)(pter→q11:)	70% 1 Kopie
M3: inv(9)(pter→p24::q31→p24::q31→qter)	100%
M4: del(3)(:p23→qter)	22%
M5: del(3)(:p12→qter)	33%

Als neues Markerchromosom konnte erkannt werden:

M9: i(1)(qter→q31::q43→q25::q43→q10::q10→q43::q25→q43::q31→qter) +

In jeweils einer Metaphase finden sich zwei weitere Veränderungen:

der(3;15)(3qter→3q10::15q10→15qter)

del(3)(pter→q12:)

MM - I - P - T / 10

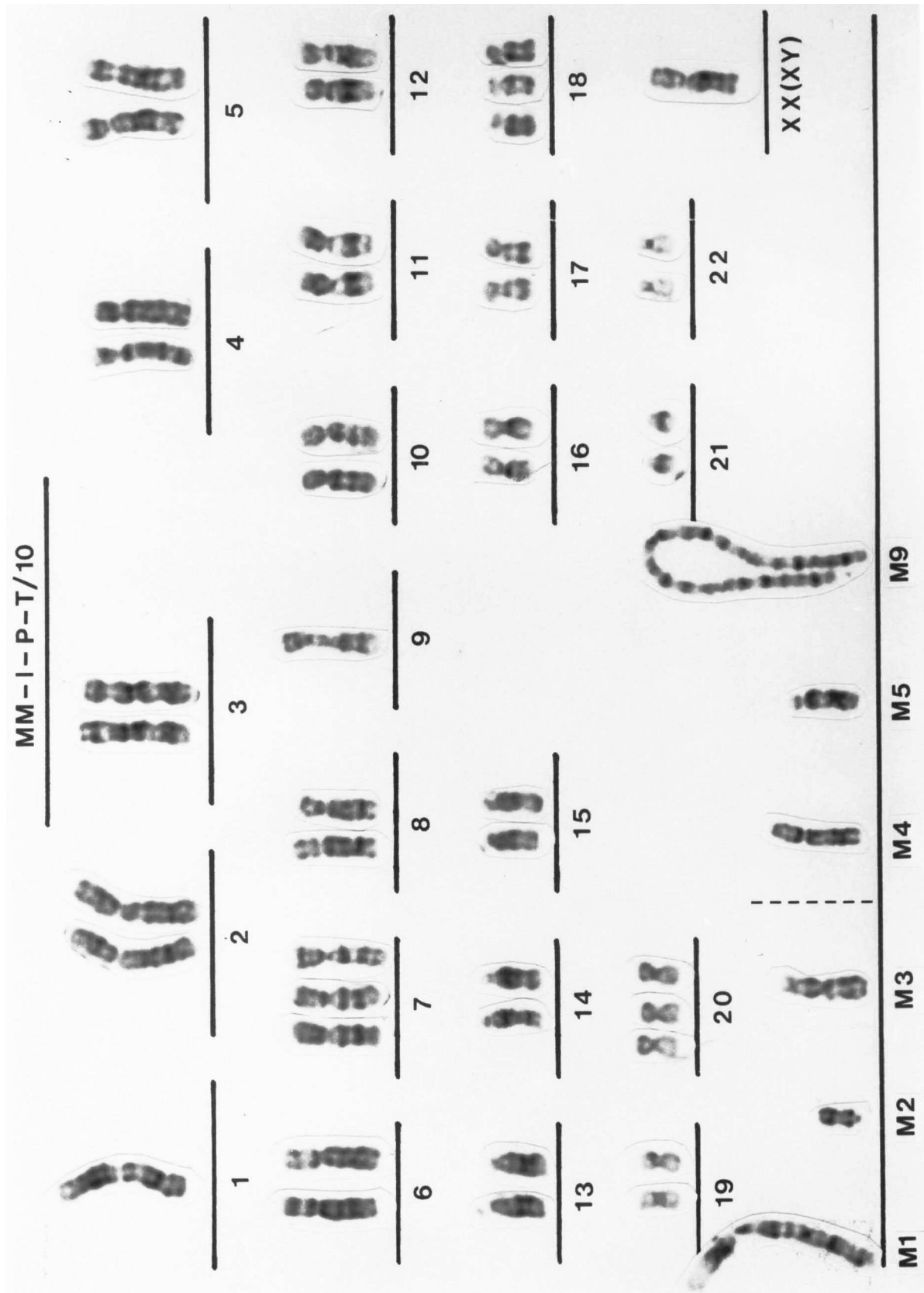


Abb. 28: Repräsentatives Karyogramm der 3. *in vitro*-Passage des 2. Tumors von **MM-I-P**. Gegenüber dem 1. Tumor sind zwei neue Veränderungen hinzugekommen.

M1: dup(1)(pter→q43::q25→q43::q31→qter)	73%
M2: del(6)(pter→q11:)	87% 1 Kopie
M3: inv(9)(pter→p24::q31→p24::q31→qter)	100%
M4: del(3)(:p23→qter)	27%
M5: del(3)(:p12→qter)	60%
M7: dup(13)(pter→q34::q22→qter)	+
M8: del(10)(pter→q24:)	+

Als neue Markerchromosomen konnten erkannt werden:

M10: dup(1)(pter→q43::q25→qter)	27%
M11: del(4)(pter→q22:)	33%

MM-I-P-T2/3

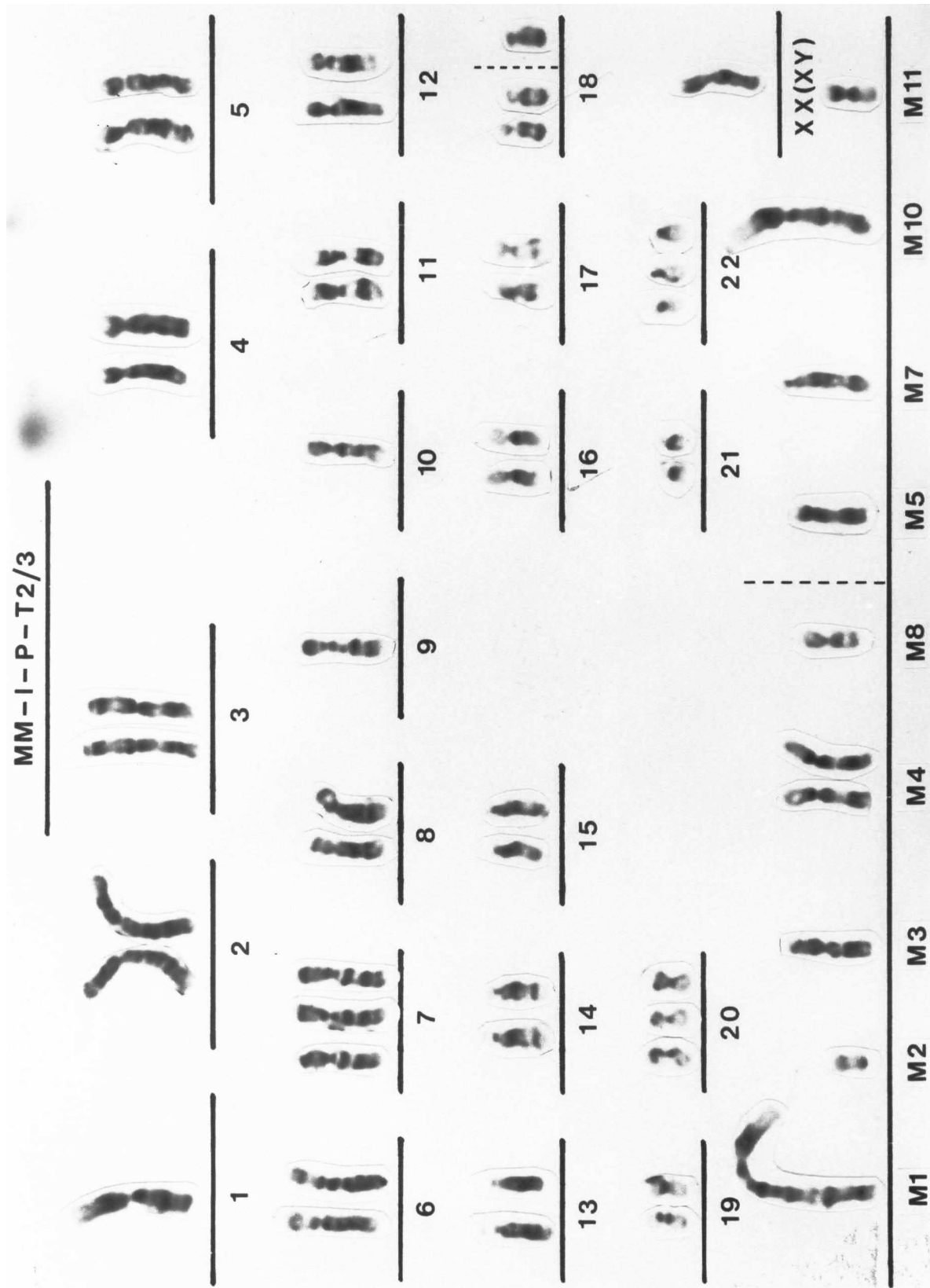


Abb. 29: Repräsentatives Karyogramm der 20. *in-vitro*-Passage des 2. Tumors von **MM-I-P**. M11 war hier nicht mehr nachzuweisen.

M1: dup(1)(pter→q43::q25→q43::q31→qter)	15%
M2: del(6)(pter→q11:)	15% 1 Kopie
M3: inv(9)(pter→p24::q31→p24::q31→qter)	100%
M4: del(3)(:p23→qter)	85%
M5: del(3)(:p12→qter)	15%
M8: del(10)(pter→q24:)	+
M10: dup(1)(pter→q43::q25→qter)	85%

Weiterhin konnte in einer Metaphase ein

i(12)(qter→q10::q10→qter)

gefunden werden.

MM - I - P - T2/20

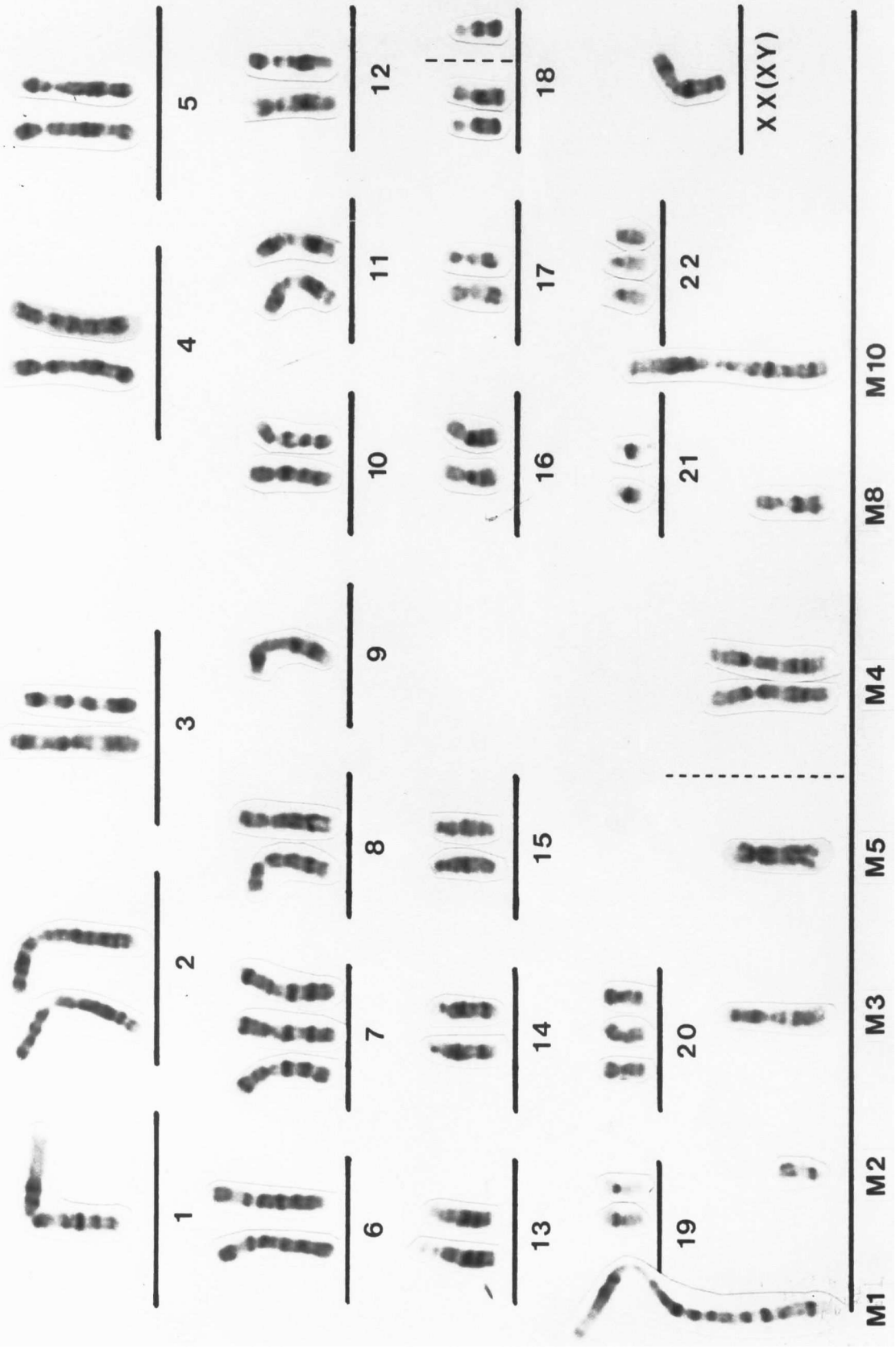


Abb. 30: Repräsentatives Karyogramm der 1. *in vitro*-Passage des 3. Tumors von **MM-I-P**. Gegenüber dem 2. Tumor ist eine neue Veränderung (M12) hinzugekommen.

M1: dup(1)(pter→q43::q25→q43::q31→qter)	91%
M2: del(6)(pter→q11:)	100% 1 Kopie
M3: inv(9)(pter→p24::q31→p24::q31→qter)	100%
M4: del(3)(:p23→qter)	27%
M7: dup(13)(pter→q34::q22→qter)	9%
M8: del(10)(pter→q24:)	+
M10: dup(1)(pter→q43::q25→qter)	9%
M11: del(4)(pter→q22:)	+

Als neue Veränderung konnte erkannt werden:

M12: del(3)(pter→p21::p14→qter)	68%
---------------------------------	-----

Jeweils eine Metaphase zeigt eine

del(3)(pter→q13:) und
i(5)(pter→p10::p10→pter)

MM-I-P-T3/1

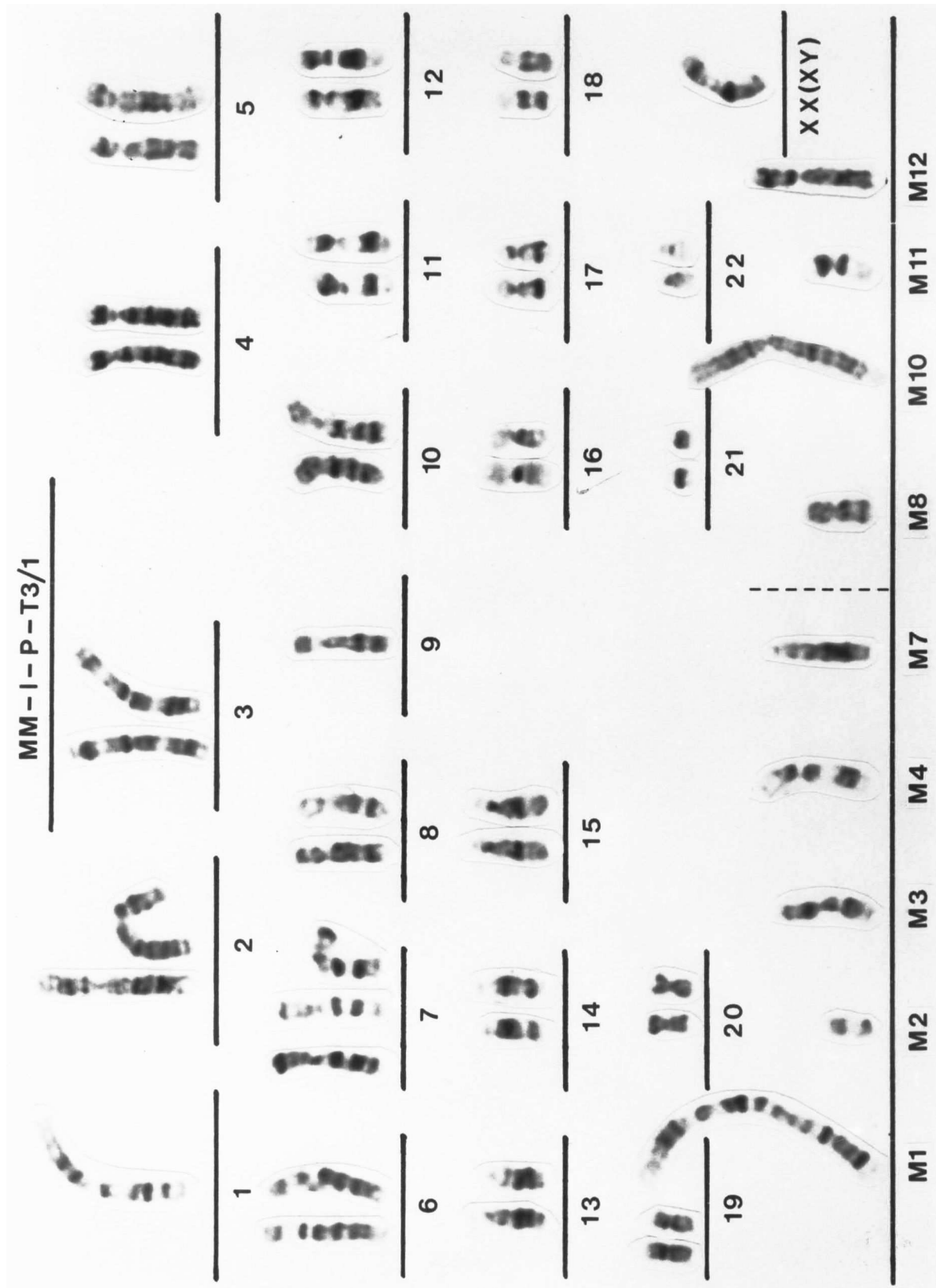


Abb. 31: Repräsentatives Karyogramm der 20. *in vitro*-Passage des 3. Tumors von **MM-I-P**. Gegenüber der 1. *in vitro*-Passage finden sich zwei neue Veränderungen. In einer Metaphase findet sich M9, das schon einmal in der 10. *in vitro*-Passage des 1. Tumors zu sehen war.

M1: dup(1)(pter→q43::q25→q43::q31→qter)	86%
M2: del(6)(pter::q11:)	90% 1 Kopie
M3: inv(9)(pter→p24::q31→p24::q31→qter)	100%
M4: del(3)(:p23→qter)	57%
M7: dup(13)(pter→q34::q22→qter)	76%
M9: i(1)(qter→q31::q43→q25::q43→q10::q10→q43::q25→q43::q31→qter) +	
M10: dup(1)(pter→q43::q25→qter)	10%
M11: del(4)(pter→q22:)	75%
M12: del(3)(pter→p21::p14→qter)	20%

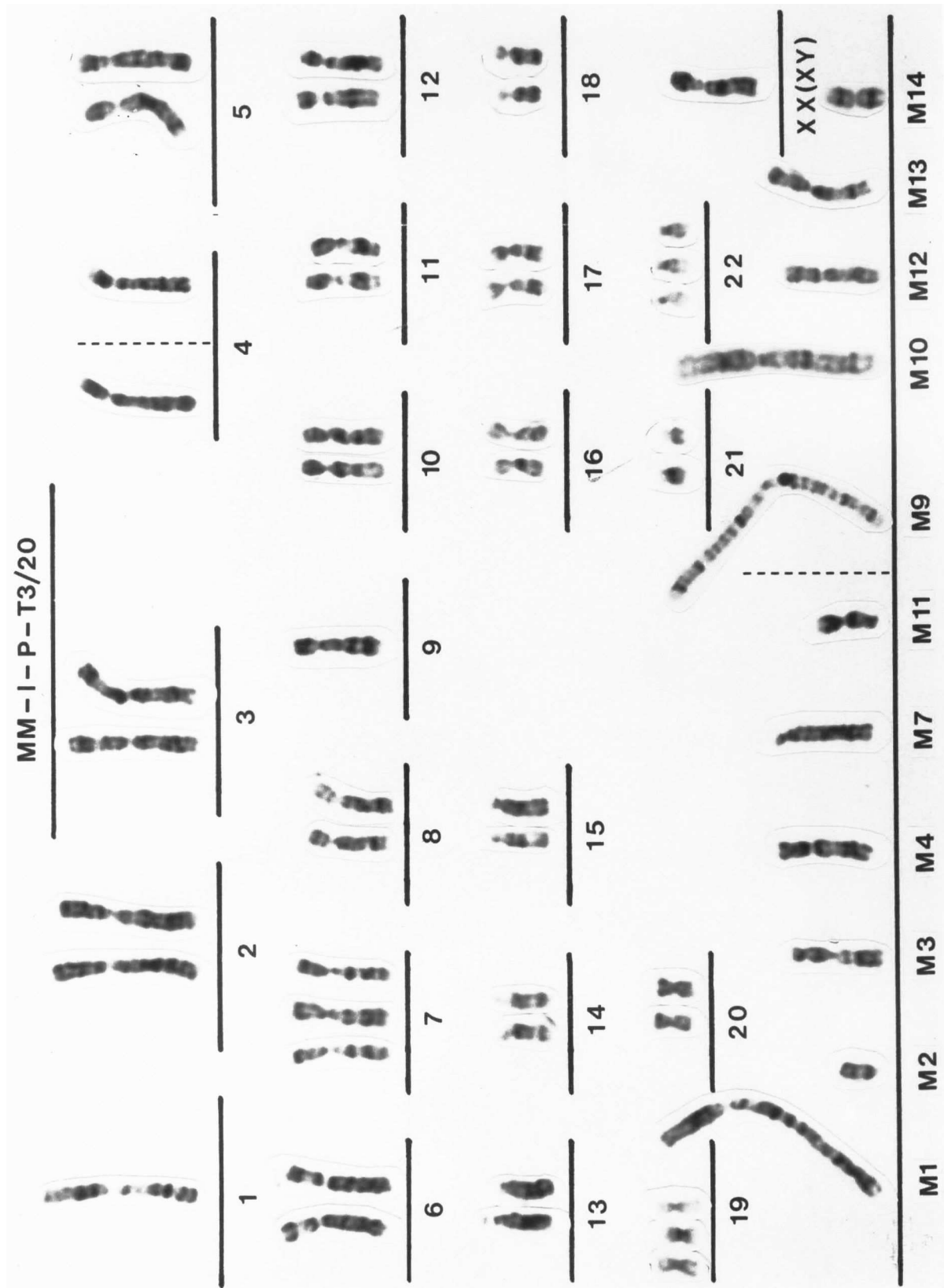
Als neue Veränderungen konnten erkannt werden:

M13: inv(7)(pter→p15::q22→p15::q22→qter)	33%
M14: i(5)(pter→p10::p10→pter)	10%

Zusätzlich finden sich in jeweils einer Metaphase folgende Veränderungen:

der(7;8)(7qter→7q10::8q10→8qter) und ein
i(2)(qter→q10::q10→qter)

MM-I-P-T3/20



B. MM-II-M

MM-II-M wurde in der 15. Passage in die Nacktmaus gespritzt. Wie bei **MM-I-P** fanden sich auch hier nach der Reaktivierung der Tumoren neue Markerchromosomen, die in der Ausgangslinie nicht zu sehen waren. Diese für den Maustumor typischen Aberrationen sind mit ihren prozentualen Anteilen an der Gesamtpopulation in nachfolgender Tabelle aufgeführt:

MM-II-M Tumoren

	Linie	Tu 1/2	Tu 1/20	Tu 2/5	Tu 2/20	Tu 3/1	Tu 3/20
	Abb. 20	Abb. 32	Abb. 33	Abb. 34	Abb. 35	Abb.36	Abb. 37
M1: del(1)(p12)	100% ¹⁾	100% ²⁾	100% ³⁾	100% ⁴⁾	100% ⁵⁾	100% ⁶⁾	100% ⁷⁾
M2: i(6)(p10)	100% ¹⁾	100% ¹⁾	100% ¹⁾	100% ¹⁾	100% ¹⁾	100% ¹⁾	100% ⁸⁾
M3: del(10)(22)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
M4: del(11)(q22)	100% ¹⁾	100% ¹⁾	100% ¹⁾	100% ¹⁾	100% ¹⁾	100% ¹⁾	100% ¹⁾
M5: del(12)(q21q23)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
M6: dup(2)(p13p21)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
M7: dup(13)(q22)	-	14%	58%	17%	36%	74%	100%
M8: der(1)t(1;14)(p12;q11)	-	14%	-	-	-	-	-
M9: del(1)(:p12→q32:)	-	17%	67%	17%	32%	81%	100%
M10: del(6)(q13)	-	-	50%	-	41%	81%	81%
M11: del(1)(q24)	-	-	17%	-	-	-	-
M12: i(7)(p10)	-	-	17%	17%	9%	26%	+
M13: dic(1;16)(p36;p13)	-	-	25%	-	-	-	-
M14: i(22)(q10)	-	-	-	17%	-	-	-
M15: del(4)(q25)	-	-	-	22%	36%	-	-
M16: dup(9)(q31)	-	-	-	-	-	15%	100%

1) 100% 2 Kopien 3) 33% 2 Kopien 5) 68% 2 Kopien 7) 1 Kopie
 2) 69% 2 Kopien 4) 83% 2 Kopien 6) 19% 2 Kopien 8) 50% 2 Kopien

Chromosomenaberrationen, die nur in einer Metaphase gefunden wurden, sind mit einem "+" gekennzeichnet.

