

**Aus dem Institut für Pathologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. H.-K. Müller-Hermelink**

**Die Notwendigkeit der Doppelfärbung für Zytokeratin und DNA in der
Durchflusszytometrie
sowie ihre Bedeutung für die durchflusszytometrische Erfassung von p53
am Beispiel des Mammakarzinoms**

**Inaugural – Dissertation
Zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Maria Annegret Hanke
aus Pirna**

Würzburg, Juni 2000

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Justus Müller
Korreferent: Prof. Dr. med. Hans Caffier
Dekan: Prof. Dr. med. Volker ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Dezember 2001

Die Promovendin ist Ärztin

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	4
1.1.	Bedeutung der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse am Mammakarzinom	4
1.2.	Bedeutung von p53 bei Mammakarzinomen	7
2.	MATERIAL UND METHODEN	10
2.1.	Material	10
2.2.	Methodik der Doppelfärbung für DNA und Zytokeratin	11
2.2.1.	Zellvereinzelung	11
2.2.2.	Fixierung in Paraformaldehyd und Permeabilisierung durch Zitratpuffer	12
2.2.3.	Färbung von Zytokeratin	12
2.2.4.	Färbung von DNA	13
2.3.	Die Methodik der Doppelfärbung für DNA und p53	14
2.3.1.	Kernfärbung am Beispiel von MIB 1	14
2.3.2.	Immunhistochemische Färbung von p53	16
2.3.3.	Zellvereinzelung	16
2.3.4.	Fixierung in Paraformaldehyd und Permeabilisierung durch Zitratpuffer	16
2.3.5.	Färbung von p53 und DNA	17
2.4.	Durchflusszytometrische Messung	17
2.5.	Zellzyklusanalyse	18
2.5.1.	DNA-Zytokeratin-Doppelfärbung	18
2.5.2.	DNA-p53-Doppelfärbung	19

3.	ERGEBNIS	21
3.1.	Ergebnisse der DNA-Zytokeratin-Doppelfärbung	21
3.1.1.	Ploidie	21
3.1.2.	S-Phase-Fraktion	28
3.1.3.	Variationskoeffizient	28
3.2.	Ergebnis der DNA-p53-Doppelfärbung	29
3.2.1.	Anteil p53-positiver Zellen an der Proliferationsfraktion	31
3.2.2.	Anteil aneuploider Zellen an p53-positiven Tumorzellen	32
3.2.3.	Anteil p53-positiver Zellen in Durchflusszytometrie und Immunhistochemie	32
4.	DISKUSSION	34
4.1.	Notwendigkeit der DNA-Zytokeratin-Doppelfärbung in der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse	34
4.1.1.	Erfassung der Ploidie	34
4.1.2.	Erfassung der Proliferationsfraktion	37
4.1.3.	Methodische Aspekte der DNA-Zytokeratin-Doppelfärbung	38
4.2.	Möglichkeiten und Grenzen der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse p53-positiver Mammakarzinome	39
4.2.1.	Verlust p53-positiver Zellen bei der Aufarbeitung für die Durchflusszytometrie	39
4.2.2.	Verteilung p53-positiver Zellen innerhalb des Zellzyklus	40
4.2.4.	Methodische Besonderheiten der parallelen Aufarbeitung für Zytoplasma- und Kernfärbung	41
5.	ZUSAMMENFASSUNG	44
6.	LITERATURLISTE	46
	DANKSAGUNG	53

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1: Doppelfärbung von DNA und Zytokeratin bzw. DNA und MIB-1 an ein und demselben Tumor (Fall 19)	15
Abb. 2: Tetraploide Tumorzellpopulation vor und nach Tumorzellselektion (Fall 9)	22
Abb. 3: Near-diploiden Tumor (Fall 3)	25
Abb. 4: Veränderungen des DNA-Index nach DNA-Zytokeratin-Doppelfärbung	27
Abb. 5: Doppelfärbungen für DNA und p53 sowie DNA und Zytokeratin an ein und demselben Tumor (Fall 17):	30
Abb. 6: Prozentualer Anteil aneuploider Zellen an p53-positiven Tumorzellen.	33

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: TNM-Klassifikation und Grading der in der statistischen Auswertung enthaltenen Tumoren	10
Tab. 2: Vergleich der Ploidie vor und nach Gaten für Zytokeratin-positive Tumorzellen	24
Tab. 3: Gegenüberstellung der Zellzyklusparameter vor und nach dem Gaten auf Zytokeratin-positive Zellen	27
Tab. 4: Gemittelte Zellzyklusparameter im Vergleich zwischen der Zytokeratin- und der p53-Färbung.	31

1. EINLEITUNG

Das Mammakarzinom hat einen Anteil von 31,5% an allen Krebsarten. In den USA entwickeln ungefähr 9% aller Frauen in ihrem Leben eine Brustkrebserkrankung (Ownby 1985). Die Mortalität des Karzinoms beträgt bei den US-amerikanischen Frauen 18,4% (Mettlin 1994).

Für die Langzeitprognose einer Brustkrebserkrankung haben sich sowohl die Prognosefaktoren der ersten Generation (Staging, Typing und Grading) als auch der zweiten Generation (wie z.B. die Steroidhormonrezeptoranalyse) in vieler Hinsicht bewährt und werden daher heute in der Routinediagnostik an jedem Mammakarzinom bestimmt (Prechtel K 1993).

Neuerdings wird eine dritte Generation der Prognosefaktoren zunehmend in die Praxis integriert. Ziel dabei ist es, bisherige Therapiekonzepte durch bessere Individualtherapie abzulösen.

