

KLONIERUNG FELINER FIBROSARKOMZELLINIEN UND DEREN ZYTOGENETISCHE CHARAKTERISIERUNG

JASMIN WASIERI



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

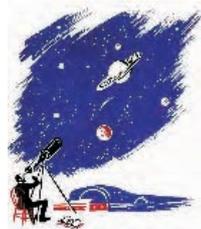
Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. M. Reinacher

**Klonierung feliner Fibrosarkomzelllinien
und deren zytogenetische Charakterisierung**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Jasmin Wasieri

Tierärztin aus Bonn

Gießen, 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter:

Prof. Dr. M. Reinacher

Prof. Dr. S. Kölle

Tag der Disputation: 05. März 2009

Meinen Eltern
und in memoriam
meinem Großvater M. Kabir Wasieri
in tiefer Liebe und Dankbarkeit

In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern,
die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben,
während sich der weite Ozean des Unbekannten
vor unseren Augen erstreckt.
(Isaac Newton)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	13
2	Literaturübersicht	17
2.1	Genetische Instabilität als Merkmal maligner Tumoren	17
2.2	Chromosomale Instabilität	17
2.3	Chromosomenaberrationen	18
2.3.1	Numerische Chromosomenaberrationen	18
2.3.2	Strukturelle Chromosomenaberrationen	19
2.4	Aneuploidie und deren Bedeutung für die Tumorentstehung	19
2.5	Struktur und Funktion von Zentrosomen	21
2.6	Regulation des Zellteilungszyklus	24
2.7	Verlauf und Regulation des Zentrosomenduplikationszyklus	25
2.8	Zentrosomenhyperamplifikation in Tumoren: Vorkommen, Definition und Mechanismen	29
2.9	Fibrosarkome der Katze	31
2.10	Einteilung der feline Fibrosarkome	31
2.10.1	FeSV-induzierte Fibrosarkome	31
2.10.2	Intraokuläre posttraumatische Fibrosarkome	32
2.10.3	Fibrosarkome unbekannter Ätiologie	32
2.10.4	Vakzinationsstellen-assoziierte Fibrosarkome	33
2.11	Feline Vakzinationsstellen-assoziierte Fibrosarkome und deren Prävalenz	33
2.12	Numerische Chromosomenveränderungen bei feline Vakzinationsstellen-assoziierten Fibrosarkomen	35
2.13	Definitionen eines Zellklons	36
3	Ziel der Arbeit	37

4	Material und Methoden	38
4.1	Zelllinien	38
4.1.1	Herkunft der Zelllinien	38
4.2	Zellkulturtechnik	39
4.2.1	Zellkultivierung und Passagierung	39
4.2.2	Kryokonservierung der Zellen	40
4.2.3	Auftauen von Zellen	40
4.3	Zellbiologische Methoden	41
4.3.1	Etablierung monoklonaler Zelllinien	41
4.3.2	Chromosomenpräparation	43
4.3.3	Giemsafärbung	45
4.3.4	Metaphasenauswertung	46
4.3.5	Fotografie und Bildbearbeitung	46
4.4	Immunzytologische Methoden	46
4.4.1	Probenvorbereitung zur Ermittlung der Zentrosomen- ausstattung	47
4.4.2	Verwendete Antikörper	47
4.4.3	Fluoreszenz-Kernfarbstoff	48
4.4.4	Versuchsdurchführung	48
4.4.5	Fotografie und Bildbearbeitung	49
4.4.6	Technische Ausrüstung	50
4.5	Statistische Auswertung	50
5	Ergebnisse	53
5.1	Etablierung monoklonaler Zelllinien	53
5.1.1	Klonierung der felinen Fibrosarkomzelllinien und der Kontrollzelllinie	53
5.1.2	Subklonierung aller Zelllinien	54
5.2	Zytogenetische Charakterisierung der Fibrosarkomzelllinie FS I.1	55
5.2.1	Chromosomenanalyse	55
5.2.2	Zentrosomenuntersuchung	55
5.3	Zytogenetische Charakterisierung der Fibrosarkomzelllinie FS II.1	56
5.3.1	Chromosomenanalyse	56
5.3.2	Vergleich der Passagen	57

5.3.3	Zentrosomenuntersuchung	58
5.4	Zytogenetische Charakterisierung der Fibrosarkomzelllinie FS III.1	60
5.4.1	Chromosomenanalyse	60
5.4.2	Zentrosomenuntersuchung	61
5.5	Zytogenetische Charakterisierung der Fibrosarkomzelllinie FS IV.1	61
5.5.1	Chromosomenanalyse	61
5.5.2	Vergleich der Passagen	62
5.5.3	Zentrosomenuntersuchung	63
5.6	Zytogenetische Charakterisierung der Fibrosarkomzelllinie FS V.1	64
5.6.1	Chromosomenanalyse	64
5.6.2	Vergleich der Passagen	65
5.6.3	Zentrosomenuntersuchung	67
5.7	Zytogenetische Charakterisierung der Kontrollzelllinie K.1	67
5.7.1	Chromosomenanalyse	67
5.7.2	Zentrosomenuntersuchung	68
5.8	Vergleichende Chromosomenanalyse aller Zelllinien	68
5.9	Zentrosomenprofil der Fibrosarkomzelllinien	70
5.10	Korrelation zwischen Zentrosomenhyperamplifikation und chromosomaler Instabilität	71
6	Diskussion	74
6.1	Relevanz der Etablierung monoklonaler Zellpopulationen	74
6.2	Vergleich der Zelllinien hinsichtlich der Klonierungsergebnisse	75
6.3	chromosomale Heterogenität der Zelllinien	77
6.4	Zentrosomenhyperamplifikation und Chromosomeninstabilität	78
7	Zusammenfassung	81
8	Summary	83
9	Anhang	101
9.1	Tabellen	101
9.2	Chemikalien, Lösungen, Puffer und Bezugsquellen	109

9.2.1	allgemeine Chemikalien und Lösungen	109
9.2.2	Arbeitsmaterialien und Geräte	109
9.2.3	Zellkultur	112
9.2.4	Immunfluoreszenz	113
10	Abkürzungsverzeichnis	115
11	Danksagung	118

1 Einleitung

Das feline Fibrosarkom ist eine infiltrativ wachsende, metastasierungsfähige Fibroblastenwucherung und ist bei der Katze der häufigste maligne mesenchymale Hauttumor (Hendrick et al., 1998; Kessler, 2000).

Die meisten feline Fibrosarkome (ca. 76 %) treten in der Subkutis typischer Vakzinationsstellen, wie z. B. Nackenbereich, seitlich am Hals, zwischen den Schulterblättern, dorsolateral am Thorax und lateral an den Hintergliedmaßen auf und werden als Vakzinationsstellen-assoziierte Fibrosarkome bezeichnet. Fibrosarkome an allen anderen Körperlokalisationen werden als nicht Vakzinationsstellen-assoziierte Fibrosarkome angesprochen (Hendrick und Brooks, 1994).

Feline Vakzinationsstellen-assoziierte Fibrosarkome zeigen neben dem lokalen invasiven Wachstum eine starke Rezidivrate (25-70 %), aber selten Metastasen, welche in den regionären Lymphknoten, im Mediastinum und in der Lunge zu finden sind (Kirpensteijn, 2006; Hershey et al., 2005; Rudmann et al., 1996; Stiglmair-Herb und Ortman, 1987).

Nach subkutanen Injektionen bzw. Vakzinationen werden fokale granulomatöse Reaktionen mit zentraler Nekrose und peripherer Lymphozyteninfiltration sowie die Präsenz von feingranulärem, grau-blauem Material im Zytoplasma einiger Makrophagen beobachtet (Hendrick und Dunagan, 1991). Bei den Vakzinationen stehen vor allem FeLV- und Tollwutvakzinen im Verdacht, die Bildung von Fibrosarkomen zu induzieren (Kass et al., 1993; Macy und Hendrick, 1996).

Obwohl die exakte Pathogenese dieser Sarkome auch nach über 10 Jahren immer noch unklar ist, wird ein Zusammenhang zwischen chronischer Entzündung, persistierender Antigenstimulation und neoplastischer Transformation von primitiven Mesenchymzellen vermutet (Macy und Hendrick, 1996). Wachstumsfaktoren wie FGF, TGF α und PDGF spielen bei der Wundheilung und neoplastischen Zelltransformation eine Rolle und werden von Tumorzellen der Sarkome exprimiert (Nieto et al., 2003). Mutationen

des Tumorsuppressorgens p53, welches eine genomische Veränderung innerhalb der möglichen Tumorursachen darstellt, wurden ebenfalls in felinen Fibrosarkomen gefunden (Nambiar et al., 2000). Diesen Untersuchungen zufolge scheinen Vakzinationen isoliert betrachtet keine Fibrosarkome zu verursachen. Folglich liegt ein Mehrstufenprozess, der genetische, iatrogene und lokale Faktoren einschließt, der Entstehung feliner Sarkome zugrunde (Kirpensteijn, 2006).

Benigne Tumoren weisen in der Regel einen normalen diploiden Chromosomensatz und intakte Zentrosomen auf (Ghadimi et al., 2000).

Bei vielen malignen Tumoren sind neben Genmutationen auch numerische Chromosomenaberrationen zu finden. Viele dieser Tumoren weisen eine starke Zunahme der Chromosomenzahl/Zelle auf (Salisbury et al., 1999).

Die Häufigkeit derartig veränderter Zellen in Präkanzerosen deutet darauf hin, dass es sich um ein frühes Ereignis in der Tumorentstehung handelt (Rajagopalan und Lengauer, 2004).

Die exakte Ausbildung des Mitosespindelapparates während des Zellteilungszyklus ist für eine symmetrische Chromosomenverteilung auf beide Tochterzellen von großer Bedeutung.

Dabei spielt das Zentrosom als MTOC (engl.: microtubule organizing center, Mikrotubuli-Organisationszentrum) der Zelle eine wichtige Rolle. Zentrosomen sind der Ausgangspunkt der Mitosespindel. Während des Zellteilungszyklus erfolgt neben der DNA-Verdopplung auch eine Duplikation des Zentrosoms.

Ein Zentrosom verdoppelt sich während eines normalen Zellteilungszyklus genau einmal, so dass zwei Zentrosomen entstehen, die die Spindelpole des bipolaren Spindelapparates der Mitose bilden. Das Vorhandensein von nur zwei Zentrosomen in einer Zelle, die in den Mitosezyklus tritt, ist Voraussetzung für die gleichmäßige Chromatidenverteilung auf die Tochterzellen (Piel et al., 2001).

Eine Reihe von Regulationsmechanismen sorgt für einen kontrollierten Ablauf des Zentrosomen- und Zellteilungszyklus. Eine Störung dieser Regulationsmechanismen kann eine Hyperamplifikation von Zentrosomen, d. h. ein Auftreten von mehr als zwei Zentrosomen pro Zelle zur Folge haben. Bei vielen malignen Tumoren wurden überzählige Zentrosomen gefunden (Salisbury et al., 1999).

Multiple Zentrosomen können während der Mitose zur Ausbildung mul-

tipolarer Spindeln führen. Dies zieht in der Folge eine Chromosomenfehlverteilung nach sich.

Bei der Fehlverteilung von genetischem Material kann es zum Verlust oder zum Gewinn von ganzen Chromosomen oder Chromosomenteilstücken kommen (Aneuploidie), wodurch chromosomal heterogene Zellen entstehen (Fukasawa, 2005).

Die entstehenden aneuploiden Zellen können proliferationsinhibierende Gene verlieren, wie z. B. das Tumorsuppressorgen p53, und zusätzlich eine verstärkte Expression von Onkogenen einleiten. Der Erwerb einer Anzahl von genetischen Aberrationen läßt in einem Mehrschrittprozeß aus einer normalen Zelle eine Tumorzelle entstehen (Sugai et al., 2003).

Diese Ausführungen zeigen, dass Zentrosomenaberrationen eine möglicherweise relevante Ursache für die Entstehung und Progression maligner Tumoren darstellen.

In Studien mit humanen Tumoren wurde der Zusammenhang zwischen chromosomaler Instabilität und Zentrosomenhyperamplifikation beschrieben, darunter in Zellen von Mammakarzinomen (D'Assoro et al., 2002; Lingle et al., 2002), Prostatakarzinomen (Pihan et al., 2001), Kolonkarzinomen (Ghadimi et al., 2000) und in hepatozellulären Karzinomen (Nakajima et al., 2004).

Auch Untersuchungen an Osteosarkomen, Chondrosarkomen und Rhabdomyosarkomen von Hunden konnten eine chromosomale Instabilität assoziiert mit einer Hyperamplifikation der Zentrosomen darstellen (Setoguchi et al., 2001).

Nur zu einem kleinen Prozentsatz (ca. 2 %) werden feline Fibrosarkome durch ein Virus verursacht. Diese Form der feline Fibrosarkome, welche häufig bei Katzen unter 5 Jahren vorkommt, steht mit einer FeLV-Infektion sowie FeSV-Entstehung in Verbindung (Hardy, 1981).

Ein hoher Anteil (ca. 78 %) der Fibrosarkome ist vakzinationsstellen-assoziiert (Ortmann, 1986). 1987 wurde in Pennsylvania eine Vorschrift erlassen, welche vorschrieb, dass Katzen gegen Tollwut zu impfen seien. Seit 1991 beobachteten Hendrick und Goldschmidt eine Zunahme von Vakzinationsstellen-assoziierten Fibrosarkomen bei Katzen. Die tatsächliche Prävalenzrate von Vakzinationsstellen-assoziierten Fibrosarkomen der Katze ist unbekannt. Untersuchungen zufolge liegt das Risiko für ein Vakzinationsstellen-assoziiertes Fibrosarkom zwischen 1:1000 und 1:10000 (Macy und

Hendrick, 1996; Hendrick, 1998a). Auf der Basis retrospektiver epidemiologischer Studien wurde eine steigende Prävalenz von 1:10000 geimpften Katzen auf 3,6:10000 beobachtet (Kass et al., 1993; Coyne et al., 1997). In einer 2-jährigen, weltweit unterstützten Studie von Gobar und Kass (2002), wurden über 30000 Katzen in den USA und Kanada hinsichtlich der Häufigkeit solcher Sarkome untersucht. Es wurde eine Häufigkeit von 1:30000 ermittelt; eine steigende Tendenz war nicht zu erkennen. Im United Kingdom, wo nicht routinemäßig gegen Tollwut geimpft wird, wird eine Häufigkeit von 0,21:10000 geimpften Katzen angenommen (Day, 2006).

Mayr et al. (1991, 1996) sowie Kalat et al. (1991) fanden bei der Untersuchung von feline Fibrosarkomzellen jeweils starke numerische Chromosomenaberrationen.

Miki et al. (2004) konnte in einer Arbeit mit feline Lymphomzelllinien eine genetische Instabilität, verbunden mit einer Zentrosomenhyperamplifikation darstellen. In dieser Studie konnte eine Korrelation zwischen Zentrosomenhyperamplifikation und chromosomaler Instabilität ermittelt werden.

Zytogenetische Studien mit feline Fibrosarkomen bezüglich chromosomaler Instabilität in Verbindung mit Zentrosomenaberrationen, sind bisher nicht veröffentlicht worden.

Am Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen wurden im Rahmen eines anderen Promotionsverfahrens (Löhberg-Grüne, derzeit i. Abschluss) fünf permanente feline Fibrosarkomzelllinien etabliert. Bei allen Zelllinien wurde eine chromosomale Instabilität (Aneuploidie) festgestellt.

Ziel der vorliegenden Studie war es nun, alle 5 etablierten Fibrosarkomzelllinien zu klonieren und ihre chromosomale Ausstattung zu evaluieren. Desweiteren sollte durch immunhistologische Untersuchungen ein möglicher Zusammenhang zwischen einer Zentrosomenhyperamplifikation und chromosomaler Instabilität untersucht werden.

Durch die zytogenetische Charakterisierung dieser feline Fibrosarkomzelllinien soll ein Beitrag zur Klärung genetischer Faktoren innerhalb der Pathogenese feline Fibrosarkome geleistet werden.

In Zukunft könnten immunhistologische Zentrosomenuntersuchungen Rückschlüsse auf die chromosomale Beschaffenheit von Fibrosarkomen zulassen.

2 Literaturübersicht

2.1 Genetische Instabilität als Merkmal maligner Tumoren

Eine normale Zelle muss genetische Veränderungen, welche DNA-Sequenzmutationen (z. B. Punktmutationen, Deletionen, Insertionen von Basenpaaren) und/oder Strukturanomalien in einem oder mehreren Chromosomen erfahren, um zu einer malignen Zelle transformiert zu werden (Bhadraraj und Yu, 2004; Emdad et al., 2005; Frank und Nowak, 2004). Obwohl viele dieser genetischen Veränderungen den unmittelbaren Zelltod zur Folge haben, können in einem Mehrschrittprozess neoplastische Zellen entstehen (Lengauer et al., 1998). Weiterhin sind karyotypische Veränderungen, welche den Zugewinn bzw. den Verlust ganzer Chromosomen (Aneuploidie) nach sich ziehen, häufig in humanen Tumoren zu finden (Lengauer et al., 1997, 1998).

Chromosomale Aberrationen von Tumorzellen umfassen sowohl numerische als auch strukturelle Alterationen, welche zu einer chromosomalen Instabilität einer Zelle führen (Pihan et al., 1998; Weber et al., 1998). Es wird vermutet, dass diese Prozesse in einem frühen Stadium stattfinden und damit der treibende Motor der Tumorigenese sind (Shih et al., 2001).

2.2 Chromosomale Instabilität

Chromosomale Instabilität ist durch Chromosomenbrüche, die Amplifikation oder Deletion chromosomaler Regionen und durch den Zugewinn bzw. Verlust ganzer Chromosomen charakterisiert, welche über mehrere Zellgenerationen hinweg bestehen bleiben.

Als Ergebnis chromosomaler Instabilität können die Karyotypen von malignen Tumorzellen innerhalb eines klonal entstandenen Tumors hinsichtlich der Chromosomenzahl und Chromosomenstruktur extrem variieren (McGavin und Zachary, 2007).

Tumorzellen zeigen oft komplexe zytogenetische Abnormalitäten, die beides, sowohl numerische als auch strukturelle Chromosomenaberrationen umfassen (Hanahan und Weinberg, 2000).

2.3 Chromosomenaberrationen

2.3.1 Numerische Chromosomenaberrationen

Sowohl Autosomen als auch Gonosomen (Geschlechtschromosomen) können von numerischen Aberrationen betroffen sein. Diese Aberrationen umfassen Veränderungen in der Chromosomenzahl pro Zelle.

Eine Aneuploidie bezeichnet Abweichungen in der Anzahl ganzer Chromosomen vom normalen diploiden Chromosomensatz einer Zelle (Euploidie). Aneuploidien treten sowohl in somatischen Zellen als auch in Keimzellen auf (Sen, 2000).

Ist der Chromosomensatz einer diploiden Zelle um ein oder mehrere Chromosomen vermindert, spricht man von einer Hypodiploidie. Im Gegensatz dazu sind bei der Hyperdiploidie einzelne Chromosomen vermehrt vorhanden.

Die entstehenden aneuploiden Zellen können eine defekte Expression proliferationsinhibierender Gene sowie einen Verlust einzelner oder mehrerer Gene, wie z. B. Tumorsuppressorgene zeigen. Bei überzähligen Genen kann zusätzlich eine verstärkte Expression von Onkogenen vorliegen.

Ein wichtiger Vorgang hierbei ist die Non-Disjunction, die während der Meiose und auch in der Mitose auftreten kann. Hierbei trennen sich homologe Chromosomen nicht, sondern gelangen, nach der Zellteilung, gemeinsam in eine Tochterzelle (Shi und King, 2005). Desweiteren gibt es noch die Polyploidie, bei der nicht einzelne Chromosomen vermehrt zu finden sind, sondern der ganze Chromosomensatz vervielfacht vorliegt.

2.3.2 Strukturelle Chromosomenaberrationen

Strukturelle Chromosomenaberrationen weisen Umbauten (z. B. Insertion, Duplikation, Deletion, Translokation) in einem Chromosom oder zwischen Chromosomen auf. Hierbei sind sogenannte balancierte Strukturveränderungen, bei denen es zu keinem Verlust oder Zugewinn von genetischem Material kommt, von unbalancierten zu unterscheiden (Albertson et al., 2003). Unbalancierte Strukturveränderungen führen zu einem Gewinn oder Verlust von Erbinformation. Strukturelle Chromosomenveränderungen treten z. B. bei oralen Plattenepithelkarzinomen des Menschen mit sich wiederholenden Breakage-fusion-bridge (BFB) Zyklen, assoziiert mit Telomerverkürzungen, auf (Murnane und Sabatier, 2004).

2.4 Aneuploidie und deren Bedeutung für die Tumorentstehung

Während eines Zellteilungszyklus werden die replizierten Chromosomen gleichmäßig auf die beiden Tochterzellen verteilt. Chromosomale Instabilität ist durch den Verlust oder den Zugewinn ganzer Chromosomen (Aneuploidie) gekennzeichnet (Emdad et al., 2005).

Ob Aneuploidie die Ursache maligner Tumoren ist oder lediglich als eine Begleiterscheinung anzusehen ist, ist noch nicht geklärt (Sen, 2000). Die Häufigkeit numerischer Chromosomenaberrationen in Präkanzerosen deutet auf ein frühes Ereignis in der Tumorentstehung hin. Präneoplastische Veränderungen wie die orale Leukoplakie (Sudbo et al., 2001) oder kleine benigne Kolontumoren (Bomme et al., 1998), zeigen in der Humanmedizin numerische Chromosomenalterationen und mit zunehmender Größe entwickeln sich maligne Tumoren, wie z. B. aus oralen Leukoplakien sich Plattenepithelkarzinome entwickeln können (Sudbo et al., 2001).

Chromosomale Instabilität ist für die Zelle mit einem hohen Risiko des Absterbens verbunden, da lebensnotwendige Grundfunktionen durch das Fehlen essentieller Gene betroffen sein können.

Für die Zelle ist entscheidend, wie viele genetische Veränderungen kompensierbar sind (Alberici et al., 2007).

So kann der Funktionsverlust lebenswichtiger Gene über eine negative

Selektion der Zellen des Tumors zum frühzeitigen Absterben dieser Tumorzellen führen.

Durch die Deletion von Tumorsuppressorgen sowie eine Amplifikation und verstärkte Expression von Onkogenen kann eine Zelle die zur Tumorigenese nötige Anzahl an genetischen Aberrationen erlangen, maligne transformieren und ein unkontrolliertes Zellwachstum zeigen (Lengauer et al., 1998).

Eine Anzahl verschiedener Mechanismen kann zu einer Chromosomenfehlverteilung führen, darunter fehlerhafte Kontrollpunktabläufe während der Mitose (Cahill et al., 1998), defekte Kinetochorfunktionen oder eine anormale Zentrosomenhyperamplifikation (Giehl et al., 2005; Fletcher und Muschel, 2006).

Die Rolle von überzähligen Zentrosomen im Zusammenhang mit chromosomaler Instabilität ist noch nicht restlos geklärt.

Es gibt zwei Modelle, die den Mechanismus von Chromosomenzugewinnen bzw. -verlusten durch Zentrosomenhyperamplifikation verdeutlichen. Zellen, die einen Zellteilungszyklus mit multipolaren Mitosespindeln durchlaufen, verteilen die replizierten Chromosomen ungleichmäßig auf die Tochterzellen. Aus Zellen mit z. B. tripolaren Spindeln können drei Tochterzellen hervorgehen. Sind diese Tochterzellen überlebensfähig, dann können diese extreme hypodiploide Chromosomenaberrationen zeigen (Fukasawa, 2002). Ein anderes Modell besagt, dass sich überzählige Zentrosomen (mehr als 2 Zentrosomen pro Zelle) zu einem pseudo-bipolaren Spindelapparat arrangieren können. Chromosomen werden in diesem Fall scheinbar gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt, jedoch können sich einige Zentrosomen während der Anaphase außerhalb der bipolaren Achse anordnen und folglich wird ein Teil der Chromosomen fehlverteilt. Die Tochterzellen mit den missregulierten Chromosomen weisen anschließend aneuploide Genome auf (Fukasawa, 2005).

Zhou et al. (1998) zeigten, dass das Gen einer Zentrosomen-assoziierten Kinase in verschiedenen humanen Tumoren überexprimiert wird, wodurch eine Zentrosomenhyperamplifikation mit Bildung multipolarer Spindelpole entsteht (Zhou et al., 1998). Die multiplen Spindelpole führen zu einer Chromosomenfehlverteilung auf die Tochterzellen und aneuploide Tochterzellen gehen aus diesen Zellteilungen hervor (Bharadwaj und Yu, 2004).