Wie es schon bei der Linie **MM-I-P** zu sehen war, finden sich auch hier die meisten neuen Veränderungen nach der 1. Tierpassage und der abgeleiteten *in vitro*-Kultur.

In der 2. *in vitro*-Passage des 1. Tumors (Abb. 32) finden sich gegenüber der Ausgangslinie (Abb. 20) drei neue Veränderungen (M7 - M9). Zwei dieser neuen Markerchromosomen (M7 und M9) konnten sich in der 20. *in vitro*-Passage (Abb. 33) stabilisieren, wogegen M8 auch in den späteren Tumoren nicht mehr nachweisbar war. M9 stellt eine terminale Deletion des q-Armes von M1 dar. In der Linie **MM-II-M** ist M1 zu 100% in zwei Kopien vertreten. Die Population, die jetzt M9 aufweist, besitzt somit entsprechend hier und in den folgenden Analysen nur eine Kopie von M1. Da sich M1, M8 und M9 in der Gesamtpopulation zu 100%

ergänzen, müssen M8 und M9 aus M1 entstanden sein. In der 20. *in vitro*-Passage des 1. Tumors haben sich noch vier weitere Markerchromosomen (M10 - M13) selektiert.

Beim 2. Tumor konnte erst ab der 5. Passage eine Analyse erstellt werden, da zwischenzeitlich methodische Probleme auftraten, so daß frühere Präparationen nicht verwertbar waren. Die Kultur zeigt hier gegenüber dem 1. Tumor zwei weitere Veränderungen (M14 und M15) (Abb. 34). M15 war auch noch in der 20. *in vitro*-Passage (Abb. 35) zu finden, wogegen M14 hier und im Weiteren nicht mehr nachweisbar war.

Die 1. *in vitro*-Passage des 3. Tumors (Abb. 36) zeigt gegenüber dem 2. Tumor eine zusätzliche Veränderung (M16), die in der 20. *in vitro*-Passage (Abb. 37) bereits in allen analysierten Metaphasen zu finden war. 50% der analysierten Metaphasen zeigen jetzt nur noch eine Kopie von M2.

Insgesamt sind bei der *in vivo*-Passagierung der Linie **MM-II-M** 10 neue Markerchromosomen aufgetreten, von denen bei Abschluß der Untersuchung noch fünf nachzuweisen waren. Besonders stark an den Sekundäraberrationen beteiligt war wiederum Chromosom # 1, das in vier verschiedenen neuen Markerchromosomen zu finden war. Ebenso sind wiederum die Chromosomen # 6 und 7 an strukturellen Veränderungen beteiligt. Signifikante Veränderungen numerischer Art waren auch bei **MM-II-M** nach der Tierpassagierung nicht festzustellen. Die für die Ausgangslinie bereits beschriebene Polysomie der Chromosomen # 8 und 22 blieb unverändert erhalten. Das Wachstumsverhalten *in vitro* und die Zellmorphologie waren jeweils der Ausgangslinie vergleichbar.

Die Linie **MM-II-M** wurde nach Abschluß der *in vivo*-Versuche noch 1 ½ Jahre bis zur 85. Passage weiter analysiert. Bis auf M15 konnte keines der nach Nacktmauspassagierung aufgetretenen Markerchromosomen in der Linie gefunden werden.

Die cytogenetischen Charakteristika der Tumoren und der hieraus abgeleiteten *in-vitro*-Kulturen sind in nachfolgenden Karyogrammen (Abb. 32 - 37) wiedergegeben.

Abb. 32: Repräsentatives Karyogramm der 2. *in vitro*-Passage des 1. Tumors von **MM-II-M**. Neben den für **MM-II-M** typischen Aberrationen finden sich drei neue Veränderungen (M7 - M9):

M1: del(1)(pter→q22:)	100% zu 69% 2 Kopien
M2: i(6)(pter→p10::p10→pter)	100% 2 Kopien
M3: del(10)(pter→q22:)	100%
M4: del(11)(pter→q22:)	100% 2 Kopien
M5: del(12)(pter→q21::q23→qter)	100%
M6: dup(2)(pter→p13::p21→qter)	100%

Folgende Veränderungen sind im Tumor neu hinzugekommen:

M7: dup(13)(pter→q34::q22→qter)	14%
M8: der(1)t(1;14)(1qter→1p12::14q11→14qter)	14%
M9: del(1)(:p12→q3.2:)	17%

MM-II - M-T/2

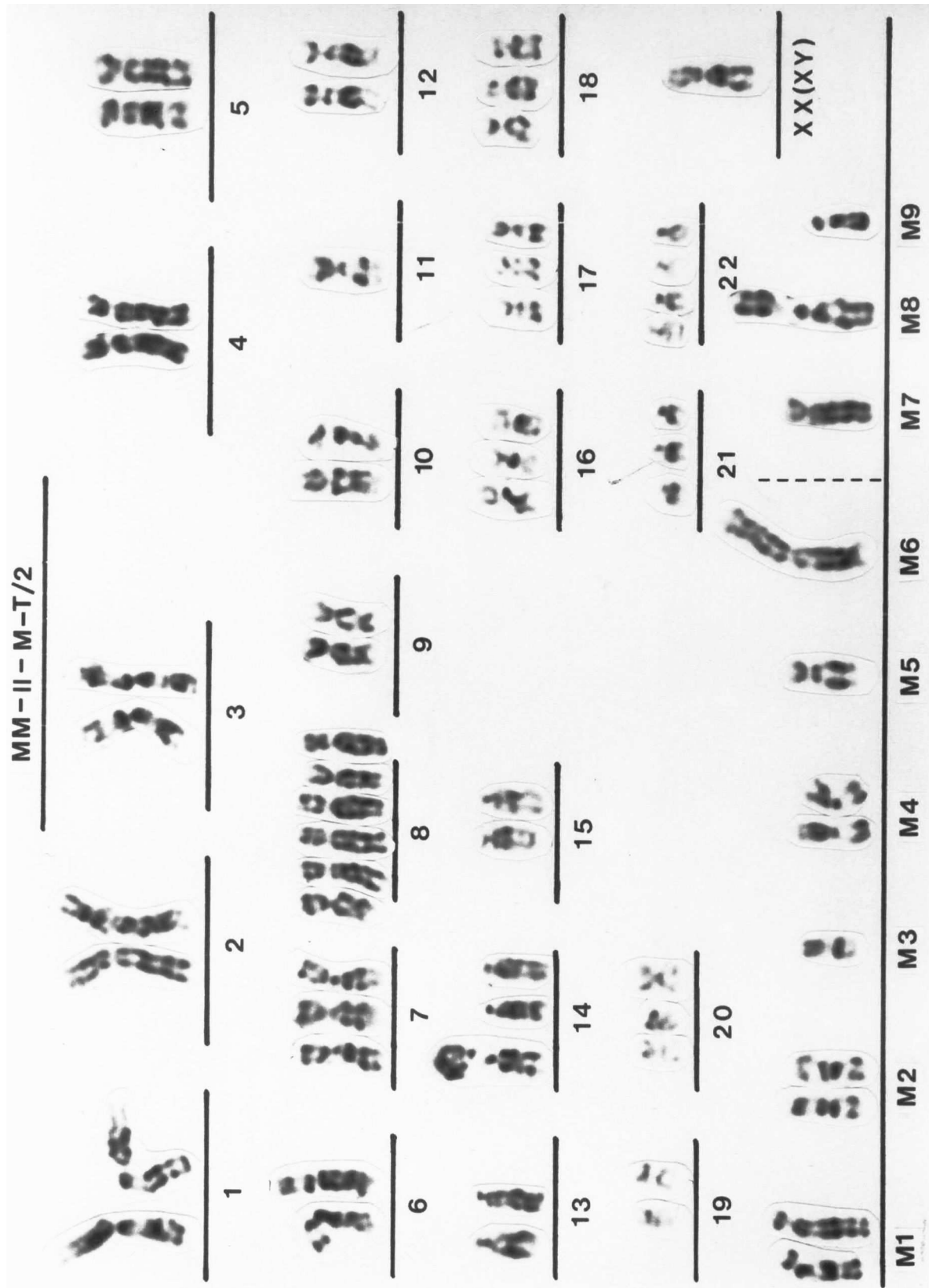


Abb. 33: Repräsentatives Karyogramm der 20. *in vitro*-Passage des 1. Tumors von **MM-II-M**. Gegenüber der 2. *in vitro*-Passage finden sich vier weitere Veränderungen (M10 - M13). M8 war hier und in den folgenden Kulturen nicht mehr nachweisbar.

M1: del(1)(:p12→qter)	100% zu 33% 2 Kopien
M2: i(6)(pter→p10::p10→pter)	100% 2 Kopien
M3: del(10)(pter→q22:)	100%
M4: del(11)(pter→q22:)	100% 2 Kopien
M5: del(12)(pter→q21::q23→qter)	100%
M6: dup(2)(pter→p13::p21→qter)	100%
M7: dup(13)(pter→34::q22→qter)	58%
M9: del(1)(p12→q32:)	67%

Die neuen Veränderungen sind:

M10: del(6)(per→q13:)	50%
M11: del(1)(pter→q24:)	17%
M12: i(7)(pter→p10::p10→pter)	17%
M13: dic(1;16)(1qter→1p36::16p13→16qter)	25%

MM-II-M-T/20

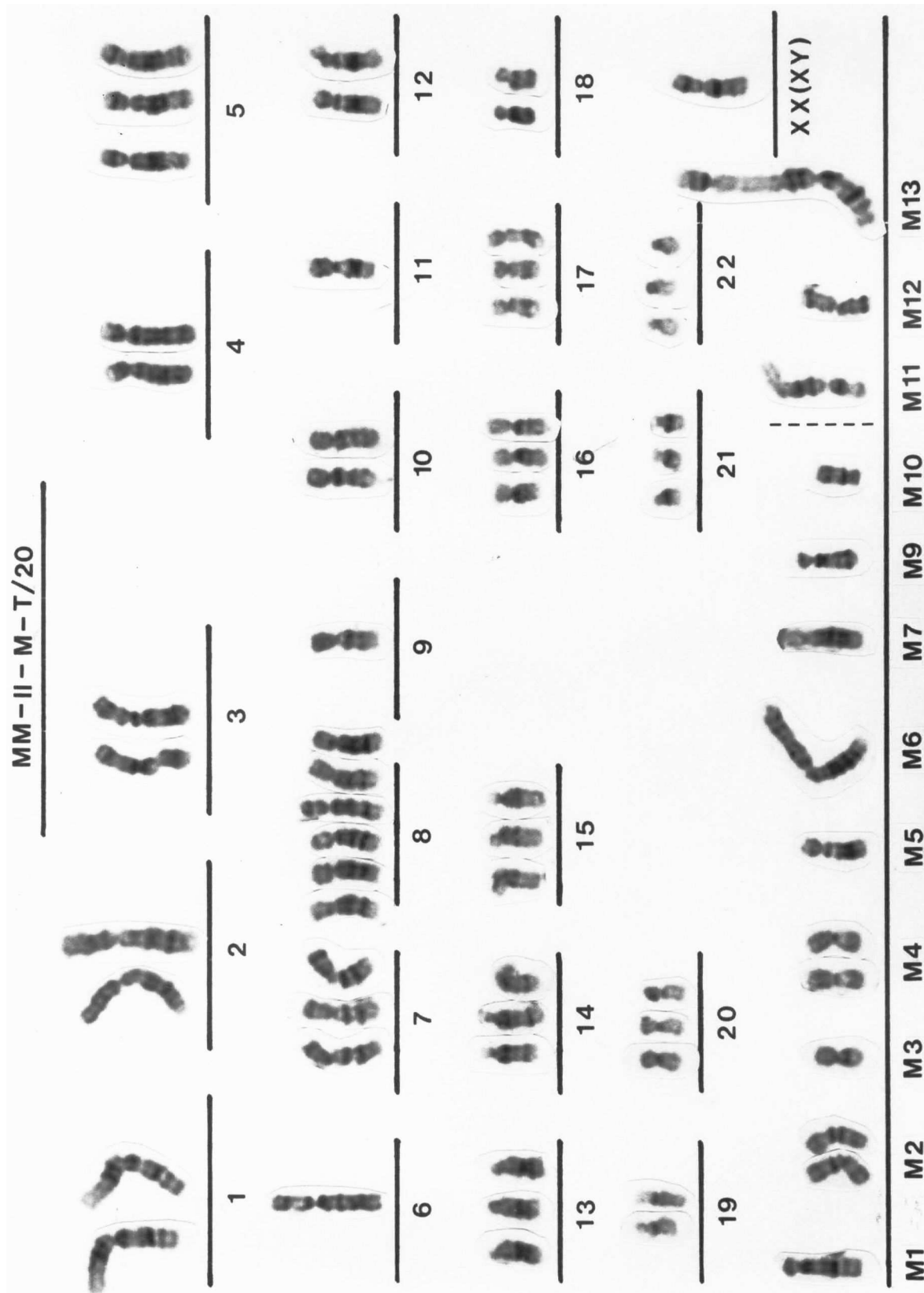


Abb. 34: Repräsentatives Karyogramm der 5. *in vitro*-Passage des 2. Tumors von **MM-II-M**. Gegenüber dem 1. Tumor finden sich zwei weitere Veränderungen (M14 und M15).

M1: del(1)(:p12→qter)	100% zu 83% 2 Kopien
M2: i(6)(pter→p10::p10→pter)	100% 2 Kopien
M3: del(10)(pter→q22:)	100%
M4: del(11)(pter→q22:)	100% 2 Kopien
M5: del(12)(pter→q21::q23→qter)	100%
M6: dup(2)(pter→p13::p21→qter)	100%
M7: dup(13)(pter→q34::q22→qter)	17%
M9: del(1)(:p12→q32:)	17%
M12: i(7)(pter→p10::p10→pter)	17%

Die neuen Veränderungen sind:

M14: i(22)(qter→q10::q10→qter)	17%
M15: del(4)(pter→q25:)	22%

MM-II - M-T2/5

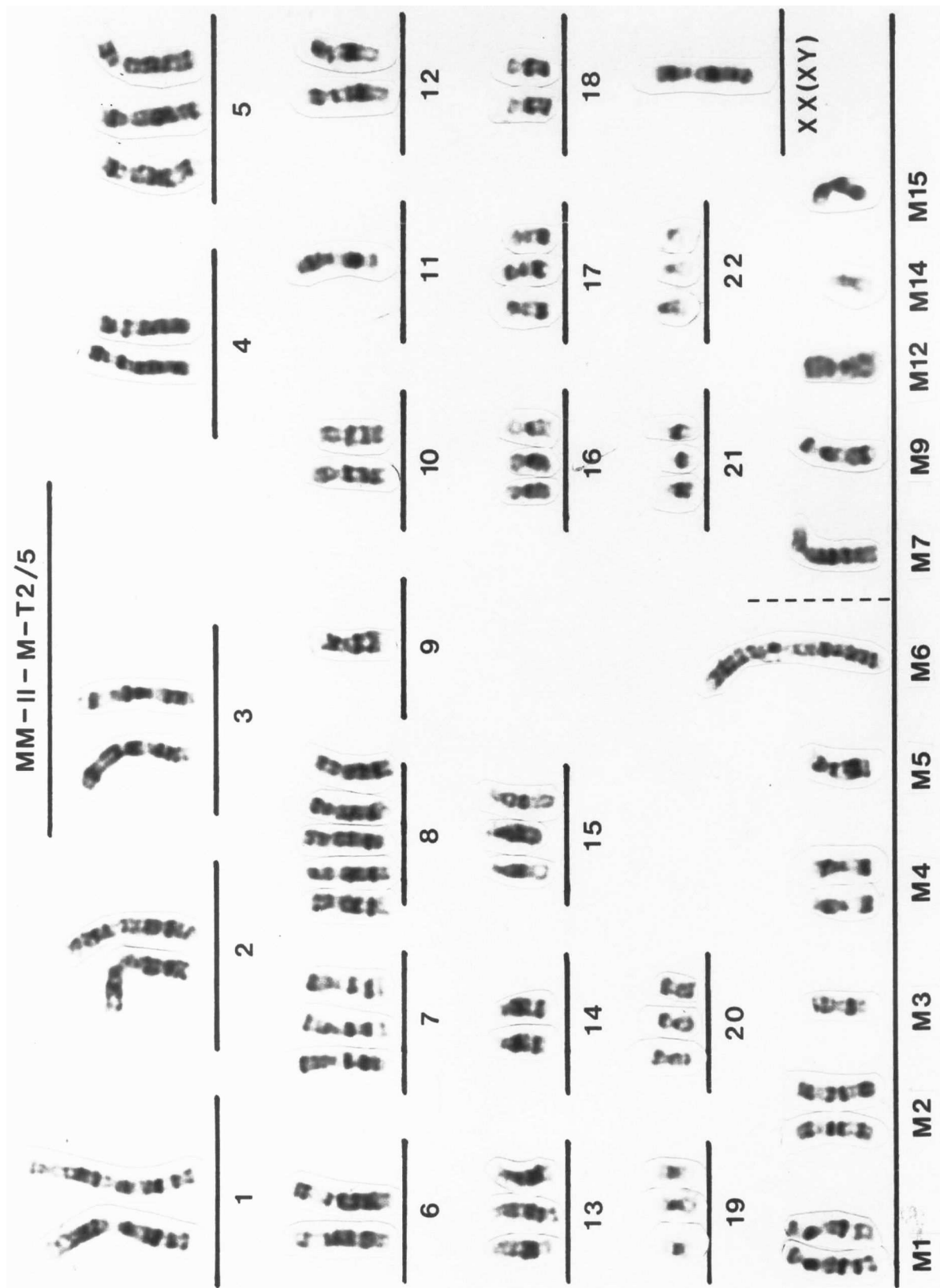


Abb. 35: Repräsentatives Karyogramm der 20. *in-vitro*-Passage des 2. Tumors von **MM-II-M**. Neue Markerchromosomen sind hier nicht hinzugekommen.