1.1. Bedeutung der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse am Mammakarzinom

Die prognostische Bedeutung der Durchflusszytometrie, insbesondere der Zellzyklusparameter, ist bereits in zahlreichen Studien aufgezeigt worden (Cornelisse 1987, Lewis 1990, Beerman 1990, Eskelinen 1992, Balslev 1994). Im Vordergrund stehen dabei die Proliferationsfraktion und die Ploidie der Tumorphysen.

Bei Untersuchung der Ploidie konnten zahlreiche Autoren für DNA-diploide, near-diploide und tetraploide Tumoren eine günstigere Prognose nachweisen (Toikkanen 1989, Witzig 1991, Balslev 1994, Visscher 1995). Dennoch ist die Ploidie als unabhängiger prognostischer Marker umstritten. Einige Autoren

konnten keine signifikante Assoziation zwischen Ploidie und Prognose nachweisen (Opfermann 1987, Cornelisse 1987, Beerman 1990, Isola 1992, Witzig 1994, Wingren 1994). Dies mag an der Größe der untersuchten Kollektive gelegen haben, an den Tumorstadien, die in die Studien eingeschlossen waren, oder auf methodischen Gründen beruhen.

Für die S-Phasen-Fraktion der Mammakarzinome ist eine prognostische Aussagekraft nachgewiesen. Erhöhte S-Phasen-Fraktionen von Mammakarzinomen sind mit mäßiger und geringgradiger histologischer Differenzierung und mit einer erhöhten Rezidivrate nodal positiver (Ewers 1992, Stal 1992, Pfisterer 1995, Kute 1995) und negativer Tumoren (Isola 1992, Balslev 1994, Witzig 1994, Wingren 1994, Winters 1994) assoziiert.

Verglichen mit der Aussagekraft der DNA-Ploidie dokumentierten zahlreiche Studien eine bessere Assoziation zwischen hoher S-Phasen-Fraktion und Krankheitsverlauf (Überlebensrate) (Eskelinen 1992; Ottestad 1993; Wingren 1994).

Dies wird nachvollziehbar, wenn man berücksichtigt, dass alle diploide Tumoren bei der Aussage der DNA-Ploidie als Tumoren mit günstigeren Prognosen gedeutet werden. Unter ihnen befinden sich jedoch auch Tumoren mit hohen Proliferationsraten, für die die allgemeine Aussage, sie besäßen eine günstigere Prognose, nicht ohne weiteres zutrifft. Bei der Ermittlung der S-Phasen-Fraktion werden auch diploide Tumoren mit hohen Proliferationsfraktionen in die prognostisch ungünstigere Gruppe eingeordnet. Aneuploide Tumoren sind dabei aufgrund ihrer hohen Proliferation ohnehin schon in der Gruppe der Tumoren mit prognostisch ungünstigem Verlauf enthalten, da sie eine signifikant höhere S-Phasen-Fraktion als die Mehrheit der diploiden Tumoren besitzen (Frei 1993, Visscher 1990, Wingren 1994). Unter diesem Aspekt ist die Erfassung der S-Phasen-Fraktion als Prognosefaktor zuverlässiger als die alleinige Bestimmung der DNA-Ploidie.

Das Tumorgewebe der Mammakarzinome stellt ein heterogenes Gewebe dar. Neben Tumorzellen sind nicht-neoplastische inflammatorische, Stroma-, Endothel-, Epithelzellen und andere Zellen enthalten, deren Zellzyklusparameter bei der Einfachfärbung die Bestimmung von S-Phasen-Fraktion und Ploidie beeinflussen. Der Anteil der nicht-Tumorzellen schwankt von Tumor zu Tumor stark und kann Werte von 10 bis 90% einnehmen (Black 1956, Berg 1959, Svennevig 1979, Rowe 1984). Die Sensitivität des Nachweises aneuploider Peaks kann durch den Anteil dieser nicht-Tumorzellen innerhalb des Gewebes erheblich beeinflusst werden. Es ist bekannt, dass die aneuploiden Populationen mitunter nur einen kleinen Teil der Tumorzellpopulation darstellen. In Tumoren mit einem hohen Anteil an Stromazellen kann er unter 10% liegen. In der konventionellen Durchflusszytometrie kann eine derart kleine Population jedoch unerkannt bleiben (Coon 1987).

Auch die Bestimmung der S-Phasen-Fraktion wird erheblich durch den Anteil nicht-neoplastischer Zellen beeinflusst. Die in Tumoren immunhistochemisch mit Ki67 und MIB1 bestimmten Proliferationsfraktionen von lymphozytären Stromainfiltraten zeigen oft Werte von 10 – 30% (Frei 1993). Diese liegen im Bereich der Proliferationsfraktionen vieler Mammakarzinome, wobei einzelne Tumoren auch deutlich niedrigere oder höhere Proliferationsfraktionen aufweisen können. Die durchflusszytometrisch bestimmte S-Phasen-Fraktion wird also in einigen Fällen weniger die Proliferation der Tumorzellen als vielmehr die Proliferation der Stromazellen des Tumors widerspiegeln (Kenyon 1994).