In vielen humanen Tumoren, wie z. B. Mammakarzinomen (Lingle und

Salisbury, 1999), Prostatakarzinomen (Pihan et al., 1998) oder Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich (Gustafson et al., 2000) wurden überzählige Zentrosomen beobachtet.

Zentrosomen von Tumorzellen weisen neben numerischen Aberrationen auch strukturelle Veränderungen auf. Hierzu zählen unter anderem eine Volumenzunahme der Zentriolen, die Akkumulation von perizentriolärem Material sowie eine unzureichende Phosphorylierung von Zentrosomenproteinen (Pihan et al., 1998; Lingle et al., 1998).

Aus diesen Gründen wurde in vielen Studien maligner Tumoren die Aufmerksamkeit auf numerische und strukturelle Zentrosomenaberrationen gelenkt, welche in der Entwicklung chromosomaler Instabilität und Tumorprogression eine wichtige Rolle spielen (Doxsey, 1998).

2.5 Struktur und Funktion von Zentrosomen

Zentrosomen sind in eukaryotischen Zellen die Mikrotubuli-Organisationszentren. Zu den Hauptfunktionen zählen die Bündelung mitotischer Mikrotubuli für die korrekte Positionierung der mitotischen Spindel während der Mitose und der Aufbau zytoplasmatischer Mikrotubuli für das Zytoskelett der Interphasezellen (Rieder et al., 2001).

Zentrosomen sollen an der Etablierung von Kontrollpunkten, an der Initiation der S-Phase und an der Beendigung der Zytokinese beteiligt sein (Fukasawa, 2002, 2005; Nigg, 2002).

Zentrosomen bestehen aus drei verschiedenen Domänen:

- Zentrioläre Domäne: sie stellt das Zentrum des Zentrosoms dar und enthält, abhängig vom Zellteilungszyklus, entweder eine einzelne Zentriole oder ein Paar Zentriolen.
- Perizentrioläre Domäne: sie umgibt das Zentrosom und wird auch als perizentrioläres Material (PCM, pericentriolar matrix) bezeichnet (siehe Abb. 2.1)

Beide Domänen zusammen haben in eukaryotischen Zellen einen Durchmesser von ca. 1 μm .

- Äußere zentrioläre Domäne: so wird der Bereich genannt, in dem das Zentrosom mit dem umgebenden Zytoplasma durch Mikrotubuli und -filamente interagiert (Krämer et al., 2002).

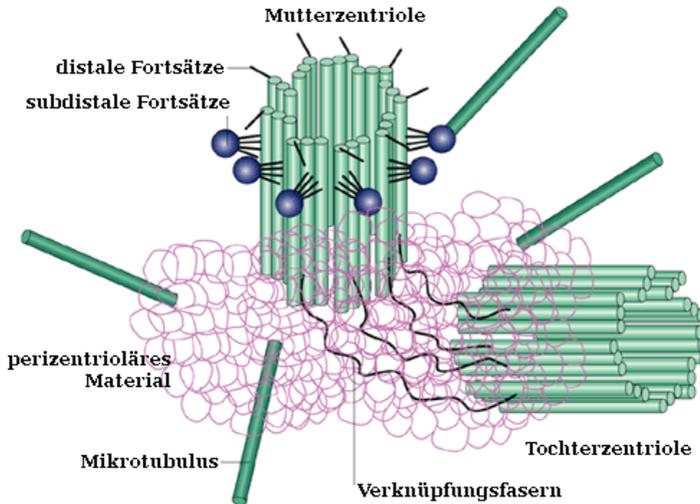


Abbildung 2.1: Zentrosomenstruktur
(modifiziert nach Doxsey, 2001)

Die Zentriolen sind zylinderförmige symmetrische Strukturen mit einer Länge von ca. 0,2-0,5 μm und einem Durchmesser von 0,2 μm . Jedes besteht aus neun Mikrotubuli-Triplets. Beide Zentriolen liegen im rechten Winkel zueinander und sind am proximalen Pol durch interzentrioläre Verknüpfungsfasern (siehe Abb. 2.1) miteinander verbunden (Fukasawa, 2002).

Beide Zentriolen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Struktur (siehe Abb. 2.1). Eine Zentriole weist am distalen Pol subdistale Fortsätze (Sattelliten) und distale Fortsätze auf (Mutterzentriole), der anderen Zentriole fehlen diese (Tochterzentriole). Die Fortsätze sind für die Verankerung der zu bildenden Mikrotubuli von Bedeutung (Bornens, 2002).

Unter Zentrosomenproteinen werden sowohl zentrosomale Proteine als auch Zentrosom-assoziierte Proteine verstanden, die an der Bildung des bipolaren Spindelapparates beteiligt sind, wie zum Beispiel Ninein und Centriolin.

Ein wichtiger Bestandteil des perizentriolären Materials (PCM) ist γ -Tubulin (Stearns et al., 1991). Dieses ist ein hochkondensiertes Protein (Molekulargewicht von 48 kDa), welches γ -Tubulin-Ringkomplexe im perizentriolären Material bildet, die als Ursprung der Tubulin-Polymerisation dienen (Schiebel, 2000). Die Mikrotubuli wachsen von den γ -Tubulin-Ringkomplexen in Richtung Zellperipherie aus. Das wachsende Ende ist das sogenannte Plus-Ende; die dem Zentrosom zugewandte Seite bezeichnet man als das Minus-Ende. Während des Zellteilungszyklus ist γ -Tubulin in der PCM, in der Nähe des proximalen Endes der Zentriole, vorhanden. Kurz vor der Einleitung der Mitose nimmt die Konzentration an γ -Tubulin und auch an Mikrotubuli-assoziierten (MT-) Proteinen in der PCM sehr stark zu (Bladgen und Glover, 2003).

Mit Hilfe von Antikörpern gegen γ -Tubulin können Zentrosomen in bildgebenden Verfahren dargestellt werden.

Die um beide Zentriolen gelegene perizentrioläre Matrix ist ein faseriges Maschenwerk, in welchem Proteinaggregate eingelagert sind. Sogenannte Coiled-Coil-Proteine, wie Pericentrin, stellen die hauptsächlichen Proteine dar, welche ein Gerüst für Ankerproteine (AKAP: A-kinase-anchoring proteins) bilden. Diese dienen der Bindung von Signalmolekülen und der Stabilisierung sowie Bündelung der Mikrotubuli (Lange, 2002).

Eine gut charakterisierte Komponente der perizentriolären Matrix ist der γ -Tubulin-Ringkomplex. Dieser besteht aus γ -Tubulin und weiteren Proteinen, die noch nicht vollständig charakterisiert sind. Zwei Proteine sind als Spc97p und Spc98p bekannt (Murphy et al., 1998).

Bisher ist wenig bekannt, wie γ -Tubulin-Ringkomplexe in Säugerzellen gebildet und an die Zentrosomen gebunden werden. Pericentrin, ein großes coiled-coil Protein der perizentriolären Matrix soll an dieser Aufgabe mitbeteiligt sein (DICTENBERG et al., 1998).

Zentriolen ähneln in ihrer Struktur Basalkörperchen, welche an der Basis von eukaryotischen Zilien und Flagellen gefunden werden (Doxsey, 2001).

Ob Zentriolen innerhalb des Zentrosoms auch eine Strukturfunktion übernehmen ist bisher unklar. Pflanzenzellen, Hefen, Pilze und Oozyten eini-

ger embryonaler Systeme besitzen Zentrosomen ohne Zentriolen. In diesen Fällen, geht man davon aus, dass Zentriolen für die Funktion oder Struktur des Zentrosoms nicht erheblich sind (Karsenti und Maro, 1986).

2.6 Regulation des Zellteilungszyklus

Zellteilung, Zellwachstum und Zelldifferenzierung unterliegen strengen Regulationsmechanismen. Sind diese im Zellverband höherer Organismen gestört, kann es zu einem veränderten Proliferationsverhalten der Zellen und damit zur Entstehung von Tumoren kommen (Lodish et al., 2001).

Die DNA-Replikation und die Mitose sind zwei voneinander abhängige Vorgänge, die einer strengen Kontrolle und Regulation unterliegen. Spezifische Kontrollpunkte sorgen für einen zeitlich abgestimmten und irreversiblen Zyklusablauf (Elledge, 1996).

Die G_1 -Phase und die G_2 -Phase ermöglichen die Kontrolle, ob die vorangegangene Zyklusphase korrekt abgeschlossen wurde und ob die Replikation der DNA fehlerfrei abgelaufen ist. Innerhalb der Mitose wird der Übergang von der Metaphase zur Anaphase reguliert. Die Trennung der Zwei-Chromatiden-Chromosomen erfolgt erst, wenn alle Chromosomen mit beiden Zellpolen des Spindelapparates verbunden sind. Bei DNA-Schäden wird der Zellzyklus in der G_1 -oder G_2 -Phase arretiert oder die DNA-Synthese wird zeitlich gestreckt, um Reparaturvorgänge zu ermöglichen.

Jede Zelle entsteht durch Teilung ihrer Mutterzelle und bildet die Grundlage für Wachstums- und Differenzierungsvorgänge. Beim Zellteilungszyklus somatischer Zellen unterscheidet man die Teilungsphasen G_1 , S, G_2 und M von einer proliferatorischen Ruhephase, der sogenannten G_0 -Phase.

Der Zellteilungszyklus läuft nach einem einheitlichen Schema ab und gewährleistet die gleichmäßige Verteilung der genetischen Information der DNA auf zwei Tochterzellen. In der G_1 -Phase (engl.: G = gap, Ruhephase) erfolgt ein Zellwachstum und die Vorbereitung der DNA-Replikation. Jedes Chromosom besteht aus nur einer Chromatide. In der folgenden S-Phase (DNA-Synthesephase) entstehen aus den Ein-Chromatid-Chromosomen durch vollständige DNA-Verdopplung Zwei-Chromatide-Chromosomen. Dann schließt sich die G_2 -Phase an, die zwischen dem Abschluß der DNA-Replikation und der Mitose liegt. Die M-Phase (Mitose) kann man

wiederum in mehrere Stadien unterteilen: Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase.

In der Prophase beginnt die Kondensation der Chromosomen und der Nucleolus verschwindet. Die in der Interphase duplizierten Zentrosomen trennen sich und wandern zu den gegenüberliegenden Zellpolen. Zu Beginn der Metaphase erfolgt der Kernmembranabbau durch eine Dephosphorylierung der Kernmembran. Die Mikrotubuli können nun den Kernbereich durchdringen und am Kinetochor (Anheftungsstelle am Zentromer des Chromosoms) andocken. In der Metaphase werden die kondensierten Metaphasechromosomen durch die Mikrotubuli der Spindel, zwischen den Spindelpolen, in der Äquatorialebene ausgerichtet. Befinden sich alle Chromosomen in der Metaphasenplatte, ist die Metaphase abgeschlossen.

In der Anaphase werden die Zwei-Chromatiden-Chromosomen durch die Spindelfasern an die beiden gegenüberliegenden Spindelpole gezogen. In der sich anschließenden Telophase wird die Kernmembran neu gebildet und die Dekondensation der Chromosomen erfolgt.

Nach der M-Phase treten die Zellen in die G_1 -Phase ein. Ausdifferenzierte, nicht mehr teilungsfähige Zellen bleiben in dieser Phase, die dann G_0 -Phase (Ruhephase) genannt wird. Ausdifferenzierte, aber teilungsfähige Zellen treten nach dem Durchlauf der Mitose in die G_0 -Phase ein, aus der sie bei Bedarf reaktiviert werden und wieder in die G_1 -Phase zurückkehren. Durch diesen Zyklus wird die Zellproliferation gesteuert. G_1 -, S- und G_2 -Phase werden auch zusammengefaßt als Interphase bezeichnet (Alberts et al., 2002).

2.7 Verlauf und Regulation des Zentrosomenduplikationszyklus

Während des Zellzyklus erfolgt neben der DNA-Verdopplung auch eine Duplikation des Zentrosoms. Dieser Zyklus stellt sicher, dass sich das Zentrosom, mit den Zellzyklusphasen koordiniert, vor der Mitose verdoppelt hat (Hinchcliffe und Sluder, 2001). Der Verlauf des Zentrosomenzyklus ist eng an den Chromosomenzyklus gekoppelt. Die Zentrosomen werden, ähnlich den Ein-Chromatid-Chromosomen, im Verlauf des Zellzyklus dupliziert und

dann auf die Tochterzellen verteilt (Tsou und Stearns, 2006). Die Abbildung 2.2 stellt schematisch den Ablauf des Zentrosomenduplikationszyklus, koordiniert mit den Zellteilungsphasen (G_1 -Phase, S-Phase, G_2 -Phase und M-Phase), dar.

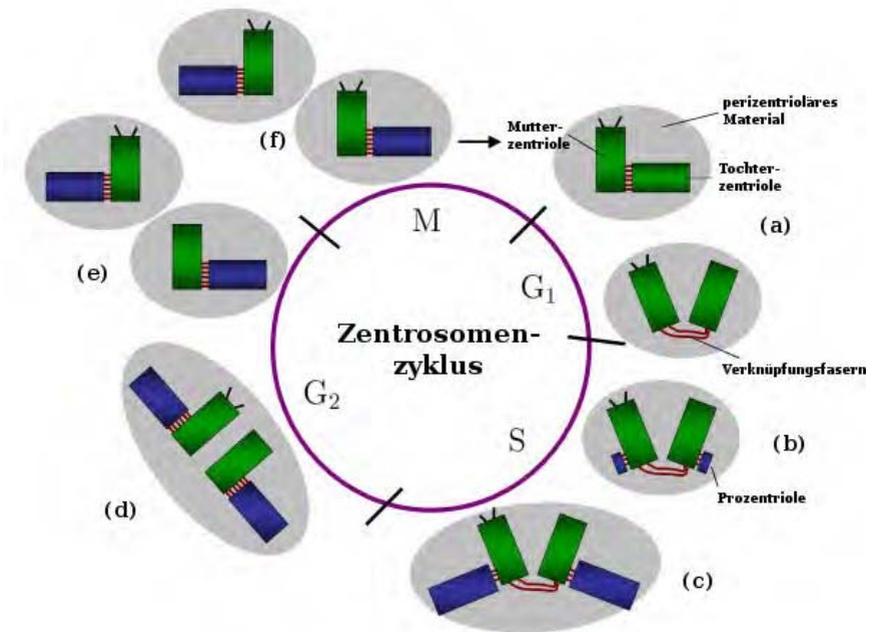


Abbildung 2.2: Zentrosomenduplikationszyklus
(modifiziert nach Crasta und Surana, 2006)

Bei eukaryotischen Zellen erfolgt in der späten G_1 -Phase die geringfügige Trennung der zwei rechtwinklig zueinander stehenden Zentriolen. Hierbei kommt es zu einer Lockerung der interzentriolären Verknüpfungsfasern am proximalen Pol der Zentriolen und eine Verdopplung des Zentrosoms kann eingeleitet werden (siehe Abb. 2.2 (a)). Dieser Vorgang (centrosome disorientation) wird durch den Cyclin E/Cdk2-Komplex gesteuert (Hinchcliffe und Sluder, 2002; Lacey et al., 1999). Der Cyclin E/Cdk2-Komplex phos-

phoryliert das Protein Nukleophosmin am Zentrosom, wodurch dieses dann vom Zentrosom dissoziiert und den Zentrosomenduplikationszyklus einleitet (Okuda et al., 2000; Bobiniec et al., 1998). In einer Studie wurde festgestellt, dass viele regulatorische Mechanismen existieren, die die Kontrolle über die Zentrosomenduplikation haben. Extrazelluläre Signale, wie zum Beispiel der epidermal growth factor (EGF), sind an der Initiation der Duplikation von Zentrosomen in der G_1 -Phase beteiligt (Balczon et al., 1995). Desweiteren wird das Retinoblastomprotein (Rb-Protein) durch den Cyclin E/Cdk2-Komplex phosphoryliert, wodurch der Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt wird. Dieser Transkriptionsfaktor aktiviert im Nukleus die Transkription von S-Phase-Genen, deren Proteine dann die DNA-Synthese und die Zentrosomenduplikation regulieren (Meraldi et al., 1999).

Nach Einleitung der Zentrosomenverdopplung (centrosome duplication), am G_1 -/S-Übergang (siehe Abb. 2.2 (b)), wächst am proximalen Pol der Mutterzentriole, eine neue Prozentriole aus.

Die für die Bildung der neuen Zentriole benötigten Proteine werden durch Dynein Mikrotubuli-abhängig zum Zentrosom transportiert.

Während der S-Phase wächst die neue Zentriole (centrosome elongation) und erreicht in der G_2 -Phase (siehe Abb. 2.2 (c)) ihre volle Größe.

Am G_2 -/M-Übergang erfolgt eine Expansion des perizentriolären Materials (PCM) und es werden Zentrosomenproteine phosphoryliert, damit Mikrotubuli der mitotischen Spindel um die Zentrosomen gebündelt werden können. Die Mutterzentriole weist am Ende dieser Phase subdistale Fortsätze (Satelliten) und distale Fortsätze auf. Dieser Schritt (siehe Abb. 2.2 (d)) ist als Reifung der Zentrosomen (centrosome maturation) anzusehen. Anschließend wird die Bindung zwischen den beiden Zentrosomen, vermittelt durch Protein c-Nap1, gelöst (siehe Abb. 2.2 (e)). Die Dissoziation des Proteins c-Nap1 vom Zentrosom wird durch die Nek2-Kinase ausgelöst, die c-Nap1 phosphoryliert (centrosome separation).

Die separaten Zentrosomen (siehe Abb. 2.2 (f)) werden nun zu den entgegengesetzten Zellkernseiten verlagert und später, während der Mitose, zu den entgegengesetzten Zellpolen, so dass die mitotischen Spindeln gebildet werden können (Meraldi und Nigg, 2002).

Um einen korrekten Ablauf sicherzustellen, unterliegt der Zentrosomenduplikationszyklus der Kontrolle des Zellteilungszyklus. Diese Kontrolle wird durch die heterodimeren Proteinkinasen Cyclin A/Cdk2 und Cy-

clin E/Cdk2 durchgeführt (Meraldi et al., 1999; Morgan, 1997). Zusätzlich spielen mehrere Struktur- und Regulatorproteine eine wichtige Rolle, wie zum Beispiel das Protein ϵ -Tubulin (Chang et al., 2003), außerdem die Phosphorylierung von Centrin-2 (Salisbury et al., 2002) sowie die Calcium-Calcmodulin Kinase II (Matsumoto und Maller, 2002). Für den Prozess der Zentrosomenreifung sind Phosphorylierungen von Proteinen der perizentriolären Matrix durch mitotische Kinasen, wie z. B. Cyclin B/Cdk1, essentiell.

Es ist festzuhalten, dass das zentrale Element der Regulation Phosphorylierungen von Proteinen sind, die auch für den exakten Ablauf des Zellteilungszyklus verantwortlich sind (Nigg, 2001).

Die exakte Verdopplung des Zentrosoms ist von enormer Bedeutung, da ansonsten Störungen dieses Zyklus schwere Folgen für die Genomstabilität hätten. Die Anwesenheit überzähliger Zentrosomen läßt die Wahrscheinlichkeit steigen, dass es zur Bildung multipolarer Spindeln mit einer anschließenden Chromosomenfehlverteilung auf die Tochterzellen kommt (Brinkley, 2001).

2.8 Zentrosomenhyperamplifikation in Tumoren: Vorkommen, Definition und Mechanismen

In Studien an humanen Tumoren wird der Zusammenhang zwischen chromosomaler Instabilität und Zentrosomenhyperamplifikation beschrieben, darunter in Zellen von Mammakarzinomen (D'Assoro et al., 2002; Linggle et al., 2002), Prostatakarzinomen (Pihan et al., 2001), Kolonkarzinomen (Ghadimi et al., 2000) und in hepatozellulären Karzinomen (Nakajima et al., 2004).

Auch Untersuchungen an verschiedenen Tumoren von Hunden (u. a. Osteosarkome, Chondrosarkome und Rhabdomyosarkome) konnten eine chromosomale Instabilität assoziiert mit einer Hyperamplifikation der Zentrosomen darstellen (Setoguchi et al., 2001).

Eine Studie von Miki et al. (2004) konnte ebenfalls eine solche Korrelation bei felineen Lymphomzelllinien feststellen.

Darüberhinaus wurden hyperamplifizierte Zentrosomen auch in frühen präkanzerogenen Veränderungen, z. B. bei Prostatahyperplasien oder benignen Kolontumoren festgestellt (Kayser et al., 2005; Pihan et al., 2001, 2003). Koutsami und seine Mitarbeiter (2006) untersuchten Lungenkarzinome. Numerische Zentrosomenalterationen wurden nicht nur bei fast einem Drittel (28,6%) der analysierten Tumoren gesehen, sondern auch im benachbarten Gewebe der Karzinome.

Eine in der G₀-, G₁-, S- und frühen G₂-Phase befindliche Zelle besitzt ein Zentrosom, welches sich aus zwei Zentriolen zusammensetzt. Dies ist ein Normalzustand.

Zwei Zentrosomen in einer Zelle sind ebenfalls als Normalzustand anzusehen, da Interphasekerne mit zwei Zentrosomen (späte G₂-Phase und M-Phase) während des Zentrosomenduplikationszyklus von entarteten Zellen nicht abzugrenzen sind.

Folglich wird unter dem Begriff Zentrosomenhyperamplifikation das Vorliegen von mehr als zwei Zentrosomen in einer Zelle verstanden.

Es werden mehrere Mechanismen diskutiert, die zu einer Zentrosomenhyperamplifikation in Tumoren führen können.

Zum einen könnte sich ein Zentrosom mehr als nur einmal während des Zentrosomenduplikationszyklus, welcher parallel zum Zellteilungszy-

klus abläuft, duplizieren.

Das Resultat einer solchen Reduplikation von Zentrosomen könnte zu einer geraden oder ungeraden Anzahl an Zentrosomen pro Zelle führen, da nicht zwangsläufig beide Zentrosomen eine erneute Verdopplung durchlaufen.

Zum anderen könnte bei Zellen die Zytokinese als letzter Schritt des Zellteilungszyklus ausbleiben. Die Folge ist nicht nur eine Zunahme der Zentrosomenanzahl pro Zelle, sondern auch eine daraus folgende Tetraploidie der Zelle (Nigg, 2002).

Eine weitere Möglichkeit stellt eine Störung der Zentriolenpaarbildung am Ende des Zentrosomenduplikationszyklus dar. Bei der Paarbildung von Mutterzentriole und der neugebildeten Tochterzentriole kann ein Zentriol dissoziieren und ein eigenständiges, individuelles Zentrosom bilden (Hut et al., 2003).

Eine vierte Erklärung besagt, dass eine Zentrosomenhyperamplifikation auch von azentriolär neugebildeten Zentrosomen herrühren könnte. Ein solches Phänomen wurde in somatischen Zellen von Vertebraten beobachtet, deren Zentrosomen experimentell zerstört wurden (Khodjakov et al., 2002). Die Zellfusion wird auch als eine Möglichkeit der Zentrosomenhyperamplifikation diskutiert. Je nach Zellteilungsphase der fusionierenden Zellen, resultiert eine überzählige Zentrosomenzahl/Zelle bzw. eine Polyploidie des Genoms daraus (Nigg, 2002). Eine durch Zellfusion induzierte Zentrosomenhyperamplifikation wurde in humanen Brustepithelzellen beobachtet (Shekhar et al., 2002).

Eine anormale Zentrosomenhyperamplifikation führt durch die Ausbildung multipler Spindelpole während der Mitose zu einer Chromosomenmissegregation. Die entstehenden Tochterzellen sind aneuploid (Fukasawa et al., 1996).

Zellen mit aberranter Zentrosomenhyperamplifikation (Anwesenheit von mehr als zwei Zentrosomen in einer Zelle) formen multiple, d. h. mehr als zwei Spindelpole. Zellen mit tripolaren Spindeln können eine Mitose vollenden. Einige der entstehenden Tochterzellen sind lebensfähig, obwohl schwere Aneuploidien vorliegen können. Andere Tochterzellen sterben aufgrund nachteiliger Chromosomenveränderungen ab, da überlebenswichtige Gene fehlen (Uetake und Sluder, 2004; Fukasawa, 2002).

2.9 Fibrosarkome der Katze

Das Fibrosarkom ist eine invasiv wachsende, metastasierungsfähige Fibroblastenwucherung und ist bei der Katze der häufigste maligne mesenchymale Hauttumor. Er geht von Fibroblasten aus und weist eine wechselnde Kollagenfaserbildung auf (Hendrick et al., 1998).