M1: del(1)(:p12→qter)	100% zu 68% 2 Kopien
M2: i(6)(pter→p10::p10→pter)	100% 2 Kopien
M3: del(10)(pter→q22:)	100%
M4: del(11)(pter→q22:)	100% 2 Kopien
M5: del(12)(pter→q21::q23→qter)	100%
M6: dup(2)(pter→p13::p21→qter)	100%
M7: dup(13)(pter→q34::q22→qter)	36%
M9: del(1)(:p12→q32:)	32%
M10: del(6)(pter→q13:)	41%
M12: i(7)(pter→p10::p10→pter)	9%
M15: del(4)(pter→q25:)	36%

MM-II - M-T2/20

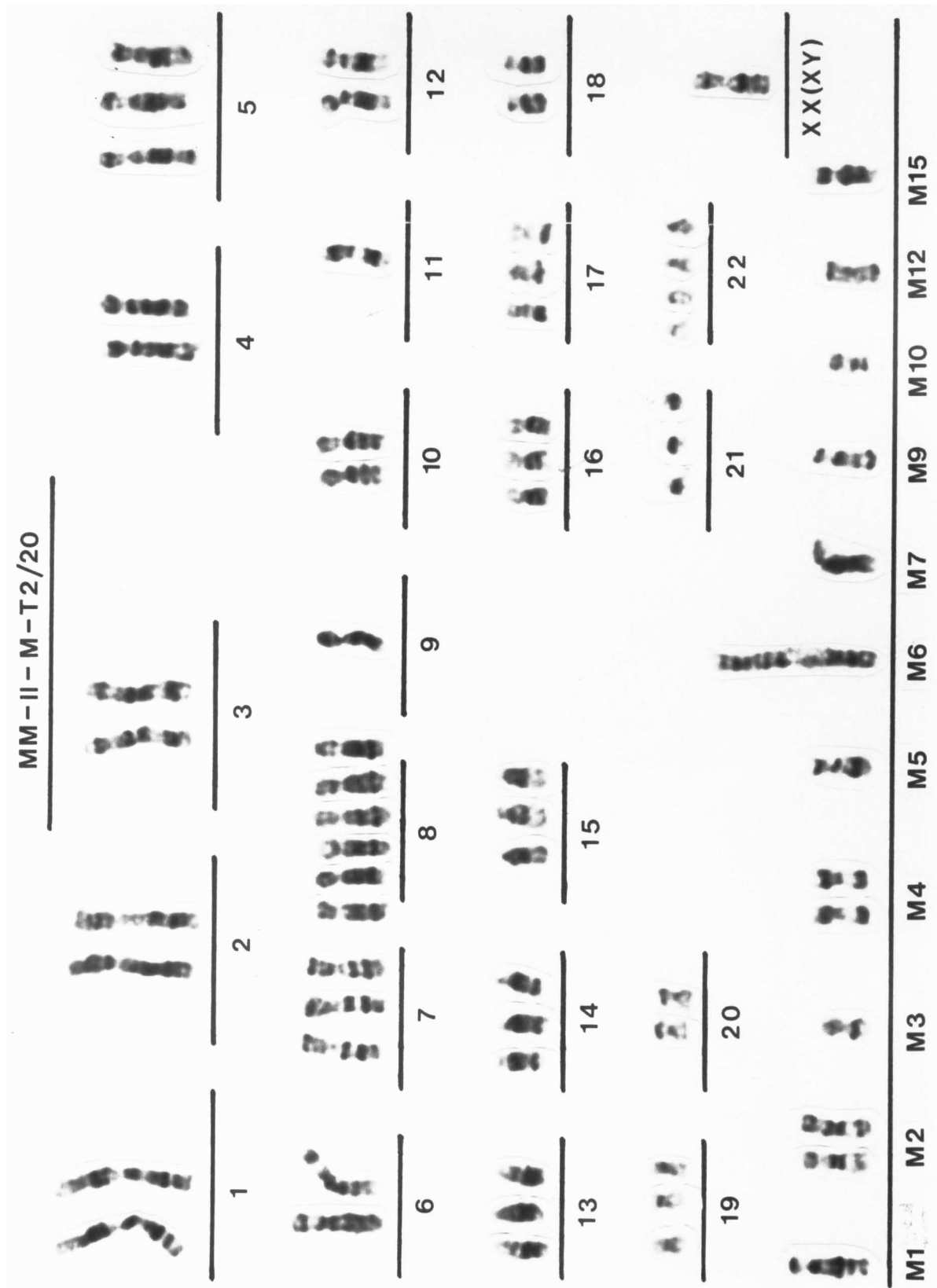


Abb.36: Repräsentatives Karyogramm der 1. *in vitro*-Passage des 3. Tumors von **MM-II-M**. Gegenüber dem 2. Tumor ist eine neue Veränderung (M16) hinzugekommen.

M1: del(1)(:p12→qter)	100% zu 19% 2 Kopien
M2: i(6)(pter→p10::p10→pter)	100% 2 Kopien
M3: del(10)(pter→q22:)	100%
M4: del(11)(pter→q22:)	100% 2 Kopien
M5: del(12)(pter→q21::q23→qter)	100%
M6: dup(2)(pter→p13::p21→qter)	100%
M7: dup(13)(pter→q34::q22→qter)	74%
M9: del(1)(:p12→q32:)	81%
M10: del(6)(pter→q13:)	81%
M12: i(7)(pter→p10::p10→pter)	26%

Als neue Veränderung findet sich:

M16: dup(9)(pter→q34::q31→qter)	15%
---------------------------------	-----

MM-II - M-T3/1

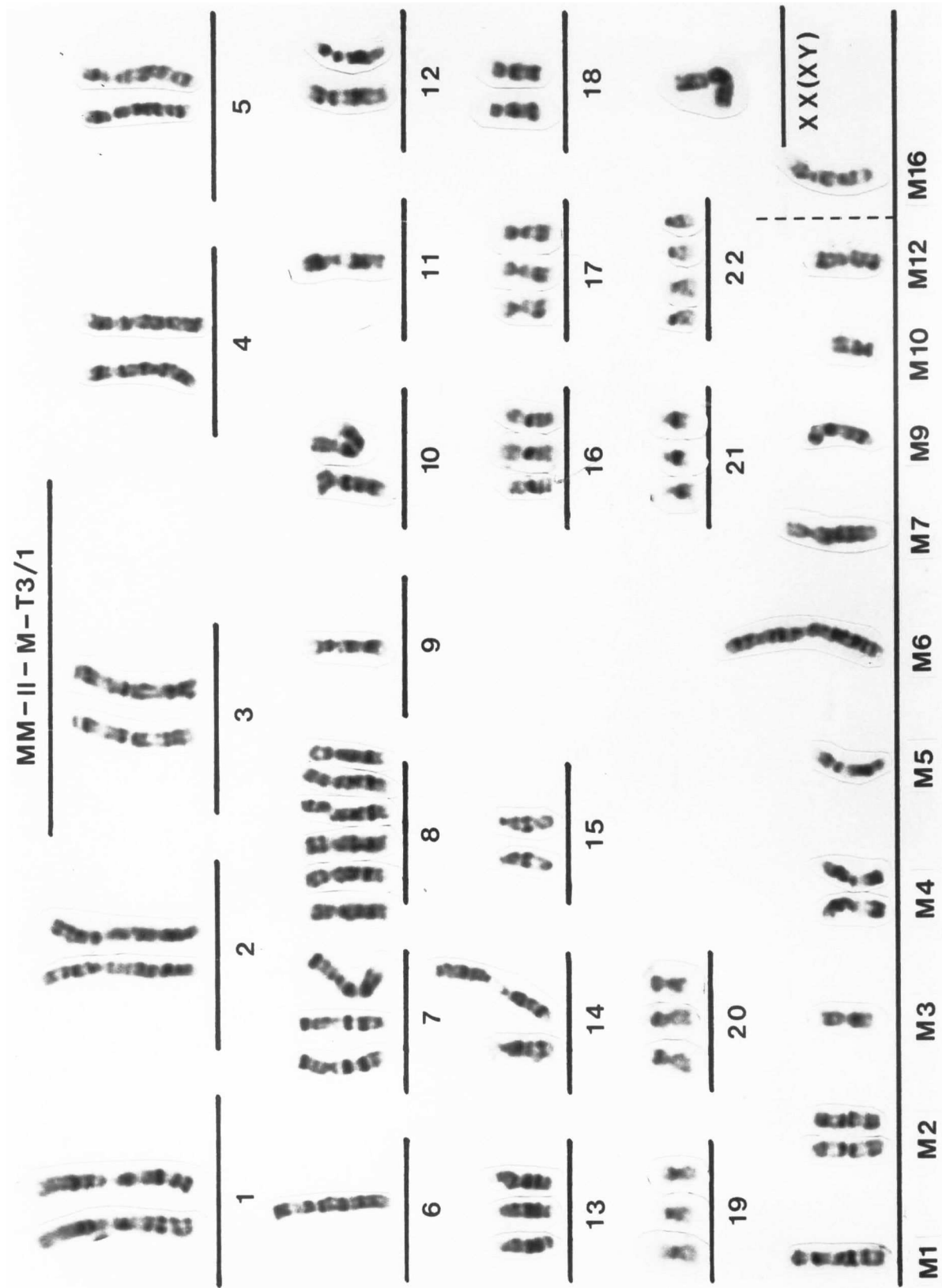
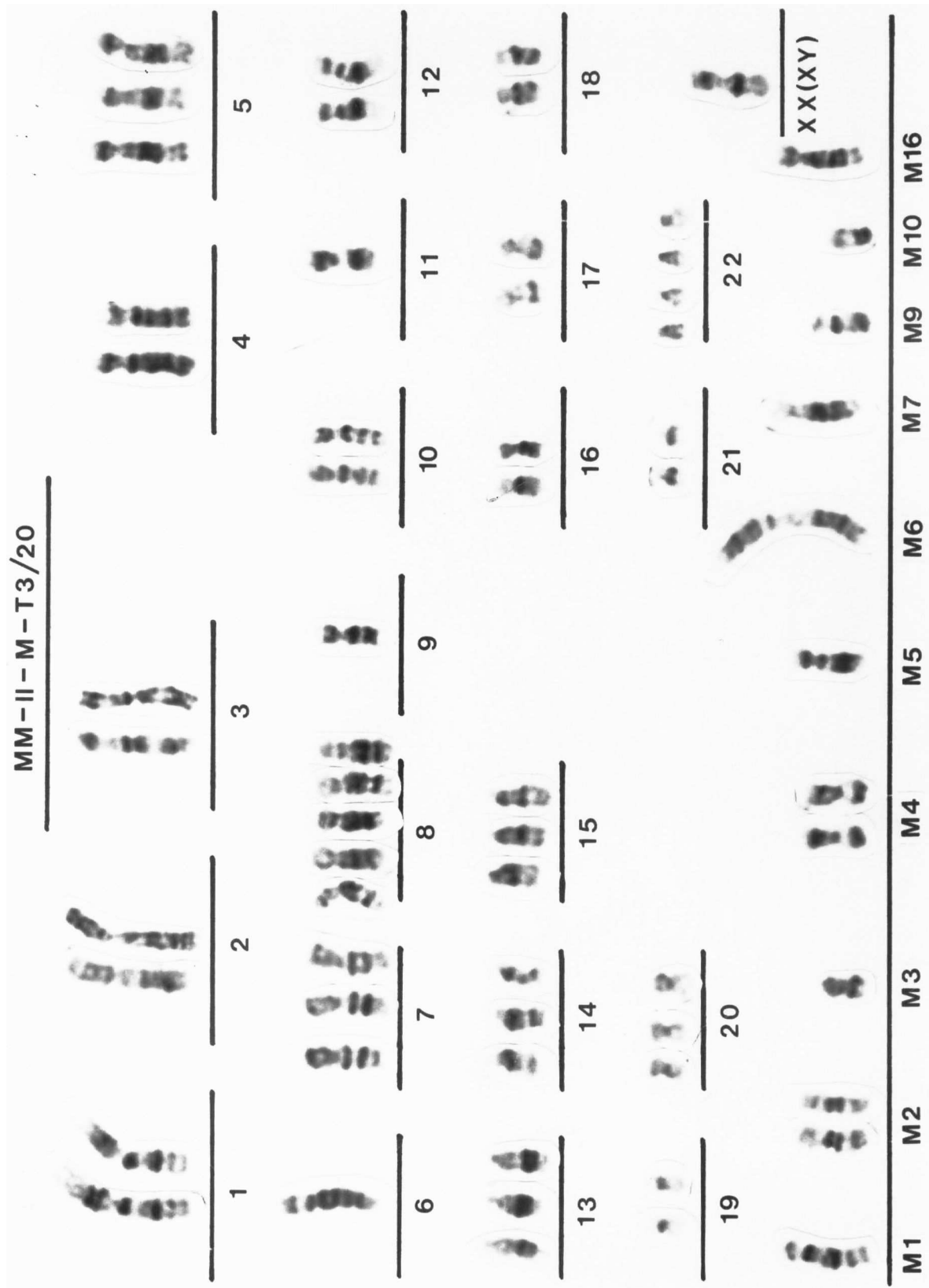


Abb. 37: Repräsentatives Karyogramm der 20. *in-vitro*-Passage des 3. Tumors von **MM-II-M**. Gegenüber den vorbeschriebenen Analysen handelt es sich hierbei um eine relativ reine Population, lediglich M10 kommt nicht in 100% der Metaphasen vor. M12 war in einer Metaphase zu finden. Neue Veränderungen sind hier nicht hinzugekommen.

M1: del(1)(:p12→qter)	100% eine Kopie
M2: i(6)(pter→p10::p10→pter)	100% 50% 2 Kopien
M3: del(10)(pter→q22:)	100%
M4: del(11)(pter→q22:)	100% 2 Kopien
M5: del(12)(pter→q21::q23→qter)	100%
M6: dup(2)(pter→p13::p21→qter)	100%
M7: dup (13)(pter→q34::q22→qter)	100%
M9: del(1)(:p12→q32:)	100%
M10: del(6)(pter→q13:)	81%
M12: i(7)(pter→p10::p10→pter)	+
M16: dup(9)(pter→q34::q31→qter)	100%

MM-II - M - T3/20



C. MM-III-M

MM-III-M wurde in der 2. Passage in die Nacktmaus gegeben. Wie bei den beiden vorbeschriebenen Zell-Linien fanden sich auch hier nach der jeweiligen Reaktivierung der Maustumore neue Veränderungen; diese, für den Maustumor typischen Veränderungen und ihre prozentualen Anteile an der Gesamtpopulation sind in nachfolgender Tabelle wiedergegeben.

MM-III-M Tumoren

	Linie	Tu 1/2	Tu 1/20	Tu 2/3	Tu 2/20	Tu 3/1	Tu 3/20
	Abb. 6	Abb. 38	Abb. 39	Abb. 40	Abb. 41	Abb.42	Abb. 43
M1: der(4;5)(q10;p10)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
M2: der(8)t(8;5)(q24;q13) dup(5)(q21q24)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
M3: der(21)t(21;?)(p11;?)	75%	80%	100%	100%	100%	96%	100%
M4: N.D.1	35%	-	-	-	-	-	-
M5: del(1)(p22)	35%	30%	-	-	-	-	-
M6: del(1)(q22)	12%	55%	-	-	85%	-	-
M7: i(1)(q10)	12%	70%	21%	81%	-	100%	100%
M8: i(1)(p10)	-	20%	-	-	100%	+	-
M9: N.D.2 (Ringchromosom)	-	100%	86%	88%	80%	93%	100%
M10: del(10)(q12)	-	70%	92%	100%	45%	89%	100%
M11: del(1)(q11)	-	-	17%	69%	-	35%	100%
M12: der(1)t(1;?)(p36;?)	-	-	91%	-	-	-	-
M13: del(10)(q24)	-	-	13%	-	10%	-	-
M14: dup(2)(p21p11)	-	-	-	-	15%	-	-
M15: del(1)(q32)	-	-	-	-	10%	-	-
M17: del(1)(p11)	-	-	-	-	-	10%	-
M18: der(1;8)(p10;p10)	-	-	-	-	-	18%	-
M19: der(1;13)(p10;q10)	-	-	-	-	-	18%	-
					+t(2;13)	+t(1q;15q)	
					+t(13q;7p)		
					+del(M12q)		
					+del(3p)		
					+t(2p;4q)		
					+t(3p;4q)		
					+t(1p;8q)		
					+i(10q)		
					+del(7p)		
					+del(1q)		
					+t(1p;21q)		

Veränderungen, die nur in einer Metaphase zu finden waren, sind wieder mit einem "+" gekennzeichnet.

Auch bei **MM-III-M** finden sich die meisten neuen Markerchromosomen nach der 1. Tierpassagierung und der späten *in vitro*-Kultur. In der zweiten *in vitro*-Passage des 1. Tumors (Abb. 38) zeigen sich drei neue Veränderungen (M8 - M10). M4 war hier und in den nachfolgenden Kulturen nicht mehr nachweisbar. Die 20. *in vitro*-Passage (Abb. 39) bringt drei weitere Veränderungen (M11 - M13) hinzu. Die Markerchromosomen M5 und M6 der Ausgangskultur konnten ab jetzt nicht mehr gefunden werden. M8 konnte nur noch einmal in einer Metaphase bei der 1. *in vitro*-Passage des 3. Tumors (Abb. 42) nachgewiesen werden.

Die 3. *in vitro*-Passage des 2. Tumors (Abb. 40) weist gegenüber dem 1. Tumor keine neuen Veränderungen auf. M12 und M13 waren hier und im Weiteren nicht mehr nachweisbar. Die 20. *in vitro*-Passage (Abb. 41) zeigt jetzt drei neue Markerchromosomen (M14 - M16), die aber auch nur hier zu finden waren. Weiter zeigt die späte *in vitro*-Kultur eine große Zahl von Aberrationen, die nur in jeweils einer Metaphase zu finden waren.

In der ersten *in vitro*-Passage des dritten Tumors (Abb. 42) sind drei neue Markerchromosomen festzustellen, die aber in der späten *in vitro*-Kultur (Abb. 43) nicht mehr nachweisbar waren. Die 20. *in vitro*-Passage stellt augenscheinlich eine homogene Population dar, alle Markerchromosomen finden sich in 100% der analysierten Metaphasen.

Insgesamt fanden sich, ohne Berücksichtigung der Veränderungen, die nur in einer Metaphase zu sehen waren, bei den *in vivo*-Versuchen mit **MM-III-M** 12 neue Markerchromosomen. Gegenüber den beiden vorbeschriebenen Zell-Linien sind hier die Sekundäraberrationen nicht so konsistent, so daß sich nach Abschluß der *in vivo*-Versuche bei dieser Linie nur drei sekundäre Markerchromosomen (M9 - M11) stabil erhalten konnten. Wiederum zeigt sich Chromosom # 1 als am stärksten an Sekundäraberrationen beteiligt, es findet sich in sieben der 12 neu entstandenen Markerchromosomen. Das Wachstumsverhalten der jeweils rekultivierten Maustumoren, sowie der Phänotyp der Zellen *in vitro* waren auch hier der Ausgangskultur vergleichbar.

Die cytogenetischen Charakteristika der Injektionstumore und ihrer abgeleiteten *in-vitro*-Kulturen sind in den nachfolgenden Karyogrammen (Abb. 38 - 43) wiedergegeben.

Abb. 38: Repräsentatives Karyogramm der zweiten *in vitro*-Passage des ersten Tumors von **MM-III-M**. Gegenüber der Explantatkultur finden sich drei zusätzliche Veränderungen (M8 - M10). M4 war hier und im Weiteren nicht mehr nachweisbar.

M1: der(4;5)(4qter→4q10::5p10→5pter)	100%
M2: der(8)t(5;8)(5qter→5q13::8q24→8pter)dup(5)(5q21→5q24)	100%
M3: der(21)t(21;?)(21qter→21p11::?)	80%
M5: del(1)(:p22→qter)	30%
M6: del(1)(pter→q22:)	55%
M7: i(1)(qter→q10::q10→qter)	70%

Neue Veränderungen sind:

M8: i(1)(pter→p10::p10→pter)	20%
M9: N.D.2 (Ringchromosom)	100%
M10: del(10)(pter→q12:)	70%

MM - III - M - T/2

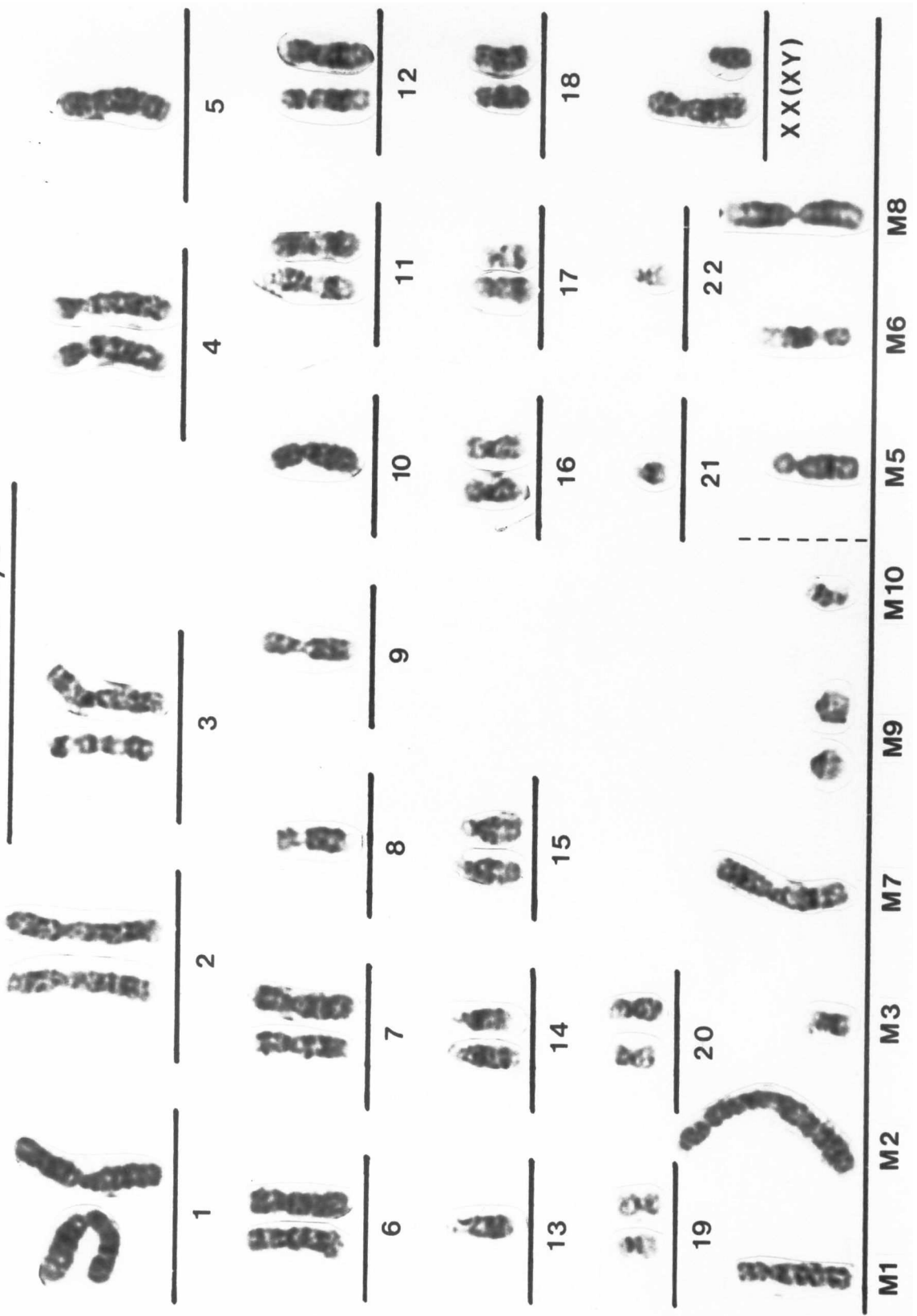


Abb. 39: Repräsentatives Karyogramm der 20. *in-vitro*-Passage des ersten Tumors von **MM-III-M**. Gegenüber der zweiten *in vitro*-Passage weist die späte *in-vitro*-Kultur 3 weitere Veränderungen (M11 - M13) auf, M5 und M6 gehen verloren.