Die Beeinflussung der Zellzyklusanalyse von Mammakarzinomen durch die Überlagerung von nicht-Tumorzellen lässt sich durch eine isolierte Darstellung der Tumorzellen vermeiden. Neuere Arbeiten zeigen, dass die Doppelfärbung von Zytokeratin und DNA am Tumorgewebe möglich ist (Visscher 1990, Frei 1993, Shankey 1994, Wingren 1994). Durch die getrennte Darstellung der Zytokeratin-positiven Zellen in einem Gate gelang es, die Tumorzellen

getrennt von den Stroma- und Endothelzellen darzustellen. Bislang existiert jedoch weder ein systematischer Vergleich der Rate aneuploider Tumoren zwischen Einfach- und Doppelfärbung, noch eine systematische Erfassung der S-Phasen-Fraktion vor und nach „Gaten“ für Zytokeratin-positive Zellen. Das Ziel im ersten Teil dieser Arbeit ist es, die Rate aneuploider Tumoren und die Zellzyklusparameter, insbesondere die Höhe der S-Phasen-Fraktion, systematisch zwischen Einfach- und Doppelfärbung am Frischmaterial zu vergleichen.

1.2. Bedeutung von p53 bei Mammakarzinomen

P53 ist ein Tumor-Suppressor-Gen, welches seine Position auf Chromosom 17p13 innehat. Das p53-Protein ist bei Schäden an der DNA in der Lage, die Zelle bis zum Ende der DNA-Reparatur in der G1-Phase zu arrestieren oder in nicht reparablen Fällen den Untergang der Zelle über den programmierten Zelltod, die Apoptose einzuleiten (Chiarugi 1994, Bates 1996). Dabei wirkt es indirekt über die Transkription einer Vielzahl anderer Gene, deren Produkte die Teilung der Zelle gemeinsam zum Stillstand bringen (Vogelstein 1992, Dickson 1995, Harris 1996, Bates 1999).

Mutation, Inaktivierung, Verlust oder die down-Regulation der Expression von p53 können die Ursache einer malignen Progression sein. Mehr als die Hälfte aller menschlichen Tumoren weisen mutiertes p53 auf. Durch diese Mutation ändert sich die Struktur des codierten Proteins. Es wird zum Onkogenprodukt und häuft sich in der Zelle an. In seltenen Fällen ist diese Mutation vererbbar. Die vererbliche homozygote p53-Mutation ist unter dem Namen Li-Fraumeni-Syndrom bekannt geworden und führt zur Brustkrebs- und Sarkomentwicklung (Malkin D 1990).

Im Falle des Mammakarzinoms ist die sporadische p53-Mutation in 20 – 50% der Fälle nachweisbar (Dickson 1995).

Die Immunhistochemie ist eine leicht durchführbare Methode zum Nachweis des mutierten p53-Proteins. Es besteht aber kritisch betrachtet nur eine lockere Korrelation zwischen immunhistochemisch detektierbarem p53 und dem tatsächlichen Vorliegen der Mutation. Zum einen führen bei weitem nicht alle p53-Mutationen zu einer für den immunhistochemischen Nachweis ausreichenden Akkumulation des Proteins im Kern, zum anderen gibt es auch „falsch positive“ Befunde durch die Überexpression des Wild-Typs von p53. Trotz dieser Einschränkung ist der immunhistochemische p53-Nachweis nach wie vor eine oft angewandte und mit den genannten Einschränkungen auch aussagekräftige Methode.

In den Studien über p53 am Mammakarzinom wurde den Zusammenhängen zwischen Proliferation, Ploidie und p53-Expression zunehmend Aufmerksamkeit geschenkt.

Die Mehrzahl p53-positiver Tumoren weisen Grad 2 oder 3 in der histologischen Differenzierung auf. Unter ihnen befindet sich ein besonders hoher Anteil aneuploider Karzinome (Brotherick 1995, Dabbs 1995, Rosanelli 1995, Pich 1996). Weiterhin korrelieren erhöhte Proliferations- (Meyer 1994, Dabbs 1995, Pich 1996) und verringerte Überlebensraten mit der Mutation von p53 (Pich 1996). Aufgrund dieser vielfältigen Zusammenhänge wurde neben der Erfassung der bekannten Prognosefaktoren sogar schon ein genetisches Staging für p53 empfohlen (Shackney 1995).

Ein Teil der oben genannten Studien erfolgte bereits durchflusszytometrisch (Brotherick 1995, Shackney 1995, Chakravarty 1996, Bonsing 1997).

Aus der Immunhistochemie ist bekannt, dass nicht alle Zellen eines p53-positiven Tumors das Protein enthalten. Die Akkumulation von p53 zeigte beispielsweise in der Studie von Bonsing (1997) intratumoral eine Heterogenität: sowohl die diploiden als auch die aneuploiden Populationen enthielten p53-positive und -negative Zellen. Auf Einzelzellebene ist aber wenig über den Zusammenhang zwischen Ploidie, p53-Überexpression und Zellzyklusregulation bekannt.

Die Verteilung der p53-positiven Zellen innerhalb des Zellzyklus stand in der vorliegenden Arbeit im Vordergrund. Dabei war der Anteil p53-positiver Zellen an der Proliferationsfraktion von besonderem Interesse, da die Auswirkungen des mutierten p53 diesbezüglich bislang nicht ausreichend bekannt sind.

Zum anderen sollte auch auf den Zusammenhang zwischen Aneuploidie und p53 eingegangen werden. Die heterogene Verteilung p53-positiver Zellen schien in den Tumoren, wie oben beschrieben, unabhängig vom DNA-Index vorzuliegen (Bonsing 1997). Es stellt sich jedoch die Frage, ob die p53-positiven Anteile in diploiden und aneuploiden Populationen nicht unterschiedlich gewichtet sind. Bei der positiven Korrelation zwischen Aneuploidie und p53 ist anzunehmen, dass der Anteil p53-positiver Zellen in aneuploiden Subpopulationen höher liegt als in diploiden, sodass demnach doch eine vom DNA-Index abhängige p53-Verteilung vorliegt.