2.10 Einteilung der feline Fibrosarkome

In der Literatur werden die feline Fibrosarkome in vier Gruppen eingeteilt:

- FeSV-induzierte Fibrosarkome
- Vakzinationsstellen-assoziierte Fibrosarkome
- Intraokuläre posttraumatische Fibrosarkome
- Fibrosarkome unbekannter Ätiologie

2.10.1 FeSV-induzierte Fibrosarkome

Sie machen bei jungen, oft unter 3 Jahren alten Katzen 2 % aller Fibrosarkome aus. Das feline Sarkomvirus (FeSV) ist eine Mutante des FeLV, die sich nur bei anwesendem replikationsfähigem FeLV vermehren kann. Es entsteht aus einer Genomrekombination zwischen FeLV und der Wirtszelle (Hardy, 1981). FeLV-Provirus-DNA rekombiniert mit einem zellulären Protoonkogen (zelluläres onc-Gen), wodurch das feline Sarkomvirus entsteht. Dieses onc-Gen wird in das Genom von FeLV eingebracht, wobei andere Regionen (gag-Region, env-Region, pol-Region) verloren gehen (Hardy, 1980). Die Bildung von FeSV-induzierten Fibrosarkomen ist folglich nur bei Vorliegen einer FeLV-Infektion mit persistierender Virämie möglich (Kessler, 2000). Frühere Untersuchungen zeigten eine Korrelation von bis zu 50 % zwischen der Entstehung von Fibrosarkomen und dem Vorliegen einer FeLV-Infektion (Reinacher, 1987b).

2.10.2 Intraokuläre posttraumatische Fibrosarkome

Intraokuläre posttraumatische Fibrosarkome treten als die zweithäufigsten primär intraokulären Tumoren bei Katzen auf (Schäffer et al., 1997).

Bei intraokulären Traumata, welche eine Linsenruptur nach sich ziehen, proliferieren Spindelzellen im Linsenepithelbereich. Auch nach chirurgischen Eingriffen, z. B. im Rahmen einer Katarakt-OP, wobei es zu einer Ruptur der Linsenkapsel kommt, können post operationem intraokuläre Tumoren entstehen. Man geht in den oben genannten Fällen von einer autoimmunen granulomatösen Entzündung, einer sogenannten phakoklastischen Uveitis aus, welche als Reaktion auf ausgetretenes Linsenprotein entsteht (Zeiss et al., 2003; Dubielzig et al., 1990).

2.10.3 Fibrosarkome unbekannter Ätiologie

Fibrosarkome, deren Ätiologie unbekannt ist, d. h. Fibrosarkome ohne posttraumatische oder virale Genese und ohne Assoziation mit Impfungen, treten nach einer Studie von Ortmann (1986) mit einer Häufigkeit von 20 % auf. Meist sind es ältere Tiere, die solche Tumoren vor allem im Kopfbereich, an den Pfoten, im Bereich des Unterbauches oder an den Gliedmaßenenden aufweisen, ohne dass eine Geschlechts- oder Rassedisposition zu erkennen ist. Eine andere Studie gibt bei Fibrosarkomen unbekannter Ätiologie einen hohen Altersdurchschnitt von 10 Jahren an (Bleier, 2003).

Bleier (2003) teilt in ihrer Studie die Körperoberfläche einer Katze in Injektionsstellen-assoziierte und nicht Injektionsstellen-assoziierte Lokalisationen ein. 40 % der Hautoberfläche wird in der Regel von Tierärzten für Injektionen genutzt; 60 % werden zu den nicht Injektionsstellen-assoziierten Lokalisationen gerechnet. In ihrer Studie traten auf diesen 60 % aber nur 27 % der untersuchten Fibrosarkome auf. Folglich lagen 73 % der Fibrosarkome an Injektionsstellen-assoziierten Stellen. Stellt man die Behauptung auf, dass die gleiche Häufigkeit von nicht Injektionsstellen-assoziierten Fibrosarkomen in der gesamten Haut zu finden ist, so hat 1 von 4 Fibrosarkomen im Bereich der Injektionsstelle eine andere Ursache.

2.10.4 Vakzinationsstellen-assoziierte Fibrosarkome

Vakzinationsstellen-assoziierte Fibrosarkome kommen an typischen Injektionsstellen (seitliche Brustwand, Interscapular- und Nackenbereich, seitlich an den Hintergliedmaßen) vor. Das Risiko einer Tumorentstehung steigt mit der wiederholten Impfung an der gleichen Injektionsstelle signifikant an (Kass et al., 1993). 1987 wurde in Pennsylvania, USA, die bis dahin unübliche Tollwutimpfung für Katzen gesetzlich vorgeschrieben. Gleichzeitig wurde die vorher verwendete Lebendvakzine durch einen inaktivierten Impfstoff, der mit Adjuvantien versetzt ist, ersetzt. Nach Einführung dieser Impfpflicht nahm die Zahl entzündlicher Reaktionen an den typischen Injektionsstellen um mehr als 61 % zu. Die durch die Impfung entstandene chronische Entzündungsreaktion soll zu einer unkontrollierten Proliferation von Mesenchymzellen führen (Hendrick und Dunagan, 1991).

2.11 Feline Vakzinationsstellen-assoziierte Fibrosarkome und deren Prävalenz

Das Risiko der Entstehung eines Vakzinationsstellen-assoziierten Fibrosarkoms liegt zwischen 1:1000 und 1:10000 (Macy und Hendrick, 1996). Im Vereinigten Königreich, wo nicht routinemäßig gegen Tollwut geimpft wird, wird eine Häufigkeit von 0,21:10000 geimpften Katzen angenommen (Day, 2006). Eine eindeutige Angabe einer Prävalenzrate ist sehr schwierig. Nicht alle feline Fibrosarkome werden zur Untersuchung an pathologische Institute eingesandt oder eine pathologisch-histologische Untersuchung kann keine präzise Ursache nennen.

Die Prävalenz in der deutschen Katzenpopulation wird mit 1:1000 angegeben (Kessler, 2001). Die Zeitspanne von der Impfung bis zur Tumorentstehung wird von drei Monaten bis zu drei Jahren angegeben (Doddy et al., 1996).

Die Impfstoffe gegen Tollwut und felines Leukämievirus stehen besonders im Verdacht, eine Fibrosarkombildung an den jeweiligen Injektionsstellen zu fördern (Hendrick und Goldschmidt, 1991; Hendrick, 1998b). Adjuvantien werden zu inaktivierten Impfstoffen zugefügt, um die Immunantwort des Organismus zu verstärken. Aluminium, welches als Adjuvans in verschie-

denen inaktivierten Impfstoffen enthalten ist, läßt sich als phagozytiertes feingranuläres Material in Makrophagen nachweisen. In neueren Untersuchungen wurde in einigen Tumorzellen ebenfalls eine Aluminiumverbindung entdeckt (Madewell et al., 2001). Es wird in einigen Studien als auslösendes Agens angesehen (Couto et al., 2002; Hendrick et al., 1992). Es werden jedoch auch Fibrosarkome an vermeintlichen Injektionsstellen beschrieben, an denen die Katzen keine Impfung oder aluminiumfreie Impfstoffe erhalten haben (Kass et al., 1993, 2003).

Bleier (2003) teilt in ihrer Studie die Körperoberfläche einer Katze in Injektionsstellen-assoziierte und nicht Injektionsstellen-assoziierte Lokalisationen ein. 40 % der Hautoberfläche wird in der Regel von Tierärzten für Injektionen genutzt; 60 % werden zu den nicht Injektionsstellen-assoziierten Lokalisationen gerechnet. In ihrer Studie traten auf diesen 60 % aber nur 27 % der untersuchten Fibrosarkome auf. Folglich lagen 73 % der Fibrosarkome an Injektionsstellen-assoziierten Stellen. Stellt man die Behauptung auf, dass die gleiche Häufigkeit von nicht Injektionsstellen-assoziierten Fibrosarkomen in der gesamten Haut zu finden ist, so hat 1 von 4 Fibrosarkomen im Bereich der Injektionsstellen eine andere Ursache.

Man geht in letzter Zeit immer mehr dazu über, diese Tumoren, statt wie bisher als Vakzinationsstellen-assoziierte Fibrosarkome, als Injektionsstellen-assoziierte Fibrosarkome zu bezeichnen, da auch andere Noxen als tumorauslösende Faktoren diskutiert werden (Esplin et al., 1999). Die Applikation anderer Arzneimittel, wie z. B. Langzeitpenicilline, Methylprednisolon-Acetat oder auch Flohmittel (Lufenuron), kann bei empfänglichen Katzen an der Injektionsstelle die Bildung eines Fibrosarkoms auslösen (Gagnon, 2000).

In einer 2-jährige Studie von Kass et al. (1993) entwickelten 3,2 % der insgesamt 345 untersuchten Katzen innerhalb eines Jahres ein Fibrosarkom an einer typischen Vakzinationsstelle. Vier Katzen (1,2 %) hatten ein Langzeitpenicillin injiziert bekommen. Nur zwei dieser 4 Katzen sind zusätzlich geimpft worden. Bei den zwei nicht geimpften Katzen wurde das Langzeitpenicillin als tumorauslösender Faktor angenommen.

Kass et al. (2003) untersuchten 1600 Gewebeproben von Katzen, die histologisch als Hauttumoren (Fibrosarkome, Basalzelltumoren) identifiziert worden waren. Ziel dieser 3-jährigen Fallstudie war es festzustellen, ob unterschiedliche Impfpraktiken (wechselnde Impflokalisationen, verschiede-

ne Hersteller) einen Einfluß auf die Entstehung von Vakzinationsstellen-assoziierten Fibrosarkomen hätten. Die Studie ergab, dass Impfungen eine Komponente der Tumorigenese von Fibrosarkomen darstellen, aber sie sind nicht die alleinige Ursache. Die Vermutung einer zusätzlichen genetischen Prädisposition dieser Katzen wurde geäußert.

2.12 Numerische Chromosomenveränderungen bei felines Vakzinationsstellen-assoziierten Fibrosarkomen

Zellbiologische Untersuchungen feliner Fibrosarkome hinsichtlich numerischer und struktureller Chromosomenanomalien wurden in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts mehrfach durchgeführt.

In einer Studie wurden die Chromosomensätze von vier felines Fibrosarkomen untersucht. Alle Zelllinien dieser Tumoren zeigten eine genetische Heterogenität (Mayr et al., 1996).

Eine andere numerische Chromosomenanalyse (Mayr et al., 1991) fand eine statistische Verteilung der Chromosomenzahlen von 34 bis zu 115 Chromosomen pro Zelle, wobei 69,2 % der Zellen einen Chromosomensatz von zwischen 51 und 64 Chromosomen aufwiesen. Dabei fiel eine Häufung von Metaphasen mit 76 Chromosomen, einer Tetraploidie entsprechend, auf, wurde aber statistisch oder strukturanalytisch nicht weiter beschrieben.

Auch Kalat et al. (1991) fanden neben strukturellen Chromosomenanomalien eine chromosomale Hyperdiploidie in felines Fibrosarkomzellen. Alle untersuchten Zellen wiesen einen hyperdiploiden Chromosomensatz von 40 bis 46 Chromosomen pro Zelle auf.

Am Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen wurden im Rahmen eines anderen Promotionsverfahrens (Löhberg-Grüne, derzeit i. Abschluss) 5 feline Fibrosarkomzelllinien etabliert. Bei allen Zelllinien wurde eine chromosomale Instabilität (Aneuploidie) festgestellt, d. h. die Chromosomenzahl/Zelle war instabil.

2.13 Definitionen eines Zellklons

In der Literatur existieren verschiedene Definitionen eines Zellklons.

Eine Definition besagt, dass ein Klon eine Gruppe genetisch identischer Zellen ist, die aus einer Einzelzelle entstanden sind (King und Stansfield, 1990).

Die Definition nach Webber (1903) erklärt, dass ein Zellklon als eine Population von Zellen oder als ein Organismus anzusehen ist, der aus einer Einzelzelle durch Mitose entstanden ist. Diese Zellpopulation muss nicht genetisch homogen sein (Rieger et al., 1968).

Nach einer weiteren Definition von Secker-Walker (1985) besteht eine klonale Zellpopulation aus Zellen, die durch Mitose aus genau einer somatischen Vorläuferzelle hervorgegangen sind.

3 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die fünf etablierten Fibrosarkomzelllinien zytogenetisch zu charakterisieren und damit einen Beitrag zur Klärung genetischer Faktoren an der Entstehung von felines Fibrosarkomen zu leisten. Als Kontrollzelllinie dienten feline Hautfibroblasten.

Zunächst sollten die Zelllinien auf Klonierbarkeit untersucht werden. Hierzu sollte von jeder Zelllinie ein aus einer Zelle hervorgegangener Zellklon etabliert werden und dessen Chromosomenzahl/Zelle analysiert werden.

Die zu klärende Frage war, ob die Zellen einer klonal etablierten Zelllinie chromosomal stabil sind, das heißt, ob sie über Zellgenerationen hinweg eine konstante Chromosomenzahl pro Zelle aufweisen. Andernfalls, bei chromosomaler Instabilität, sollten die Zellen mittels Immunzytologie auf numerische Zentrosomenaberrationen untersucht werden, da auch bei felines Fibrosarkomen eine wie bei mehreren malignen humanen Tumoren beschriebene korrelative Beziehung zwischen chromosomaler Instabilität und Zentrosomenhyperamplifikation bestehen könnte.

Zytogenetische Studien von felines Fibrosarkomen in Bezug auf chromosomale Instabilität in Verbindung mit numerischen Zentrosomenaberrationen sind bisher nicht veröffentlicht worden.

4 Material und Methoden

Eine Auflistung der verwendeten Chemikalien, Lösungen, Geräte und weiteren Arbeitsmaterialien mit den Hersteller- und Bezugsangaben befindet sich im Anhang.

4.1 Zelllinien

4.1.1 Herkunft der Zelllinien

In dieser Studie wurde mit fünf verschiedenen permanenten Fibrosarkomzelllinien gearbeitet, die am Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen im Rahmen eines anderen Promotionsverfahrens (Löhberg-Grüne, derzeit i. Abschluss) etabliert worden sind. Als Ausgangsmaterial für diese Zelllinien dienten Fibrosarkome, die im Umkreis von 100 km um das Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen gesammelt wurden. Alle stammten von typischen Injektionsstellen bzw. Impflokalisationen (seitliche Brustwand, zwischen den Schulterblättern).

Die genaue Herkunft und die klinischen Daten der etablierten Zelllinien sind im Anhang in Tab 9.3 ausgewiesen.

Bei den in Kultur genommenen Tumoren handelt es sich um die adhären-ten Fibrosarkomzelllinien FS I, FS II, FS III, FS IV und FS V. Der Abschluss einer FeLV-Infektion erfolgte immunhistologisch (gp70 und p27) und durch Polymerase-Kettenreaktion ebenfalls im Rahmen des vorherigen Promotionsverfahrens (Löhberg-Grüne, derzeit i. Abschluss).

Zum Vergleich der Fibrosarkomzellen mit normalen Zellen wurde eine Kontrollzelllinie aus felines Hautfibroblasten gewählt, die in Zellkulturmedium, versetzt mit Dimethylsulfoxid (DMSO), eingefroren verfügbar war. Die Zellen wurden aus einem jungen Katzenfetus isoliert und nach dem in

Kap. 4.2.1 beschriebenem Verfahren kultiviert. Auch hier zeigte die immunhistologische und molekularbiologische Untersuchung auf FeLV-Antigen ein negatives Ergebnis (Löhberg-Grüne, derzeit i. Abschluss). Diese adhärente Zelllinie wird seit 2006 als permanente Zelllinie kultiviert. Die Passage 13 wurde für die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen eingesetzt.

4.2 Zellkulturtechnik

4.2.1 Zellkultivierung und Passagierung

Die untersuchten Zelllinien wurden mit dem unten aufgeführten Zellkulturmedium kultiviert. Alle 2-3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel bei allen Zelllinien. Vor jeder Zellpflege wurden die Zellen mikroskopisch hinsichtlich ihrer Zellmorphologie und Zelldichte kontrolliert. Alle Zellkulturlösungen wurden vor der Verwendung in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Zur Herstellung des Zellkulturmediums wurden 500 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) mit 5,5 ml Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) und 0,5 ml Gentamicin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) verwendet. Darüberhinaus wurden 56 ml inaktiviertes fetales Kälberserum (Foetal Bovine Serum, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) zugesetzt.

Beim Erreichen einer konfluenten Monolayer-Schicht wurden die Zellen passagiert.

Zunächst wurde das Zellkulturmedium abgesaugt. Dann wurden 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung (MP Biomedicals, North America, USA) in eine Zellkulturflasche gegeben und diese 10 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem Verbringen der Kulturflasche in die sterile Werkbank wurden die vom Flaschenboden abgelösten Zellen mit 3 ml Zellkulturmedium aufgenommen und in ein konisches Zentrifugenglas überführt. Nach der Zentrifugation der Zellsuspension (1600 x g, 4 °C, 5 min) wurde der Überstand abgesaugt. Durch Zugabe von 3 ml Zellkulturmedium wurde das Zellpellet resuspendiert. 5 ml Zellkulturmedium wurden in eine neue Zellkulturflasche gegeben und dann ein bis zwei Tropfen der resuspendier-

ten Zellsuspension hinzugegeben. Die Zellkulturflasche wurde anschließend verschlossen und in den Brutschrank zurückgelegt.

4.2.2 Kryokonservierung der Zellen

Zur Lagerung der Zellen in einem Stickstoffbehälter (flüssiger Stickstoff, $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) wurden diese mit einem Einfriermedium eingefroren. Für 10 ml Einfriermedium wurden 6,5 ml Zellkulturmedium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) mit 2,5 ml inaktiviertem fetalem Kälberserum (Foetal Bovine Serum, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) versetzt. Zusätzlich wurde 1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) hinzugegeben, welches die Kristallbildung inner- und außerhalb der Zelle verhindert. Die Zellen wurden nach der Zentrifugation ($1600 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 min, im Zellkulturmedium) mit dem Einfriermedium im Verhältnis 10:1 (Medium/Zellpellet) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde anschließend in Kryoröhrchen (1,8 ml Nunc Cryo Tubes, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden) überführt und über Nacht in einer Kryobox (Nalgene[®] Cryo $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ Freezing Container, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden) langsam auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Die anschließende Lagerung erfolgte in einem Kryocontainer mit flüssigem Stickstoff bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.3 Auftauen von Zellen

Die in Kryoröhrchen (1,8 ml Nunc Cryo Tubes, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden) eingefrorenen Zellen wurden im Wasserbad auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter ständiger Bewegung aufgetaut. 3 ml des auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmten Zellkulturmediums wurden mit einer Glaspipette zur aufgetauten Zellsuspension zugegeben. Die Zellsuspension wurde resuspendiert und anschließend zentrifugiert ($1600 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 min), um die Zellen vom zytotoxischen DMSO zu befreien. Der Überstand wurde abgesaugt. Schließlich wurden die Zellen in frischem Zellkulturmedium aufgenommen und in Zellkulturflaschen ausgesät.

4.3 Zellbiologische Methoden

4.3.1 Etablierung monoklonaler Zelllinien

Erforderliche Lösungen und Arbeitsmaterialien:

- konische Zentrifugenröhrchen (Becton Dickinson Labware Europe, Meylan Cedex, Frankreich)
- Standard Eppendorf Reaktionsgefäße (Eppendorf AG, 22339 Hamburg)
- 96 Well Polystyrol Zellkultur Microplatten (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen)
- 24 Well Zellkultur Multiwell Platten (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen)
- sterile Pipettenspitzen (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf)
- 0,36 % Trypanblaulösung (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- sterile Spritzenfilter (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Die Trypanblaulösung wurde in 0,9 % NaCl angesetzt und anschließend mit einem sterilen Spritzenfilter filtriert.

Vitalitätsbestimmung mit der Trypanblau-Methode

Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und der Anteil vitaler Zellen gleichzeitig mit der Trypanblau-Methode ermittelt.

Limited-Dilution-Klonierung

Aus der Vielzahl der Klonierungsmethoden für adhärente Zellen wurde für die vorliegende Arbeit die Limited-Dilution-Klonierung gewählt.

Aus der Stammkultur wurde eine Verdünnungsreihe so angelegt, dass rechnerisch in jede Vertiefung einer 96-Well-Microtiterplatte eine Einzelzelle zu liegen kommt, aus der ein Zellklon gezüchtet wird. Dazu wurde die Zellzahl pro ml Zellsuspension ermittelt (z. B. 100.000 Zellen/ml).

Dann wurde eine Verdünnungsreihe angelegt, wobei jede Verdünnungsstufe mit 1:10 angesetzt wurde. Jede Zellkonzentration wurde in konischen Zentrifugenröhrchen mit sterilen Pasteurpipetten vorsichtig gut durchgemischt. Das Ziel war eine Zellkonzentration von 100 Zellen/ml herzustellen.

Dann wurden in jede Vertiefung der 96-Well-Microtiterplatte 10 μ l der letzten Verdünnungsstufe einpipettiert.

Die Platte wurde sofort mit der Abdeckplatte verschlossen und lichtmikroskopisch auf das Vorhandensein einer einzelnen Zelle pro Vertiefung kontrolliert. Vertiefungen, in denen eindeutig eine Zelle lag, wurden markiert. Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, dass Zellpopulationen vorlagen, die jeweils von einer einzigen Ausgangszelle abstammten.

Anschließend wurden 200 μ l Zellkulturmedium (20 % fetales Kälberserum enthaltend) in jede Vertiefung gegeben. Die Platte wurde täglich daraufhin kontrolliert, ob aus der Einzelzelle eine Zellpopulation ausgewachsen war.

Jeden Tag wurden 4-5 μ l Zellkulturmedium (20 % fetales Kälberserum enthaltend) einpipettiert. Nach 3-4 Tagen erfolgte der erste komplette Mediumwechsel. Nach 14-21 Tagen, wenn die Zellpopulationen einen konfluenten Monolayer gebildet hatten, wurde das Zellkulturmedium abgesaugt. Dann wurden 35 μ l Trypsin-EDTA in jede Vertiefung gegeben, die Microtiterplatte verschlossen und für 5 min in den Brutschrank gelegt. Danach wurden die abgelösten Zellen mit 200 μ l Zellkulturmedium aufgenommen und in ein konisches Zentrifugenröhrchen überführt. Nach dem Zentrifugieren (1600 x g, 4 °C, 5 min) wurde der Überstand abgesogen und mit 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in eine Vertiefung einer 24-Well-Zellkultur Multiwell Platte gegeben. Zusätzlich wurden 2 ml frisches Zellkulturmedium mit 20 %-igem fetalem Kälberserum hinzugefügt. Täglich wurde die Platte kontrolliert und nach 3-4 Tagen erfolgte der erste Mediumwechsel. Nachdem ein konfluenter Monolayer vorlag, wurde nach oben beschriebem Vorgehen erneut passagiert und die Zellsuspension in eine 25 cm² Zellkulturflasche überführt.

Die weitere Zellpflege erfolgte wie in Kap. 4.2.1 beschrieben.

Subklonieren von Zelllinien

Die Subklonierung monoklonal etablierter Zellpopulationen erfolgte gemäß dem oben beschriebenen Verfahren (Kap. 4.3.1).

4.3.2 Chromosomenpräparation

Die Präparation der Chromosomen erfolgte nach der Methode von Barch (1991) mit der von Henegariu et al. (2001) beschriebenen Modifikation.

Um die Ausbeute mitotischer Zellen zu erhöhen, wurden die Zellen ca. 2 Stunden vor Präparationsbeginn, durch Zugabe von 50 µl Colchizin (Colcemid[®], Biochrom AG seromed, Berlin) in eine 25 cm² Kulturflasche, in der Metaphase des Zellzyklus arretiert. Zellen weisen in den Zellzyklusphasen eine unterschiedliche geometrische Beschaffenheit auf. In der Metaphase haften sie mit einer kugeligen Gestalt (anstatt einer spindelförmigen Gestalt mit Zytoplasmaausläufern) am Kulturflaschenboden. Durch diese kugelige Gestalt können sie leichter, z. B. durch das Einwirken einer mechanischen Kraft, von ihrer Unterlage entfernt werden.

Durchführung der Präparation:

1. Die Zellen wurden durch kräftiges Schlagen des Kulturgefäßes auf eine geeignete Unterlage (Buch mit halbfester Einbindung (z. B. ein Telefonbuch), ca. 500 Seiten) aus einer Höhe von ca. 50-60 cm vom Kulturgefäßboden abgelöst. Die Kraft war so zu bemessen, dass das Kulturgefäß nicht zerbrach.
2. Das Zellkulturmedium mit den darin befindlichen abgelösten Zellen wurde in ein konisches Zentrifugenröhrchen überführt. Die abgelösten Zellen wurden zentrifugiert (225 x g, 4 °C, 10 min). Danach wurde der Überstand abgesaugt.
3. Die Zellen wurden in hypotoner Lösung (0,075 M KCl, auf 37 °C vorgewärmt) zunächst resuspendiert und dann 10 min im 37 °C warmen Wasserbad inkubiert. Die Hypotonie führt auf osmotischem Weg zu einer Instabilität der Zellmembran.