M1: der(4;5)(4qter→4q10::5p10→5pter)	100%
M2: der(8)t(5;8)(5qter→5q13::8q24→8pter)dup(5)(5q21→5q24)	100%
M3: der(21)t(21;?)(21qter→21p11::?)	100%
M7: i(1)(qter→q10::q10→qter)	21%
M8: i(1)(pter→p10::p10→pter)	20%
M9: N.D.2 (Ringchromosom)	86%
M10: del(10)(pter→q12:)	92%

Neue Veränderungen sind:

M11: del(1)(pter→q11:)	17%
M12: der(1)t(1,?)(1qter→1p36::?)	91%
M13: del(10)(pter→q24:)	13%

MM - III - M - T/20

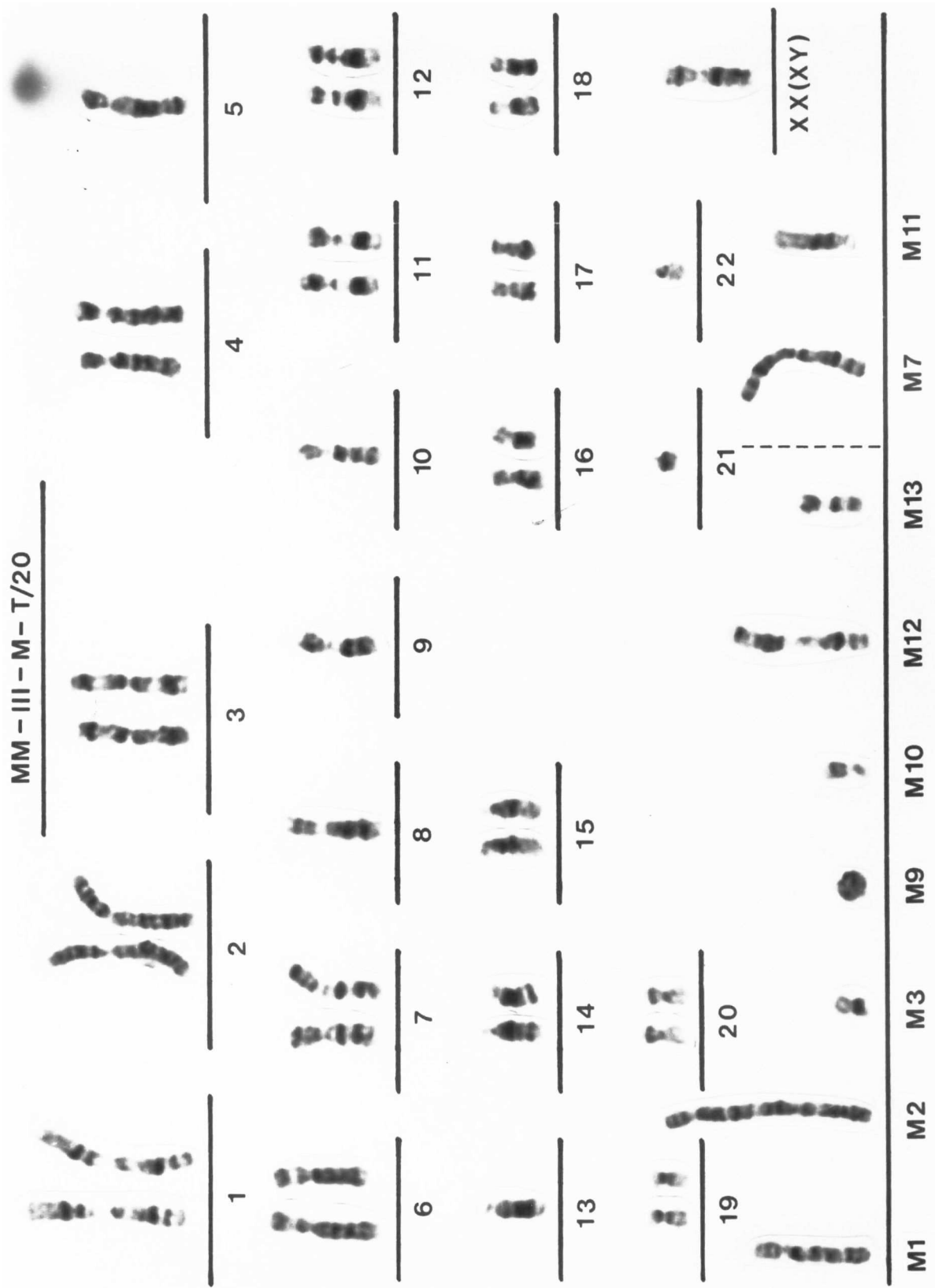


Abb. 40: Repräsentatives Karyogramm dritten *in vitro*-Passage des zweiten Tumors von **MM-III-M**. In diesem Tumor waren keine neuen Veränderungen nachweisbar. M12 und M13 waren hier nicht mehr zu finden.

M1: der(4;5)(4qter→4q10::5p10→5pter)	100%
M2: der(8)t(5;8)(5qter→5q13::8q24→8pter)dup(5)(5q21→5q24)	100%
M3: der(21)t(21;?)(21qter→21p11::?)	100%
M7: i(1)(qter→q10::q10→qter)	81%
M9: N.D.2 (Ringchromosom)	88%
M10: del(10)(pter→q12:)	100%
M11: del(1)(pter→q11:)	69%

MM - III - M - T2/3

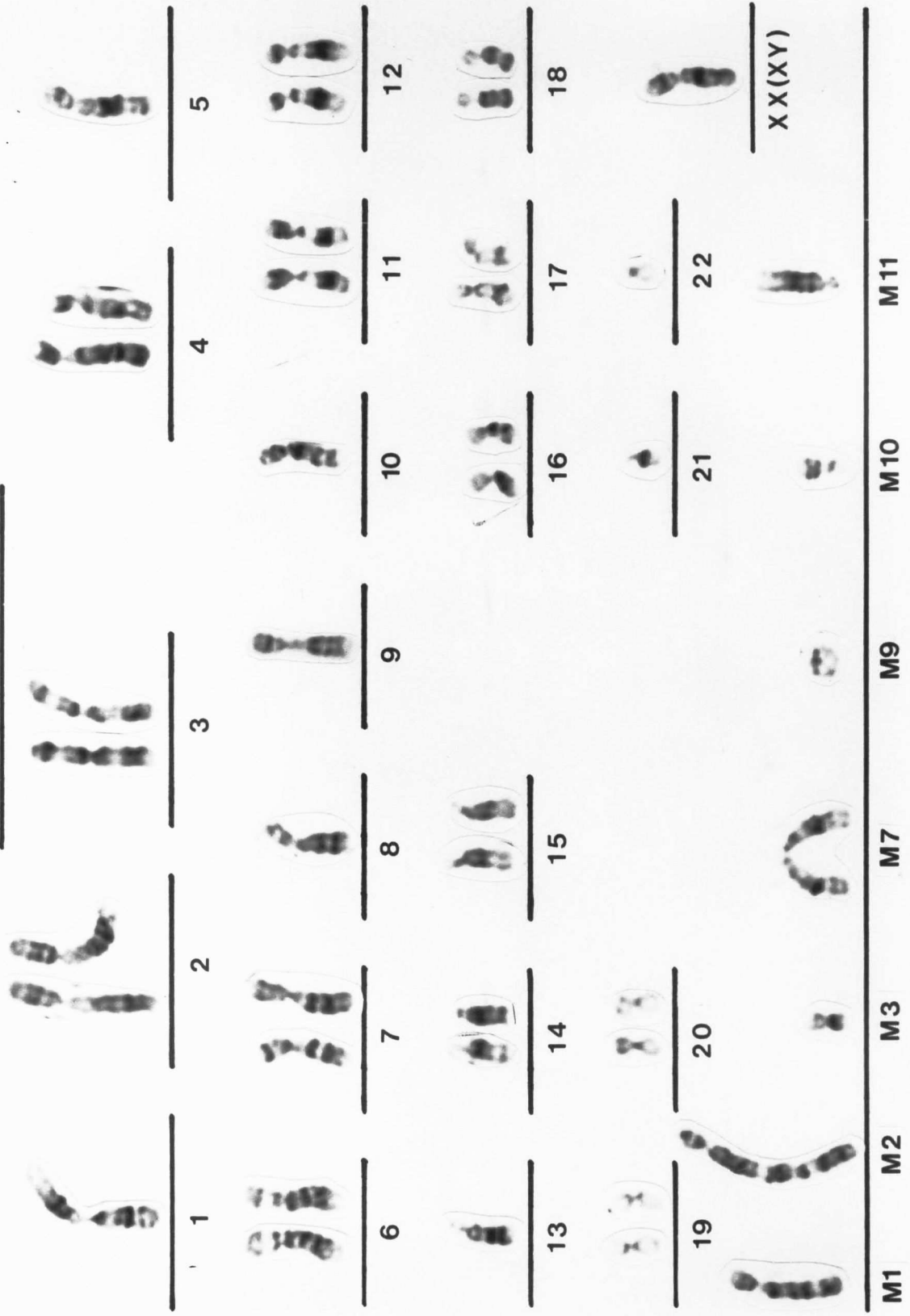


Abb. 41: Repräsentatives Karyogramm der 20. *in-vitro*-Passage des zweiten Tumors von **MM-III-M**. Gegenüber dem 1. Tumor finden sich drei weitere Veränderungen (M14 - M16).

M1: der(4;5)(4qter→4q10::5p10→5pter)	100%
M2: der(8)t(5;8)(5qter→5q13::8q24→8pter)dup(5)(5q21→5q24)	100%
M3: der(21)t(21;?)(qter→p11::?)	100%
M7: i(1)(qter→q10::q10→qter)	85%
M9: N.D.2 (Ringchromosom)	100%
M10: del(10)(pter→q12:)	80%
M11: del(1)(pter→q11:)	45%

Die neuen Veränderungen sind:

M14: dup(2)(pter→p11::p21→qter)	10%
M15: del(1)(pter→q32:)	15%
M16: i(6)(pter→p10::p10→pter)	10%

Zusätzlich hierzu finden sich in jeweils einer Metaphase folgende Veränderungen:

der(2)t(2;13)(2qter→2p25::13q11→13qter)
 der(7;13)(7pter→7p10::13p10→13qter)
 der(1)t(1,?)(1q11→1p36::?) [„delM12q“]
 del(3)(:p11→qter)
 der(2;4)(2pter→2p10::4q10→4qter)
 der(3;4)(3pter→3p10::4q10→4qter)
 der(1;8)(1pter→1p10::8q10→8qter)
 i(10)(qter→q10::q10→qter)
 del(7)(:p13→qter)
 del(1)(pter→q34:)
 der(1;21)(1pter→1p10::21q10→21qter)

MM - III - M - T2/20

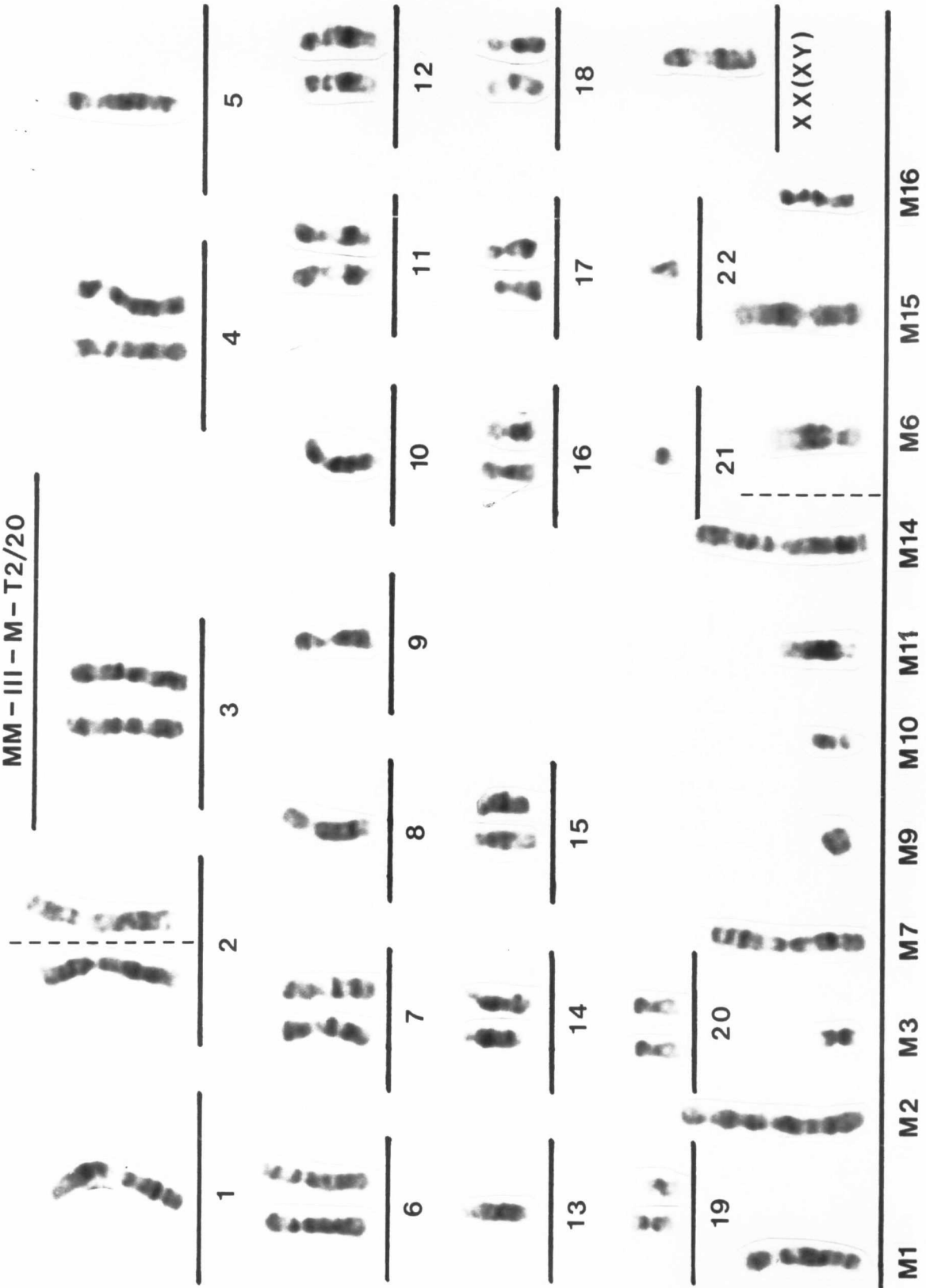


Abb. 42: Repräsentatives Karyogramm der ersten *in vitro*-Passage des dritten Tumors von **MM-III-M**. Gegenüber dem zweiten Tumor finden sich drei weitere Veränderungen (M17 - M19). M14 - M16 waren nicht mehr nachweisbar.

M1: der(4;5)(4qter→4q10::5p10→5pter)	100%
M2: der(8)t(5;8)(5qter→5q13::8q24→8pter)dup(5)(5q21→5q24)	100%
M3: der(21)t(21;?)(qter→p11::?)	96%
M7: i(1)(qter→q10::q10qter)	100%
M8: i(1)(pter→p10::p10→pter)	+
M9: N.D.2 (Ringchromosom)	93%
M10: del(10)(pter→q12:)	89%
M11: del(1)(pter→q11:)	35%

Neue Veränderungen sind:

M17: del(1)(:p11→qter)	10%
M18: der(1;8)(1pter→1p10::8p10→8pter)	18%
M19: der(1;13)1(pter→1p10::13q10→13qter)	18%

In einer Metaphase konnte eine Translokation
 der(1;15)(1qter→1q10::15q10→15qter)
 nachgewiesen werden.

MM - III - M - T3/1

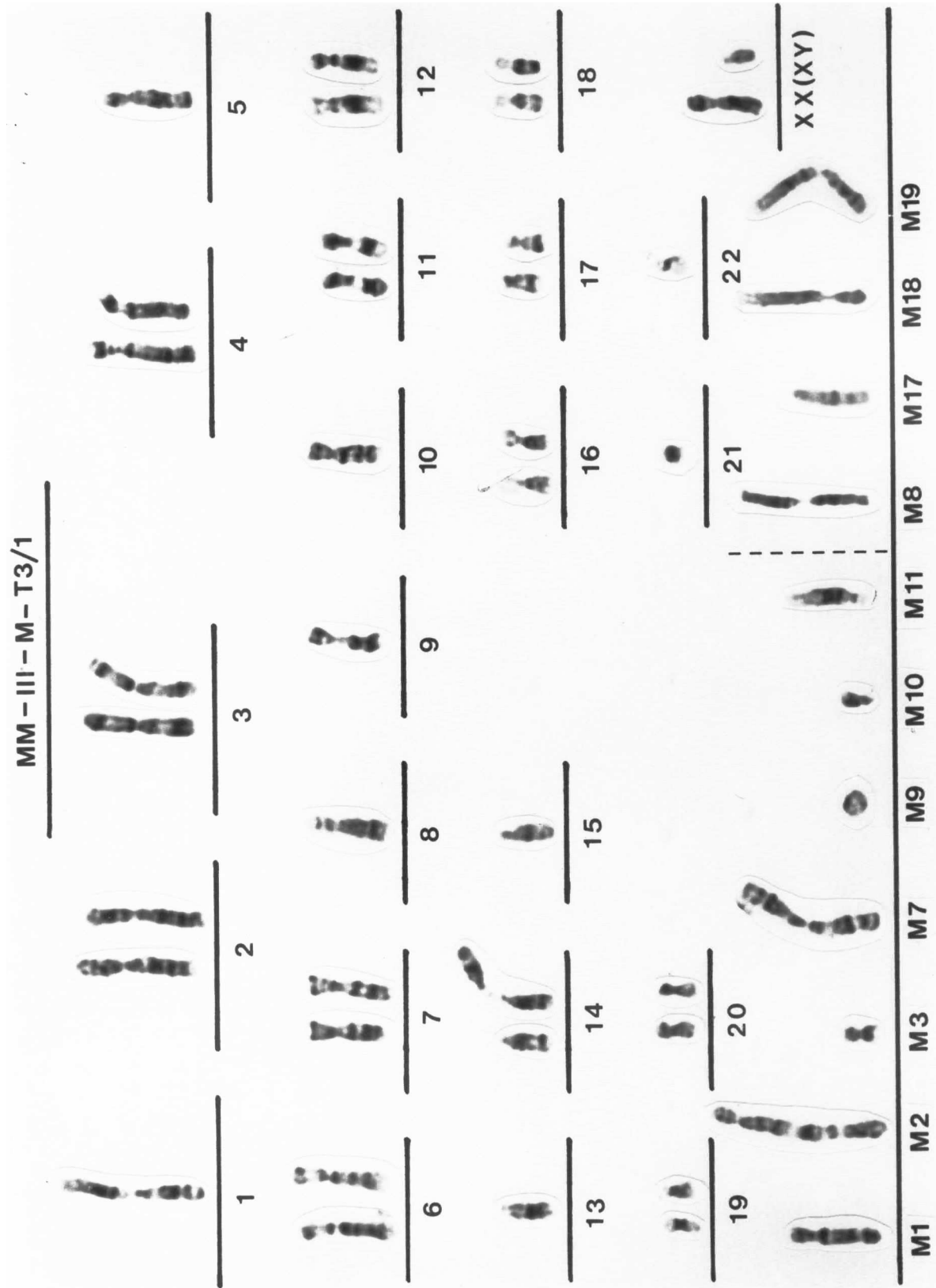
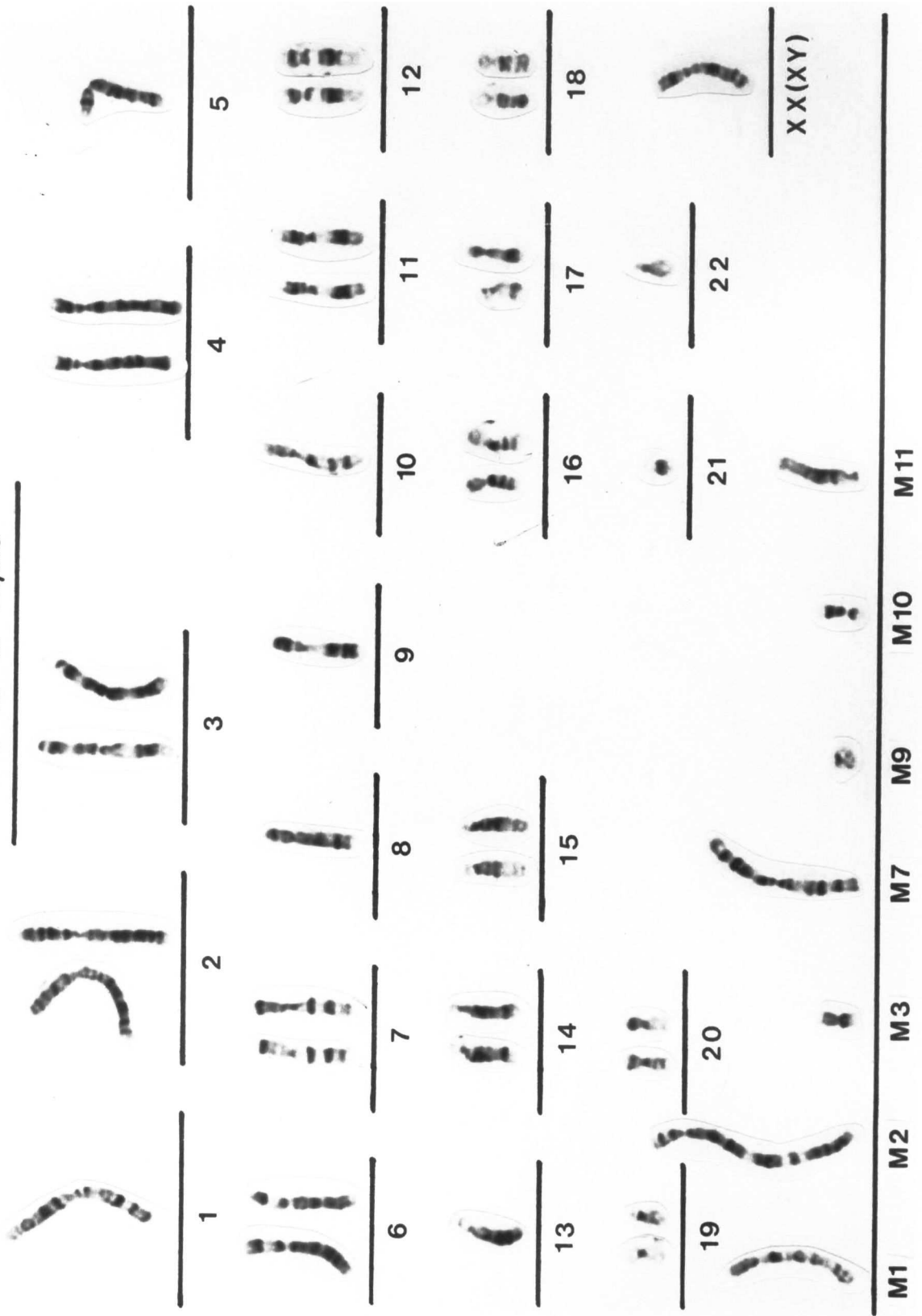


Abb. 43: Repräsentatives Karyogramm der 20. *in-vitro*-Passage des dritten Tumors von **MM-III-M**. Die *in-vitro*-Kultur stellt eine homogene Population dar, die gegenüber der Ausgangskultur nur drei zusätzliche Markerchromosomen aufweist. M17 - M19 aus der frühen *in vitro*-Kultur des dritten Tumors konnten hier nicht mehr beobachtet werden.