Für sämtliche Aussagen wurde ein direkter Bezug zwischen den p53-positiven Zellen und der Gesamtheit der Tumorzellen eines Falles hergestellt. Die Gesamtheit der Tumorzellen wurde dabei vereinfachend mit den Zytokeratin-positiven Zellen gleichgesetzt, die, wie im ersten Teil der Arbeit beschrieben, als Tumorzellen getrennt von den nicht-Tumorzellen des Zellgemisches ausgewertet wurden. Die Voraussetzung für ihren Vergleich war, eine Aufarbeitungsmethode zu finden, die sowohl die Färbung von Oberflächen- als auch Kernstrukturen ermöglicht. Dies war erforderlich, da sich Zytokeratin im Zytoplasma und p53 in seiner aktiven Form im Zellkern anreichert.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

Für die Doppelfärbung von DNA und Zytokeratin wurden 28 Mammakarzinome untersucht, 22 davon waren invasiv-duktales und 5 invasiv-lobuläre Karzinome. Von diesen 28 Fällen waren 26 für die DNA-Zytokeratin-Doppelfärbung komplett auswertbar. TNM Klassifikation und histologische Differenzierung sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1: TNM-Klassifikation und Grading der in der statistischen Auswertung enthaltenen Tumoren

	DNA-Zytokeratin- Doppelfärbung: N=26	DNA-p53- Doppelfärbung: N=9
Tab.1a: Tumogrösse		
T1	3	2
T2	9	3
T3	3	1
T4	11	3
Tab.1b: LK-Status		
N0	10	4
N1	8	3
N2	3	1
N (in Axilla keine LK auffindbar)	1	0
Nx (keine LK entnommen)	4	1
Tab.1c: Grading		
G1	0	0
G2	8	0
G3	13	8
Invasiv lobulär	5	1

Bei 9 dieser 26 ausgewerteten Fälle konnte immunhistochemisch p53 nachgewiesen werden. Es erfolgte parallel zur Doppelfärbung von DNA und Zytokeratin die Doppelfärbung von DNA und p53. Die Einordnung dieser Fälle nach TNM und Grading ist ebenfalls in Tab.1 enthalten.

2.2. Methodik der Doppelfärbung für DNA und Zytokeratin

2.2.1. Zellvereinzellung

Das Frischgewebe wurde bis zur Aufbereitung bei -70°C aufbewahrt. Von den soliden Blöcken wurden für jede Doppelfärbung mit Hilfe eines Mikrotoms durchschnittlich vier $100\ \mu\text{m}$ Schnitte angefertigt, in Petrischalen platziert und mit PBS (pH 7,4, 4°C) bedeckt. Die Anzahl der Schnitte richtete sich dabei nach dem Durchmesser, der angeschnittenen Fläche des Tumors und dem geschätzten Anteil an Tumorzellen im Gewebe.

Um die einzelnen Zellen aus dem Verband zu lösen, wurden unterschiedliche Methoden aus den Veröffentlichungen der letzten Jahre erprobt. Unter ihnen insbesondere die mechanische Zerkleinerung mit Hilfe von Pinzetten, Mörser und gekreuzten Klingen. Am Mammakarzinom erwies sich dabei nur die zuletzt genannte Methode als standardisiert einsetzbar (Cerra 1990). Sowohl die Zerkleinerung mit Pinzetten als auch die mittels Mörser erzeugten qualitativ minderwertige Zellsuspensionen mit hohem Debris-Anteil, wodurch sie für die Durchflusszytometrie nicht mehr auswertbar waren.

Die erhaltene Suspension wurde durch Zugabe von ca. 1 ml PBS aufgeschwemmt und durch eine Nylon-Gaze mit $50\ \mu\text{m}$ Maschenweite in ein Zentrifugenröhrchen filtriert.

2.2.2. Fixierung in Paraformaldehyd und Permeabilisierung durch Zitratpuffer

Die Tumore wurden in Anlehnung an eine von Lan et al. 1996 beschriebene Methode vorbereitet. Zu den Zellsuspensionen wurde die gleiche Menge an 4%igem 4°C kaltem Paraformaldehyd zugegeben. Die Zellen wurden für 10 Minuten auf Eis fixiert. Anschließend wurden sie abzentrifugiert, gewaschen und in einem unverschlossenen 50 ml - Becherglas in circa 10 ml 0.01 M - Natrium Zitratpuffer (pH 6.0, versetzt mit 0.5% BSA) resuspendiert. Dieses Becherglas wurde in ein mit Plastikfolie abgedecktes 500 ml - Becherglas gestellt und in der Mikrowelle bei 800 W bis zum Sieden (ca. 30 Sekunden lang) erhitzt. Die Probe wurde aus den beiden heißen Bechergläsern in ein normales Zentrifugenröhrchen gegeben und danach auf Eis für 10 Minuten abgekühlt. Vor der Färbung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und erneut durch eine Nylon-Gaze mit 50 µm Porenweite filtriert.

Um Messung und Methode überprüfen zu können, wurden von jeder Zellsuspension Zellausstriche angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Die Zusammensetzung des Zellgemisches im Ausstrich wurde mit der Zusammensetzung des Zellgemisches im Gewebeschnitt verglichen.

2.2.3. Färbung von Zytokeratin

Für die Färbung von Zytokeratin wurde der an Zytokeratin 8 und 18 bindende Antikörper CAM 5.2 verwendet (Becton Dickenson, Heidelberg, Deutschland). Die Proben wurden für die Färbung von Zytokeratin und Isotyp in gleicher Verdünnung und unter den selben Bedingungen aufgearbeitet.