4. Herstellung der Fixatorlösung:

- 75 ml 99,8 % Methanol (Rotipuran[®], Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) wurden
- 25 ml 100 % Essigsäure (Rotipuran[®], Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) zugesetzt und auf -20 °C gekühlt

5. Anschließend erfolgte ein erneutes Zentrifugieren (225 x g, 4 °C, 10 min).

6. Der Überstand wurde bis auf 1 ml abgesaugt. Danach erfolgte die erste Fixation mit dem oben beschriebenen Fixativ (bei Raumtemperatur, 10 min). Beim ersten Fixationsschritt wurde die Fixativlösung tropfenweise unter Schütteln zugegeben, um eine Zellverklumpung zu vermeiden. Nach der ersten 10-minütigen Fixierung erfolgte wieder eine Zentrifugation (225 x g für 10 min) und der Überstand wurde anschließend abgesaugt. Insgesamt wurden so 3 Fixierungen durchgeführt. Zwischen den Fixationsschritten wurden die Zellen immer wieder durch Zentrifugation (225 x g, 4 °C, 10 min) pelletiert und der Überstand abgesaugt. Nach dem letzten Fixationsschritt wurde der Überstand bis auf 0,5 ml abgesaugt und das Zellpellet darin resuspendiert.

7. Nach dem letzten Fixationsschritt wurde der Überstand bis auf 0,5 ml abgesaugt und das Zellpellet darin resuspendiert. Anschließend wurden 2 Tropfen der Zellsuspension nebeneinander auf trockene, fettfreie Glasobjektträger (auf -20 °C gekühlt) aufgetropft. Da bei -20 °C vorgekühlte Glasobjektträger Eiskristalle auf der Oberfläche aufweisen, platzen die aufgetropften Zellen leichter und die fixierten Metaphasenplatten werden frei.

8. Die Glasobjektträger wurden dann 2 s über ein auf 70 °C erhitztes Wasserbad gehalten, so dass die dehydrierten Chromosomen decondensierten. Zum Schluß wurde ein Tropfen 100 % Essigsäure (Rotipu-

ran[®], Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) am Rand des Glasobjektträgers aufgetropft. Die Essigsäure verursacht eine Denaturierung der Histone, eine Entfernung verbliebener Zytoplasmareste und bewirkt eine erneute Kondensation der Chromosomen. Sie wird am Rand des Glasobjektträgers aufgetropft, so dass sie nur noch eine abgeschwächte Wirkung in Chromosomennähe hat.

9. Die Glasobjektträger wurden bei Raumtemperatur luftgetrocknet und anschließend mit Hilfe eines Lichtmikroskops auf die Anwesenheit von Metaphasenplatten und gespreiteten Chromosomen mit 100- bis 400-facher Vergrößerung überprüft.

4.3.3 Giemsa-Färbung

Die luftgetrockneten Präparate wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 100 %) jeweils 2 min bei Raumtemperatur dehydriert und anschließend wieder luftgetrocknet.

Giemsa ist ein Gemisch aus verschiedenen Thiazinfarbstoffen und Eosin Y. Diese Kombination färbt Chromatin einheitlich im Ganzen rot-violett an.

Vor der Durchführung der Giemsa-Färbung wurden zwei Lösungen hergestellt.

1. Herstellung der Sörensen A-Lösung:
 - 4,539 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4 , Merck, Darmstadt) in 500 ml Aqua bidestillata
2. Herstellung der Sörensen B-Lösung:
 - 5,938 g Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, Merck, Darmstadt) in 500 ml Aqua bidestillata

Durchführung der Giemsa-Färbung:

1. Die Metaphasenpräparate wurden in eine Färbeküvette eingestellt.

2. Zur Herstellung der Färbelösung wurden je 50 ml Sörensenlösung A und B vermischt. Diese Lösung hatte einen pH-Wert von 6,8. Anschließend wurden 4 ml Giemsa-Stammlösung (Merck, Darmstadt) hinzugegeben.
3. Die Färbelösung wurde in die Färbeküvette eingefüllt; hierbei sollten die Präparate vollständig mit Giemsa-Färbelösung bedeckt sein.
4. Es erfolgte eine Inkubationszeit von 4 bis 5 min.
5. Die Färbelösung wurde mit Leitungswasser aus der Färbeküvette gründlich ausgespült.
6. Nach der Färbung erfolgte eine Lufttrocknung und anschließend eine dauerhafte Eindeckung mit Eukitt[®] (O. Kindler, Freiburg i. Br.) und einem Deckgläschen.

4.3.4 Metaphasenauswertung

Die numerische Auswertung der Chromosomenzahl pro Metaphasenplatte erfolgte im Hellfeldlichtmikroskop (E. Leitz, Orthoplan Mikroskop). Ein Grünfilter (546 nm) wurde zur Kontrastverstärkung verwendet. Die Untersuchung erfolgte mit einem 100er Öl-Immersionsobjektiv.

4.3.5 Fotografie und Bildbearbeitung

Die Metaphasen wurden digital (Nikon, Coolpix 4500) aufgenommen. Die Bilder wurden anschließend mit einem Bildbearbeitungsprogramm (Adobe Photoshop CS, Adobe Systems incorporated) in Bezug auf Helligkeit und Kontrast bearbeitet.

4.4 Immunzytologische Methoden

Eine Auflistung der verwendeten Chemikalien, Lösungen, Puffer und weiteren Arbeitsmaterialien mit den Hersteller- und Bezugsangaben befindet sich im Anhang.

4.4.1 Probenvorbereitung zur Ermittlung der Zentrosomenausstattung

Zur Untersuchung der Zentrosomenausstattung der adhärent wachsenden Zellen wurden diese auf vierfach gekammerten Kulturkammerobjektträgern (Chamber Slides, Lab-Tek[®] II mit Deckel, Nalge Nunc International Corp., Naperville, USA) mit Deckel ausgesät und unter Standard-Zellkulturbedingungen inkubiert (siehe Kap. 4.2.1). Der Zellrasen wurde lichtmikroskopisch täglich auf seine Dichte kontrolliert. Vor dem Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen fixiert. Hierzu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 99,8 % Methanol (auf -20 °C vorgekühlt) für 10 min fixiert. Anschließend wurde das Fixationsmittel abgesaugt und die Zellen mit Aceton (auf -20 °C vorgekühlt) für 1 min fixiert. Nach erneutem Absaugen des Fixationsmittels wurden die Objektträger, nachdem die Kulturkammer-Aufsätze abgenommen wurden, zum Trocknen bei Raumtemperatur aufgestellt. Die so vorbereiteten Zellen konnten nun bis zur weiteren Verarbeitung im Kühlschrank (4-8 °C) gelagert werden.

4.4.2 Verwendete Antikörper

Der Primärantikörper zum Nachweis von γ -Tubulin, dem Hauptprotein der Zentrosomen ist ein monoklonaler Antikörper aus der Maus (monoclonal anti- γ -Tubulin, CLONE GTU-88, Sigma-Aldrich, Steinheim). Er wurde 1:800 in TBS/BSA-Lösung (1 %) verdünnt eingesetzt. Der Sekundärantikörper (Cy3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L), Dianova GmbH, Hamburg) wurde 1:800 in TBS-Gebrauchslösung verdünnt eingesetzt.

Kontrollen der immunzytologischen Untersuchungen

Um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers zu erkennen, wurden Negativkontrollen angefertigt. Hierzu wurde die indirekte Immunfluoreszenz (siehe Kap. 4.4.4) ohne Zusatz des Primärantikörpers durchgeführt. Es wurden pro Objektträgerfeld 100 μ l TBS/BSA-Lösung (1 %) aufgetragen.

4.4.3 Fluoreszenz-Kernfarbstoff

Um eine eindeutige Zuordnung der Zentrosomen, die Kernmembran-assoziiert liegen, zu erreichen, wurden die Zellkerne mit Sybr Green (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) dargestellt. Sybr Green ist ein Fluorochrom, das spezifisch in die DNA-Helix interkaliert und so den Zellkern anfärbt. Eine 1:10.000 Verdünnung (in TBS-Gebrauchslösung) wurde gewählt.

4.4.4 Versuchsdurchführung

Die Untersuchung der Zentrosomenausstattung erfolgte mittels der indirekten Immunfluoreszenz entsprechend den Angaben von Miki et al. (2004).

Durchführung:

1. Die fixierten, vierfach gekammerten Kulturkammerobjektträger (Chamber Slides, Lab-Tek[®] II mit Deckel, Nalge Nunc International Corp., Naperville, USA) wurden aus dem Kühlschrank genommen und 5 min in eine Standküvette mit TBS-Gebrauchslösung gestellt.
2. Um eine Permeabilisierung der Zellen mit Hilfe eines Detergens zu erreichen, wurden die Kulturkammerobjektträger für 12 min bei 37 °C in eine Standküvette mit 1 % Nonidet P-40-Lösung gestellt.
Für die folgenden Arbeitsschritte wurden die Kulturkammerobjektträger in eine lichtgeschützte feuchte Kammer gelegt.
3. Zur Entfernung des Detergens wurden die Zellen dreimal für je 5 min mit TBS-Gebrauchslösung gewaschen.
4. Es folgte eine Inkubation mit der Blockierungslösung (40 % Schweineserum in TBS-Gebrauchslösung angesetzt) für 1 Stunde bei Raumtemperatur.
5. Negativkontrollen: auf eines der vier Objektträgerfelder wurden anstatt der Primärantikörperlösung 100 µl TBS/BSA-Lösung (1 %) aufgetragen.

6. Die Primärantikörperlösung wurde mit je 100 μl auf die anderen drei Objektträgerfelder aufgetragen.
7. Die Inkubation der Zellen mit der Primärantikörperlösung erfolgte 24-30 Stunden bei 4 °C.
8. Zur Entfernung der Primärantikörperlösung wurden die Zellen dreimal für je 5 Minuten mit TBS-Gebrauchslösung gewaschen.
9. Der Sekundärantikörper wurde in TBS-Gebrauchslösung angesetzt; die Inkubation erfolgte für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur.
10. Zur Entfernung der Sekundärantikörperlösung wurden die Zellen dreimal für je 5 Minuten mit TBS-Gebrauchslösung gewaschen.
11. Nach dem Auftragen des Fluoreszenz-Kernfarbstoffs (Sybr Green) erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur.
12. Anschließend wurden die Zellen dreimal für je 5 Minuten mit TBS-Gebrauchslösung gewaschen.
13. Zum Schluß wurden die Präparate in 40 μl Einbettmedium (Fluoromount for microscopy, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) mit einem Deckglas (Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde) eingeschlossen.

Die Fluoreszenzpräparate wurden in einer lichtgeschützten Präparatebox bei 4 °C aufbewahrt. Sie sollten zunächst horizontal gelagert werden, da das Einbettmedium erst nach 24 Stunden vollständig ausgehärtet ist.

4.4.5 Fotografie und Bildbearbeitung

Die Fluoreszenzpräparate wurden mit einem Universalmikroskop Axioplan 2 in Epifluoreszenz untersucht. Dazu wurden je nach Fluoreszenzfarbstoff die entsprechenden Filtersätze verwendet (siehe Kap. 4.4.6). Zur Bilddokumentation wurde eine Kompakt-Digitalkamera (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen) mit entsprechender Software (Axio Vision Release 4.6, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen) verwendet. Die Cy3-gekoppelten Antikörper werden durch gefiltertes Licht mit einer Wellenlänge

von 549 nm angeregt und emittieren rotes Licht der Wellenlänge 562 nm. Die Anregung des Kernfarbstoffes SybrGreen erfolgte durch gefiltertes Licht einer Wellenlänge von 498 nm. Er emittiert grünes Licht einer Wellenlänge von 522 nm. Gleiche Bildausschnitte wurden mit beiden Filtern fotografiert und übereinander projiziert. Dadurch konnte die Kernmembran-assoziierte Lage der Zentrosomen von einer davon abweichenden Lage unterschieden werden.

Die Bilder wurden hinsichtlich Kontrast- und Helligkeit mit Hilfe eines Bildbearbeitungsprogramms (Adobe Photoshop CS) bearbeitet.

4.4.6 Technische Ausrüstung

- Fluoreszenzmikroskop:
Universalmikroskop Axioplan 2 mit selektiven Filtersätzen (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena)
 - für Cy3:
Zeiss Filtersatz 43, Excitation BP 545/25, Strahlenteiler FT 570, Emission BP 605/70
 - für Sybr Green:
Zeiss Filtersatz 09, Excitation BP 450-490, Strahlenteiler FT 510, Emission LP 520
- Kamera:
Kompakt-Digitalkamera mit Filtergewinde (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen)
 - Software: Axio Vision Release 4.6 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen)

4.5 Statistische Auswertung

Die Zellen einer Zelllinie wurden hinsichtlich ihrer Chromosomenzahl/Zelle beurteilt. Anschließend wurde dieses Merkmal bei allen Zelllinien mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft.

Es zeigte sich, dass die Chromosomenzahlverteilung aller Zelllinien nicht normalverteilt ist, sondern einer rechtsschiefen Verteilung folgt.

Verschiedene Transformationsverfahren (logarithmische Transformation; Kehrwert- bzw. reziproke Transformation) wurden eingesetzt, um näherungsweise eine symmetrische Verteilung der Daten zu erreichen.

Da die Abweichung von der Normalverteilung durch die oben genannten Transformationsverfahren nicht aufgehoben werden konnte, wurden für sämtliche statistische Auswertungen nicht-parametrische (verteilungsfreie) statistische Testverfahren angewandt.

Zum Vergleich der mittleren Chromosomenzahl/Zelle zwischen verschiedenen Zelllinien wurde ein nicht-parametrisches Rangsummenverfahren, der sogenannte Kruskal-Wallis-Test (H-Test), angewandt.

Im Falle von signifikanten globalen Unterschieden zwischen den Stichproben, wurden anschließend die Stichproben paarweise untereinander verglichen. Zu diesem Zweck wurde der multiple paarweise (post hoc) Vergleich nach Nemenyi verwendet. Auch hier handelt es sich um ein nicht-parametrisches Rangsummenverfahren.

Die Datenbeschreibung der erhobenen Variablen erfolgte durch die Angabe der Mediane, der Quartile (Q_1 und Q_3) sowie der Minima (x_{min}) und Maxima (x_{max}) mit der Darstellung im Box-und-Whisker Plot (Lorenz, 1996).

Als ergänzende Fragestellung wurde die Prüfung auf Varianzgleichheit der voneinander unabhängigen Stichproben mit dem Levene-Test untersucht.

Es wird die Nullhypothese, dass alle Varianzen gleich sind, gegen die Alternativhypothese (mindestens eine Stichprobe unterscheidet sich bezüglich der Varianz von den anderen) geprüft. Dieser Test ist auch auf deutlich schief verteilte Stichproben anwendbar (Sachs, 1992).

Das Signifikanzniveau wurde generell auf $\alpha = 0,05$ festgelegt, d. h. Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant und Werte mit $p < 0,0001$ als hochsignifikant beurteilt. Zusätzlich wird – wenn möglich – der exakte p-Wert angegeben.

Die Untersuchung auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Zentrosomenhyperamplifikation und chromosomaler Instabilität erfolgte mit einer Korrelationsanalyse (Programm BMDP6D).

Da die vorliegenden Werte keiner Normalverteilung folgen, ist die Anwendung der Korrelationsanalyse nach Pearson nicht möglich. Aus diesem Grunde wurde der Rangkorrelationstest nach Spearman errechnet. Dieser

Test ist, wie andere nicht-parametrische Verfahren, stabiler gegen vorhandene Ausreißerwerte.

Das Tabellenkalkulationsprogramm EXCEL (Microsoft) für Windows XP diene der Datenerfassung und für einfache Datenbeschreibungen.

Die Diagramme wurden mit dem Programm PlotIT für Windows, Version 3.20b (Eisensmith, 1994) sowie sowie mit Gnuplot, Version 4.2.3, erstellt.

Die Datenauswertung erfolgte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung der Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Veterinärmedizin. Die statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe des Statistikprogrammpakets BMDP/Dynamic, Release 7.0 (Dixon, 1993) durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 Etablierung monoklonaler Zelllinien

5.1.1 Klonierung der felines Fibrosarkomzelllinien und der Kontrollzelllinie

Von allen Zelllinien konnten monoklonale Zellpopulationen etabliert werden.

Die Klonierungsergebnisse der Fibrosarkomzelllinien und der Kontrollzelllinie sind in Tabelle 5.1 detailliert aufgelistet.

Zelllinie	Adh. + Prolif.	nur Adh.	keine Adh.	n. verw. Wells
FS I	4 (4,5 %)	4	80	8
FS II	2 (2,2 %)	5	82	7
FS III	3 (3,5 %)	8	76	9
FS IV	3 (3,4 %)	5	81	7
FS V	2 (2,2 %)	4	85	5
K	10 (11,5 %)	15	62	9

Tabelle 5.1: Klonierungseffizienz der Zelllinien

Die Anzahl der Vertiefungen einer 96-Well-Mikrotiterplatte, in denen Zellen angewachsen und proliferiert (Adh. + Prolif.)/nur angewachsen (nur Adh.)/nicht angewachsen (keine Adh.)/sind.

Darüberhinaus gab es auch Wells, die keine Zelle oder ≥ 2 Zellen enthielten (n. verw. Wells). Es wurden nur die Wells mit einer Einzelzelle weiter kultiviert.

Erläuterung der Abkürzungen:

Adh.: Adhärenz; Prolif.: Proliferation; FS: Fibrosarkomzelllinie; K: Kontrollzelllinie

In den Vertiefungen, in denen keine monoklonale Zellpopulation auswuchs, ließen sich zwei verschiedene Beobachtungen festhalten:

- Variante 1: Die Einzelzelle heftete sich nach spätestens 15 Minuten an. Nach etwa 1-2 h waren langgestreckte Zellausläufer lichtmikroskopisch zu erkennen. Die tägliche lichtmikroskopische Betrachtung zeigte nach einigen Tagen, dass sich bei diesen Einzelzellen ein Sistieren des Zellwachstums (Zellgröße und Zellteilung) einstellte und die Zelle abstarb.
- Variante 2: Die einzelne Zelle heftete sich erst gar nicht an den Boden der Vertiefung an, sondern war nach 15 min, 3 h, 6 h, 18 h und auch nach 24 h noch immer als runder Zelleib, ohne Zellausläufer, am Boden der Platte zu erkennen.

5.1.2 Subklonierung aller Zelllinien

Von jeder Fibrosarkomzelllinie wurde eine monoklonal etablierte Zellpopulation ausgewählt und subkloniert.

Diese Subklonierung erfolgte gemäß dem beschriebenen Verfahren (siehe Kap. 4.3.1). Es war möglich, von allen Zelllinien Subklone zu etablieren.

Die Tabelle 5.2 gibt eine detaillierte Übersicht der Subklonierungsergebnisse der Zelllinien.

In den Vertiefungen, in denen keine monoklonale Zellpopulation auswuchs, ließen sich auch hier wieder die gleichen Beobachtungen festhalten, die schon in Kap. 5.1.1 beschrieben worden sind.

Von jeder Zelllinie wurde eine subklonierte Zellpopulation ausgewählt und für die weiteren zytogenetischen Untersuchungen verwendet.

Die monoklonalen Zelllinien wurden im weiteren Verlauf als Fibrosarkomzelllinie FS I.1, FS II.1, FS III.1, FS IV.1 und FS V.1 bezeichnet. Die monoklonale Zellpopulation der Kontrollzelllinie trug nun den Namen K.1.

Die Zelllinien befanden sich seit 2005 in Zellkultur und zeigten ein unverändert stabiles Wachstum.

Zelllinie	Adh. + Prolif.	nur Adh.	keine Adh.	n. verw. Wells
FS I	5 (5,6 %)	3	81	7
FS II	2 (2,2 %)	6	80	8
FS III	4 (4,4 %)	8	79	5
FS IV	3 (3,5 %)	8	76	9
FS V	2 (2,4 %)	5	78	11
K	8 (10,0 %)	20	60	8

Tabelle 5.2: Subklonierungseffizienz der Zelllinien

Anzahl der Vertiefungen einer 96-Well-Mikrotiterplatte, in denen Zellen angewachsen und proliferiert (Adh. + Prolif.)/nur angewachsen (nur Adh.)/nicht angewachsen (keine Adh.) sind.

Darüberhinaus gab es auch Wells, die keine Zelle oder ≥ 2 Zellen enthielten (n. verw. Wells). Es wurden nur die Wells mit einer Einzelzelle weiter kultiviert.

Erläuterung der Abkürzungen:

Adh.: Adhärenz; Prolif.: Proliferation; FS: Fibrosarkomzelllinie; K: Kontrollzelllinie

5.2 Zytogenetische Charakterisierung der Fibrosarkomzelllinie FS I.1

5.2.1 Chromosomenanalyse der Fibrosarkomzelllinie FS I.1

Aus der Passage 118 der Zelllinie FS I.1 wurden insgesamt 71 Metaphasen hinsichtlich ihrer Chromosomenzahl pro Zelle ausgewertet. Die Anzahl der Chromosomen variierte dabei zwischen 26 und 130 Chromosomen/Zelle. Der Medianwert lag bei 44 Chromosomen/Zelle.

5.2.2 Zentrosomenuntersuchung der Fibrosarkomzelllinie FS I.1

Die immunzytologische Untersuchung von 151 Zellen zeigte, dass 15,3 % der ausgezählten Zellen mehr als 2 Zentrosomen aufwiesen. Die genaue Zentrosomenzahl pro Zelle ist in Abb. 5.2 dargestellt.

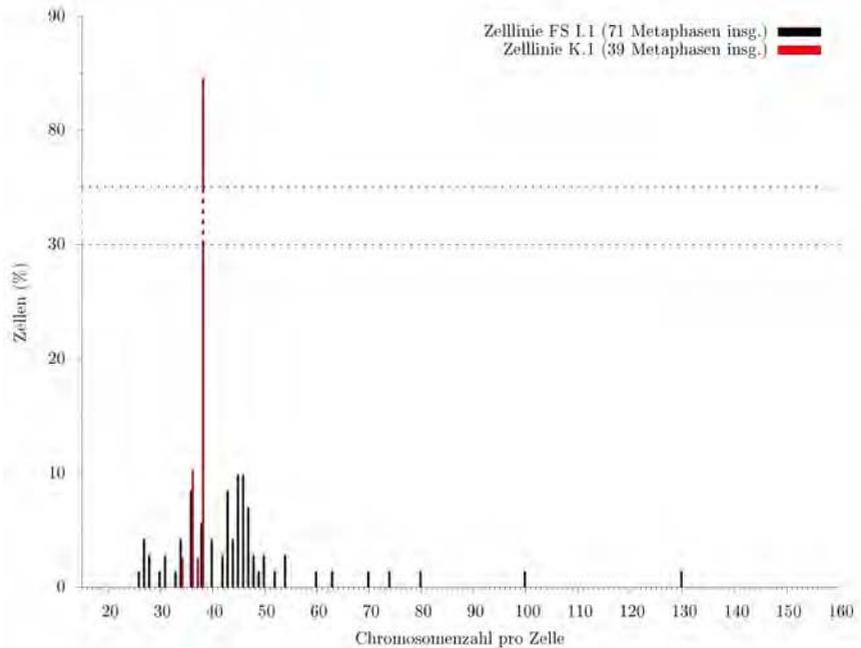


Abbildung 5.1: Chromosomenzahl in verschiedenen Zellen von FS I.1 und K.1

5.3 Zytogenetische Charakterisierung der Fibrosarkomzelllinie FS II.1

5.3.1 Chromosomenanalyse der Fibrosarkomzelllinie FS II.1

Bei der Fibrosarkomzelllinie FS II.1 wurden 60 Metaphasen ausgezählt. Diese Metaphasen stammten aus den Passagen 28, 37 und 65. Die Metaphasenauswertung der untersuchten Zellen zeigte eine Spannweite von 19 bis 73 Chromosomen pro Zelle. Der Medianwert lag bei 42 Chromosomen pro Zelle.



Abbildung 5.2: Zentrosomenzahl/Zelle der feline Fibrosarkomzelllinie FS I.1

5.3.2 Vergleich der Passagen P 28, P 37 und P 65 der FS II.1

Bei der Fibrosarkomzelllinie FS II.1 stammten die 112 ausgezählten Metaphasen aus den 3 verschiedenen Passagen 28, 37 und 65. Der Medianwert der Passage 28 lag bei 40 Chromosomen pro Zelle. Die Passage 37 wies einen Medianwert von 38 Chromosomen pro Zelle auf, wohingegen der Median der Passage 65 bei 49 Chromosomen pro Zelle lag.