M1: der(4;5)(4qter→4q10::5p10→5pter)	100%
M2: der(8)t(5;8)(5qter→5q13::8q24→8pter)dup(5)(5q21→5q24)	100%
M3: der(21)t(21;?)(21qter→21p11::?)	100%
M7: i(1)(qter→q10::q10→qter)	100%
M9: N.D.2 (Ringchromosom)	100%
M10: del(10)(pter→q12:)	100%
M11: del(1)(pter→q11:)	100%

MM - III - M - T3/20

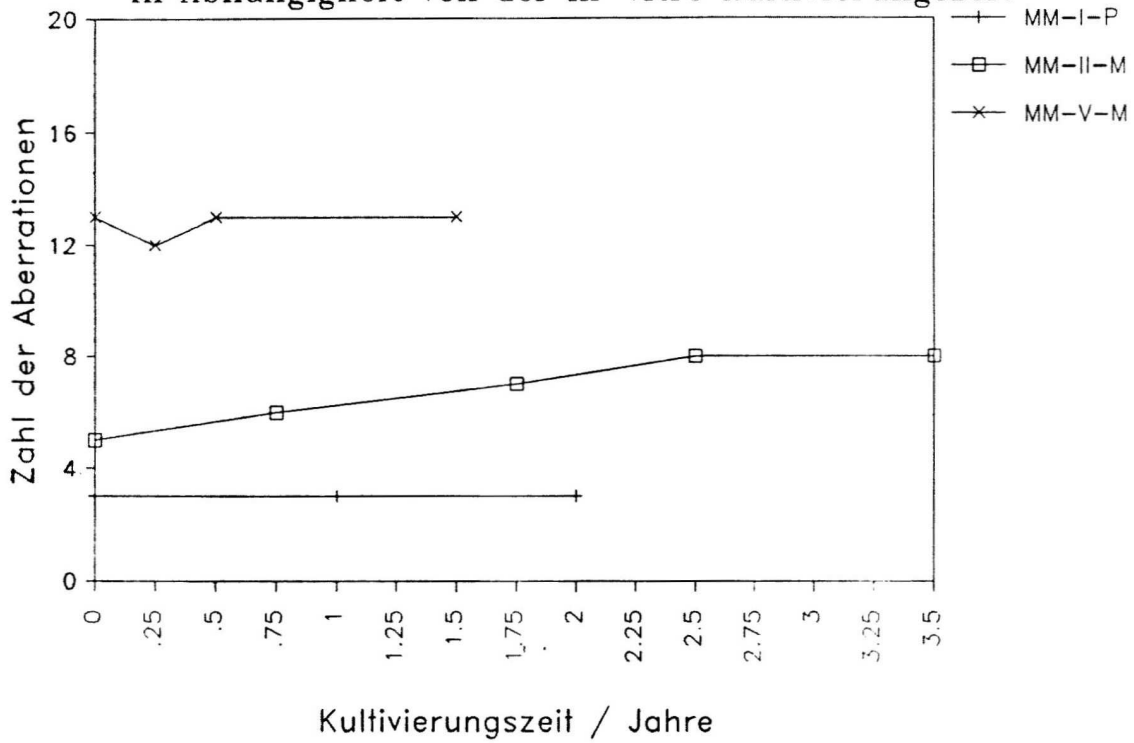


Die vorbeschriebenen Untersuchungen an den drei Melanom-Zell-Linien **MM-I-P**, **MM-II-M** und **MM-III-M** zeigen, daß die *in vitro* sehr stabilen Zellen im *in vivo*-System schnell Subpopulationen bilden, die durch neue Markerchromosomen gekennzeichnet sind. Wenn es sich bei diesem Versuchssystem auch um eine heterologe *in vivo*-Umgebung handelte, dürfte dies der Situation entsprechen, wie sie für den Patienten beschrieben wird (Fidler I.J. et al, 1982). Die *in vitro*-Stabilität ist somit nicht in den Zellen fixiert, sondern muß durch die unphysiologischen Gegebenheiten der Zellkultur bedingt sein.

MM-I-P wies *in vitro* über zwei Jahre (66 Passagen) keine zusätzlichen Markerchromosomen auf, wogegen ca. 20 Wochen Propagierung im Tier ausreichten, um 11 neue zum Teil stabile Markerchromosomen zu bilden. **MM-II-M** bildete *in vitro* in 3 ½ Jahren (85 Passagen) drei neue Markerchromosomen aus und zwei gingen verloren. Nach ebenfalls 20 Wochen im Tier zeigten sich 10 neue Veränderungen. Die *in vivo*-Propagierungszeit entspricht etwa einem neuntel des untersuchten *in vitro*-Zeitraumes. Rechnete man die Zahl der Sekundäraberrationen nach *in vivo*-Passagierung auf 3 ½ Jahre hoch, so stünden drei neue Aberrationen *in vitro* 90 neuen Aberrationen *in vivo* gegenüber. Dieser Vergleich ist so uneingeschränkt natürlich nicht statthaft, da die Populationsverdopplungszeiten *in vivo* sicher geringer sind als *in vitro*, die Zellen besitzen im *in vivo*-System somit eine größere Chance Chromosomenveränderungen zu erfahren als im *in vitro*-System. **MM-III-M** zeigte während der *in vivo*-Passagierung 12 neue Markerchromosomen, die jedoch nicht so stabil waren, wie bei den beiden vorbeschriebenen Linien, so daß von diesen 12 neuen Veränderungen bei Abschluß der Untersuchungen nur noch drei zu sehen waren. Dieser Sachverhalt, der *in vitro*-Stabilität und *in vivo*-Labilität wird in den nachfolgenden beiden Graphiken verdeutlicht.

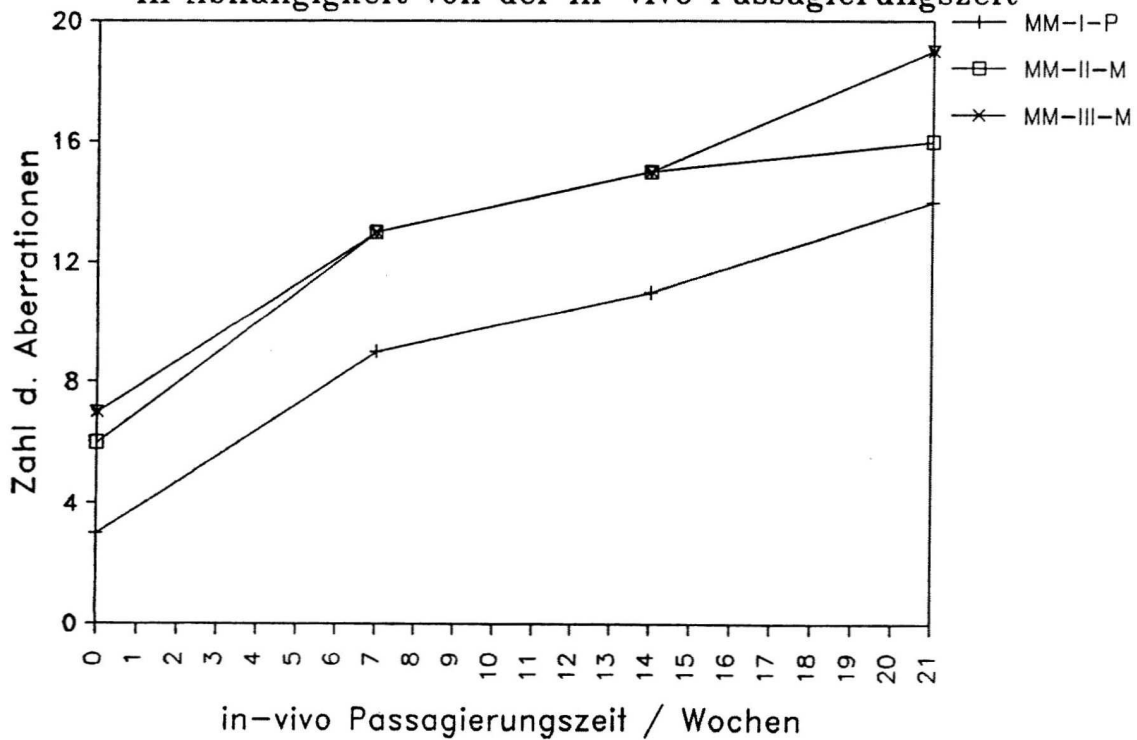
Chromosomenaberrationen

in Abhängigkeit von der in-vitro Kultivierungszeit



Chromosomenaberrationen

in Abhängigkeit von der in-vivo Passagierungszeit

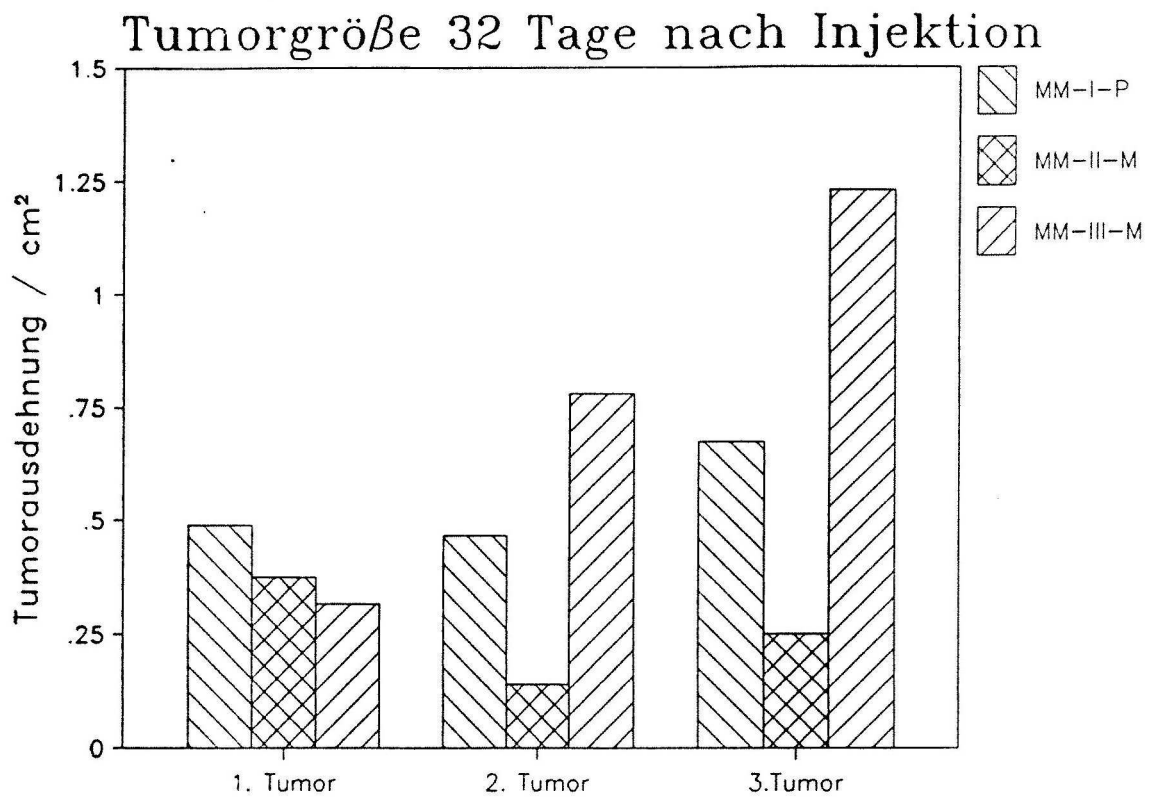


Die erste Graphik zeigt die Zahl der Chromosomenaberrationen in Abhängigkeit von der *in vitro*-Kultivierungszeit, die zweite bezieht sich auf die *in vitro*-Passagierungszeit. Beim Vergleich der beiden Graphiken ist darauf zu achten, daß die *in vitro*-Kultivierungszeit in Jahren, die *in vivo*-Passagierungszeit in Wochen angegeben ist.

Bei den Sekundäraberrationen nach Tierpassagierung fällt auf, daß, wie bei der Vorstellung der cytogenetischen Daten der verschiedenen Zell-Linien, Chromosom # 1 verstärkt in Mitleidenschaft gezogen ist. Eine Präferenz für den p- oder q-Arm ist nicht auszumachen. Dieses Chromosom muß somit als besonders anfällig für Bruchereignisse angesehen werden. Auch die Chromosomen # 6 und 7 sind an den Sekundäraberrationen beteiligt, die auch hier zur Unterrepräsentierung der jeweiligen q-Arme führen. Bei **MM-I-P** war zusätzlich noch eine stärkere Beteiligung von Chromosom # 3 festzustellen. Eine Präferenz für bestimmte Aberrationstypen war nicht auszumachen, so finden sich zwar überwiegend Deletionen bei den Sekundäraberrationen, aber viele andere Chromosomenveränderungen sind ebenfalls vertreten.

6. Das Tumorwachstum in Abhängigkeit von der Zahl der *in vivo* Passagierungen

Der Gewinn neuer Markerchromosomen führte nicht, wie man annehmen könnte, zwangsläufig zu einem verbesserten Tumorwachstum. Lediglich bei **MM-III-M** war ein steter Anstieg der Tumorwachstumsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der *in-vivo*-Passagenzahl festzustellen. Bei **MM-I-P** blieb sie in etwa für jeden Tumor gleich groß, bei **MM-II-M** wuchs der erste Tumor am schnellsten, der zweite etwa halb so schnell und beim dritten war wieder ein leichter Anstieg festzustellen. Ermittelt wurde das Tumorwachstum durch stetes Messen der Tumorgröße an der Maus. Das nachfolgende Blockdiagramm zeigt die jeweilige Tumorausdehnung für **MM-I-P**, **MM-II-M** und **MM-III-M** jeweils 32 Tage nach Injektion der gleichen Zellzahl in das Tier.



Die Latenzzeit zwischen der Injektion der Zellen und dem ersten meßbaren Auftreten von Tumoren ist erheblichen Schwankungen von Tier zu Tier, auch innerhalb eines Versuchs, unterworfen. Es war somit nicht möglich, eindeutige Änderungen der Latenzzeit, in Abhängigkeit von der Zahl der Passagierungen, zu erfassen.

7. Southern- und Northern-Blot-Analyse verschiedener Oncogene an Melanom-Zell-Linien

Da die Melanom-Zelllinien mehr oder weniger starke Aberrationen aufwiesen, sollte getestet werden, ob es durch veränderte Positionseffekte es zu erhöhter Expression einiger bekannter Proto-Oncogene kommt. Um eine möglichst empfindliche Aussage zu haben, wurden Northern-Blots gemacht, die unter wenig stringenten Bedingungen gewaschen wurden. Die Untersuchungen wurden an den am besten untersuchten Zelllinien **MM-I-P**, **MM-II-M**, **MM-II-M** und **MM-IV-M** durchgeführt.

Von Interesse war die Untersuchung der Oncogene *myc* und *mos*, die auf Chromosom # 8 liegen, da **MM-II-M** eine erhebliche Polysomie von Chromosom # 8 aufweist. Auch die Linien **MM-II-M** und **MM-V-M** besitzen Aberrationen mit Beteiligung von Chromosom # 8. Nanus et al (1987) konnten die Expression des H-ras Oncogens in einigen Melanomen und deren Vorläuferstadien nachweisen. Shin et al (1987) fanden eine erhöhte Expression von K-ras in einem Melanom, deshalb wurden auch diese beiden Oncogene in die eigenen Untersuchungen mit einbezogen. Darüber hinaus konnten auch noch die Oncogene *src* und *fos* auf eine mögliche Expression hin getestet werden.

Selbst unter diesen wenig stringenten Bedingungen war lediglich bei *myc* bei allen 4 Linien eine leichte Expression zu verzeichnen (Abb.44). Die Expression dieses zellulären *myc* Gens ist hier wenig aussagekräftig, da dieses Gen am Zellcyclusgeschehen beteiligt ist. Bei der molekularbiologischen Untersuchung gut proliferierender Zellen wird man immer eine leichte Expression des *myc*-Proto-Oncogens angezeigt bekommen.

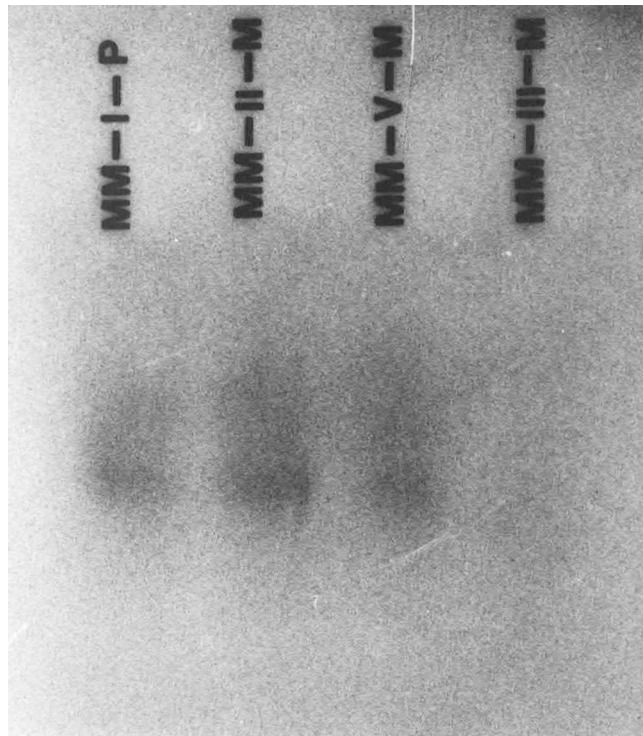


Abb. 44: Northern-Blot der Zell-Linien **MM-I-P**, **MM-II-M**, **MM-III-M** und **MM-V-M** für das cellüäre Proto-Oncogen *myc*. Der Blot zeigt eine leichte Expression für das getestete Oncogen.

Da die Zell-Linie **MM-II-M** eine Polysomie von Chromosom # 8 besitzt, sollte geschaut werden, ob diese auch auf der molekularbiologischen Ebene zu sehen ist. Aus diesem Grund wurde zusätzlich eine Southern-Blot-Analyse für das *myc*-Proto-Oncogen durchgeführt. Dieser Test fiel allerdings negativ aus, eine Überrepräsentierung des Proto-Oncogens *myc* war nicht auszumachen (Abb. 45). Interessanterweise weist der Blot auf einen Polymorphismus für das getestete Oncogen hin, der durch die unterschiedlichen Laufstrecken auf dem Blot angezeigt wird.

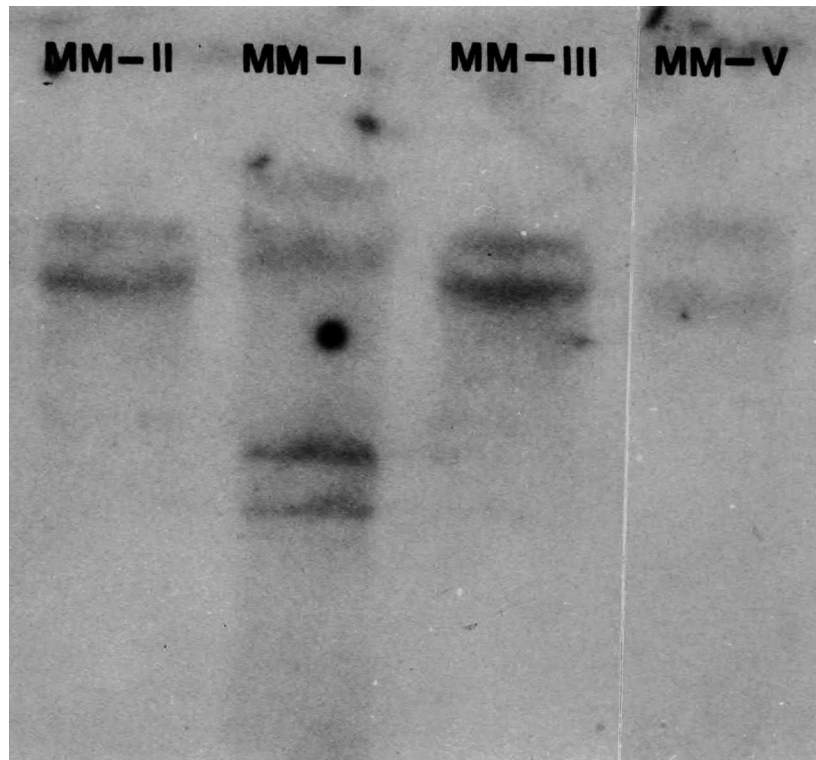


Abb. 45: Southern Blot der Zell-Linien **MM-I-P**, **MM-II-M**, **MM-III-M** und **MM-V-M** für das zelluläre Proto-Oncogen myc. Eine Überrepräsentierung des myc-Gens konnte in den einzelnen Zell-Linien nicht ausgemacht werden. Die Zellen zeigen einen Polymorphismus für das getestete Oncogen.

Die molekularbiologischen Untersuchungen konnten eine gestörte Genexpression als Folge bestimmter Chromosomenanomalien, zumindest der getesteten Oncogene, nicht belegen. Eine allumfassende Aussage ist hier natürlich nicht möglich, da wesentlich mehr Oncogene bekannt sind und die Analyse somit nur einen Stichprobencharakter hat. Eine Austestung weiterer bekannter Oncogene war aufgrund mangelnder Verfügbarkeit und aufgrund des erheblichen Arbeitsaufwandes im Untersuchungszeitraum nicht möglich.

V. Diskussion

Die vorliegende Arbeit sollte dazu beitragen, humane Melanom-Zell-Linien als Modellsysteme besser zu charakterisieren. Die Untersuchungen wurden an 14 verschiedenen Melanom-Kulturen durchgeführt, von denen sechs selbst etabliert wurden und acht aus anderen Labors stammten. Bei den selbstgewonnenen Kulturen handelte es sich in drei Fällen um Primärtumoren als Ausgangsmaterial, die drei anderen Kulturen waren metastatischen Ursprungs. Von einem Primärtumor und drei Metastasen war es möglich, permanente Zell-Linien zu entwickeln, in einem Fall allerdings erst nach einer Passage durch die Thymus-aplastische Nacktmaus.