Von den Zellsuspensionen wurden zwei gleich große Mengen gleicher Zelldichte (angestrebte Zellzahl 10^5 - 10^6) abzentrifugiert. Die Blockierung unspezifischer Bindungen erfolgte durch Inkubation der Zellen in 100 μ l Schweineserum (1:2 mit PBS verdünnt), bzw. 50 μ l Blocking Reagenz (Merck, Darmstadt, Deutschland).

Nach einem Waschgang in PBS wurde der eine Teil der Probe direkt mit FITC konjugiertem monoklonalen Maus-IgG2a Antikörper (cam 5.2), bzw. indirekt mit monoklonalem Maus-IgG2a Antikörper (cam 5.2) und FITC konjugiertem anti-Maus IgG2a Antikörper gefärbt.

Als negative Kontrolle wurde der andere Teil der Probe mit einem nicht spezifisch an das Gewebe bindendem, FITC konjugierten IgG2a Antikörper (Ziege F(ab`)-anti-Maus (H&L)-Fluorescein, Manchester, England). Im Falle der indirekten Färbung wurden für die Markierung des Isotyps ein unspezifisch bindender monoklonaler Maus IgG2a Antikörper (Amyloid A) und FITC konjugierter anti-Maus IgG2a Antikörper verwendet.

2.2.4. Färbung von DNA

Abschließend wurde die DNA mit 5 μ l Propidium Jodid (5 mg/ml, Serva, Deutschland) angefärbt und für 15 Minuten unter Lichtabschluss bei 4°C inkubiert.

2.3. Die Methodik der Doppelfärbung für DNA und p53

2.3.1. Kernfärbung am Beispiel von MIB 1

In Vorbereitung auf die Untersuchung von p53 erfolgte eine durchflusszytometrische Färbung mit MIB 1 (Ki-67). Da dieser Marker im Kern jeder proliferierenden Zelle präsent ist, diente er in diesem Fall zur Erprobung der Kernfärbung der in Anlehnung an Lan 1996 beschriebenen Methode. Diese Methode wurde gewählt, da sie eigens zur parallelen Färbung von Oberflächenmarkern und nukleären Antigenen entwickelt wurde.

Parallel zur Doppelfärbung von Zytokeratin und DNA (siehe Material und Methoden unter 2.) wurde die Doppelfärbung für Ki67 und DNA durchgeführt. Anstelle des Antikörpers CAM 5.2 wurde der monoklonale Maus IgG2a Antikörper MIB1 (Dianova, Hamburg, Deutschland) verwendet. Von 12 durchflusszytometrisch erfassbaren Tumoren konnten alle für DNA und MIB1 als positiv gewertet werden (Abb.1), sodass die Methode zur durchflusszytometrischen Erfassung von Kernproteinen als ausreichend zuverlässig anzusehen ist und bei allen Tumoren eingesetzt werden konnte.

Abb.1a: Isoantikörper-Färbung

Abb.1b: Propidium Jodid Einfachfärbung: aneuploider Tumor (DI=1.823)

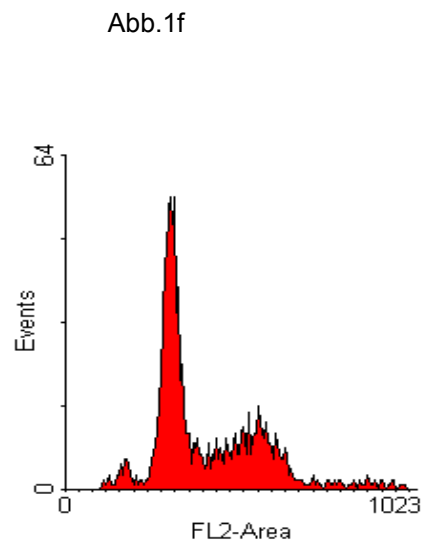
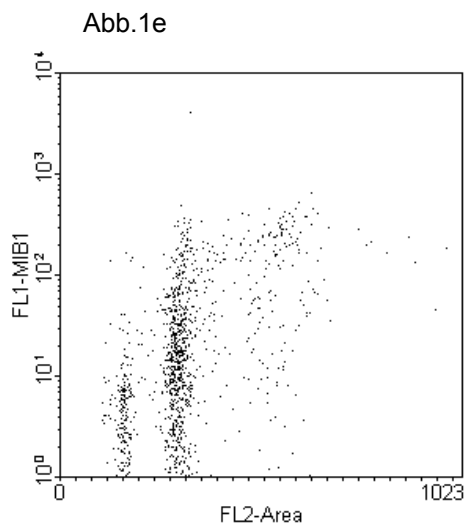
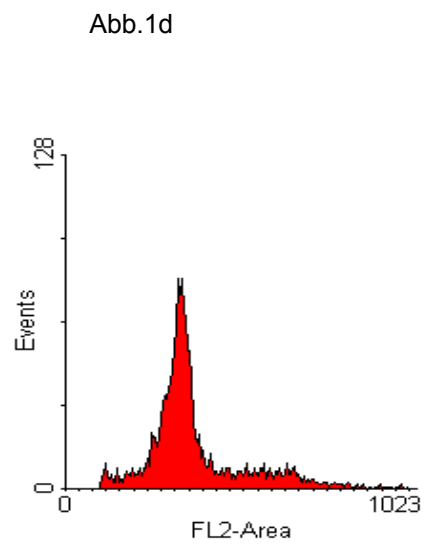
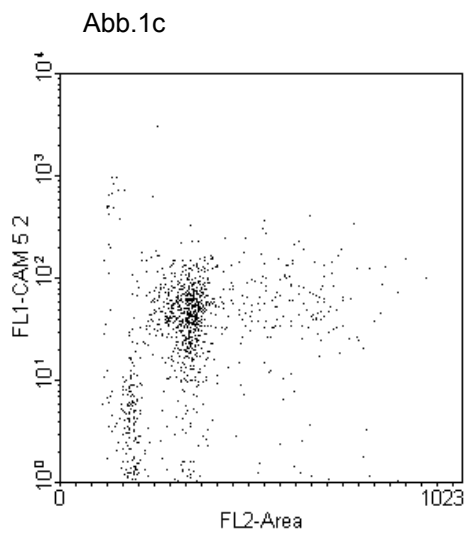
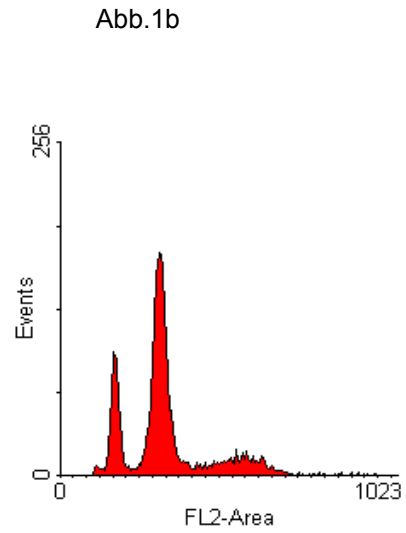
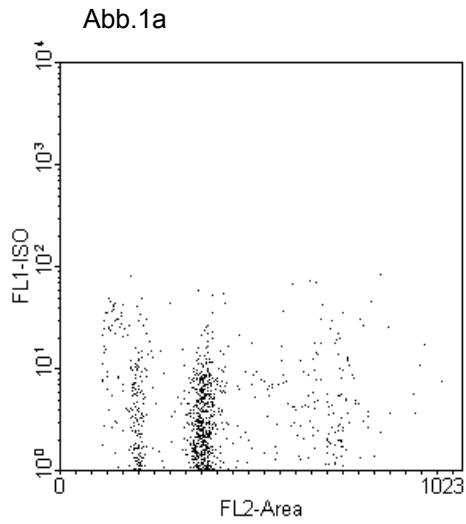
Abb.1c: Dotplot der Doppelfärbung für Zytokeratin und DNA: Deutliche Absetzung der Zytokeratin-positiven Zellen von der Begleitpopulation.