Die Medianwerte der 3 Passagen der Fibrosarkomzelllinie II.1 lagen zwischen 38 und 49 Chromosomen/Zelle. Mittels des Kruskal-Wallis-Tests konnte im Hinblick auf die mittlere Chromosomenzahl/Zelle ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Passagen berechnet werden ($p = 0,001$). Die Streuung der Chromosomen innerhalb dieser Zelllinie umfaßte sowohl hypo- als auch hyperdiploide Metaphasenplatten. Deren Untersuchung auf Varianzgleichheit ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p = 0,16$, Levene-Test).

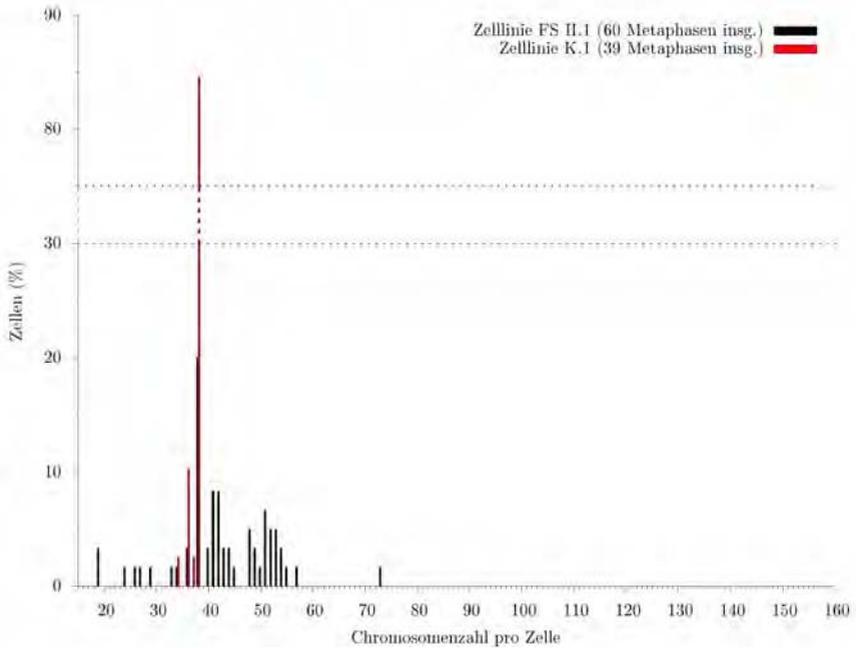


Abbildung 5.3: Chromosomenzahl in verschiedenen Zellen von FS II.1 und K.1

5.3.3 Zentrosomenuntersuchung der Fibrosarkomzelllinie FS II.1

155 Fibrosarkomzellen wurden hinsichtlich ihrer zentrosomalen Ausstattung ausgewertet. 12,2 % der Zellen wiesen mehr als 2 Zentrosomen pro Zelle auf. Eine detaillierte Zentrosomenauswertung ist in Abb. 5.5 dargestellt.

5.3 Zytogenetische Charakterisierung der Fibrosarkomzelllinie FS II.1

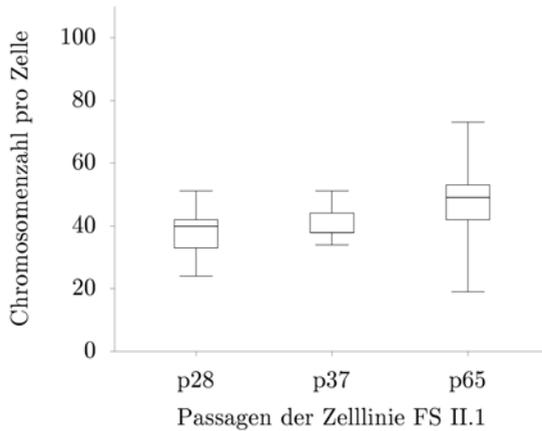


Abbildung 5.4: Box-and-Whisker-Plot zur vergleichenden Darstellung der Chromosomenzahl pro Zelle aus verschiedenen Passagen von FS II.1.



Abbildung 5.5: Zentrosomenzahl/Zelle der feline Fibrosarkomzelllinie FS II.1

5.4 Zytogenetische Charakterisierung der Fibrosarkomzelllinie FS III.1

5.4.1 Chromosomenanalyse der Fibrosarkomzelllinie FS III.1

Bei der Fibrosarkomzelllinie FS III.1 wurden aus der Passage 53 insgesamt 112 Zellen hinsichtlich ihrer Chromosomenzahl/Zelle untersucht. Die Anzahl der Chromosomen pro Zelle variierte dabei von 21 bis 155. Der ermittelte Medianwert lag bei 58 Chromosomen pro Zelle.

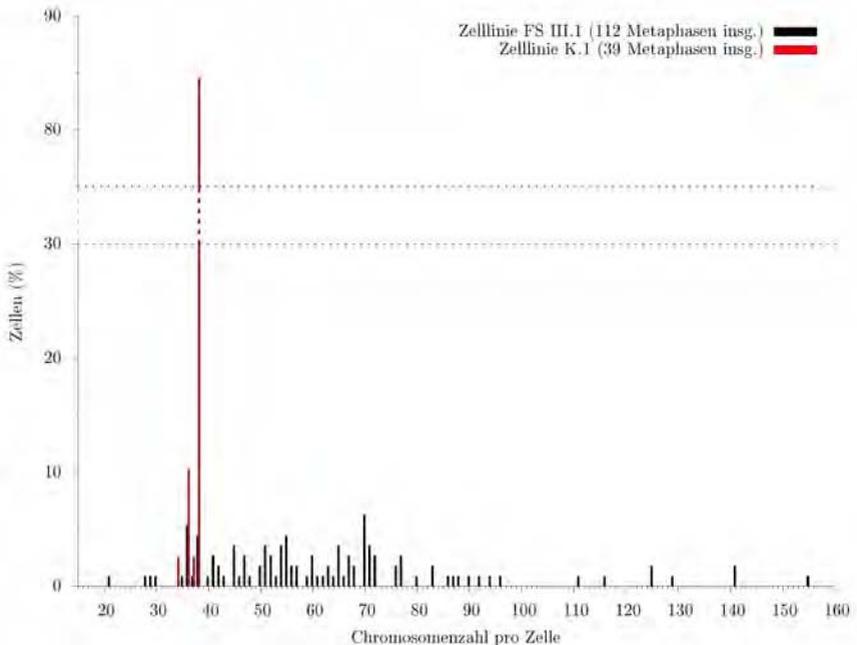


Abbildung 5.6: Chromosomenzahl in verschiedenen Zellen von FS III.1 und K.1

5.4.2 Zentrosomenuntersuchung der Fibrosarkomzelllinie FS III.1

Die immunzytologische Untersuchung von 155 Zellen zeigte, dass 5,8 % der ausgezählten Zellen mehr als 2 Zentrosomen aufwiesen. Die genaue Zentrosomenzahl pro Zelle ist in der Abb. 5.7 dargestellt.



Abbildung 5.7: Zentrosomenzahl/Zelle der feline Fibrosarkomzelllinie FS III.1

5.5 Zytogenetische Charakterisierung der Fibrosarkomzelllinie FS IV.1

5.5.1 Chromosomenanalyse der Fibrosarkomzelllinie FS IV.1

Aus den Passagen 21 und 66 der Zelllinie IV.1 wurden insgesamt 63 Metaphasen hinsichtlich ihrer Chromosomenzahl pro Zelle ausgewertet. Die Anzahl der Chromosomen variierte dabei zwischen 23 und 105 Chromosomen pro Zelle. Der Medianwert lag bei 48 Chromosomen pro Zelle.

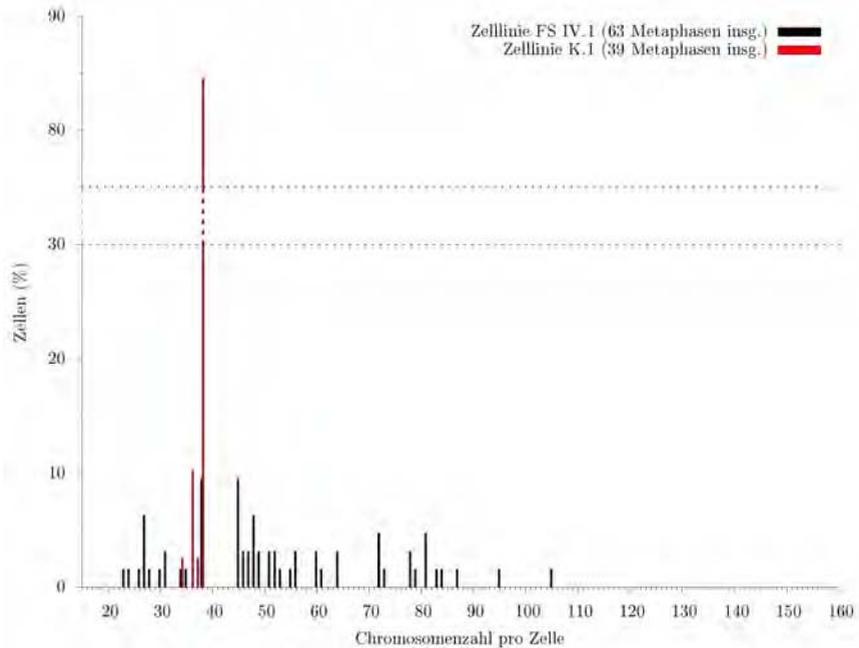


Abbildung 5.8: Chromosomenzahl in verschiedenen Zellen von FS IV.1 und K.1

5.5.2 Vergleich der Passagen P 21 und P 66 der FS IV.1

Die 63 ausgezählten Metaphasen der Fibrosarkomzelllinie FS IV.1 stammten aus den Passagen: 21 und 66. Der Medianwert der P 21 lag bei 56 Chromosomen pro Zelle, der Median der P 66 bei 46 Chromosomen pro Zelle.

Mittels des Kruskal-Wallis-Tests konnte im Hinblick auf die mittlere Chromosomenzahl/Zelle ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Passagen berechnet werden ($p = 0,004$). Die Streuung der Chromosomen innerhalb dieser Zelllinie umfaßte sowohl hypo- als auch hyperdiploide Metaphasenplatten. Deren Untersuchung auf Varianzgleichheit ergab einen

statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,006$, Levene-Test).

Die vergleichende Darstellung der ausgezählten Metaphasen der verschiedenen Passagen ist im nachfolgenden Box-and-Whisker-Plot dargestellt.

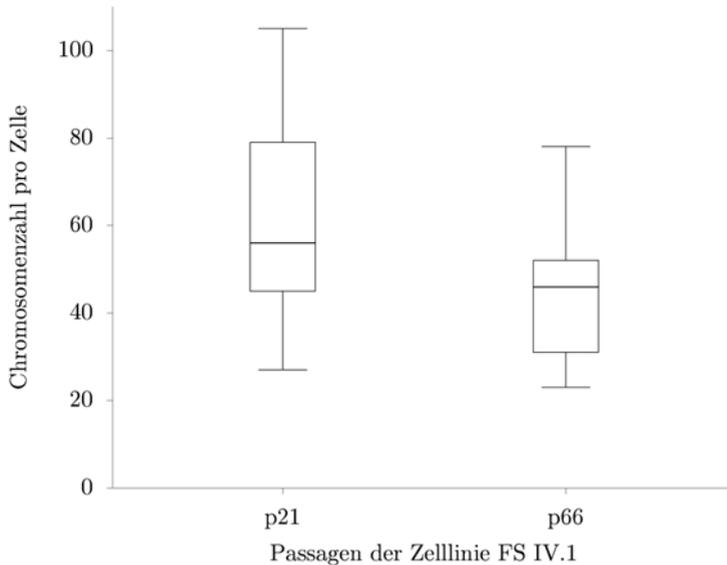


Abbildung 5.9: Box-and-Whisker-Plot zur vergleichenden Darstellung der Chromosomenzahl pro Zelle aus verschiedenen Passagen.

5.5.3 Zentrosomenuntersuchung der Fibrosarkomzelllinie FS IV.1

159 Fibrosarkomzellen wurden hinsichtlich ihrer zentrosomalen Ausstattung ausgewertet. 6,9 % der Zellen wiesen mehr als 2 Zentrosome pro Zelle auf. Eine detaillierte Zentrosomenauswertung ist in der Abb. 5.10 dargestellt.



Abbildung 5.10: Zentrosomenzahl/Zelle der feline Fibrosarkomzelllinie FS IV.1

5.6 Zytogenetische Charakterisierung der Fibrosarkomzelllinie FS V.1

5.6.1 Chromosomenanalyse der Fibrosarkomzelllinie FS V.1

Aus den Passagen 10, 20, 27 und 44 der Zelllinie FS V.1 wurden insgesamt 120 Metaphasen hinsichtlich ihrer Chromosomenzahl/Zelle ausgewertet. Die Anzahl der Chromosomen variierte dabei zwischen 22 und 55 Chromosomen pro Zelle. Der Medianwert lag bei 42 Chromosomen pro Zelle.

5.6 Zytogenetische Charakterisierung der Fibrosarkomzelllinie FS V.1

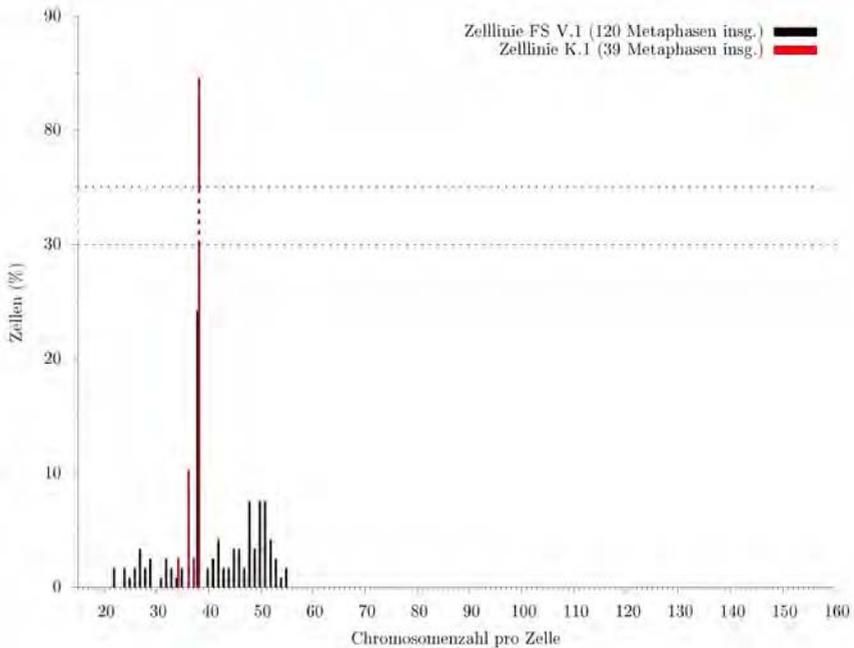


Abbildung 5.11: Chromosomenzahl in verschiedenen Zellen von FS V.1 und K.1

5.6.2 Vergleich der Passagen P 10, P 20, P 27 und P 44 der FS V.1

Bei der Fibrosarkomzelllinie FS V.1 stammten die 120 ausgezählten Metaphasen aus 4 verschiedenen Passagen: 10, 20, 27 und 44. Der Medianwert der Passage 10 lag bei 41 Chromosomen/Zelle. Die Passage 20 wies einen Medianwert von 38 Chromosomen/Zelle auf. Die Medianwerte der Passage 27 und Passage 44 lagen bei 43 Chromosomen/Zelle bzw. bei 45,5 Chromosomen/Zelle.

Mit dem Kruskal-Wallis-Test konnte kein statistisch signifikanter Un-

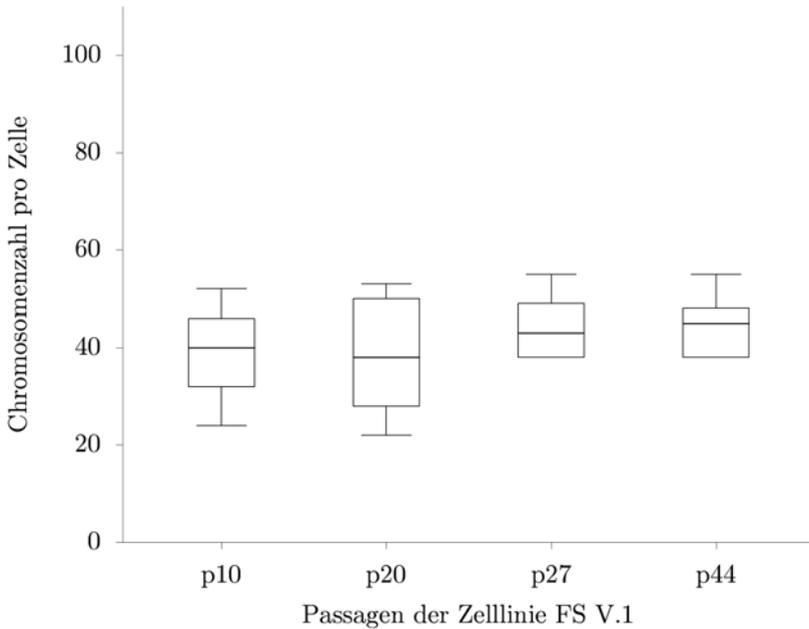


Abbildung 5.12: Box-and-Whisker-Plot zur vergleichenden Darstellung der Chromosomenzahl pro Zelle aus verschiedenen Passagen.

terschied ($p = 0,11$) zwischen den Medianen der Passagen der Zelllinie FS V.1 nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde die Variabilität der Passagen bezüglich der ermittelten Chromosomenzahl/Zelle miteinander verglichen. Dabei ergab der Levene-Test mit $p < 0,0001$ hochsignifikante Unterschiede.

Interessanterweise traten in den höheren Passagen 27 und 44 nur hyperdiploide Metaphasenplatten auf. Die beiden anderen Passagen wiesen sowohl hypo- als auch hyperdiploide Werte auf.

Im Box-und-Whisker-Plot in Abbildung 5.12 sind die Metaphasenwerte der unterschiedlichen Passagen vergleichend dargestellt.

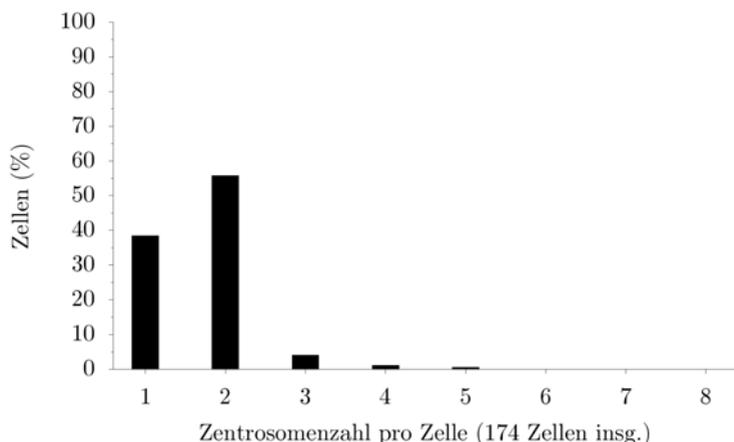


Abbildung 5.13: Zentrosomenzahl/Zelle der feline Fibrosarkomzelllinie FS V.1

5.6.3 Zentrosomenuntersuchung der Fibrosarkomzelllinie FS V.1

Insgesamt wurden 174 Zellen mit Hilfe der Immunzytologie ausgewertet. 5,8 % der Zellen zeigten mehr als 2 Zentrosomen pro Zelle. Die beobachtete Zentrosomenzahl pro Zelle ist in Abbildung 5.13 dargestellt.

5.7 Zytogenetische Charakterisierung der Kontrollzelllinie K.1

5.7.1 Chromosomenanalyse der Kontrollzelllinie K.1

Bei der Kontrollzelllinie K.1 wurden 39 Metaphasen ausgewertet. Diese Metaphasen stammten aus der Passage 13. Die Anzahl der Chromosomen variierte dabei zwischen 34 und 38 Chromosomen pro Zelle. Der Medianwert lag bei 38 Chromosomen pro Zelle.

5.7.2 Zentrosomenuntersuchung der Kontrollzelllinie K.1

Insgesamt wurden 151 Zellen im Hinblick auf ihre zentrosomale Ausstattung ausgewertet. 99,3 % der Zellen wiesen 1 oder 2 Zentrosomen/Zelle auf. Die ermittelte Zentrosomenzahl pro Zelle ist in Abb. 5.14 dargestellt.

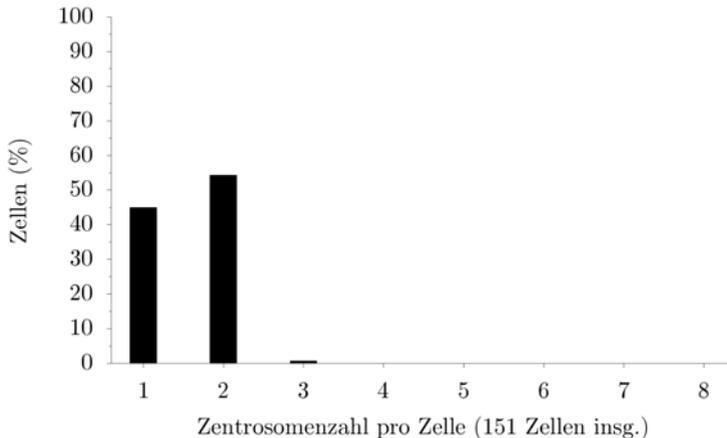


Abbildung 5.14: Zentrosomenzahl/Zelle der Kontrollzelllinie K.1

5.8 Vergleichende Chromosomenanalyse aller Zelllinien

Die vollständig erhobenen Chromosomenzahlen für jede monoklonale Fibrosarkomzelllinie, einschließlich der Kontrollzelllinie, sind im Anhang tabellarisch zusammengefasst (Tab. 9.1).

Die Häufigkeitsverteilung der Chromosomenzahl pro Zelle wurde in Abb. 5.15 für jede Fibrosarkomzelllinie und die Kontrollzelllinie in Form eines Box-and-Whisker-Plots dargestellt. Ganz rechts in der Abbildung sind die Chromosomenzahlen/Zelle der Kontrollzelllinie dargestellt.

Die Übersicht zeigt, dass sowohl innerhalb jeder Fibrosarkomzelllinie als auch im Vergleich zwischen den Zelllinien eine starke Heterogenität in der

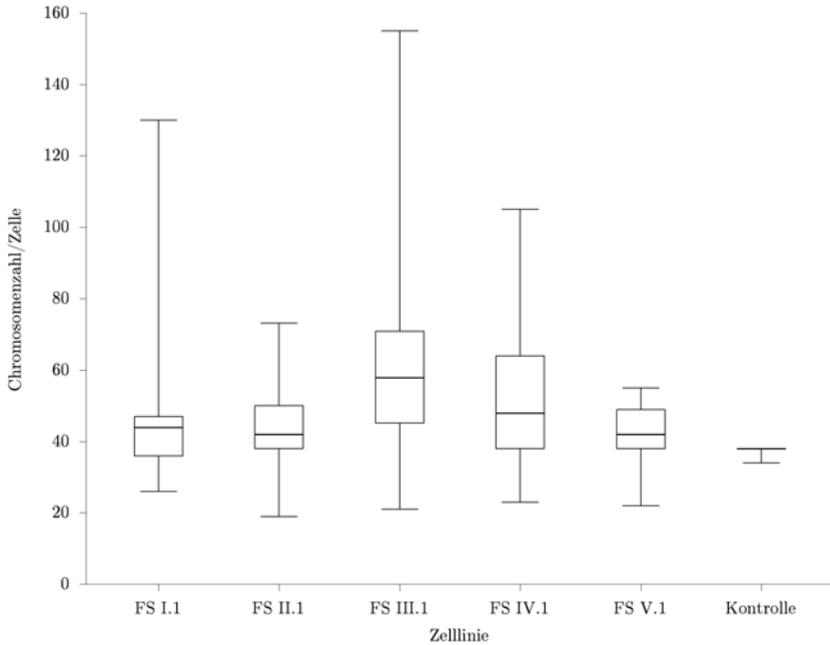


Abbildung 5.15: Häufigkeitsverteilung der Chromosomenzahl pro Zelle für alle Zelllinien

Häufigkeitsverteilung der Chromosomenzahl/Zelle vorliegt.