Ein Schwerpunkt der Arbeiten war die cytogenetische Charakterisierung der Melanom-Kulturen. Die Untersuchungen zeigten, daß es, anders als bei den Leukämien, zwar keine tumortypischen Markerchromosomen gibt, wohl aber bestimmte Chromosomen verstärkt an der Formierung von Markerchromosomen beteiligt sind. Aus diesen strukturellen Aberrationen und der Verteilung augenscheinlich unveränderter Chromosomen, konnte eine, auf die meisten Zell-Linien zutreffende, Über- bzw. Unterrepräsentierung von Chromosomenmaterial abgeleitet werden.

Ein weiterer Punkt galt der Frage der genetischen Stabilität etablierter Melanom-Zell-Linien über lange Kultivierungszeiträume. Für diese Untersuchungen wurden die drei Zell-Linien herangezogen, die selbst und ohne vorherige Tierpassagierung etabliert wurden. Regelmäßige Karyotypierung, ausgehend vom frühest möglichen Zeitpunkt bis in hohe Passagen, ergaben, daß sich der Karyotyp und der Phänotyp der untersuchten Zell-Linien im jeweiligen Untersuchungszeitraum nicht wesentlich änderte. Hieraus konnte auf eine generell hohe Stabilität humaner Melanom-Zell-Linien in Zellkultur geschlossen werden.

Ausgehend von diesem vorbeschriebenen Befund, der hohen *in vitro*-Stabilität, war es interessant zu erforschen, wie sich der individuelle Karyotyp von Melanomzellen unter dem Einfluß eines, dem Patienten vergleichbaren *in vivo*-Systems verhält. Als *in vivo*-System diente die Thymus-lose Nacktmaus, die aufgrund ihres nur schwachen Immunsystems artfremde Zellen toleriert. Maligne humane Zellen können deshalb in der Nacktmaus zu Tumoren auswachsen. Zur Beantwortung der Frage der *in vivo*-Stabilität wurden drei eigene Melanom-Linien, die bereits cytogenetisch analysiert waren, subcutan in die Nacktmaus

injiziert, die resultierenden Tumoren rekultiviert und *in vitro* in früher und später Passage analysiert. Im Gegensatz zu den *in vitro*-Befunden zeigte sich bei den *in vivo*-Versuchen bei den Melanom-Zellen ein eher labiler Karyotyp. Nach jeder *in vivo*-Passage traten neue Subpopulationen auf, die durch neue Markerchromosomen gekennzeichnet waren. Eine Änderung des Phänotyps der Zellen *in vitro* war bei diesen abgeleiteten Kulturen, im Vergleich zur Ausgangszell-Linie nicht festzustellen. Ein verbessertes Wachstumsverhalten der Melanomzellen im Tier, in Abhängigkeit von der Zahl der *in vivo*-Passagen, war nicht zu verzeichnen.

Molekularbiologische Untersuchungen an den Melanom-Linien sollten schließlich klären, ob diese bestimmte Oncogene fehlexprimieren und ob diese Fehlexpression dann mit bestimmten Chromosomenanomalien zu korrelieren ist. Northern-Blot-Analyse einiger Oncogene an den vier selbstetablierten Zell-Linien zeigten keine erhöhte Expression für die getesteten Oncogene. Amplifikationen, wie sie im Southern-Blot sichtbar werden, konnten nicht nachgewiesen werden.

1. Anzüchtung und phänotypische Charakterisierung humaner Melanome

Die Kultivierung humaner Melanome und der Erhalt von Reinkulturen ist derzeit noch relativ schwierig, insbesondere wenn es sich um Primärtumoren als Ausgangsmaterial handelt. Dies wird durch die Tatsache belegt, daß es auf der Welt nur wenige Zell-Linien gibt, die direkt aus primären Melanomen etabliert wurden. Die meisten verfügbaren Linien stammen aus Metastasen und sind dabei noch in der Mehrzahl über einen Transplantattumor aus der Nacktmaus gewonnen worden. Die Gründe hierfür sind vielfältig, wobei sowohl methodische und systemimmanente als auch biologische gleichermaßen eine Rolle spielen:

Aufgrund guter diagnostischer Möglichkeiten und steigender Sensibilisierung der Bevölkerung werden viele Melanome glücklicherweise früh erkannt und operiert (Tilgen W., 1987). In diesem Stadium besitzen die Tumoren oft nur die Größe eines Reiskorns und werden deshalb vollständig zur histologischen Begutachtung der Pathologie zugeführt. Weiterhin, und dies gilt für Primärtumoren und Metastasen gleichermaßen, ist die Kommunikation zwischen Klinik und wissenschaftlichem Labor aufgrund räumlicher Trennung oft nicht ausreichend, so daß Tumormaterial, wenn verfügbar, oft erst verspätet der Aufarbeitung zugeführt wird.

Primärtumoren liegen fest im Gewebeverband aus Keratinocyten und Stromazellen und lassen sich nur durch mehrstündige enzymatische Behandlung aus diesen herauslösen, was die Vitalität der Zellen beeinträchtigt. Selbst bei sauberer Präparation der Tumoren wird man immer ein Zellgemisch aus Tumorzellen, Stromazellen und Keratinocyten erhalten (Herlyn M. et al, 1987). Lassen sich die Keratinocyten noch durch differenzielle Trypsinierung, d.h. unter Ausnutzung der unterschiedlichen Sensitivität gegenüber Trypsin, relativ leicht aus der Kultur eliminieren, ist eine Trennung von Melanom- und Stromazellen enzymatisch nahezu unmöglich. Frühe Kulturen werden schnell von Fibroblasten überwachsen und so die Melanomzellen aus der Kultur verdrängt. Generell zeigen die meisten Melanomzellen anfangs große Adaptationsschwierigkeiten an die *in vitro*-Bedingungen, manche sind unter diesen Bedingungen gar nicht zum Wachstum befähigt. So konnte in einem Fall ein Tumor im Tier propagiert werden, wogegen sich die Zellen weder aus dem Patientenmaterial, noch aus dem Tiertumor an die Kulturbedingungen adaptieren ließen, weshalb eine *in vitro*-Kultivierung in diesem Fall nicht möglich war. Im Bearbeitungszeitraum standen fünf Primärtumoren humaner Melanome für die Anzucht zur Verfügung. Aus drei Tumoren konnten Primärkulturen gewonnen werden, von denen eine in eine permanente Zell-Linie überführbar war. Hieraus muß geschlossen werden, daß die derzeitigen Kulturbedingungen, insbesondere wohl die Kulturmedien, zur Zeit noch alles andere als adäquat sind, um Zellen aus Primärtumoren am Leben zu erhalten und zur Proliferation zu bringen.

Für die Anzüchtung von Melanomen aus Metastasen, insbesondere Lymphknotenmetastasen, ist die Situation zwar insgesamt günstiger. Das mag zum Teil an der erleichterten Präparation des wesentlich weicheren Materials liegen, jedoch sind die Schwierigkeiten bezüglich des "agressiven" Wachstumsverhaltens der Stromazellen ähnlich. So konnten von mir im Untersuchungszeitraum aus 13 erhaltenen Lymphknotenmetastasen zwei permanente Zelllinien direkt und eine weitere über die Mauspassagierung etabliert werden. Diese zum Teil frustrierende Situation bezüglich der Kultivierung von Melanomen ließ Autoren darüber spekulieren, ob es sich bei "überwachsenen" frühen Kulturen nicht um Stromazellen, sondern um dedifferenzierte Melanomzellen mit normalem Karyotyp handelt (Aubert C. et al, 1984). Die im Ergebnisteil gezeigte und auch von Tilgen et al (1985) beschriebene große Ähnlichkeit von Melanomzellen mit Stromazellen in Kultur macht ein Erkennen kontaminierter Kulturen oft erst spät möglich. Delcroix et al (1986) konnten durch Versuche mit Melanom- und Fibroblasten-assoziierten Antikörpern zeigen, daß es sich in "überwachsenen" Kulturen wirklich um Stromazellen handelt. Während die Melanomkulturen

kurz nach dem Anwachsen eine hohe Zahl von Zellen mit Bindungskapazität für Melanom-assoziierte Antikörper aufwiesen, nahm diese Zahl in späteren Kulturen deutlich ab, bis sie schließlich nicht mehr nachweisbar war. Stattdessen nahm die Population von Zellen zu, die einen Fibroblasten-assoziierten Antikörper binden konnten, weshalb es sich hier um Stromazellen handeln muß.

Wie im Ergebnisteil beschrieben, weisen die Melanomzellen in Kultur verschiedene Phänotypen auf. Es finden sich alle Übergänge einer "epitheloiden" bis "bipolaren" Erscheinungsform der Zellen, die für jeden Tumor bzw. abgeleitete Zell-Kultur charakteristisch und stabil ist. Eine Korrelation zwischen Phänotyp und Kultivierbarkeit der entsprechenden Tumore war nicht auszumachen.

Die eigenen Versuche zur Eliminierung von Stromazellen, bzw. zur selektiven Begünstigung der Melanomzellen in ihrem Wachstumsverhalten durch entsprechende Kulturbedingungen schlugen fehl. Es gibt somit bis heute noch kein adäquates und zuverlässiges Verfahren für die Kultivierung von Melanomzellen, weshalb auf diesem Gebiet noch umfangreiche Untersuchungen von Nöten sind. Diese Untersuchungen müßten sich mit den Stoffwechsel von Melanom- und Stromazellen beschäftigen, um hieraus Melanom-spezifische Kulturbedingungen zu etablieren. Gerade für die Austestung Melanom-assoziiertes Antikörper ist es wichtig, in nächster Zeit eine große Zahl von Melanom-Zell-Linien aus verschiedenen Tumorstadien zu erhalten, um weitere Fortschritte in der Melanomdiagnostik und -therapie zu erzielen.

2. Cytogenetik humaner Melanom-Zell-Linien

Erste cytogenetische Untersuchungen an soliden Tumoren wurden meist an Direktpräparaten von Patientenmaterial durchgeführt. Die oft geringe Quantität und Qualität der Metaphasenplatten und der hohe Anteil an Stromazellen mit normalem Karyotyp führten zu der Schlußfolgerung, daß es solide Tumoren mit normalem Karyotyp gibt. Chromosomenaberrationen wären somit als sekundäre, nichtkausale Ereignisse bei der Tumorentstehung einzustufen und hätten nur geringe Relevanz für das Transformationsgeschehen. Verbesserte Präparations- und Bänderungstechniken konnten jedoch zeigen, daß bei jedem Tumor, wenn zum Teil auch nur geringe, Veränderungen am Chromosomensatz vorliegen. Trotzdem hält sich noch heute in einem kleinen Kreis von Krebsforschern das Dogma, daß Chromosomenaberrationen bei soliden Tumoren als sekundär einzustufen sind. Erst jüngst erschien hierzu eine Studie von Richmond et al (1986). Die Autoren konnten nachweisen, daß der Weg vom benignen Nevus zum malignen Melanom neben der Ausbildung histologischer Charakteristika von einer steigenden Produktion von Mitogenen durch die Melanomzellen begleitet wird. Primärkulturen von Melanomvorläuferläsionen (dysplastische Nevi) und Melanomen, die eine hohe Mitogenproduktion aufwiesen, zeigten einen normalen Karyotyp. Für die cytogenetische Analyse wurden aber jeweils nur zwei gebänderte Karyogramme herangezogen. Die eigenen Untersuchungen an Explantat- und frühen Unterkulturen zeigten, daß von jeweils 30 analysierten Metaphasen nur etwa zwei einen aberranten Karyotyp besaßen. Da diese aber alle Charakteristika der späteren Passagen aufwiesen, dürfte es sich hier um die originäre Tumorzellpopulation gehandelt haben. Die Metaphasen mit normalem Karyotyp dürften somit von Stromazellen stammen. Diese Ergebnisse und die Problematik der Identifizierung von Melanomzellen und begleitenden Stromazellen in frühen Kulturen, lassen vermuten, daß die Aussage in der Studie von Richmond et al, sowohl durch die geringe Zahl ausgewerteter Metaphasen, als auch aufgrund der überwiegend gemischten Populationen in Primärkulturen, keine allgemeine Bedeutung hat. Es ist vielmehr anzunehmen, daß es sich bei den analysierten Zellen nicht um Tumorzellen, sondern um begleitende Stromazellen handelte.

Das Vorkommen tumortypischer Aberrationen bei Leukämien, wie etwa das "Philadelphia-Chromosom" bei der chronischen myeloischen Leukämie (Rowley J.D., 1983) oder die Translokation (8;14) beim Burkitt Lymphom (Zech L. et al, 1976) führten dazu, daß auch solide Tumore verstärkt auf ihre cytogenetischen Charakteristika hin untersucht wurden (siehe

hierzu in der Einleitung: Cytogenetik solider Tumore). Ein bei den Leukämien wahrscheinlich gemachter Mechanismus der Transformation durch Oncogen-Expression als Folge einer Transposition eines Oncogens in die Nähe der differenzierungsbedingt aktiven Immunglobulingene, ließ die Autoren verschiedener Studien ihr Hauptaugenmerk auf die strukturellen Aberrationen des Chromosomensatzes lenken.

Einig sind sich die überwiegende Zahl der Autoren (z.B. Bertrand S. et al, 1985; Richmond A. et al, 1986; Ohyashiki J.H. et al, 1986; Becher R. et al, 1983) darin, daß Veränderungen der Chromosomen # 1, 6 und 7 gehäuft bei malignen Melanomen zu finden sind. Ebenso herrscht Einigkeit darüber, daß Aberrationen an Chromosom # 1, und hier insbesondere die zentromerische Region und die Region q21, für die Tumorentstehung allgemein von Wichtigkeit sind (Kovacs G., 1978). Da Aberrationen von Chromosom # 6 bei anderen Neoplasien eher selten beschrieben, die Inzidenz beim malignen Melanom aber sehr hoch ist, wurde den Veränderungen an diesem Chromosom beim Melanom besondere Bedeutung beigemessen. Zur Frage, ob dies primäre oder sekundäre Veränderungen sind, konnten die Untersuchungen in der Regel keine Aussage machen, weil sie an späten Tumorstadien erfolgten und nur zum Teil an Primärtumoren.

Für eine detaillierte Erfassung der cytogenetischen Verhältnisse im Tumor ist eine möglichst frühe Untersuchung nach Erhalt des Tumormaterials aus der Klinik zu fordern. Direktpräparationen weisen jedoch große methodische Schwierigkeiten auf, da zum einen die Zahl der Metaphasen unzureichend ist und zum anderen die Qualität von Spreitung und Bänderung in der Regel nicht ausreicht zur detaillierten Analyse. Dieser Umstand wird von Ohyashiki et al (1986) bestätigt und auch für die Direktpräparation von Knochenmarkszellen beschrieben (Trent J.M. et al, 1984). Zudem lassen die oft geringen Mengen an Tumormaterial, die für die Bearbeitung zur Verfügung stehen, nur die Wahl zwischen Direktpräparation oder Anzucht. Aus diesem Grund wurde später dazu übergegangen, auf Direktpräparationen ganz zu verzichten und versucht, die Tumoren anzuzüchten. Bei erfolgreicher Anzucht wurden die ersten Untersuchungen an der Explantatkultur oder frühen Unterkultur vorgenommen und aus den Ergebnissen Rückschlüsse auf die chromosomale Situation im Tumor gezogen. Dieses Vorgehen ist jedoch nur mit Einschränkung vertretbar, da die Verhältnisse in der Zellkultur nicht die Zusammensetzung der Zellpopulationen im Tumor widerspiegeln müssen. Zum einen könnten Tumor-Subpopulationen aufgrund von Anpassungsschwierigkeiten an die *in vitro*-Situation von anderen Populationen überwachsen werden und sich so der Analyse entziehen. Zum anderen könnten präparations- und kulturbedingt neue Veränderungen auftreten (Kaneko Y. et al, 1975), die in keinem

Zusammenhang zur Tumorgenese stehen. Dieser Unsicherheitsfaktor muß bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden. Wenn diese Probleme auch von Herlyn et al (1987) als gering eingeschätzt werden, könnten sie jedoch eine erhebliche Rolle spielen, solange nicht eindeutig bewiesen ist, daß die Tumorzellpopulationen *in vitro* der Situation *in vivo* entsprechen.

Die hier wiedergegebenen Befunde aus der Analyse der 14 Melanom-Kulturen bestätigen im Wesentlichen die Angaben aus früheren Publikationen, nämlich, daß keine vorherrschende, allen gemeinsame Melanom-spezifische Chromosomenaberration gefunden werden kann. Wohl aber sind die Chromosomen # 1, 6 und 7 gehäuft an Chromosomenaberrationen beteiligt. Bei den strukturellen Aberrationen stehen die Deletionen, Translokationen und Isochromosomen im Vordergrund, die anderen möglichen Chromosomenveränderungen, wie Inversionen oder Duplikationen kommen eher sporadisch vor. Gerade bei den Zell-Linien, die aus anderen Labors erhalten wurden, kommt oft nur ein kleiner Teil der Markerchromosomen in 100% der analysierten Metaphasen vor. Die Präsenz anderer Markerchromosomen in unterschiedlichen Mengen deutet auf das Vorhandensein verschiedener Subpopulationen hin, die sich zum Teil überlappen oder ausschließen. Die Markerchromosomen, die in allen Populationen gemeinsam vorkommen, dürften somit die ursprünglichsten Veränderungen darstellen.

Bei der Darstellung der Ergebnisse wurde zusammenfassend davon ausgegangen, daß ein gemeinsamer chromosomaler Mechanismus für die Entstehung des malignen Melanoms vorliegt. Die zum Teil breite Variation struktureller Veränderungen deutet aber eher auf das Vorhandensein verschiedener Mechanismen hin, die das gleiche Ergebnis, die Formierung eines Tumors, zur Folge haben. Möglicherweise gibt es geographische Unterschiede im Zusammenhang von Auslösemechanismus und Tumorentstehung, die auf unterschiedlicher Mutagenexposition oder ethnischer Gegebenheiten beruhen könnten. Die nur geringe Zahl verfügbarer Daten aus der Literatur und den eigenen Untersuchungen läßt aber noch keine generalisierende Schlußfolgerung zu.

Für die Entstehung dieser Veränderungen, die sich im Wesentlichen aus Bruchereignissen an den Chromosomen ableiten, werden unter anderem häufig die sogenannten "fragile sites" verantwortlich gemacht. "Fragile sites" sind definierte Punkte auf den Chromosomen, an denen sich, z.B. durch Wachstum der Zellen in verschiedenen Streßmedien, insbesondere solchen mit Einfluß auf den Thymidin-Stoffwechsel, lokale Dekondensierungen induzieren lassen. Nimmt man an Zellen, die in einem solchen Medium gewachsen sind, eine

Chromosomenpräparation vor, so können sich nach Färbung der Chromosomen an den "fragile sites" ungefärbte Bereiche zeigen. Für die Entstehung der "fragile sites" werden Störungen im Thymidineinbau während der Replikation der DNA verantwortlich gemacht (Sutherland G. and Hecht F., 1985). Das wohl bekannteste "fragile site" ist das "fragile X", das auf dem X-Chromosom liegt und mit mentaler Retardierung korreliert. Zur Zeit sind etwa 18 "rare fragile sites" (r-fra) und 72 "common fragile sites" (c-fra) bekannt. Yunis et al (1984) machten neben der direkten Wirkung von Carcinogenen, Störungen des Thymidin-Einbaus für die Ausbildung chromosomaler Aberrationen bei Neoplasien verantwortlich. Miro et al (1987) machten die Einschränkung, daß die meisten Chromosomenbruchpunkte, die mit Neoplasien korrelieren, zumindest in der Nähe von "fragile sites" lägen. War Frederick Hecht noch 1986 vom Einfluß der "fragile sites" auf die Entstehung von Krebsbruchpunkten überzeugt (persönliche Mitteilung), schränkt er diesen jetzt rein auf die Distamycin-A-induzierbaren "fragile sites" ein (Hecht F., 1988). In den eigenen Untersuchungen fanden sich die gefundenen Bruchpunkte nur eher zufällig in Deckung mit den bekannten "fragile sites", ließen aber keinesfalls eine Häufung oder Präferenz erkennen.

Der Einfluß dieser vielleicht typischen Aberrationen auf die Melanomzellen ist zur Zeit noch nicht definitiv bekannt, weshalb die meisten Autoren auch keine Spekulationen darüber anstellen und es bei der Beschreibung der Befunde bewenden lassen. Kausale Zusammenhänge zwischen Chromosomenaberrationen und maligner Transformation von Melanocyten sehen Pedersen et al (1986) und Parmiter et al (1988) in einer möglicherweise gestörten Oncogenexpression. Becher et al (1983) diskutieren eine Störung der Histokompatibilitätsantigene, die auf Chromosom # 6 liegen, wodurch sich die Melanomzellen einer Zerstörung durch das Immunsystem entziehen. Balaban et al (1986) nehmen eine Überexpression des Rezeptors für den "epidermal growth factor" (EGFR), dessen Gen auf dem Chromosomenarm 7p lokalisiert ist, als möglichen Transformationsmechanismus an, da Chromosom # 7 bei Melanomen häufig überrepräsentiert ist. Keine dieser Hypothesen ist aber bis jetzt nachgewiesen.

Bedingt durch die cytogenetischen Befunde bei den Leukämien, lenkten die meisten Autoren früherer Publikationen ihr Hauptaugenmerk auf die strukturellen Veränderungen des Chromosomensatzes. Numerische Veränderungen blieben im Allgemeinen wenig berücksichtigt. Die neuerliche Diskussion um die mögliche Beteiligung von Supressorgen am Transformationsgeschehen normaler Zellen hin zu malignen Tumorzellen, erfordert es, nunmehr auch den numerischen Veränderungen, insbesondere den Unterrepräsentierungen von genomischen Material, erhöhte Aufmerksamkeit zu schenken.

Peehl und Stanbridge konnten 1982 zeigen, daß **HeLa**-Zellen, die normalerweise tumorigen in der Nacktmaus sind, nach Fusion mit normalen Fibroblasten zwar noch immortal waren, ihre Tumorigenität jedoch verloren hatten. Selbst tumorigene Zell-Linien, die das ras-Oncogen hyperexprimierten, verloren nach Fusion mit normalen Fibroblasten ihre Tumorigenität, aber ohne Verlust der Oncogenexpression und -translation (Geiser A.G. et al, 1986). Weiter konnte gezeigt werden, daß diese Zellhybride, wenn sie im Kulturverlauf ein Chromosom # 11 oder Teile des p-Armes von Chromosom # 11 verloren, ihren tumorigenen Status wiedererlangten. Um die Herkunft des verlorengegangenen Chromosom # 11 aufzudecken, wurde ein "DNA-fingerprinting" an **HeLa**-Zellen, Fibroblasten und den Zellhybriden durchgeführt. Diese Untersuchungen erbrachten den Nachweis, daß es sich bei dem verlorengegangenen Chromosom stets um ein Chromosom # 11 handelte, welches die Fibroblastenzelle mit eingebracht hatte, d.h. Kontrollgene des normalen Karyotyps verloren gingen (Srivatsan E.S. et al, 1986). Es kann somit davon ausgegangen werden, daß eine mögliche Oncogenexpression alleine nicht kausal für das Transformationsgeschehen ist, weshalb dem Verlust von Kontrollgenen oder Supressorgen eine erhöhte Aufmerksamkeit geschenkt werden muß.