Abb.1d: Darstellung der Zytokeratin-positiven im DNA-Histogramm: Sämtliche Zytokeratin-positiven Zellen sind aneuploid

Abb.1e: Dotplot der Doppelfärbung für MIB1 und DNA

Abb.1f: Propidium - Jodid - Färbung der MIB-1 positiven Zellen: Geringe Proliferationsfraktion im G0/G1 Peak der Nicht-Tumorzellen und hohe Proliferation im G0/G1 Peak der Tumorzellen.

Abb. 1: Doppelfärbung von DNA und Zytokeratin bzw. DNA und MIB-1 an ein und demselben Tumor (Fall 19)



2.3.2. Immunhistochemische Färbung von p53

Nicht alle Antikörper gegen p53 sind für die Durchflusszytometrie geeignet. Zu denen für die eine suffiziente Färbung belegt ist, gehört der hier verwendeten Antikörper vom Klon DO-7 (Bonsing 1997).

Die immunhistochemische Färbung zum p53-Nachweis erfolgte an Schnitten von Paraffinblöcken, die nach der Deparaffinisierung in einem Dampfkochtopf mit 10 mM Zitratpuffer, pH 6 für 15 Minuten erhitzt worden waren. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur (für mindestens 20 Minuten) erfolgte die Absättigung durch den spezifischen Antikörper für p53 (Klon DO-7, Glostrup, Dänemark) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die darauf folgende Färbung der Antikörperbindungen erfolgte nach dem Protokoll der Peroxidase-Reaktion.

2.3.3. Zellvereinzellung

Die Gewinnung der Zellsuspension aus den Gefrierblöcken (Zellvereinzellung) erfolgte in derselben Weise, wie es in der Aufarbeitung der Proben für die Zytokeratin-Färbung beschrieben wurde: durch die Zerkleinerung des Gewebes mit gekreuzten Klingen an 100 µm - Schnitten.

2.3.4. Fixierung in Paraformaldehyd und Permeabilisierung durch Zitratpuffer

Die Vorbereitung der Zellsuspensionen für die Bindung des p53-Antikörpers an sein nukleäres Antigen wurde nach der von Lan et al. 1995 beschriebenen Methode durchgeführt. Diese wurden bereits für die Doppelfärbung von DNA

und Zytokeratin erläutert. Die notwendigen Schritte erfolgten für beide Doppelfärbungen (DNA-Zytokeratin und DNA-p53) bis zum letzten Waschgang an einer gemeinsamen Suspension. Erst danach wurde die Suspension in unterschiedliche Reagenzgläser zu je gleichen Teilen für die Färbung von Isotyp, Zytokeratin und p53 aufgeteilt.

Auch im Falle der p53 Färbung wurden vor der Messung Zellausstriche für eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung gewonnen, um die Qualität der vereinzelt Zellen einschätzen und um im Vergleich zu den Paraffinschnitten die Repräsentativität der Tumorzellsuspension beurteilen zu können.

2.3.5. Färbung von p53 und DNA

Das Protokoll der Doppelfärbung für DNA und p53 entsprach weitestgehend dem der Zytokeratin-Färbung mit unkonjugiertem Antikörper CAM 5.2. Dieser wurde ersetzt durch den monoklonalen Maus IgG2a Antikörper p53 (Klon DO-7, Glostrup, Dänemark). Für die negative Kontrolle konnte die Isotyp-Färbung der DNA-Zytokeratin-Doppelfärbung verwendet werden (FITC an Amyloid A - IgG2a monoklonal Maus Antikörper).