Zwischen den Zelllinien zeigten sich hoch signifikante Unterschiede bezüglich der mittleren Chromosomenzahl ($p < 0,0001$, Kruskal-Wallis-Test). Der multiple paarweise Vergleich nach Nemenyi (post-hoc Test) ließ in Bezug auf die chromosomale Heterogenität erkennen, dass sich die Zelllinien

- FS I.1 von FS III.1 ($p < 0,0001$)
- FS II.1 von FS III.1 ($p < 0,0001$)
- FS III.1 von FS V.1 ($p < 0,0001$)

- FS III.1 von FS K ($p < 0,0001$)
- FS IV.1 von FS K ($p < 0,0001$)
- FS IV.1 von FS V.1 ($p = 0,04$)

statistisch signifikant unterscheiden.

Die anderen Paarvergleiche zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede. Der zusätzliche Vergleich der Varianzen ergab statistisch hoch signifikante Unterschiede ($p < 0,0001$, Levene-Test) zwischen den Zelllinien.

5.9 Zentrosomenprofil der Fibrosarkomzelllinien

Die Zentrosomenauswertung aller Zelllinien ist im Anhang tabellarisch zusammengestellt (Tab. 9.2).

Der Anteil von Zellen mit hyperamplifizierten Zentrosomen, d.h. mit mehr als erwartungsgemäß 1 oder 2 Zentrosomen/Zelle, lag zwischen 5,7 % und 15,2 %. Die Kontrollzelllinie wies nur 0,6 % Zellen mit mehr als 2 Zentrosomen auf.

Beim Vergleich der Zentrosomenausstattung fiel ein statistisch hoch signifikanter Unterschied zwischen den Zelllinien ($p < 0,0001$, Kruskal-Wallis-Test) auf.

Anschließend wurde ein paarweiser Vergleich der Mittelwerte der Stichproben (post-hoc Test nach Nemenyi) vorgenommen. Die paarweisen Vergleiche zeigten statistisch signifikante Unterschiede

- zwischen FS II.1 und FS IV.1 ($p = 0,001$),
- zwischen FS II.1 und FS K.1 ($p = 0,008$),
- zwischen FS III.1 und FS IV.1 ($p = 0,004$) sowie
- zwischen FS III.1 und FS K.1 ($p = 0,04$).

Die anderen Paarvergleiche waren statistisch nicht signifikant verschieden.

5.10 Korrelation zwischen Zentrosomenhyperamplifikation und chromosomaler Instabilität

Ein möglicher Zusammenhang zwischen Zentrosomenhyperamplifikation und chromosomaler Instabilität wurde mit dem nichtparametrischen Maß einer Rangkorrelation nach Spearman errechnet, da von einer Normalverteilung nicht ausgegangen werden konnte. Als Maß der Streuung der Chromosomenzahl wurde der mittlere Quartilsabstand der Chromosomenzahlverteilung einer Zelllinie gewählt.

Der Rangkorrelationskoeffizient lag bei $r_s=0,154$, $p=0,80$. Es konnte somit statistisch keine signifikante Korrelation festgestellt werden.

Legende zu Abbildung 5.16 (S. 72)

- (A) eudiploide Metaphase der felines Kontrollzelllinie K.1 ($2n = 38$).
- (B) hypodiploide Metaphase der felines Fibrosarkomzelllinie FS I.1 ($2n = 30$).
- (C) hyperdiploide Metaphase der felines Fibrosarkomzelllinie FS I.1 ($2n = 88$).
- (D) eudiploide Metaphase der felines Fibrosarkomzelllinie FS I.1 ($2n = 38$).

Legende zu Abbildung 5.17 (S. 73)

- (A) Die Zentrosomen (Pfeile) wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen γ -Tubulin (CLONE GTU-88) detektiert. Als Sekundärantikörper diente ein Cy3-konjugierter Antikörper, der eine gelb-orange Färbung bewirkte, Obj. x 40.
- (B) Wie (A), aber mit zusätzlich darüberprojizierter Bildebene, in der die Zellkerne mit Sybr Green grün gefärbt wurden, Obj. x 40.
- (C) Fibrosarkomzelle der Zelllinie FS I.1 mit drei Zentrosomen, Obj. x 100.
- (D) Fibrosarkomzelle der Zelllinie FS III.1 mit sechs Zentrosomen, Obj. x 100.
- (E) Fibrosarkomzelle der Zelllinie FS V.1 mit drei Zentrosomen, Obj. x 100.
- (F) Fibrosarkomzelle der Zelllinie FS II.1 mit acht Zentrosomen, Obj. x 100.

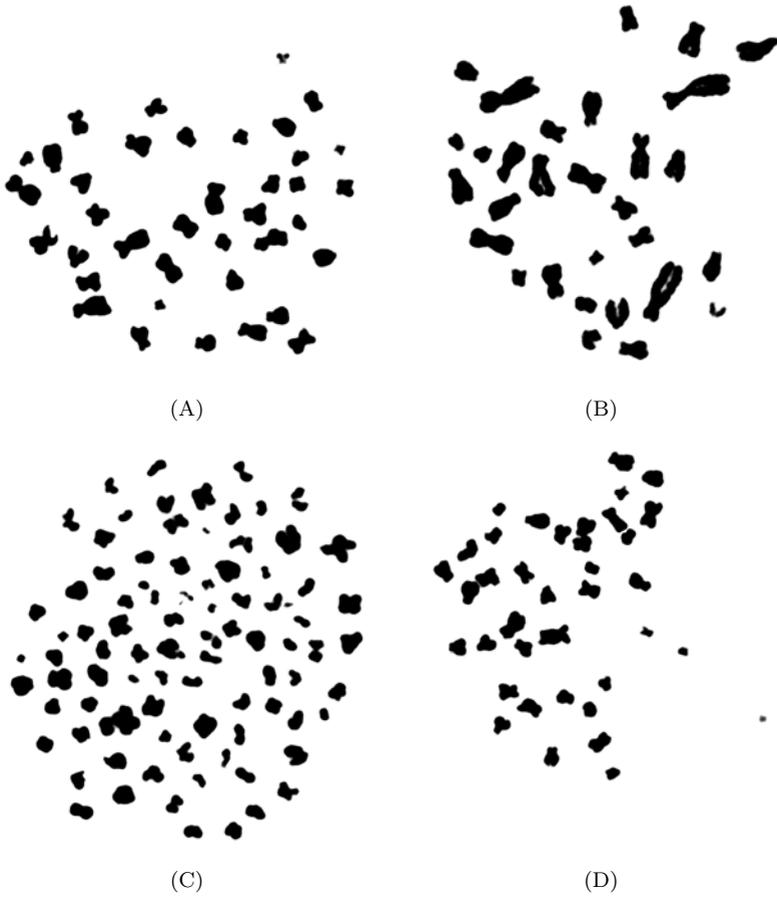


Abbildung 5.16: Beispielhafte Metaphasenplatten der Fibrosarkomzelllinie FS I.1 und der Kontrollzelllinie K.1. Legende S. 71

5.10 Korrelation zwischen Zentrosomenhyperamplifikation und chromosomaler Instabilität

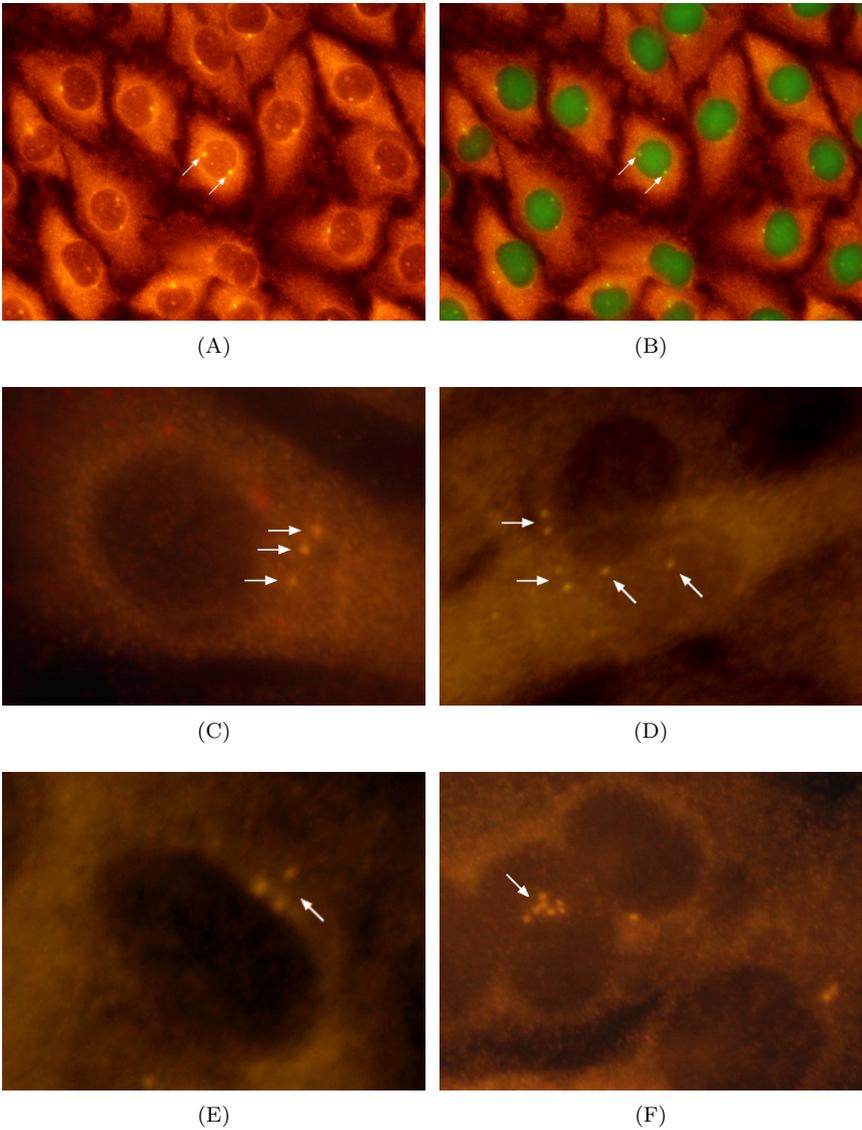


Abbildung 5.17: Numerische Zentrosomenaberrationen der feline Fibrosarkomzelllinien. Legende S. 71

6 Diskussion

6.1 Relevanz der Etablierung monoklonaler Zellpopulationen

Als Grundlage für die Etablierung monoklonaler Zellpopulationen dienten erste Chromosomenanalysen im Rahmen eines anderen Dissertationsprojekts am hiesigen Institut (Löhberg-Grüne, derzeit i. Abschluss).

Zelllinie	Chr.-z. (Minimum)	Chr.-z. (Median)	Chr.-z. (Maximum)
FS I	27	47	64
FS II	27	47	113
FS III	23	66	144
FS IV	36	46	60
FS V	38	62	156

Tabelle 6.1: Chromosomenanalyse der von Löhberg-Grüne etablierten Fibrosarkomzelllinien

Erläuterung der Abkürzungen:

Chr.-z.: Chromosomenzahl/Zelle; FS: Fibrosarkomzelllinie

Die Chromosomenanalyse aller fünf Fibrosarkomzelllinien (Tab. 6.1) zeigte durchweg eine Fehlverteilung der Chromosomenzahl/Zelle, sowohl innerhalb jeder Zelllinie als auch im Vergleich der Zelllinien untereinander.

Zur Erklärung der chromosomalen Heterogenität aller fünf Fibrosarkomzelllinien wurden zwei Hypothesen formuliert:

Hypothese 1: Eine in Zellkultur befindliche Fibrosarkomzelllinie besteht aus mehreren, chromosomal verschiedenen Zellpopulationen, wobei jede Zellpopulation einen stabilen Chromosomensatz aufweist. Dieser Chromosomensatz kann vom eudiploiden Chromosomensatz der Katze ($2n=38$) abweichen und wird bei jeder Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben.

Hypothese 2: Jede Zelle einer Fibrosarkomzelllinie weist ein chromosomal instabiles Genom auf, d. h. bei jeder Zellteilung erfolgt eine Fehlverteilung der Chromosomen an die entstehenden Tochterzellen. Der Chromosomensatz der Tochterzellen weicht folglich von dem der Mutterzelle ab.

Nachdem nun eine Chromosomenanalyse aller fünf klonal etablierten Zelllinien vorliegt, kann als gesichert angenommen werden, dass sich die in Zellkultur befindlichen Fibrosarkomzelllinien nicht aus mehreren, chromosomal stabilen Zellpopulationen zusammensetzen.

Jede Zelle einer FS-Zelllinie ist chromosomal instabil und es findet eine ständige Fehlverteilung der Chromosomen statt. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die oben formulierte zweite Hypothese.

6.2 Vergleich der Zelllinien hinsichtlich der Klonierungsergebnisse

Wie bereits in der Literaturübersicht (siehe Kap. 2.13) dargelegt, existieren mehrere Definitionen eines Zellklons. Die Definition nach Webber (1903) erklärt, dass ein Zellklon als eine Population von Zellen oder als ein Organismus anzusehen ist, der aus einer Einzelzelle durch Mitose entstanden ist. Diese Zellpopulation muss nicht genetisch homogen sein (Rieger et al., 1968). Nach einer weiteren Definition von Secker-Walker (1985) besteht eine klonale Zellpopulation aus Zellen, die durch Mitose aus genau einer somatischen Vorläuferzelle hervorgegangen sind.

Im Rahmen dieser Arbeit ist bei der Verwendung des Begriffs Zellklon gemeint, dass jede Zelllinie jeweils aus einer einzigen Zelle (monoklonal) ent-

standen ist. Der Chromosomensatz der nachfolgenden Tochterzellen muss nicht stabil sein, d. h. die Zellpopulation muss nicht chromosomal homogen sein.

Im Ergebnisteil dieser Arbeit wurden die Klonierungsergebnisse der einzelnen Fibrosarkomzelllinien und der Kontrollzelllinie tabellarisch (siehe Tab. 5.1) zusammengestellt.

Die Limited-Dilution-Klonierung zielte darauf ab, dass in jede Vertiefung einer 96-Wellplatte eine Zelle zu liegen kam. Diese Einzelzelle kann, wenn man die chromosomale Ausstattung der Zelllinien berücksichtigt, einen hypodiploiden, eudiploiden oder einen hyperdiploiden Chromosomensatz aufweisen. Vergleicht man die Fibrosarkomzelllinien mit der Kontrollzelllinie, so fällt bei allen fünf Fibrosarkomzelllinien eine deutlich geringere Klonierbarkeit gegenüber den Kontrollzellen auf. Von den vereinzelt Fibrosarkomzellen wuchsen im Durchschnitt 3,4 % an, wohingegen die Kontrollzellen eine Klonierungseffizienz von durchschnittlich 11 % zeigten (siehe Kap. 5.1).

Ein Erklärungsansatz für das schlechte Proliferationsverhalten vieler vereinzelter Fibrosarkomzellen ist die starke chromosomale Heterogenität dieser Zellen. Ein instabiler Karyotyp einer Tumorzelle könnte in diesem Falle nicht mehr über essentielle Gene oder deren Expressionsmechanismen für Zellwachstum und -proliferation verfügen. Die Folge wäre ein Absterben der Zelle.

Bei der Fibrosarkomzelllinie FS V.1 fiel auf, dass in den späteren untersuchten Passagen (P 27 und P 44) keine der aneuploiden Metaphasen mehr im hypodiploiden Bereich lag. Die sich hier andeutende negative Selektion wäre eine weitere Folge des Fehlens essentieller Zellbestandteile.

Wie bereits oben dargestellt, wuchsen bei der Kontrollzelllinie im Vergleich zu den Fibrosarkomzelllinien deutlich mehr Einzelzellen zu monoklonalen Zellpopulationen aus. Dies würde im Umkehrschluß zum oben erwähnten bedeuten, dass die vereinzelt Zellen einen eudiploiden Karyotyp und damit alle lebenswichtigen Gene und deren Expressionsmechanismen zur Zellproliferation und zum Zellwachstum besaßen.

Daraus ließe sich ableiten, dass die chromosomale Instabilität der Tumorzellen zwar eine Verbesserung der Anpassung der Gesamtpopulation an ihre Umgebung und damit zu einem abnormal erhöhten Wachstum führt, dies aber auf Kosten der Überlebensfähigkeit vieler Einzelzellen geht.

6.3 chromosomale Heterogenität der Zelllinien

Die Chromosomenanalyse der Kontrollzelllinie zeigte, dass aus den Einzelzellen eine monoklonale Zellpopulation auswuchs, deren Chromosomenzahl/Zelle weitestgehend homogen war.

Fast 90 % der Zellen wiesen den normalen diploiden felines Karyotyp ($2n=38$) auf. Zwar waren einige hypodiploide Metaphasenplatten auch vorhanden, aber hierbei handelt es sich sehr wahrscheinlich um präparationsbedingte Artefakte, die während der Chromosomenpräparation nicht völlig auszuschließen sind.

Beim letzten Schritt der Chromosomenpräparation (siehe Kap. 4.3.2) wurden die fixierten Zellen auf einen auf -20°C vorgekühlten Glasobjektträger aufgetropft. Beim Auftropfen verdunstet der Fixator und die Chromosomen einer Metaphasenplatte werden durch hydrodynamische Kräfte, welche ihrerseits von der Luftfeuchtigkeit und Temperatur des Präparationsraumes abhängig sind, vom Zentrum des Tropfens weg über den Glasobjektträger gezogen. Dies führt zu einer Spreitung der Chromosomen. Dabei kann es passieren, dass einige Chromosomen einer Metaphasenplatte abschwimmen. Eine echte Hypodiploidie ist in solchen Fällen von einer präparationsbedingten nicht abzugrenzen.

Anhand der Ergebnisse der ausgewerteten Metaphasenplatten der Kontrollzelllinie ist aber zu erkennen, dass sich der präparationsbedingte Fehler auf höchstens 10 % der Zellen beschränkt, bei denen höchstens 10 % Chromosomen weniger gefunden wurden als wahrscheinlich tatsächlich vorhanden waren.

Vergleicht man die einzelnen Fibrosarkomzelllinien hinsichtlich der ermittelten Chromosomenzahl/Zelle, so zeigen alle Zelllinien eine starke chromosomale Instabilität. Die Spannweite der gezählten Chromosomenwerte reichte hierbei von 19 bis 155 Chromosomen/Zelle.

Diese Aneuploidie geht um Größenordnungen über den oben dargestellten maximalen präparationsbedingten Fehler hinaus und lässt auf eine echte chromosomale Heterogenität aller Fibrosarkomzelllinien schließen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich mit den in der Literaturübersicht (S. 35) vorgestellten Untersuchungen. Mayr et al. (1991) fanden eine Verteilung von 34 bis 115 Chromosomen pro Metaphase in einer Zellkultur, die aus einem felines Fibrosarkom gezogen worden war. Kalat et al.

(1991) konnten eine durchgängige Hyperdiploidie von 40 bis 46 Chromosomen pro Metaphase in einem anderen feline Fibrosarkom zeigen.

6.4 Zentrosomenhyperamplifikation und Chromosomeninstabilität

Bei allen Fibrosarkomzelllinien konnte eine deutliche Zentrosomenhyperamplifikation beobachtet werden.

Die untersuchten Zellen wiesen hierbei eine Zentrosomenzahl zwischen 1 und 8 Zentrosomen auf. Vergleicht man diese Werte mit denen der Kontrollzelllinie, welche nur 0,6 % an Zellen mit mehr als 2 Zentrosomen aufwies, so erkennt man, dass in den Fibrosarkomzelllinien etwa 10 bis 25 mal so viele Zellen überzählige Zentrosomen besaßen.

Dieses Phänomen wurde bereits bei verschiedenen anderen Tumoren beobachtet. Zwei Studien mit humanen Brusttumoren zeigten, dass 30 % bis 40 % der Karzinomzellen bis zu 20 Zentrosomen/Zelle hatten (Carroll et al., 1999; Lingle et al., 1998).

Eine andere Untersuchung mit Tumoren von Hunden (u. a. Myxosarkome, Osteosarkome, Chondrosarkome) fanden bei 9,5 % bis 48,1 % der untersuchten Tumorzellen eine Zentrosomenhyperamplifikation (Setoguchi et al., 2001).

Ähnliche Zentrosomenveränderungen wurden in einer Untersuchung mit feline Lymphomzelllinien beobachtet. Hierbei wiesen 10 % bis 30 % der Tumorzellen 3 oder mehr Zentrosomen auf (Miki et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit lag der Prozentsatz der gesteigerten Zentrosomenzahlen/Zelle zwischen 5,7 % und 15,2 %. Neben den Zentrosomenaberrationen wurde zudem bei allen Fibrosarkomzelllinien eine deutliche Aneuploidie festgestellt.

Zentrosomenhyperamplifikation ist nicht nur ein Phänomen, das bei Tumoren im Allgemeinen beobachtet wird, sondern es tritt besonders häufig in Tumoren auf, die eine hohe Rezidivrate zeigen (Tabor et al., 2004). Auch Fibrosarkome gehören zu den Tumoren, deren Rate an Rezidiven hoch ist. In 20 % bis 75 % der Fälle kommt es zum Tumorrezidiv (Stiglmair-Herb und Ortmann, 1987; Kirpensteijn, 2006; Hershey et al., 2005).

Man ging bisher davon aus, dass bei marginaler Resektion feliner Fibrosarkome, aufgrund ihres infiltrativen Wachstums, verbleibende Tumorzellen in den Tumorrändern die Ursache der Rezidive sind. Wurde ein Fibrosarkom vollständig reseziert, dann könnten Zentrosomenhyperamplifikationen in den Zellen, welche um den Tumor liegen, eine entscheidene Rolle spielen.

In einer Studie von Yamamoto et al. (2004) wurden Zentrosomenhyperamplifikationen in nicht-invasiven Übergangszellkarzinomen der Harnblase untersucht. 53,5 % der Tumoren zeigten ein Tumorrezidiv, obwohl die Tumorränder pathologisch-histologisch als frei von Tumorzellen diagnostiziert worden sind. Die Tumorrezidive ohne Zentrosomenhyperamplifikation zeigten ein statistisch signifikant höheres tumorfreies Intervall als die mit Zentrosomenhyperamplifikation. Die in der vorliegenden Studie ermittelten Ergebnisse legen auch die Vermutung nahe, dass numerische Zentrosomenaberrationen in Zellen der Tumorränder an der Rezidivbildung von felinen Fibrosarkomen beteiligt sein könnten. Insbesondere ist es ein Erklärungsansatz für die Fibrosarkome, deren Tumorränder pathologisch-histologisch als unauffällig beurteilt worden sind.

In den in Kap. 6.3 genannten Untersuchungen von Mayr, et al. (1991) und Kalat et al. (1991) wurden numerische Zentrosomenaberrationen als möglicher Auslöser der chromosomalen Heterogenität nicht untersucht.

Die vorliegende Arbeit versuchte, durch numerische Zentrosomenanalysen einen Erklärungsansatz für die in den eigenen Untersuchungen ermittelte Aneuploidie feliner Fibrosarkomzelllinien zu finden.

Es wurden zwar bei allen fünf analysierten Fibrosarkomzelllinien Zentrosomenhyperamplifikationen gefunden, aber es bleibt noch unklar, wie Zentrosomenhyperamplifikation und chromosomale Instabilität im gestörten Zellteilungszyklus zusammenhängen.

Zentrosomenhyperamplifikation und Aneuploidie wurden auch schon in vielen soliden Tumoren und Tumorzelllinien beobachtet und werden als frühe Faktoren der Tumorinitiation und -progression angesehen (Fukasawa, 2005; Ghadimi et al., 2000; Lingle et al., 2002; Nigg, 2002). Auch in frühen präkanzerogen Veränderungen, z. B. bei Prostatahyperplasien oder benignen Kolontumoren wurden solche Beobachtungen gemacht (Kayser et al., 2005; Pihan et al., 2001, 2003).

Koutsami und seine Mitarbeiter (2006) untersuchten Gewebe von Lungenkarzinomen. Hyperamplifizierte Zentrosomen wurden nicht nur bei fast

einem Drittel (28,6 %) der analysierten Tumoren gesehen, sondern auch im benachbarten Gewebe der Tumoren diagnostiziert.

Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass Zentrosomenhyperamplifikationen als präkanzerogenes Merkmal früh auftreten. Zellen mit überzähligen Zentrosomen durchlaufen eine Zellteilung mit einem multipolaren Spindelapparat, welcher zu einer Missegregation der Chromosomen und folglich zur Aneuploidie führt (Yang et al., 2003).

Zentrosomenaberrationen scheinen einen der verschiedenen möglichen Mechanismen darzustellen, der für die Induktion einer Aneuploidie (Zugewinn oder Verlust von Chromosomen) der Zelle verantwortlich ist.

Aufgrund unserer Ergebnisse kann angenommen werden, dass numerische Zentrosomenalterationen in der Karzinogenese feline Fibrosarkome eine Rolle spielen.

Diese für feline Fibrosarkome neu gewonnenen Erkenntnisse können zum Verständnis der Bedeutung von Zentrosomen in der Onkogenese solcher Tumoren beitragen.