Gemeinsames Merkmal vieler Melanom-Zell-Linien ist eine Überrepräsentierung von Chromosomenarm 6p bei gleichzeitiger Unterrepräsentierung von 6q, die in den eigenen Untersuchungen in 10 von 14 Kulturen festzustellen war. Man könnte hiernach annehmen, daß der Verlust von Kontrollgenen auf 6q zur Entwicklung eines malignen Melanoms führt. Nun weisen aber "nur" 80,8% aller Melanome eine sichtbare Veränderung an Chromosom # 6 auf (Pathak S. et al, 1983), d.h. für die anderen 19,2% muß ein anderer Mechanismus gefordert werden, es sei denn, die Veränderungen sind im Karyogramm nicht sichtbar.

Bei der Linie **MM-II-M** könnten Gene auf Chromosom # 8 eine Rolle spielen. Die Linie **MM-II-M** besitzt bis zu 10 Kopien von Chromosom # 8 pro nahe triploider Zelle; würde diese Polysomie keine Rolle spielen, so hätte sich die Zell-Linie mit Sicherheit solchen "genetischen Ballastes" entledigt. Eine Trisomie 8 wurde auch von Richmond et al (1986) als alleinige Veränderung in einem benignen Nevus beschrieben. Brioux de Salum et al (1984) fanden eine Trisomie 8 in einem primären nodulären Melanom, eine Trisomie 8q wurde von Rey (1985) in der Hirnmetastase eines malignen Melanoms gefunden. Howard Baden (1987) konnte eine spontan transformierte Keratinocytenlinie etablieren, die als einzige Veränderung bis in hohe Passagen eine Trisomie 8 aufweist. Auch bei Leukämien treten häufig Polysomien

von Chromosom # 8 auf. Demnach könnte diesem Chromosom für die Krebsentstehung allgemein eine Bedeutung zukommen.

Eine abschließende Bewertung der strukturellen und numerischen Veränderungen des Chromosomensatzes bei Neoplasien kann erst gemacht werden, wenn detaillierte Genkartierungen des menschlichen Genoms vorliegen, oder Genprodukte nachgewiesen werden, deren Über- bzw. Unterproduktion eindeutig mit der malignen Transformation von Zellen korreliert.

3. Genetische Stabilität im Kulturverlauf

Es ist bekannt, daß solide Tumoren, einschließlich des malignen Melanoms, heterogene Populationen darstellen, die sich *in situ* weiter verändern (z.B. Fidler I.J. et al, 1982; Nowell P.C., 1976, 1986). Diese Heterogenität führt zur Ausbildung unterschiedlicher Phänotypen der Zellen eines Tumors. Auch das unterschiedliche Ansprechen auf Cytostatika und Immuntherapeutika dürfte auf diese Heterogenität zurückzuführen sein (Ochi H. et al, 1984). Vergleichende Untersuchungen an Primärtumoren und Metastasen eines Patienten zeigten, daß sich diese, angezeigt durch verschiedene Markerchromosomen, voneinander unterscheiden. So könnten zusätzliche Veränderungen den Zellen zu einem besseren Adaptationsvermögen an die geänderte Umgebung in einer Metastase verhelfen (Nicolson G.L., 1987). Diese Subpopulationen sind klonalen Ursprungs, was durch das Vorhandensein gemeinsamer Markerchromosomen belegt wird. Es wird somit deutlich, daß das Ausbilden chromosomaler Aberrationen kein einmaliges Ereignis bei der Tumorentstehung darstellt, welches konserviert bleibt. Vielmehr behalten neoplastische Zellen ihre "Mutationsbereitschaft" im Laufe der Tumorgenese bei (Nicolson G.L., 1987).

Wie schon erwähnt, ist es sehr schwierig aus Tumormaterial direkte Chromosomenpräparationen, die qualitativ verwertbar sind, zu fertigen. Aus diesem Grund liegen die eigenen cytogenetischen Daten, wie die anderer Autoren, oft erst aus der Explantatkultur vor. Diese Problematik, sowie die Heterogenität und Instabilität der Tumorzellpopulationen, machten es erforderlich, den Einfluß des Kultursystems auf die Tumorzellen zu verfolgen.

Die eigenen Untersuchungen zur Beantwortung der Frage der Stabilität von Melanom-Zell-Linien *in vitro* wurden an den drei Zell-Linien **MM-I-P**, **MM-II-M** und **MM-V-M** durchgeführt. Die Linie **MM-I-P** blieb über 66 untersuchte Passagen, was einem Kultivierungszeitraum von etwa zwei Jahren entspricht, cytogenetisch völlig unverändert. Die Linie **MM-II-M** bildete innerhalb von 85 Passagen und einem Zeitraum von ca. 3 1/2 Jahren 3 neue Markerchromosomen aus, wogegen zwei vorher existente Markerchromosomen verloren gingen. Bei **MM-V-M** trat nach fünf *in vitro*-Passagen aus drei unterschiedlichen zu beobachtenden Zellpopulationen eine in den Vordergrund. Bis zur 50. Passage (ca. 1 1/2 Jahre) entstand lediglich ein neues Markerchromosom. Diese Befunde belegen eine hohe *in vitro*-Stabilität von Melanom-Zell-Linien, die auch von Ohyashiki et al (1986) und Herlyn et al (1987) bestätigt wird. Die Autoren verfolgten mehrere Melanom-Kulturen, jedoch nur über einige Wochen *in vitro*. In diesem Zeitraum blieben die Kulturen gänzlich unverändert.

Längerfristige Untersuchungen wurden von Kunzmann und Hölzel (1987) an einer Ovarial-Karzinom-Zell-Linie durchgeführt. Diese zeigte sich über 179 *in vitro*-Passagen cytogenetisch absolut stabil. Kirchner et al (1981) hielten eine Myelom-Zell-Linie in Langzeitkultur. Erst nach zwei Jahren zeigte sich eine erste kulturbedingte Veränderung, der Verlust eines Markerchromosoms. Die Änderung des Karyotyps führte dazu, daß die vorher nicht tumorigene Zell-Linie Tumore in der Nacktmaus ausbilden konnte.

Diese Befunde unterscheiden sich von denen an epithelialen Zell-Linien aus Plattenepithel-Karzinomen, die eine Polyploidisierung und starke Variabilität des Karyotyps im Laufe der Kultivierung aufweisen (Tilgen W. et al, 1983). Ähnlich verhielt sich auch eine spontan entstandene Keratinocyten-Zell-Linie, die recht früh polyploidisierte und Subpopulationen bildete (Boukamp P. et al, 1988).

Durch die hohe Stabilität der Melanom-Zell-Linien bietet die Zellkultur hier ein gutes Modellsystem für das Studium maligner Melanome, wenngleich eine Erfassung aller im Tumor vorherrschenden genetischen Varianten sicher nicht möglich ist. Die Zellkultur wird immer nur wenige präexistente Tumorzellpopulationen repräsentieren, die aber dafür weitgehend dem *in vivo*-Genotyp entsprechen dürften, sofern nicht präparationsbedingt durch die Aufarbeitung des Tumormaterials, zusätzliche Veränderungen auftreten. Weiterhin dürften Zell-Linien höherer Passagen, zumindest teilweise, noch den ursprünglichen Karyotyp besitzen und sind somit für vergleichende Untersuchungen durchaus heranziehbar. Die *in vitro*-Stabilität von Melanomkulturen ist nicht auf Zell-Linien aus anderen Tumoren übertragbar, sondern ist vielmehr für jedes Ursprungsgewebe neu zu belegen.

4. Genetische Stabilität im *in vivo*-System

Bei der seriellen *in vivo*-Propagierung der Melanom-Zell-Linien galt es zu zeigen, ob diese ihre *in vitro* so große Stabilität beibehalten, oder ob sich wieder eine Situation, vergleichbar der im Patienten, einstellen wird.

Die Versuche zeigten, daß die stabilen *in vitro*-Kulturen im *in vivo*-System weniger stabil waren und schon nach einmaliger Passage durch die Nacktmaus zusätzliche Markerchromosomen aufwiesen, die bei Wiederholung des Vorgangs zunahmten. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Kunzmann und Hölzel (1987) beschrieben, die eine stabile Ovarial-Karzinom-Linie in die Nacktmaus einbrachten und nach Rekultivierung drei neue Markerchromosomen fanden, wogegen drei vorher vorhandene Markerchromosomen verloren gingen. Die Autoren führen dies auf reine Selektionsmechanismen zurück, die vorher nicht erkannte, präexistente Populationen im Tier begünstigen. Auch in der Studie von Kirchner et al (1981) zeigte die *in vitro* recht stabile Myelom-Zell-Linie nach *in vivo*-Passagierung neue Veränderungen des Karyotyps. Fonatsch et al (1981) fanden in einigen Lymphom-Zell-Linien zusätzliche Markerchromosomen nach Heterotransplantation, das Auftreten neuer Veränderungen korrelierte zum Teil mit einem Anstieg der SCE-Rate. Um reine Selektionsmechanismen ausschließen zu können, wäre es erforderlich gewesen, die *in vivo*-Versuche nicht mit Massenpopulationen, sondern an klonierten Kulturen durchzuführen. In unseren Versuchen ließen sich die Melanome jedoch nicht klonieren, aber zumindest **MM-II-M** kann als reine Population angesehen werden, da diese Zell-Linie bereits in früher Zeit ein zusätzliches Markerchromosom erwarb (M6), welches eindeutig mit verbessertem Wachstumsverhalten korreliert war und sich in der 5. Passage bereits in 100% der analysierten Metaphasen vorfand. Handelte es sich beim Auftreten neuer Markerchromosomen im *in vivo*-System um reine Selektionsmechanismen, die kleine, vorher schon vorhandene Populationen selektiv im Tier begünstigen, so sollten diese Populationen nach Rekultivierung ihren Anteil an der Gesamtpopulation wieder reduzieren. Dies war jedoch meistens nicht der Fall, sondern die neu aufgetretenen Markerchromosomen blieben während der weiteren *in vitro*-Propagierung zum Teil stabil oder konnten ihren Anteil an der Gesamtpopulation sogar noch erhöhen. Auch in der Studie von Kunzmann und Hölzel blieben diese neuen Markerchromosomen in nachfolgender *in vitro*-Kultur stabil. Es muß sich hier also um neu erworbene Chromosomenmutationen handeln.

Bei dem Auftreten weiterer neuer Markerchromosomen in späteren *in vitro*-Passagen bei den rekultivierten Tumoren dürfte es sich, aufgrund der bereits festgestellten hohen *in vitro*

Stabilität von Melanom-Kulturen, um die Selektion bereits existenter kleiner Populationen aus dem Tiertumor handeln.

Die Frage, die zur Zeit noch nicht abschließend beantwortet werden kann, ist, ob im *in vivo*-System der Mutationsdruck höher ist als in der Zellkultur, oder ob im *in vitro*-System der Rahmen mit dem Leben vereinbarere Mutationen enger ist als im *in vivo*-System. Fonatsch et al (1980) konnten bei Lymphom-Zell-Linien zeigen, daß die SCE-Rate mit der Anzahl der Chromosomenaberrationen einer Zelle positiv korreliert. Die Schwester-Chromatid-Austauschrate der von mir kultivierten Melanomzellen liegt jedoch im Kontrollrahmen. Dies spräche eher für eine hohe Stabilität *in vitro*. Über den Auslösemechanismus dieser Mutationen *in vivo* kann man zur Zeit noch keine gesicherten Aussagen machen.

Bei der Betrachtung dieser neu erworbenen Veränderungen fällt auf, daß es sich überwiegend um Deletionen handelt, die aus Brüchen innerhalb eines Chromosomenarmes und nicht in Zentromernähe resultieren. Interessanterweise sind wiederum die, bei Melanomen häufiger betroffenen Chromosomen # 1, 6 und 7 verstärkt in Mitleidenschaft gezogen. Auffällig ist ebenfalls, daß sich die Veränderungen, die im Maustumor entstehen, strukturell ähneln. So besitzt **MM-II-M** bereits im Originaltumor eine Deletion des q-Armes von Chromosom # 10. Die gleiche Veränderung wird von **MM-I-P** und **MM-III-M** im Maustumor erworben. **MM-III-M** bildet eine Duplikation im p-Arm von Chromosom # 2 aus, welche von **MM-II-M** *in vitro* erworben wurde. Zeigte **MM-III-M** ausnahmsweise keine Aberration an Chromosom # 6 in der Zell-Kultur, so findet sie sich im Maustumor in Form eines Isochromosoms des p-Armes. Diese Befunde sprechen dafür, daß es für das maligne Melanom definierte Schwachstellen auf den Chromosomen gibt, die häufiger betroffen sind und somit möglicherweise Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten der Zellen unter den jeweiligen Bedingungen haben. Die große *in vivo*-Heterogenität könnte eine Erklärungsmöglichkeit für die frühe Metastasierung maligner Melanome bieten, wenngleich eine Metastasierung in der Nacktmaus nicht zu beobachten war. Dies dürfte an den heterologen Bedingungen im Tier liegen.

5. Auswirkung der Passagierung und der Chromosomenveränderungen auf die Tumorprogression

Bei der Bearbeitung der Frage der Bedeutung der beobachteten Chromosomenveränderungen während der *in vivo*-Passagierung in Bezug auf das Malignitätsverhalten der Zellen ließ sich keine eindeutige Korrelation erkennen. Dies betraf sowohl die Tumorigenität, als auch die fehlende Progression zum metastatischen Phänotyp.

Ein eindeutig verbessertes Wachstumsverhalten der Tumore in Abhängigkeit von der Zahl der Tierpassagen konnte nur bei **MM-III-M** nachgewiesen werden. Nun birgt die rein visuelle Erfassung eines solchen Phänomens erhebliche Fehler. Es kann nur der oberflächlich sichtbare Teil des Tumors gemessen werden, das Tiefenwachstum geht in die Messung der Tumorgöße nicht voll ein. Weiter könnte es zu einem veränderten Verhältnis von absterbenden zu vitalen, proliferierenden Zellen kommen. Dies ließ sich jedoch nur durch Stoffwechseluntersuchungen bestimmen, die den Rahmen dieser Studie gesprengt hätten. Dias-Wickramanayake et al (1985) konnten zeigen, daß sich im Laufe des Tumorwachstums maligner Melanome in der Nacktmaus die Zellzykluszeiten stetig verlängern, was später zum Erreichen eines Plateaus führt, in dem sich Zelltod und Zellteilung die Waage halten. Es könnte sein, daß durch die serielle Injektion die Zellen potentiell einen Wachstumsvorteil erlangen, der durch den Erwerb von Sekundäraberrationen angezeigt wird, daß dieser sich aber aufgrund des vorzeitigen Erreichens der Plateauphase nicht auswirkt.

Bemerkenswert ist, daß ein aggressiver Tumor, wie das maligne Melanom, welches beim Patienten schnell zur Metastasierung neigt, in der Nacktmaus nur abgekapselte Tumoren bildet. In einigen Fällen konnte bei **MM-I-P** ein Durchwachsen dieser Tumorkapsel beobachtet werden. Die Folge hiervon war, daß die Tumorzellen in den Bauchraum ausgestreut wurden und hier Tochtergeschwülste bildeten. Histologische Begutachtung von Leber, Lunge und Darm zeigten jedoch, daß die Organe selbst nicht befallen waren. Die Tochtergeschwülste saßen lediglich den verschiedenen Organen auf. Eine echte hämogene oder lymphogene Metastasierung konnte nicht beobachtet werden. Das Ausbleiben einer Metastasierung dürfte auf die heterologe Umgebung der Zellen im Tier zurückzuführen sein. Aus der Literatur sind nur drei Fälle von malignen Melanomen bekannt, die zur Metastasierung in der Nacktmaus nach subcutaner Injektion befähigt sind.

Wilson et al (1988) konnten aus der Lebermetastase eines malignen Melanoms eine Zelllinie etablieren (**UCT-Mel 3**), die regelmäßig in der Nacktmaus metastasierte. Tochtergeschwülste waren hauptsächlich in Lunge und Gonaden zu finden. Cytogenetische Daten dieser Zell-Linie liegen leider nicht vor.

Bevaqua et al (1986) führten *in vitro*-Studien an der Zelllinie **A-375** durch, die eine geringe Neigung zur Metastasierung besitzt. Es wurden Zellen von **A-375** auf Amnion-Membran gesetzt und die Zellen, die fähig waren diese Membran zu durchwachsen, weiter propagiert. In diesen "metastatischen" Zellen konnten gegenüber der normalen **A-375**-Population zahlreiche "double minutes", paarige Chromatinkörper, in denen Gene amplifiziert vorliegen, nachgewiesen werden.

Wie 1984 von Kerbel und Man beschrieben, metastasiert die Zell-Linie **MeWo** mitunter in der Nacktmaus. White et al (1984) wiesen "homogenously staining regions" (hsr) auf Chromosom # 15 und X bei **MeWo** nach. Klonierung dieser Sequenzen zeigte, daß es sich bei der Amplifikation um zentromerisches Heterochromatin mit Homologie zu Chromosom # 1 und 9 handelt. NOR-Färbung erbrachte den Nachweis, daß die hsr eine große aktive Nukleolus-Organisator-Region darstellt. Diese Befunde sind insofern erstaunlich, da aktive NOR's normalerweise nur auf den Satelliten der acrozentrischen Chromosomen zu finden sind. In normalen Zellen liegt diese amplifizierte Sequenz in etwa 6.000 Kopien vor und ist bei **MeWo** 10-fach amplifiziert. Gitelman et al (1987) konnten zeigen, daß die Metastasierung mit dem Vorhandensein von hsr's auf Chromosom # 15 positiv korreliert.

Die beiden vorbeschriebenen Studien zeigen, daß der Genamplifikation bei der Metastasierung maligner Melanome eine entscheidende Bedeutung zukommt. "Gene-dosage"-Effekte könnten zu einer Fehlexpression bestimmter Gene führen (Schwab M., 1983), die die Zellen befähigen Basalmembranen aufzulösen und Nachbargewebe zu infiltrieren.

Die **MeWo**-Zellen zeigten bei meinen Untersuchungen keine hsr's auf Chromosom # 15 oder X und waren auch nicht zur Metastasierung befähigt (persönliche Mitteilung von Dr. W. Tilgen, Hautklinik Heidelberg). Während der zum Teil langen *in vitro*- und *in vivo*-Propagierung traten bei den eigenen Zell-Linien keine cytogenetischen Anzeichen einer Genamplifikation auf, so daß dies mit Sicherheit kein generelles und häufig zu beobachtendes Phänomen ist.

6. Molekularbiologische Untersuchungen an Melanom-Kulturen

In der letzten Zeit wurde immer wieder, wie bereits erwähnt, der Zusammenhang einer gestörten Proto-Oncogen-Expression als Folge von Chromosomenaberrationen und maligner Transformation erörtert (z.B. Pedersen M.I. et al, 1986; Parmiter A.H. et al, 1988). Erstaunlicherweise gibt es nur wenige Studien, die sich molekularbiologisch mit der Oncogen-Expression bei Melanomen oder Melanom-Zell-Linien beschäftigen und so diese Hypothese stützen könnten. Nanus et al (1987) konnten die Bildung des Genproduktes des **H-ras**-Oncogens, das **p-21**, in einigen Nevi, Primärtumoren und Metastasen nachweisen. Shin et al (1987) konnten die Expression der Oncogene **K-ras**, **N-myc**, und **sis** in einem Melanom aufzeigen. Die Untersuchungen erfolgten jedoch ausschließlich an Biopsie-Material, so daß eine Korrelation mit etwaigen cytogenetischen Daten der jeweiligen Tumoren nicht möglich ist.

Bei Fischmelanomen (**Xiphophorus spec.**) ist eine Beteiligung des Oncogens **Tu**, welches Homologien zu den Oncogenen **c-sis** und **c-erb** aufweist, bei der Entstehung des vererbbaeren Melanoms nachgewiesen (Anders F. et al, 1986).

Um zu schauen, ob bei Melanomen möglicherweise eine Oncogenamplifikation oder eine erhöhte Oncogenexpression vorliegt und ob diese dann mit einer Chromosomenaberration zu korrelieren ist, wurden die Zelllinien **MM-I-P**, **MM-II-M**, **MM-III-M** und **MM-V-M** im Southern-Blot auf das **myc**-Oncogen und im Northern-Blot auf die Oncogene **src**, **mos**, **myc**, **fos**, **ras** und *K-ras* getestet. Lediglich beim **myc**-Gen ließ sich eine leichte Expression feststellen, die aber, aufgrund der Beteiligung des **myc**-Gens am Zellzyklus, für gut proliferierende Zellen als normal anzusehen ist. Diese Untersuchung hat aufgrund der geringen Zahl getesteter und der Vielzahl bekannter Oncogene nur einen Stichprobencharakter und schließt eine mögliche Beteiligung anderer Oncogene am Transformationsgeschehen natürlich nicht aus.

7. Schlußbetrachtung

Im Zuge der rasanten Entwicklung der Molekularbiologie in den letzten Jahren sind die klassischen biologischen Disziplinen, und hierzu gehört die Cytogenetik, etwas aus dem Blickfeld von Wissenschaft und Öffentlichkeit geraten. Für fundierte Untersuchungen zur Aufklärung der Ätiologie von Malignomen ist jedoch eine verstärkte interdisziplinäre Zusammenarbeit zu fordern. So hat das reine Aufzeigen von Chromosomenaberrationen, ohne die Möglichkeit der Korrelation zum Stoffwechselgeschehen, zur Zeit höchstens diagnostischen Wert. Auf der anderen Seite fehlt molekularbiologischen Betrachtungen, ohne Berücksichtigung der chromosomalen und zellbiologischen Situation, eine sichere Basis, die es gestattet eindeutige Aussagen zu machen. Weiter ist die Cytogenetik die Methode der Wahl bei der Identifizierung verschiedener Zellen und somit gerade bei Arbeiten mit vielen verschiedenen Zell-Linien oder Heterotransplantaten unerläßlich. Es wird somit deutlich, daß für die Zukunft eine verstärkte interdisziplinäre Zusammenarbeit unumgänglich ist.

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, daß bei Melanomen zwar mittlerweile tumortypische Aberrationen nachzuweisen sind, das Gesamtbild jedoch wesentlich komplexer als beispielsweise bei den Leukämien ist. Für die Zukunft wäre es interessant, Melanomvorläuferstadien, sowie Primärtumore und Metastasen von jeweils einem Patienten zu analysieren. Hieraus könnte ein besseres Bild über initiale und sekundäre tumortypische Veränderungen gewonnen werden. Solche Untersuchungen setzen eine perfekte Zusammenarbeit zwischen Klinik und wissenschaftlichem Labor voraus.