2.4. Durchflusszytometrische Messung

Die Messungen wurden mit einem FACScan (Becton Dickenson, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Zählraten zwischen 100 und 800 Zellen / Minute ergaben eine bestmögliche Auflösung. 20000 Zellen wurden im List Mode Modus aufgezeichnet. Geringere Zellzahlen entstanden bei besonders schwierig zu vereinzeln Tumorgewebe (z.B. bei hohem Fettanteil). Die minimale Zellzahl für die Auswertung wurde auf 5000 festgesetzt. FITC wurde

auf Kanal 1 (grüne Fluoreszenz) und Propidium Jodid auf Kanal 2 (rote Fluoreszenz) gemessen. Zwischen diesen beiden Kanälen wurde mit Zellsuspensionen kompensiert, die mit FITC gekoppeltem Isoantikörper und Propidium Jodid sowie mit FITC gekoppeltem spezifischen Zytokeratin-Antikörper gefärbt worden waren.

2.5. Zellzyklusanalyse

Die Ergebnisse wurden nach doublet discrimination mit Multicycle Software AV (Phoenix Flow Systems, San Diego, USA) unter Verwendung der Zelldebris- und Zellklumpensubstraktionsfunktion (doublet discrimination modus, Haag 1987; Shankey 1993) ausgewertet.

2.5.1. DNA-Zytokeratin-Doppelfärbung

Die Position der Zytokeratin-negativen Zellen im Dotplot wurde durch die Färbung des Isoantikörpers ermittelt. Die Zytokeratin-negativen Zellen konnten nach Bedarf von der Analyse ausgeschlossen werden, indem ein Gate auf die Zytokeratin-positiven Zellen gesetzt wurde. Die Zellzyklusparameter wurden von den Zytokeratin-positiven Populationen im Vergleich zu den Tumorphpopulationen in der DNA-Einfachfärbung erfasst.

In der Einfachfärbung wurde der Peak mit dem niedrigsten DNA-Gehalt als diploide Referenzpopulation erachtet (Hiddemann 1984). Entsprechend den Angaben in der Literatur wurden Tumoren mit einem DNA-Index von 0,9 bis 1,1 als diploid, bei einem DNA-Index von 1,1 bis 1,3 als „near-diploid“, bei einem DNA-Index von 1,3 bis 1,9 als aneuploid, bei einem DNA-Index von 1,9

bis 2,1 als tetraploid und bei einem DNA-Index größer als 2,1 als hypertetraploid definiert (Lawry 1993, Beerman 1990).

Der diploide Referenzpeak in der Doppelfärbung wurde definiert als die Population mit dem niedrigsten DNA-Gehalt der Zytokeratin-negativen Zellen. Der DNA-Index der Zytokeratin-positiven Population wurde festgelegt, indem die G0/G1 Kanalnummer der Zytokeratin-positiven Population durch die des diploiden G0/G1 Peaks der Zytokeratin-negativen Referenzpopulation dividiert wurde. Die Definition der Ploidie erfolgte wie bei der Einfachfärbung.

Um eine exakte Zellzyklusanalyse zu gewährleisten, wurde der Variationskoeffizient des G0/G1-Peaks der Referenzpopulation auf 10% beschränkt. Ein höherer Wert des Variationskoeffizienten wurde nur bei einem aneuploiden oder multiploiden Tumorpeak akzeptiert, wenn die optische Bewertung des Histogramms eindeutig möglich war.

Die Zellzyklusparameter der Tumorzellen in der Einfachfärbung wurden mit den Zellzyklusparametern der Zytokeratin-positiven Zellen in einem t-Test für gepaarte Stichproben verglichen (Statistika / W 5.0).

2.5.2. DNA-p53-Doppelfärbung

Nach DNA-p53-Doppelfärbung wurde die Zellzyklusanalyse vergleichend am Gesamtkollektiv der Tumorzellen (Zytokeratin-positiv) sowie an den p53-positiven Zellen eines Tumors durchgeführt. Die daraus resultierenden Angaben zu den einzelnen Zellzyklusparametern (S-Phasen-Fraktion, G2M-Fraktion, Proliferationsfraktion) wurden mit den entsprechenden Angaben der Zellzyklusanalyse der Zytokeratin-positiven Population in einem t-Test für gepaarte Stichproben direkt verglichen.

Von der isolierten Erfassung der DNA-Indices p53-positiver Zellen wurde Abstand genommen. Die Bestimmung des DNA-Index ist abhängig von der

Bezugsgröße: dem G0/G1-Peak. Dieser sollte an sicher diploiden Populationen, beispielsweise nicht-Tumorzellpopulationen bestimmt werden. In Teilkollektiven, wie denen der p53-positiven, fehlt naturgemäß diese Bezugsgröße, so dass von diesen Teilkollektiven keine Bestimmung des DNA-Index durchgeführt werden kann. Die Bestimmung der Zellzyklusfraktionen dieser Teilkollektive bleibt davon aber unbeeinflusst.

Wie in der Einleitung ausgeführt (S. 9-11), liegt p53 in den Tumorphpopulationen in einer heterogenen Verteilung vor. Sowohl diploide als auch aneuploide Subpopulationen enthalten p53-positive und –negative Anteile. Unter der Fragestellung, ob bei der Höhe des Anteils p53-positiver Zellen bei diploiden und aneuploiden Populationen Unterschiede vorliegen, wurde der prozentuale Anteil p53-positiver Zellen an den aneuploiden Zellen ermittelt.