7 Zusammenfassung

1. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, etablierte Zelllinien von felinen Fibrosarkomen auf ihre Klonierbarkeit zu untersuchen und sie anschließend zytogenetisch zu charakterisieren. Anhand von zellbiologischen und immunzytologischen Methoden wurde das Auftreten numerischer Chromosomen- und Zentrosomenaberrationen analysiert. Als gesunde Vergleichszelllinie dienten Hautfibroblasten eines jungen Katzenfetuses, die *in vitro* eine schnelle Zellproliferation und ein gutes Zellwachstum zeigten. Die zytogenetische Charakterisierung dieser Zelllinien soll einen Beitrag zur Erkennung zytogenetischer Faktoren innerhalb der Pathogenese feliner Fibrosarkome leisten.
2. Die Literaturübersicht erklärt genetische Instabilität unter besonderer Beachtung der Aneuploidie und deren Bedeutung für die Tumorigenese maligner Tumoren. Im Weiteren werden Zentrosomenaberrationen, deren Vorkommen und Entstehungsmechanismen erläutert und gezeigt, dass numerische Zentrosomenaberrationen zu einer Chromosomenfehlverteilung mit konsekutiver genetischer Instabilität in Zellen führen können. Zudem wird der Stand der Forschung hinsichtlich chromosomaler Instabilität und Zentrosomenveränderungen bei malignen Tumoren von Menschen und Hunden dargestellt. Anschließend gibt der zweite Teil der Literaturübersicht einen Überblick über die verschiedenen Formen feliner Fibrosarkome und deren Kenntnis bezüglich Aneuploidie in Verbindung mit Zentrosomenaberrationen.
3. Die eigenen Untersuchungen erfolgten an fünf klonal selektierten Fibrosarkomzelllinien und einer ebenfalls klonal etablierten Kontrollzelllinie. Zur Analyse der Klonierbarkeit aller Zelllinien wurde die Limited-Dilution-Klonierung verwendet. Die zellbiologischen Untersuchungen zur Chromosomenanalyse erfolgte an Giemsa-gefärbten

Metaphasenplatten. Die immunzytologischen Untersuchung der Zentrosomen wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz mit einem monoklonalen Antikörper gegen γ -Tubulin, dem Hauptprotein der Zentrosomen, durchgeführt.

4. Bei allen Zelllinien konnten monoklonale Zellpopulationen etabliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass alle Zelllinien eine starke Variation in ihrer chromosomalen Ausstattung aufwiesen. Die Chromosomenanalyse ergab Werte von 19 bis 155 Chromosomen pro Zelle. Sowohl zwischen den Zelllinien als auch innerhalb jeder Zelllinie zwischen verschiedenen Passagen traten signifikante Unterschiede hinsichtlich des Chromosomensatzes auf. Der Anteil von Zellen mit hyperamplifizierten Zentrosomen, d.h. mit mehr als erwartungsgemäß 1 oder 2 Zentrosomen/Zelle, lag zwischen 5,7 % und 15,2 %. Die Kontrollzelllinie wies nur 0,6 % Zellen mit mehr als 2 Zentrosomen auf. Bei allen Fibrosarkomzelllinien wurden *in vitro* numerische Zentrosomenaberrationen nachgewiesen. Vergleicht man die Fibrosarkomzellen mit den Kontrollzellen, so zeigt sich, dass 10- bis 25-mal so viele Zellen mehr als 2 Zentrosomen/Zelle aufwiesen.
5. Die ermittelten Ergebnisse bestärken die Vermutung, dass numerische Zentrosomenaberrationen in einem Zusammenhang mit chromosomaler Instabilität stehen, indem sie eine fehlerhafte Chromosomensegregation während des Zellteilungszyklus bewirken. Diese neu gewonnenen Erkenntnisse tragen zu einer weiteren Charakterisierbarkeit feline Fibrosarkome bei. Sowohl die Ursachen als auch die Konsequenzen zentrosomaler Aberrationen bei feline Fibrosarkomen bleiben ein interessantes Forschungsgebiet.

8 Summary

1. The purpose of this study was to get knowledge about the clonality of five already established feline fibrosarcoma cell lines and to characterize these cell lines cytogenetically. On the basis of biological and immunocytochemical methods, numerical chromosomal and centrosomal aberrations were examined. As a control, dermal fibroblasts were isolated from a fetal cat and cultured. These cells revealed in vitro a stable cell proliferation and cell growth. The cytogenetical characterization of these cell lines intends to make a contribution to the diagnosis of cytogenetical factors within the pathogenesis of feline fibrosarcomas.
2. In the literature review, genetic instability considering aneuploidy was defined and its importance in the development of malignant tumors shown. Furthermore, centrosomal aberrations, their occurrence and development and their role in chromosome missegregation are explained with consecutive genetic instability. Moreover, the current state of knowledge regarding chromosomal instability and centrosomal alterations in malignant tumors in humans and in dogs is described. The second part of the literature reviews the classification of feline fibrosarcomas and the present knowledge of aneuploidy and centrosome hyperamplification in these tumors.
3. Investigations were performed on five feline fibrosarcoma cell lines and dermal fibroblasts from a fetal cat as a control cell line. The clonality of all cell lines was examined using limited-dilution-cloning. The number of chromosomes were counted by metaphase spread. The prepared chromosomes were subjected to Giemsa staining and analyzed under a light microscope. The immunocytochemical analysis of centrosomes was performed by indirect immunofluorescence using

anti- γ -tubulin monoclonal antibody that targets γ -tubulin, a major component of centrosomes.

4. Monoclonal cell populations could be established from all cell lines. In all feline fibrosarcoma cell lines, the number of chromosomes was found to have abnormal deviation from the physiologic number $2n=38$. The chromosomal analysis revealed 19 to 155 chromosomes/cell. Centrosome hyperamplification was observed in all five feline fibrosarcoma cell lines with a proportion of cells with more than 2 centrosomes/cell of 5.7 % to 15.2 %. The control cell line revealed only in 0.6 % of the cells more than 2 centrosomes/cell. Concluding, the feline fibrosarcoma cell lines revealed 10 to 25 times as many cells with centrosome hyperamplification as the control cell line.
5. In conclusion, the study revealed that centrosome hyperamplification occurs in feline fibrosarcoma cell lines. These observations suggest an association of numerical centrosome aberrations with chromosomal instability by increasing the frequency of abnormal mitosis that lead to chromosome missegregation. The results of this study may be helpful for a further characterization of feline fibrosarcomas. Finally, the causes and as well the consequences of centrosome abnormalities in feline fibrosarcomas requires further investigations.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Zentrosomenstruktur	22
2.2	Zentrosomenduplikationszyklus	26
5.1	Chromosomenzahl in verschiedenen Zellen von FS I.1 und K.1	56
5.2	Zentrosomenzahl/Zelle der felines Fibrosarkomzelllinie FS I.1	57
5.3	Chromosomenzahl in verschiedenen Zellen von FS II.1 und K.1	58
5.4	Box-and-Whisker-Plot zum Passagenvergleich der Fibrosar- komzelllinie FS II.1	59
5.5	Zentrosomenzahl/Zelle der felines Fibrosarkomzelllinie FS II.1	59
5.6	Chromosomenzahl in verschiedenen Zellen von FS III.1 und K.1	60
5.7	Zentrosomenzahl/Zelle der felines Fibrosarkomzelllinie FS III.1	61
5.8	Chromosomenzahl in verschiedenen Zellen von FS IV.1 und K.1	62
5.9	Box-and-Whisker-Plot zum Passagenvergleich der Fibrosar- komzelllinie FS IV.1	63
5.10	Zentrosomenzahl/Zelle der felines Fibrosarkomzelllinie FS IV.1	64
5.11	Chromosomenzahl in verschiedenen Zellen von FS V.1 und K.1	65
5.12	Box-and-Whisker-Plot zum Passagenvergleich der Fibrosar- komzelllinie FS V.1	66
5.13	Zentrosomenzahl/Zelle der felines Fibrosarkomzelllinie FS V.1	67
5.14	Zentrosomenzahl/Zelle der Kontrollzelllinie K.1	68
5.15	Häufigkeitsverteilung der Chromosomenzahl pro Zelle für al- le Zelllinien	69
5.16	Beispielhafte Metaphasenplatten der Fibrosarkomzelllinie FS I.1 und der Kontrollzelllinie K.1.	72

5.17 Numerische Zentrosomenaberrationen der feline Fibrosarkomzelllinien. 73

Tabellenverzeichnis

5.1	Klonierungsergebnisse der Zelllinien	53
5.2	Subklonierungsergebnisse der Zelllinien	55
6.1	Chromosomenanalyse der von Löhberg-Grüne etablierten Fibrosarkomzelllinien	74
9.1	Chromosomenzahl/Zelle der verschiedenen Zelllinien	101
9.2	Tabellarische Übersicht der gezählten Zellen mit ihrer jeweiligen Zentrosomenzahl	107
9.3	Herkunft des Ausgangsmaterials der untersuchten Zelllinien	108

Literaturverzeichnis

- Alberici, P., de Pater, E., Cardoso, J., Bevelander, M., Molenaar, L., Jonkers, J. und Fodde, R., 2007. Aneuploidy arises at early stages of Apc-driven intestinal tumorigenesis and pinpoints conserved chromosomal loci of allelic imbalance between mouse and human. *Am. J. Pathol.* 170, 377–387.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Walter, P., 2002. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. Garland Science, S. 983–990.
- Albertson, D. G., Collins, C., McCormick, F. und Gray, J. W., 2003. Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat. Genet.* 34, 369–376.
- Balczon, R., Bao, L., Zimmer, W. E., Brown, K., Zinkowski, R. P. und Brinkley, B. R., 1995. Dissociation of centrosome replication events from DNA synthesis and mitotic division in hydroxyurea arrested chinese hamster ovary cells. *J. Cell Biol.* 130, 105–115.
- Barch, M. J., 1991. *The ACT cytogenetics laboratory manual*. New York: Raven Press, S. 17–30.
- Bharadwaj, R. und Yu, H., 2004. The spindle checkpoint, aneuploidy and cancer. *Oncogene* 23, 2016–2027.
- Bladgen, S. P. und Glover, D. M., 2003. Polar expeditions: provisioning the centrosome for mitosis. *Nat. Cell Biol.* 5, 505–511.
- Bleier, T., 2003. *Untersuchungen zu Einteilung und Pathogenese des felinen Fibrosarkoms*. Vet. med. Diss., Giessen.
- Bobiniec, Y., Khodjakov, A., Mir, L. M., Rieder, C. L., Edde, B. und Bornens, M., 1998. Centriole disassembly in vivo and its effect on centrosome structure and function in vertebrate cells. *J. Cell Biol.* 143, 1575–1589.

- Bomme, L., Bardi, G., Pandis, N., Fenger, C., Kronborg, O. und Heim, S., 1998. Cytogenetic analysis of colorectal adenomas: karyotypic comparisons of synchronous tumors. *Cancer Genet Cytogenet.* 106, 66–71.
- Bornens, M., 2002. Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 25–34.
- Brinkley, B. R., 2001. Managing the centrosome numbers game: from chaos to stability in cancer cell deviation. *Trends Cell Biol.* 11, 18–21.
- Cahill, D. P., Lengauer, C., Yu, J., Riggins, G. J., Willson, J. K., Markowitz, S. D., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B., 1998. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 392, 300–303.
- Carroll, P. E., Okuda, M. und Horn, H. F., 1999. Centrosome hyperamplification in human cancer: chromosome instability induced by p53 mutation and/or Mdm2 overexpression. *Oncogene* 18, 1935–1944.
- Couto, S. S., Griffey, S. M., Duarte, P. C. und Madewell, B. R., 2002. Feline vaccine-associated fibrosarcoma: morphologic distinctions. *Vet. Pathol.* 39, 33–41.
- Coyne, M. J., Reeves, N. C. P. und Rosen, D. K., 1997. Estimated prevalence of injection-site sarcomas in cats during 1992. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 210, 249–251.
- D’Assoro, A. B., Lingle, W. L. und Salisbury, J. L., 2002. Centrosome amplification and the development of cancer. *Oncogene* 21, 6146–6153.
- Davidson, E. B., Gregory, B. und Kass, P. H., 1997. Surgical excision of soft tissue fibrosarcoma in cats. *Vet. Surg.* 26, 265–269.
- Day, M. J., 2006. Vaccine side effects: Fact and fiction. *Vet. Microbiol.* 117, 51–58.
- Dicthenberg, J. B., Zimmerman, W., Sparks, C. A., Young, A., Vidair, C., Zheng, Y., Carrington, W., Fay, F. S. und Doxsey, S. J., 1998. Pericentriolar and gamma-tubulin form a protein complex and are organized into a novel lattice at the centrosome. *J. Cell Biol.* 141, 163–174.

- Doddy, F. D., Glickmann, L. T., Glickman, N. W. und Janovitz, E. B., 1996. Feline fibrosarcomas at vaccination sites and non-vaccination sites. *J. Comp. Path.* 114, 165–174.
- Doxsey, S., 1998. The centrosome - a tiny organelle with big potential. *Nat. Genet.* 20, 104–106.
- Doxsey, S., 2001. Re-evaluating centrosome function. *Nature Reviews, Mol. Cell Biol.* 2, 688–698.
- Dubielzig, R., Everitt, J., Shaddock, J. und Albert, D., 1990. Clinical and morphologic features of post-traumatic ocular sarcomas in cats. *Vet. Pathol.* 27, 62–65.
- Dubielzig, R. R., 1984a. Ocular neoplasia in small animals. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 20, 837–848.
- Dubielzig, R. R., 1984b. Ocular sarcoma following trauma in three cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 184, 578–581.
- Elledge, S. J., 1996. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274, 1664–1672.
- Emdad, L., Devanand, S., Zao-Zhong, S. und Fisher, P. B., 2005. Emerging roles of centrosomal amplification and genomic instability in cancer. *Front. Biosci.* 10, 728–742.
- Esplin, D. G., Bigelow, M., McGill, L. D. und Wilson, S. R., 1999. Fibrosarcoma at the site of a lufenuron injection site in a cat. *Vet. Cancer Soc. Newsletter* 23, 8–9.
- Fletcher, L. und Muschel, R. J., 2006. The centrosome and the DNA damage induced checkpoint. *Cancer Letters* 243, 1–8.
- Frank, S. A. und Nowak, M. A., 2004. Problems of somatic mutation and cancer. *Bioassays* 26, 291–299.
- Fukasawa, K., 2002. Introduction. Centrosome. *Oncogene* 21, 6140–6145.

- Fukasawa, K., 2005. Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. *Cancer Letters* 230, 6–19.
- Fukasawa, K., Choi, T., Kuriyama, R., Rulong, S. und Vande Woude, G. F., 1996. Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science* 271, 1744–1747.
- Gagnon, A. C., 2000. Drug injection-associated fibrosarcoma in a cat. *Feline Pract.* 28, 18–21.
- Ghadimi, B. M., Sackett, D. L., Difilippantonio, M. J., Schröck, E., Neumann, T. und Jauho, A., 2000. Centrosome amplification and instability occurs exclusively in aneuploid but not in diploid colorectal cancer cell lines and correlates with numerical chromosomal aberrations. *Genes Chromosomes Cancer* 2, 183–190.
- Giehl, M., Fabarius, A. und Frank, O., 2005. Centrosome aberrations in chronic myeloid leukemia correlate with stage of disease and chromosomal instability. *Leukemia* 19, 1192–1197.
- Gobar, G. M. und Kass, P. H., 2002. World wide web-based survey of vaccination practices, postvaccinal reactions, and vaccine site-associated sarcomas in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 220, 1477–1482.
- Gustafson, L. M., Gleich, L. L., Fukasawa, K., Chadwell, J., Miller, M. A., Stambrook, P. J. und Gluckmann, J. L., 2000. Centrosome hyperamplification in head and neck squamous cell carcinoma: a potential phenotypic marker of tumor aggressiveness. *Laryngoscope* 110, 1798–1801.
- Hanahan, D. und Weinberg, R. A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hardy, W. D., 1980. The biology and virology of the feline sarcoma virus. *Cancer Res.* 4, 79–82.
- Hardy, W. D. j., 1981. The feline sarcoma viruses. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 17, 981–997.

- Hendrick, M. J., 1998a. Historical review and current knowledge of risk factors involved in feline vaccine-associated sarcomas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213 (10), 1422–1423.
- Hendrick, M. J., 1998b. Feline vaccine-associated sarcomas: current studies on pathogenesis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213 (10), 1425–1426.
- Hendrick, M. J. und Brooks, J. J., 1994. Postvaccinal sarcomas in the cat: histology and immunohistochemistry. *Vet. Pathol.* 31, 126–129.
- Hendrick, M. J. und Dunagan, C. A., 1991. Focal necrotizing granulomatous panniculitis associated with subcutaneous injection of rabies vaccine in cats and dogs: 10 cases (1988-89). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 198, 304–305.
- Hendrick, M. J. und Goldschmidt, M. H., 1991. Do injection site reactions induce fibrosarcomas in cats? *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199, 968.
- Hendrick, M. J., Goldschmidt, M. H., Shofer, F. S., Wang, Y. Y. und Somlyo, A. P., 1992. Postvaccinal sarcomas in the cat: epidemiology and electron probe microanalytical identification of aluminium. *Cancer Res.* 52, 5391–5394.
- Hendrick, M. J., Mahaffey, E. A., Moore, F. M., Vos, J. H. und Walder, E. J., 1998. *Histological classification of mesenchym tumors of skin and soft tissues of domestic animals.* 2nd Ed. Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D. C., S. 17.
- Henegariu, O., Heerema, N., Lowe Wright, L., Bray-Ward, P., Ward, D. und Vance, G., 2001. Improvements in cytogenetic slide preparation: controlled chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing. *Cytometry* 43, 101–109.
- Hershey, A. E., Dubielzig, R. R., Padilla, M. L. und Helfand, S. C., 2005. Aberrant p53 expression in feline vaccine-associated sarcomas and correlation with prognosis. *Vet. Pathol.* 42, 805–811.
- Hinchcliffe, E. H. und Sluder, G., 2001. It takes two to tango: understanding how centrosome duplication is regulated throughout the cell cycle. *Genes Dev.* 15, 1167–1181.

- Hinchcliffe, E. H. und Sluder, G., 2002. Two for two: Cdk2 and its role in centrosome doubling. *Oncogene* 21, 6154–6160.
- Hut, H. M., Lemstra, W., Blaauw, E. H., van Cappellen, G. W., Kampinga, H. H. und Sibon, O. C., 2003. Centrosomes split in the presence of impaired DNA integrity during mitosis. *Mol. Biol. Cell* 14, 1993–2004.
- Karsenti, E. und Maro, B., 1986. Centrosomes and the spatial distribution of microtubules in animal cells. *TIBS* 11, 460–463.
- Kass, P. H., Barnes, W. G. J. und Spangler, 1993. Epidemiologic evidence for the causal relationship between vaccination and fibrosarcoma tumorigenesis in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 201, 396–405.
- Kass, P. H., Spangler, W. L., Hendrick, M. J., McGill, L. D., Esplin, D. G., Lester, S., Slater, M., Meyer, E. K., Boucher, F., Peters, E. M., Gobar, G. G., Htoo, T. und Decile, K., 2003. Multicenter case-control study of risk factors associated with development of vaccine-associated sarcomas in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 223, 1283–1292.
- Kayser, G., Gerlach, A., Walch, A., Nitschke, R., Haxelmans, S., Kayser, K., Hopt, U., Werner, M. und Lassmann, S., 2005. Numerical and structural centrosome aberrations are an early and stable event in the adenoma-carcinoma sequence of colorectal carcinomas. *Virchows Arch.* 447, 61–65.
- Kessler, M., 2000. Kleintieronkologie. Parey Buchverlag Berlin, S.246–251.
- Kessler, M., 2001. Studies on the epidemiology of feline vaccine-associated fibrosarcomas in Germany. Abstr. FECAVA Berlin .
- Khodjakov, A., Rieder, C. L., Sluder, G., Cassels, G., Sibon, O. und Wang, C. L., 2002. De novo formation of centrosomes in vertebrate cells arrested during S phase. *J. Cell Biol.* 158, 1171–1181.
- King, R. C. und Stansfield, W. D., 1990. Encyclopedic dictionary of genetics. VCH Weinheim Verlag,, S. 112.
- Kirpensteijn, J., 2006. Feline injection site-associated sarcoma: Is it a reason to critically evaluate our vaccination policies? *Vet. Microbiol.* 117, 59–65.

- Koutsami, M. K., Tsantoulis, P. K., Kouloukoussa, M., Apostolopoulou, K., Pateras, I. S., Spartinou, Z., Drougou, A., Evangelou, K., Kittas, C., Bartkova, J., Bartek, J. und Gorgoulis, V. G., 2006. Centrosome abnormalities are frequently observed in non-small-cell lung cancer and are associated with aneuploidy and cyclin E overexpression. *J. Pathol.* 209, 512–521.
- Krämer, A., Neben, K. und Ho, A. D., 2002. Centrosome replication, genomic instability and cancer. *Leukemia* 16, 767–775.
- Lacey, K. R., Jackson, P. K. und Stearns, T., 1999. Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 2817–2822.
- Lange, B. M., 2002. Integration of the centrosome cycle, stress response and signal transduction pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 35–43.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B., 1997. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 386, 623–627.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B., 1998. Genetic instability in human cancers. *Nature* 396, 643–649.
- Löhberg-Grüne, C., derzeit i. Abschluss. Etablierung von Zelllinien aus feline Fibrosarkomen. *Vet. med. Diss.*, Giessen.
- Lingle, W. L., Barrett, S. L., Negron, V. C., D'Assoro, A. B., Boeneman, K., Lin, W., Whitehead, C. M., Reynolds, C. und Salisbury, J. L., 2002. Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 1978–1983.
- Lingle, W. L., Lutz, W. H., Ingle, J. N., Maimle, N. J. und Salisbury, J. L., 1998. Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 2950–2955.
- Lingle, W. L. und Salisbury, J. L., 1999. Altered centrosome structure is associated with abnormal mitoses in human breast tumors. *Am. J. Pathol.* 155, 1941–1951.

- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. und Darnell, J. E., 2001. *Molekulare Zellbiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin, S. 890–903.
- Lorenz, R. J., 1996. *Grundbegriffe der Biometrie*, 3. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- Macy, D. W. und Hendrick, M. J., 1996. The potential role of inflammation in the development of postvaccinal sarcomas in cats. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Prac.* 26, 103–109.
- Madewell, B. R., Griffey, S. M., McEntee, M. C., Leppert, v. J. und Munn, R. J., 2001. Feline vaccine-associated fibrosarcoma: an ultrastructural study of 20 tumors (1996-99). *Vet. Pathol.* 38, 196–202.
- Mayr, B., Bockstahler, B., Loupal, G., Reifinger, M. und Schleger, W., 1996. Cytogenetic variation between four cases of feline fibrosarcoma. *Res. Vet. Sci.* 61, 268–270.
- Mayr, B., Eschborn, U. und Kalat, M., 1991. Near triploidy in a feline fibrosarcoma. *J. Vet. Med.* 38, 617–620.
- McGavin, D. M. und Zachary, J. F., 2007. *Pathologic basis of veterinary disease*. 4th ed. Mosby Elsevier Verlag, S. 282–285.
- Meraldi, P., Lukas, J., Fry, A. M., Bartek, J. und Nigg, E. A., 1999. Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk/Cyclin A. *Nat. Cell Biol.* 1, 88–93.
- Meraldi, P. und Nigg, E. A., 2002. The centrosome cycle. *FEBS Letters* 521, 9–13.
- Miki, R., Okuda, M., Oikawa, T., Watanabe, M., Ma, Z., Matsumoto, K., Iwata, H. und Inokuma, H., 2004. Centrosome amplification and chromosomal instability in feline lymphoma cell lines. *J. Vet. Med. Sci.* 66, 797–805.
- Morgan, D. O., 1997. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks and micro-processors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 261–291.