VI.Zusammenfassung

Das maligne Melanom zeigt, wie für die meisten Krebserkrankungen nachgewiesen, einen aberranten Karyotyp. Anders als bei Neoplasien des blutbildenden Systems und soliden Tumoren aus Lunge oder Niere lassen sich beim Melanom keine tumortypischen Markerchromosomen finden.

Cytogenetische Untersuchungen an 14 Melanomkulturen zeigten, daß bestimmte Chromosomen gehäuft an Chromosomenaberrationen beteiligt sind. Hier ist in besonderem Maße Chromosom # 1 zu nennen. Die Chromosomen # 5, 6, 7 und 8 zeigen ebenfalls eine erhöhte Beteiligung an Chromosomenaberrationen, wogegen die Chromosomen # 9, 10, 14, 16, 17, 18, 19 und X eher selten an Chromosomenmutationen beteiligt sind. Die zentromerische Region ist als besonders anfällig anzusehen, so sind ca. 65% aller gefundenen Translokationen und Deletionen auf ein oder mehrere Brüche in der zentromerischen Region eines Chromosomes zurückzuführen. Ca. 35% der Veränderungen (Translokationen, Deletionen, Inversionen oder Duplikationen) beruhen auf Bruchereignissen im nicht-zentromernahen Bereich. Die Bruchpunkte stimmen, wie kürzlich von anderen Autoren bestätigt, selten mit den sogenannten "fragile sites" überein.

Als gemeinsames Merkmal in numerischer Sicht zeigen die Melanome eine Überrepräsentierung des Chromosomenarmes 6p bei gleichzeitiger Unterrepräsentierung von 6q, die in 10 von 14 Kulturen festzustellen war. Eine Überrepräsentierung des Chromosomenarmes 7p fand sich in sieben der 14 untersuchten Kulturen. Diese Ergebnisse bestätigen bisherige Literaturangaben. Darüber hinaus konnte eine Unterrepräsentierung von Chromosom # 4 in acht von 14 Kulturen, von Chromosom # 9 in acht von 14 Kulturen und von Chromosom # 10 in sieben von 14 Kulturen festgestellt werden.

Melanom-Zell-Linien, die unter konstanten Kulturbedingungen, von der Primärkultur bis zu hohen Passagen, gehalten wurden, erwiesen sich als genetisch und phänotypisch sehr stabil. Dieser Umstand läßt, zumindest für die Melanome, die Zellkultur zur Beantwortung pharmakologischer und immunologischer Fragen geeignet erscheinen.

Stabile, hinreichend analysierte Zelllinien verlieren im experimentellen *in vivo*-System der Nacktmaus ihre Stabilität und bilden Subpopulationen aus, die durch das Auftreten neuer Markerchromosomen gekennzeichnet sind. Da einige dieser Subpopulationen nach Rekultivierung und anschließender *in vitro*-Passagierung ihren prozentualen Anteil an der Gesamtpopulation noch erhöhen konnten, scheint ein reiner Selektionsmechanismus für das

Erscheinen zusätzlicher Aberrationen wenig wahrscheinlich. Ein verbessertes *in vivo*-Wachstum in Abhängigkeit von der Zahl der *in vivo*-Passagierungen ließ sich nur in einem Fall eindeutig nachweisen, d. h. Chromosomenveränderungen führen nicht zwangsläufig zu erhöhter Adaptierung und Wachstumsdynamik. Die genetische Heterogenität der Injektionstumoren spiegelt sich auch im histologischen Bild wieder, hier finden sich alle Übergänge von epitheloider bis zu spindelförmiger Zellmorphologie. Erstaunlicherweise ist eine Metastasierung der Melanome im Tier nie zu beobachten gewesen. Die Tierpassagierung zur erleichterten Anzucht von Melanomzellen ist zumindest aus cytogenetischer Sicht problematisch, da über Heterotransplantate abgeleitete Zell-Linien der Tumorsituation im Patienten nicht mehr voll entsprechen dürften. Chromosomenaberrationen könnten charakteristisch für die veränderte Umgebung im Mausorganismus und nicht für den Primärtumor des Patienten sein.

Bei stichprobenartiger molekularbiologischer Untersuchung auf eine erhöhte Oncogenexpression als Folge eines numerisch und/oder strukturell aberranten Chromosomensatzes ließ sich keine atypische Aktivierung der getesteten Oncogene nachweisen. Die geringe Zahl der getesteten Oncogene schließt eine mögliche Aktivierung anderer nicht aus. Die zur Zeit laufende Diskussion über eine mögliche Beteiligung von Supressorgenen am Transformationsgeschehen maligner Zellen und damit zusammenhängende Versuche zeigen, daß eine reine Oncogenaktivierung als direkte kausale Voraussetzung für die Transformation somatischer Zellen hin zur malignen Tumorzelle wenig wahrscheinlich ist.

VII. Literaturverzeichnis

Anders A., Anders F.; The Gordon-Kosswig melanoma System in 1986 (meeting abstract); XIIIth International Pigment Cell Conference, Tucson, AZ, p. No. 13; 1986

Atkin N.B., Maker M.C.; Chromosome 1 in 26 carcinomas of the cervix uteri; Cancer 44: 604 - 613; 1979

Aubert C., Rouge F., Galindo J.R.; Differentiation and tumorigenicity of human malignant melanocytes in relation to their culture conditions; J Natl Cancer Inst 72: 3 - 12; 1984

Baden H.P., Kubilus J., Wolman S.R., Steinberg M.L., Phillips S.B., Kvedar J.C.; NM-1 keratinocyte line is cytogenetically and biologically stable and exhibits a unique structural protein; J Invest Dermatol 89 (6): 574 - 579; 1987

Balaban G.B., Herlyn M., Clark W.H., Nowell P.C.; Karyotypic evolution in human malignant melanoma; Cancer Genet Cytogenet 19: 113 - 122; 1986

Becher R., Gibas Z., Karakousis C., Sandberg A.A.; Nonrandom chromosome changes in malignant melanoma; Cancer Research 43: 5010 - 5016; 1983

Bertrand S., Thomasset N., Duga I., Delsol G. Dore J.F.; Homogenously staining regions (HSR) and tumorigenicity of human melanoma cell lines (Meeting Abstract); First Internatinal Conference on Skin Melanoma. May 6 - 9, 1985, Venice; Abstract 14

Bevaqua S.J., Greef C.W., Hendrix M.J.; The invasive behavior of human melanoma cells may be related to a gene amplification event (Meeting Abstract); XIIIth International Pigment Cell Conference. October 5 - 9, 1986, Tuscon, Az, p. 39

Binger S.H., Mark J.; Chromosomes and chromosomal progression of human gliomas *in vivo*, *in vitro* and in athymic nude mice; Prog Exp Tumor Res 27: 67 - 82; 1984

Boukamp P.; Untersuchungen zum Studium der Carcinogenese menschlicher Epidermiszellen: Etablierung und Charakterisierung von Primärkulturen und immortalen Zell-Linien sowie die maligne Transformation durch das zelluläre Harvey-ras Onkogen; Dissertation, Universität Kaiserslautern; 1987

Boukamp P., Petrusevska R.T., Bretkreutz D.,Hornung J., Markham A.,Fusenig N.E.; Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line; *J Cell Biol* 106; 1988

Boveri T.; Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren; Gustav Fischer, Jena; 1914

Brieux de Salum S., Slavtsky I., Besuschio S., Pavlovsky A.A.; Homogeniously staining regions (HSR) in a human malignant melanoma; *Cancer Genet Cytogenet* 11 (1): 53 - 60; 1984

Caspersson T., Zech L., Johansson C., Modest E.J.; Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents; *Chromosoma (Berl.)* 30; 1970

Delcroix M., Libert A., Lejeune F.J.; Identification of cell types in human melanoma cultures using a panel of morphological, cytochemical and immunological tests; *Anticancer Research* 6: 1369 - 1376; 1986

Dennis M., Di Sorbo; Combination of insulin and transferrin stimulates the growth of human melanoma cells in a serum-free defined medium; *Proceedings of AACR* 27; 1986

Dias-Wickramanayake P., Loeffler M., Klein H.O., Groth W., Wichmann H.E.; Growth dependent cell proliferation kinetics of a human malignant melanoma grown in nude mice; *J Cancer Res Clin Oncol* 110: 11 - 16; 1985

Dofuku R., Biedler J.L., Spengler B.A., Old L.J.; Trisomy of chromosome 15 in spontaneous leukemia of AKR-mice; *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 1515 - 1517; 1975

Eagle H.; amino acid metabolism in mammalian cell cultures; *Science* 130: 432 - 437; 1959

Fidler I. J., Hart I.; Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications; *Science* 217: 998 - 1003; 1982
Francke U.; Spezific Chromosome Changes in the human heritable tumors of retinoblastoma and nephroblastoma; *Chromosomes and Cancer from Meolecules to Man* pp 139 - 159, New Yorck, Academic Press; 1983

Fonatsch C., Schaadt M., Kirchner H., Diehl V.; A possible correlation between the degree of karyotype aberrations and the rate of sister chromatid exchanges in lymphoma lines; *Int. J. Cancer* 26: 749 - 756; 1980

Fonatsch C., Kirchner H.H., Schaadt M., Günzel M., Diehl V.; Sister chromatid exchange in lymphoma lines and lymphoblastoid cell lines before and after heterotransplantation into nude mice; *Int. J. Cancer* 28: 441 - 445; 1981

Fusenig N.E., Worst P.K.M.; Mouse epidermal cell cultures II: Isolation, characterisation and cultivation of epidermal cells from perinatal mouse skin; *Exp Cell Res* 93: 443 - 457; 1975

Geiser A.G., Der J.C. Marshall C.J., Stanbridge E.J.; Suppression of tumorigenicity with continued expression of the c-Ha-ras oncogene in EJ-bladder carcinoma - human fibroblast hybrid cells; *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 5209 - 5213; 1986

Gey G.O., Coffman W.D. Kubicek M.T.; Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium; *Cancer Res.* 12: 264; 1952

Gibas Z., Prout R.P., Connolly J.G., Pontes J.E., Sandberg A.A.; Nonrandom chromosomal changes in transitional cell carcinoma of the bladder; *Cancer Research* 44: 1257 - 1264; 1984

Gitelman I., Dexter D.F., Roder J.C.; DNA amplification and metastasis of the human melanoma cell line **MeWo**; *Cancer Research* 47: 3851 - 3855; 1987

Halban R., Ghosh S., Duray P., Kirkwood J.M., Lerner A.B.; Human melanocytes cultured from Nevi and Melanomas; *Soc Inv Dermatol* pp 95 - 101; 1986

Hecht F.; Minireview: Rare and polymorphic fragile sites and cancer; *Cancer Genet Cytogenet* 34: 195 - 199; 1988

Herlyn M., Clark W.H., Rodeck U., Mancianti M.L., Jambrosic J., Koprowski H.; Biology of disease: Biology of tumor progression in human melanocytes; *Laboratory Investigation* 56: 461 - 474; 1987

ISCN: An International System for Human Cytogenetics Nomenclatur. Birth Defects; Original Article Series 21 (1); National Foudation - March of Dimes, New Yorck; 1985

Yunis J.J., Soreng A.L.; Constitutive fragile sites and cancer; *Science* 226: 1199 - 1204; 1984

Kaneko Y., Sasaki M.; A preliminary note on primary methylcholanthrene-induced mouse-sarcomas; *Chrom Inf Serv* 19: 28 - 29; 1975

Kerbel R.S., Man M.S.; Single-step selection of unique human melanoma variants displaying unusually aggressive metastatic behavior in nude athymic mice; *Invasion and Metastasis* 4 (1): 31 - 43; (1984)

Kirchner H.H., Fonatsch C., Schaadt M., Günzel M., Hellriegel K.P., Diehl V.; Correlation of chromosomal aberrations in a myeloma cell line with tumorigenicity in nude mice; *Blut* 43: 93 - 97; 1981

Kovacs G.; Abnormalities of chromosome # 1 in human solid malignant Tumors; *Int J Cancer* 21: 688 - 694; 1978

Krizman D.B., Carpenter N.J., Pathak S., Olive M., Cailleau R., Hsu T.C.; HeLa-marker Chromosomes in human breast tumors: Proposal about the origin of the **HeLa** cell line; *J Clinic Lab Anal* 1: 93 - 97; 1987

Kunzmann R., Hölzel F.; Karyotype alterations in human ovarian carcinoma cells during long-term cultivation and nude mouse passage; *Cancer Genet Cytogenet*; 1987

Lejeune J., Gautier M., Turpin M.R.; Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens; *C. R. Acad Sci (Paris)* 248: 1721 - 1722; 1959

Levan G., Ahlström U., Mitelman F.; The specificity of Chromosome # 12 involvement in DMBA-induced rat sarcomas; *Hereditas* 77: 263 - 280; 1974

Miro R., Clemente I.C., Fuster C., Egozcue J.; Fragile sites chromosome evolution, and human neoplasia; *Hum Genet* 75: 345 - 349; 1987

Mukai S., Dryja T.P.; Loss of alleles at polymorphic loci on chromosome # 2 in uveal melanoma; *Cancer Genet Cytogenet* 22 (1): 45 - 53; 1986

Muleris M.M., Salmon R.J., Dutrillaux A.M., Vielh P., Zafrani B., Girodet J., Dutrillaux B.; Characteristic chromosomal imbalances in 18 near-diploid colorectal tumors; *Cancer Genet Cytogenet* 29: 289 - 301; 1987

Nanus D.M., Cordon-Cardo C., Albino A.P.; Expression of ras proto-oncogene p-21 product in premalignant and malignant Melanoma tissues (Meetig Abstract); Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res 28: 21; 1987

Nicolson G.L.; Tumor cell instability diversification, and progression to the metastatic phenotype: from oncogene to oncofetal expression; Cancer Res 47: 1473 - 1487; 1987

Nowell P.C., Hungerford D.A.; A minute chromosome in human granulocytic leukemia; Science 132: 1497; 1960

Nowell P.C.; The clonal evolution of tumor cell populations; Science 194: 23 - 28; 1976

Nowell P.C.; Mechanisms of tumor progression; Cancer Res 46: 2203 - 2207; 1986

Ochi H., Wake N., Rao U., Takeuchi J., Slocum H.K., Rustum Y.M., Karakousis C., Sandberg A.A.; Serial cytogenetic analysis of a recurrent malignant melanoma; Cancer Genet Cytogenet 11: 175 - 183; 1984

Ohyashiki J.H., Ohyashiki K., Gibas Z., Karakousis C., Sandberg A.A.; Cytogenetic findings in a malignant melanoma and its derived cell line; Cancer Genet Cytogenet 23: 77 - 85; 1986

Parmiter A.H., Balaban G., Clark H.C., Nowell P.C.; Possible involvement of the chromosome region 10q2.4-q2.6 in early stages of melanocytic neoplasia; Cancer Genet Cytogenet 30: 313 - 317; 1988

Parmiter A.H., Balaban G., Herlyn M., Clark W.H., Nowell P.C.; A (1;19) chromosome translocation in three cases of human malignant melanoma; Cancer Research 46: 1526; 1986

Pathak S., Drwinga H.L., Hsu T.C.; Involvement of chromosome 6 in rearrangements in human malignant melanoma cell lines; Cytogenet Cell Genet 36: 573 - 579; 1983

Pedersen M.I., Bennett J.W., Wang N.; Nonrandom chromosome structural aberrations and oncogene loci in human malignant melanoma; Cancer Genet Cytogenet 20: 11 - 27; 1986

Peehl D.M., Stanbridge E.J.; The role of differentiation in the suppression of tumorigenicity in human cell hybrids; Int J Cancer 30: 113 - 120; 1982

Ponder P.; Gene losses in human tumors; nature 335: 400 - 402; 1988

Popescu N.C., Chahinian A.P., Di Paolo J.A.; Nonrandom chromosome alterations in human malignant mesothelioma; *Cancer Research* 48: 142 - 147; 1988

Rauh M., Paul E., Illig L.; Incidence of malignant melanoma in central Hesse, Germany; *Anticancer Res.* 7: 447 - 448; 1987

Rey J.A., Bello M.J., de Campos J.M., Ramos M.C., Benitez J.; Cytogenetic findings in a human malignant melanoma metastatic to the brain; *Cancer Genet Cytogenet* 16: 179 - 183; 1985

Rheinwald J.G., Green H.; Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells; *Cell* 6: 331 - 344; 1975

Riccardi V.M., Hittner H.M., Francke U., Yunis J.J., Ledbetter D., Borges W.; The aniridia-Wilm's Tumor association: The clinical role of chromosome band 11p1.3; *Cancer Genet Cytogenet* 2: 131 - 137; 1980

Richmond A., Fine R., Murray D., Lawson D.H., Priesr J.H.; Growth factor and cytogenetic abnormalities in cultured Nevi and malignant melanomas; *Soc Inv Dermatol* pp295 - 302; 1986

Rowley J.D.; Human oncogene locations and chromosome aberrations; *Nature* 301: 290 - 291; 1983

Schwab M., Alitalo K., Varmus H.E., Bishop J.M. George D.; A cellular oncogene (c-kirras) is amplified, overexpressed, and located within karyotypic abnormalities in mouse adenocortical tumor cells; *Nature* 303: 497 - 501; 1983

Sharma A.K., Sharma A.; Chromosome technics - theorie and practice; Butterworths; 1986

Shin D.M., Gupta V., Donner L., Chawla S., Benjamin R., Gutterman J., Blick M.; Aberrant oncogene expression in uncultured human sarcoma and melanoma; *Anticancer Research* 7: 1117 - 1124; 1987

Srivatsan E.S., Benedict W.F., Stanbridge E.J.; Implication of chromosome 11 in the suppression of neoplastic expression in human cell hybrids; *Cancer Research* 46: 6174 - 6179; 1986

Stenman G., Sandros J., Dahlenfors R., Juberg-Ode M., Mark J.; 6q- and loss of the Y-chromosome - two common deviations in malignant human salivary gland tumors; *Cancer Genet Cytogenet* 22: 283 - 293; 1986

Stubblefield E., Sanford J.; A general survey of genetics and cancer; *Anticancer Research* 7: 1085 - 1104; 1987

Sutherland G., Hecht F.; fragile sites on human chromosomes; *Oxford Monographs on Medical Genetics* No. 13; Oxford University Press; 1985

Tjio J.H., Levan A.; The chromosome number of man; *Hereditas* 42: 1 - 6; 1956

Tilgen W., Boukamp P., Breitkreutz D., Dzarlieva R.T., Engstner M., Haag D., Fusenig N.E.; Preservation of morphological, functional and karyotypic traits during long-term culture and *in vivo* passage of two human skin squamous cell carcinomas; *Cancer Research* 43: 5995 - 6011; 1983

Tilgen W., Dzarlieva R.T., Breitkreutz D., Hennes B., Engstner M., Matzku S., Fusenig N.E.; Heterogeneity of human malignant melanoma cells *in vivo* and *in vitro*: Role of experimental systems; *Proceedings of the XIIth International Pigment Cell Conference* Giessen, FRG; 1985

Tilgen W.; Die Früherkennung des malignen Melanoms - Ihre prognostische Bedeutung; *Onkologie für den Hausarzt, Aktuelle Oncologie* 36: 51 - 75; 1987

Trent J.M., Thompson F.H., Ludwig C.; Evidence for selection of homogeneously staining regions in a human melanoma cell line; *Cancer Research* 44: 233 - 237; 1984

Wang N., Pedersen M.; Consistent involvement of oncogene loci in marker formation in human malignant melanoma (Meeting Abstract); *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 26: 31; 1985

Whang-Peng J., Kao-Shan C.S., Lee E.C., Bunn P.A., Carney D.N., Gaydar A.F., Minna J.D.; Specific chromosome defect associated with small-cell lung cancer: Deletion 3p(1.4 - 2.3); *Science* 215: 181 - 182; 1982

White B.N., Higgins M.J., Shtromas I., Reimer D., Wang H.S., Roder J., Holden J.J.A.; Homogeneously staining regions in a human melanoma cell line contain amplified sequences from Chromosome 15 (Meeting Abstract); Fed Proc 43 (6): 1559; 1984

Wilson E.L., Gartner M.F.R.M., Campbell J.A.H., Dowdle E.B.; Metastasis of a human melanoma cell line in the nude mouse; Int J Cancer 41: 83 - 86; 1988

Zankl H., Zang K.D.; Cytological and cytogenetical studies on brain tumors. IV: Identification of the missing G-chromosomes in human meningiomas an no. 22 by fluorescent technique; Humangenetik 14: 167 - 169; 1972

Zech L., Haglund V., Nilsson K., Klein G.; Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas; Int J Cancer 17: 47 - 56; 1976

VIII. Lebenslauf

Geboren am: 13. Juli 1957

Geburtsort: Bonn/Rhein

Eltern: Rudolf Pascheberg und Emmalotte Pascheberg, geborene Tölke

Grundschule: 1964 bis 1968 (Karl-Simrock-Schule in Bonn)

Realschule: 1968 bis 1974 (Gottfried-Kinkel-Schule in Bonn)
Abschlußzeugnis vom 3. Juli 1974

Gymnasium: 1974 bis 1977 (Friedrich-Ebert-Gymnasium in Bonn).
Erlangung der allgemeinen Hochschulreife am 7. Juni 1977

Berufstätigkeit: 31. Mai 1977 bis 30. September 1977 als Angestellter im
Bundesministerium der Justiz in Bonn

Grundwehrdienst: 3. Oktober 1977 bis 31. Dezember 1978

Berufstätigkeit: 1. Januar 1979 bis 5. Oktober 1979 als Angestellter im
Bundesministerium der Justiz in Bonn

Studium: Wintersemester 79/80 bis Wintersemester 88/89 an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn,
Fachbereich Biologie

Vordiplom: 5. November 1981

Ab März 1984 Anfertigung der Diplomarbeit bei Prof. Dr.
Norbert Weissenfels am Zoologischen und Vergleichend
Anatomischen Institut der Universität Bonn mit dem Thema:
Die vier Spogilliden des Bonner Raumes - eine vergleichende
histologisch-cytologische Untersuchung

Diplomprüfung: 6. August 1985 Erlangung des akademischen
Grades eines Diplom-Biologen

Berufstätigkeit: Vom 1. Januar 1986 bis 31. Dezember 1987 als Doktorand auf
wissenschaftlicher Hilfskraftstelle (geprüft) beim Tumorzentrum
Mannheim - Heidelberg

Vom 1. Januar 1988 bis 31. März 1989 als Doktorand auf
wissenschaftlicher Hilfskraftstelle (geprüft) beim Deutschen
Krebsforschungszentrum in Heidelberg

Ich versichere, daß die vorliegende Dissertation von mir selbständig ohne unerlaubte fremde Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

Ulrich Pascheberg