- Murnane, J. P. und Sabatier, L., 2004. Chromosome rearrangements resulting from telomere dysfunction and their role in cancer. *Bioassays* 26, 1164–1174.
- Murphy, S. M., Urbani, L. und Stearns, T., 1998. The mammalian γ -tubulin complex contains homologues of the yeast spindle pole body components spc97p and spc98p. *J. Cell Biol.* 141, 663–674.
- Nakajima, T., Moriguchi, M., Mitsumoto, Y., Sekoguchi, S., Nishikawa, T., Takashima, H., Watanabe, T., Katagishi, T., Kimura, H., Okanoue, T. und Kagawa, K., 2004. Centrosome aberration accompanied with p53 mutation can induce genetic instability in hepatocellular carcinoma. *Mod. Pathol.* 17, 722–727.
- Nambiar, P. R., Haines, D. M., Ellis, J. A., Kidney, B. A. und Jackson, M. L., 2000. Mutational analysis of tumor suppressor gene p53 in feline vaccine site-associated sarcomas. *Am. J. Vet. Res.* 61, 1277–1281.
- Nieto, A., Sanchez, M. A., Martinez, E. und Rollan, E., 2003. Immunohistochemical expression of p53, fibroblast growth factor-b and transforming growth factor in feline vaccine-associated sarcomas. *Vet. Pathol.* 40, 651–658.
- Nigg, E. A., 2001. Mitotic kinases are regulators of cell division and its checkpoints. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 21–32.
- Nigg, E. A., 2002. Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat. Rev. Cancer* 2, 815–825.
- Okuda, M., Horn, H. F., Taraporen, P., Tokuyama, Y., Smulian, A. G., Chan, P. K., Knudsen, E. S., Hofmann, I. A., Synder, J. D., Bove, K. E. und Fukasawa, K., 2000. Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/Cyclin E in centrosome duplication. *Cell* 103, 127–140.
- Ortmann, U., 1986. Die Hauttumoren der Katze unter besonderer Berücksichtigung der Fibrosarkome. *Vet. med. Diss.*, München.
- Piel, M., Nordberg, J., Euteneuer, U. und Bornens, M., 2001. Centrosome-dependent exit of cytokinesis in animal cells. *Science* 291, 1550–1553.

- Pihan, G. A., Purohit, A., Wallace, J., Knecht, H., Woda, B., Quesenberry, P. und Doxsey, S. J., 1998. Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res.* 58, 3974–3985.
- Pihan, G. A., Purohit, A., Wallace, J., Malhotra, R., Liotta, L. und Doxsey, S. J., 2001. Centrosome defects can account for cellular and genetic changes that characterize prostate cancer progression. *Cancer Res.* 61, 2212–2219.
- Pihan, G. A., Wallace, J., Zhou, Y. und Doxsey, S. J., 2003. Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. *Cancer Res.* 63, 1398–1404.
- Rajagopalan, H. und Lengauer, C., 2004. Aneuploidie and cancer. *Nature* 432, 338–341.
- Reinacher, M., 1987b. Infection with feline leukemia virus detected upon post-mortem examination. *J. Small. Anim. Prac.* 28, 640–649.
- Rieder, C. L., Khodjakov, A. und Faruki, S., 2001. The centrosome in vertebrates—more than a mikrotubule-organizing center. *Trends Cell Biol.* 11, 413–419.
- Rieger, R., Michaelis, A. und Green, M. M., 1968. A Glossary of genetics and cytogenetics. Springer Verlag New York Inc., S. 90.
- Rudmann, D. G., van Alstine, W. G., Doddy, F., Sandusky, G. E. B. T. und Janovitz, E. B., 1996. Pulmonary and mediastinal metastases of a vaccine-site sarcoma in a cat. *Vet. Pathol.* 33, 466–469.
- Salisbury, J. L., Suino, K. M., Busby, R. und Springer, M., 2002. Centrin-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr. Biol.* 12, 1287–1292.
- Salisbury, J. L., Whitehead, C. M., Lingle, W. L. und Barrett, S. L., 1999. Centrosomes and cancer. *Biol. Cell* 91, 451–460.
- Schäffer, E. H., Weber, K. und Pflieger, S., 1997. Das feline primär intraokuläre Sarkom. *Tierärztl. Prax.* 25, 498–505.

- Schiebel, E., 2000. Gamma-tubulin complexes: binding to the centrosome, regulation and microtubule nucleation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 113–118.
- Secker-Walker, L. M., 1985. The meaning of a clone. *Cancer Genet. Cytogenet.* 16, 187–188.
- Sen, S., 2000. Aneuploidy and cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 12, 82–88.
- Setoguchi, A., Okuda, M., Nishida, E., Yazawa, M., Ishizaka, T., Hong, S.-H., Hisasue, M., Nishimura, R., Sasaki, N., Yoshikawa, Y., Masuda, K., Ohno, K. und Tsujimoto, H., 2001. Results of hyperamplification of centrosomes in naturally developing tumors of dogs. *Am. J. Vet. Res.* 62, 1134–1141.
- Shekhar, M. P., Lyakhovich, A., Visscher, D. W., Henq, H. und Kondrat, N., 2002. Rad6 overexpression induces multinucleation, centrosome amplification, abnormal mitosis, aneuploidy and transformation. *Cancer Res.* 62, 2115–2124.
- Shi, Q. und King, R. W., 2005. Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. *Nature* 437, 1038–1042.
- Shih, I. M., Zhou, W., Goodman, S. N., Lengauer, C., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B., 2001. Evidence that genetic instability occurs at an early stage of colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 61, 818–822.
- Stearns, T., Evans, L. und Kirschner, M., 1991. Gamma-tubulin is a highly conserved component of the centrosome. *Cell* 65, 825–836.
- Stiglmair-Herb, M. T. und Ortmann, U., 1987. Die Fibrosarkome der Katze unter besonderer Berücksichtigung ihrer Dignität. *Kleintierpraxis* 32, 75–79.
- Sudbo, J., Bryne, M., Johannessen, A. C., Kildal, W., Danielsen, H. E. und Reith, A., 2001. Comparison of histological grading and large-scale genomic status (DNA ploidy) as prognostic tools in oral dysplasia. *J. Pathol.* 194, 303–310.

- Sugai, T., Takahashi, H., Habano, W., Nakamura, S., Sato, K., Orii, S. und Suzuki, K., 2003. Analysis of genetic alterations, classified according to their DNA ploidy pattern, in the progression of colorectal adenomas and early colorectal carcinomas. *J. Pathol.* 200, 168–176.
- Tabor, M. P., Brakenhoff, R. H., Ruijter-Schippers, H. J., Kummer, J. A., Leemans, C. R. und Braakhuis, J. M., 2004. Genetically altered fields as origin of locally recurrent head and neck cancer: a retrospective study. *Clin. Cancer Res.* 10, 3607–3613.
- Tsou, M. B. und Stearns, T., 2006. Mechanism limiting centrosome duplication to once per cell cycle. *Nature* 442, 947–951.
- Uetake, Y. und Sluder, G., 2004. Cell cycle progression after cleavage failure: mammalian somatic cells do not possess a tetraploidy checkpoint. *J. Cell Biol.* 165, 609–615.
- Weber, R. G., Bridger, J. M., Benner, A., Weisenberger, D., Ehemann, V., Reifemberger, G. und Lichter, P., 1998. Centrosome amplification as a possible mechanism for numerical chromosome aberrations in cerebral primitive neuroectodermal tumors with TP53 mutations. *Cytogenet. Cell Genet.* 83, 266–269.
- Yamamoto, Y., Matsuyama, H., Furuya, T., Oga, A., Yoshihiro, S., Okuda, M., Kawauchi, S., Sasaki, K. und Naito, K., 2004. Centrosome hyperamplification predicts progression and tumor recurrence in bladder cancer. *Clin. Cancer Res.* 10, 6449–6455.
- Yang, A. H., Kaushal, D., Rehen, S. K., Kriedt, K., Kingsbury, M. A., McConnell, M. J. und Chun, J., 2003. Chromosome segregation defects contribute to aneuploidy in normal neural progenitor cells. *J. Neurosci.* 23, 10454–10462.
- Zeiss, C., Johnson, E. und Dubielzig, R., 2003. Feline intraocular tumors may arise from transformation of lens epithelium. *Vet. Pathol.* 40, 355–362.
- Zhou, H., Kuang, J., Zhong, L., Kuo, W., Gray, J. W., Sahin, A., Brinkley, B. R. und Sen, S., 1998. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces

centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat. Genet.* 20, 189–193.

9 Anhang

9.1 Tabellen

Tabelle 9.1: Chromosomenzahl/Zelle der verschiedenen Zelllinien

FS	I.1	II.1			III.1	IV.1		V.1				K.1
Pass.	118	28	37	65	53	21	66	10	20	27	44	13
Chr.-z.												
19	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
24	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
26	1	1	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0
27	3	1	0	0	0	1	3	2	2	0	0	0
28	2	0	0	0	1	0	1	0	2	0	0	0
29	0	1	0	0	1	0	0	2	1	0	0	0
30	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
31	2	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0
33	1	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
34	3	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1

Tabelle 9.1: Chromosomenzahl/Zelle der verschiedenen Zelllinien (fortgesetzt)

FS	I.1			II.1		III.1	IV.1		V.1				K.1
Pass.	118	28	37	65	53	21	66	10	20	27	44	13	
Chr.-z.													
35	0	0	0	0	1	0	1	0	2	0	0	0	
36	6	0	2	0	6	0	0	0	0	0	0	4	
37	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	
38	4	2	7	3	5	4	2	4	3	9	13	33	
39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
40	3	2	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	
41	0	3	0	2	3	0	0	0	0	2	1	0	
42	2	2	0	3	2	0	0	4	1	0	0	0	
43	6	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	
44	3	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	
45	7	1	0	0	4	3	3	2	0	1	1	0	
46	7	0	0	0	1	0	2	2	1	0	1	0	
47	5	0	0	0	3	0	2	0	1	0	1	0	
48	2	0	2	1	1	2	2	0	2	1	6	0	
49	1	0	0	2	0	2	0	1	0	3	0	0	
50	2	0	0	1	2	0	0	1	4	2	2	0	
51	0	1	1	2	4	0	2	1	5	2	1	0	
52	1	0	0	3	3	0	2	2	1	0	2	0	
53	0	0	0	3	1	0	1	0	2	0	1	0	
54	2	0	0	2	4	0	0	0	0	0	1	0	
55	0	0	0	1	5	0	1	0	0	1	1	0	
56	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	
57	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	
58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
59	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	

Tabelle 9.1: Chromosomenzahl/Zelle der verschiedenen Zelllinien (fortgesetzt)

FS	I.1	II.1			III.1	IV.1		V.1				K.1
Pass.	118	28	37	65	53	21	66	10	20	27	44	13
Chr.-z.												
60	1	0	0	0	3	0	2	0	0	0	0	0
61	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
62	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
63	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
64	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0
65	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0
66	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
67	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
68	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
69	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
70	1	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0
71	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0
72	0	0	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0
73	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
74	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
76	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
77	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
78	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
79	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
80	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
81	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
83	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0
84	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Tabelle 9.1: Chromosomenzahl/Zelle der verschiedenen Zelllinien (fortgesetzt)

FS	II.1			III.1	IV.1		V.1				K.1	
Pass.	118	28	37	65	53	21	66	10	20	27	44	13
Chr.-z.												
85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
86	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
87	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
88	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
91	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
92	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
93	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
94	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
95	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
96	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
98	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
101	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
102	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
104	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
105	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
106	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
107	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
108	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
109	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 9.1: Chromosomenzahl/Zelle der verschiedenen Zelllinien (fortgesetzt)

FS	I.1			II.1		III.1	IV.1		V.1				K.1
Pass.	118	28	37	65	53	21	66	10	20	27	44	13	
Chr.-z.													
110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
111	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
112	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
113	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
114	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
115	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
116	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
117	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
118	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
119	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
121	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
122	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
123	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
124	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
125	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	
126	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
127	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
128	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
129	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
130	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
131	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
132	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
133	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
134	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Tabelle 9.1: Chromosomenzahl/Zelle der verschiedenen Zelllinien (fortgesetzt)

FS	I.1			II.1		III.1	IV.1		V.1				K.1
Pass.	118	28	37	65	53	21	66	10	20	27	44	13	
Chr.-z.													
135	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
136	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
137	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
138	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
139	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
140	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
141	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	
142	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
143	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
144	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
145	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
146	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
147	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
148	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
149	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
151	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
152	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
153	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
154	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
155	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	

Erläuterung der Abkürzungen:

Zell.: Zelllinie; K: Kontrollzelllinie; Pass.: Passage; Chr.-z.: Chromosomenzahl/Zelle

Tabelle 9.2: Tabellarische Übersicht der gezählten Zellen mit ihrer jeweiligen Zentrosomenzahl

Zelllinie	Zentrosomenzahl/Zelle										insg. gezählte Zellen
	1	2	3	4	5	6	7	8	1 oder 2	≥ 3	
FS I.1	58	70	20	3	0	0	0	0	84,8 %	15,2 %	151
FS II.1	38	97	15	3	1	0	0	1	87,1 %	12,9 %	155
FS III.1	37	107	8	1	0	2	0	0	92,9 %	7,1 %	155
FS IV.1	87	61	6	3	2	0	0	0	93,1 %	6,9 %	159
FS V.1	67	97	7	2	1	0	0	0	94,3 %	5,7 %	174
K.1	68	82	1	0	0	0	0	0	99,4 %	0,6 %	151

Erläuterung der Abkürzungen:

FS: Fibrosarkomzelllinie; K: Kontrolle

Tabelle 9.3: Herkunft des Ausgangsmaterials der untersuchten Zelllinien

Zelllinie	Alter	Geschl.	Rasse	Lokalisation	Injektionen
FS I	11 Jahre	m	EKH	re. Thorax	nicht bekannt
FS II	6 Jahre	mk	EKH	re. Thorax	Impfungen
FS III	12,5 Jahre	mk	EKH	zw. Schulterblättern	Impfungen
FS IV	8 Jahre	mk	EKH	re. Thorax	Impfungen
FS V	11 Jahre	wk	Perser	li. Thorax	RCP/T u. Leukose
Kontr.	junger Fetus*	w	EKH	-	-

Erläuterung der Abkürzungen:

FS: Fibrosarkomzelllinie; Geschl.: Geschlecht; m: männlich; w: weiblich; k: kastriert; EKH: Europäische Kurzhaarkatze; re.: rechter; li.: linker; *: 25.- 30. Trächtigkeitstrag; k.A.: keine Angabe; zw.: zwischen

9.2 Chemikalien, Lösungen, Puffer und Bezugsquellen

9.2.1 allgemeine Chemikalien und Lösungen

- Millipore GmbH, Eschborn
Milli-RO10/QUF (Plus)-Water Purification System
Aqua bidestillata
- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methanol 99,9 %, Rotipuran[®], p. a.
Essigsäure 100 %, Rotipuran[®], p. a.
Ethanol 100 %, Rotipuran[®], p. a.
Trypanblaupulver für Mikroskopie, (C. I. 23850), 100 g
Aceton (99,5 %), zur Synthese
- DROL Laborgeräte & Zubehör Dr. Otto Lorey, Reichertshausen
Fermacidal D2[®] (Flächendesinfektionsmittel)
Ch.-Nr. 58485
- Kesla Chemie GmbH, Pharma Wolfen, Wolfen
Wofasept[®] AH (Händedesinfektionsmittel)
UN 1219/N-15668

9.2.2 Arbeitsmaterialien und Geräte

- DUNN Labortechnik GmbH, Asbach
Scitech Division of Asahi Techno Glass Corporation, Tokio, Japan
Zellkulturflaschen (25 cm², canted neck, IWAKI), Kat.-Nr.: 3100-025
Zellkulturflaschen (75 cm², canted neck, IWAKI), Kat.-Nr.: 3110-075
- Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
96 Well Polystyrol Zellkultur Microplatten,
transparent, V-Boden, mit Abdeckplatte (Kat.-Nr.: 651 180)

24 Well Zellkultur Multiwell Platte
transparent, mit Abdeckplatte (Kat.-Nr.: 665 180)

- Karl Hecht KG „Assistent“, Sondheim/Rhön
Pasteurpipetten (230 mm, lange Form)
(Kat.-Nr.: 567/2)
- Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Nunc Cryo Tube Rack (Kat.-Nr.: 376589) Nalgene® Cryo 1 °C Freezing Container (Kat.-Nr.: 5100-0001)
- Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Einwegpasteurpipetten, 3 ml, unsteril
(Art.-Nr.: EA 65.1)
- Eppendorf AG, 22339 Hamburg
Standard Eppendorf Tubes (3810x), farblos, 1,5 ml
(Bestell.-Nr.: 0030 125.150)
- Becton Dickinson Labware Europe, Meylan Cedex, Frankreich
konische Zentrifugenröhrchen, 15ml (Kat.-Nr.: 352096)
- Hettich Zentrifugen GmbH, Tuttlingen
Universal 16A, Rotina 48 RC
- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Rotilabo®-Spritzenfilter, steril, 0,45 µl (Art.-Nr.: P665.1)
- Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Universalmikroskop Axioplan 2
- Leica, Wetzlar
Orthoplan Mikroskop mit Grünfilter 546 nm
- Digitalkamera Nikon
Coolpix 4500
- Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Kompakt-Digitalkamera (mit Filtergewinde)
Axio Vision Release 4.6 (Software)

- Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen, steril
- O. Kindler, Freiburg i. Br.
Eukitt[®], Einschlussmittel für mikroskopische Technik
- Nalge Nunc International Corp., Naperville, USA
Lab-Tek[®] II, ChamberSlide[®]-System mit Deckel, steril
(Art.-Nr.: 154526)
- Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde
StarFrost Objektträger (ca. 76 x 26 mm / 3 x 1 inch)
Deckgläser für Mikroskopie (24 x 60 mm)
- Fa. Heraeus Instruments/ Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
Sicherheitswerkbank (LaminAir)
- Heraeus Instruments, Bereich Thermotech, Hanau
Begasungsbrutschrank (BB 16)
- Fa. Tecnomara GmbH, Fernwald
Absaugpumpe, Vacuboy[®]
Abflamngerät, Fireboy[®]
- Fa. Semperit Technikprodukte GmbH & Co KG, Wien, Österreich
Einmalhandschuhe (Semperguard Latex powderfree)
- J. Köttermann KG, Labortechnik, Hänigsen
Wasserbad
- W. Memmert, Fabrik für Laboratoriumsgeräte, Schwabach/Bayern
Trockensterilisator
- Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Neubauer Zählkammer, Glas, DIN 12847, 0,0025 mm²x 0,1 mm Tiefe
Haemacytometer-Deckgläser (20 x 26 mm)
- Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg
Olympus-Invers-Mikroskop IX50/IX70

- Schott-Rohrglas GmbH, Mitterteich
Schott-Duran[®], Zentrifugengläser (mit kurzkonischem Spitzboden, glatter Rand)
Schott-Duran[®], Zentrifugengläser (mit rundem Boden, glatter Rand)
- Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Pipetus[®]-akku (Akku-betriebene Pipettierhilfe)
- Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim
Magnetrührer (MR 3001 K8, 800 W)

9.2.3 Zellkultur

- PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium),
high glucose (4,5 g/l) with L-glutamine, 500 ml
(Kat.-Nr.: E15-810)
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/10 mg in normal saline), 100 ml
(Kat.-Nr.: P11-010)
Gentamicin solution, 50 mg/ml, steril filtriert, 100 ml
(Kat.-Nr.: P11-005)
Foetal Bovine Serum, 500 ml
(Kat.-Nr.: A15-151)
- MP Biomedicals, North America, USA
Trypsin-EDTA-Lösung für Zellkulturgebrauch, 100 ml
(Kat.-Nr.: 1689149)
- Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), 1000 g
(Art.-Nr.: 4873)
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$), 1000 g
(Art.-Nr.: 6580)
Kaliumchlorid (max. 0,005 % Br) zur Analyse, 500 g
(Art.-Nr.: 4933)
Giemsa-Lösung (Azur-Eosin-Methylenblaulösung), 100 ml
(Art.-Nr.: 1.09204.0100)

- Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Nunc Cryo Tubes (external thread tubes), 1,8 ml (Kat.-Nr.: 368632)
- Biochrom AG seromed, Berlin
Colcemid[®] (Colchizin) in PBS, 25 ml
(Art.-Nr.: L6221)

9.2.4 Immunfluoreszenz

- TBS-Stammlösung (Tris-buffered saline), pH 7,6
 - 60,57 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
 - 610 ml Aqua bidestillata
 - 390 ml HCl 1 N (Titrisol[®], Merck, Darmstadt)
 - Der pH-Wert wurde mit 1 N HCl eingestellt.
- TBS-Gebrauchslösung
 - 100 ml Stammlösung
 - 900 ml 0,8 % NaCl in Aqua bidestillata
 - Die Gebrauchslösung wies einen pH-Wert von 7,8 auf.
- Detergens (1 %):
 - 1 ml Nonident P-40 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
 - 99 ml TBS-Gebrauchslösung
- Blockierungslösung (Schweineserum, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich):
 - 40 % Schweineserum (in TBS-Gebrauchslösung ansetzen)
- TBS/BSA-Lösung (1 %):
 - 500 mg BSA (Bovines Serum Albumin, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.)
 - 50 ml TBS-Gebrauchslösung

- Primärantikörper
Sigma-Aldrich, Steinheim
monoclonal anti-gamma-Tubulin (CLONE GTU-88), mouse ascites
fluid
(Produkt-Nr.: T6557)
- Sekundärantikörper
Dianova GmbH, Hamburg
Cy3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L), 1,5 mg/ml
(Produkt-Nr.: 115-165-003)
- Fluoreszenz-Kernfarbstoff
Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Sybr Green (safe DNA gel stain)
(Kat.-Nr.: S-33102)
- SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Fluoromount for microscopy (Einbettmedium)
(Kat.-Nr.: 21644)
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Nonidet P-40 (nonionic detergent), 50 ml (Kat.-Nr.: N-6507)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, 1000 g (Kat.-Nr.: 93352)
- PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Porcine Serum, 500 ml
(Kat.-Nr.: B15-030)
- Merck, Darmstadt
Titrisol[®], 1N (1 mol/L) HCl
(Kat.-Nr.: 1.09970.0001)
Natriumchlorid, reinst
(Kat.-Nr.: 1.06400.5000)
- Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.
Bovines Serumalbumin (BSA), IgG-free/Protease-free, 50 g

10 Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
BSA	Bovine serum albumine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EKH	Europäische Kurzhaarkatze
et al.	et alii
FeLV	felines Leukämievirus
FeSV	felines Sarkomvirus
FGF	fibroblast growth factor
FS	Fibrosarkomzelllinie
K	Kontrollzelllinie
k. A.	keine Angaben
ml	Milliliter
MTOC	microtubule organizing center
P	Passage
PBS	Phosphate buffered saline
PCM	pericentriolar matrix
PDGF	Platelet-derived growth factor
®	registered trade mark

Abkürzungsverzeichnis

TBS	Tris puffered saline
TGF α	transforming growth factor alpha
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
well	Vertiefung einer Zellkulturplatte

Ich erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne un-erlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherheit guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

11 Danksagung

Einer Vielzahl hilfsbereiter Menschen möchte ich ganz herzlich danken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre:

Herrn Prof. M. Reinacher für die freundliche Aufnahme am Institut und die Möglichkeit, auf diesem interessanten und vielseitigen Forschungsgebiet arbeiten zu können.

Herrn Dr. Werner Hecht.

Werner, ich möchte Dir für Dein Interesse am Fortgang meiner Promotion und Deine Begeisterung vermittelnde, engagierte Betreuung herzlich danken.

Herrn Prof. E. Burkhardt für eine immerwährende „zauberfeen“hafte Arbeitsatmosphäre.

Herrn Dr. Failing und Frau M. Sparenberg vom Institut für Biomathematik der Justus-Liebig-Universität Gießen für ihre freundliche Hilfe bei der statistischen Beurteilung und Darstellung der Daten.

Allen Kollegen und Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Pathologie für die gute Zusammenarbeit.

Silke Engel für die Einführung in die Chromosomenpräparation, doch vor allem für ihre zuverlässige, gute Laune und freundschaftliche Verbundenheit. Eine Rheinländerin bedankt sich für die unvergeßliche Gastfreundschaft Holzheims, Hauptstadt von Pohlheim.

Meiner Zimmerkollegin Annika Herrmann für die schöne Zeit im „Frauenbüro“.

Annette Artelt für die zuverlässige Zellpflege während meiner Urlaubszeiten.

Frau Daniela Ott, Mitarbeiterin des Instituts für Veterinär-Physiologie, danke ich ganz herzlich für die Einführung in die Welt der Immunfluoreszenz.

Meinen Eltern und meinen Geschwistern Vanessa und Huschaam von ganzem Herzen, die jederzeit bedingungslos meinen beruflichen Werdegang unterstützt haben.

Meinem Verlobten, Svante C. v. Erichsen, in tiefer Liebe für seine unendliche Geduld und Unterstützung, aus denen ich immer wieder Kraft geschöpft habe.

Meinen engsten Freunden Simone Kuntze, Tatjana und Stephan Linde für ihre unermüdliche Unterstützung und ihren hilfreichen Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Harris.

Körper und Stimme leiht die Schrift dem stummen Gedanken,
durch der Jahrhunderte Strom trägt ihn das ruhende Blatt.
(Friedrich Schiller)

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5407-5



9 17 8 3 8 3 5 1 9 5 4 0 7 6 1