Dieser wurde mit dem prozentualen Anteil Aneuploider der Zytokeratin-positiven Zellen der entsprechenden Fälle in einem t-Test für gepaarte Stichproben verglichen.

3. ERGEBNIS

3.1. Ergebnisse der DNA-Zytokeratin-Doppelfärbung

26 Fälle waren für diese Färbung komplett auswertbar.

Eine Aufschlüsselung nach Tumorgröße, Lymphknotenstatus und Grading der in der Statistik enthaltenen Fälle ist in Tab.1 (S.12) dargestellt.

3.1.1. Ploidie

Insgesamt resultierte nach dem Gaten ein Anstieg des Anteiles aneuploider Tumoren von 73,1% auf 84,6% (Tab.2). In dieser Studie basiert dies insbesondere auf dem Zuwachs der near-diploiden Tumoren (Abb.2). Der Anteil aneuploider Tumoren mit einem DNA-Index zwischen 1.3 und 1.9 sank zugunsten eines Anstiegs tetraploider Tumoren (1.9 – 2.1), was auf der beschriebenen Verlagerung des Referenzpeaks und der neuen Kalkulation des DNA-Index nach dem Gaten beruhte. Für zwei Gruppen aneuploider Tumoren konnte nach Doppelfärbung und selektiver DNA-Analyse der Zytokeratin-positiven Zellen eine signifikant höhere Sensitivität nachgewiesen werden: tetraploide Tumoren (Abb. 2) und near-diploide Tumoren (Abb. 3).

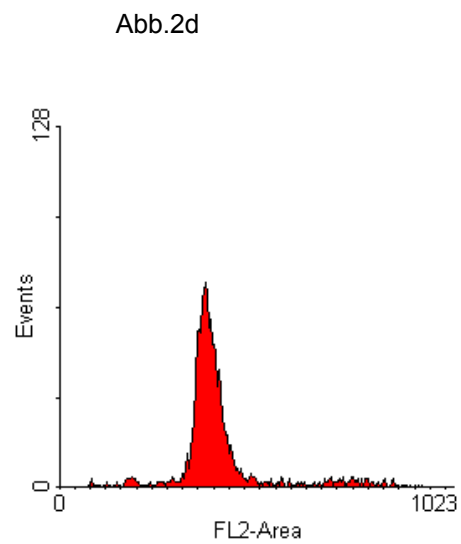
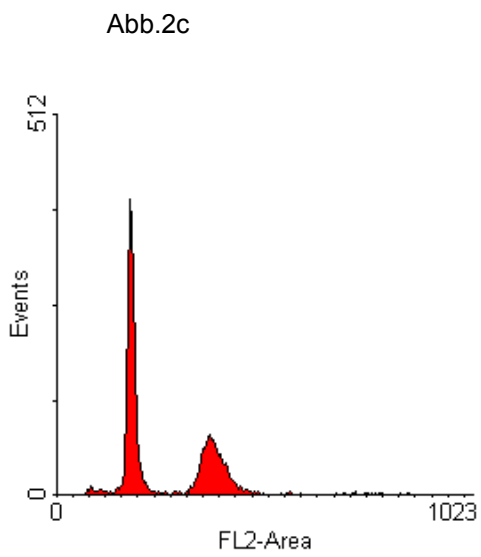
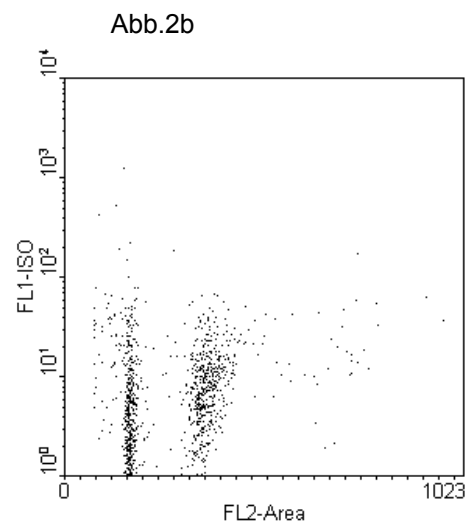
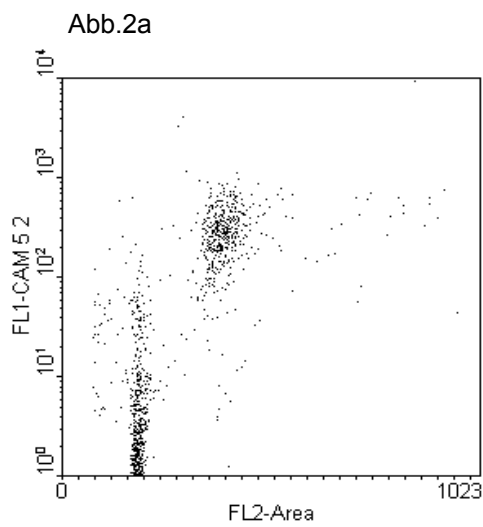
Abb.2a: Die Doppelfärbung von DNA (FL2-area) versus Zytokeratin (CAM 5.2-FITC) zeigt eine Zytokeratin-negative euploide Population, sowie eine Zytokeratin-positive tetraploide Zellpopulation.

Abb.2b: Isotypkontrolle für den Zytokeratin-Antikörper .

Abb.2c: DNA-Histogramm der ungegateten Gesamtpopulation: Dies könnte fehlinterpretiert werden, als eine euploide Zellpopulation mit hoher G2M-Fraktion.

Abb.2d: DNA-Histogramm nach Gaten der Zytokeratin-positiven Zellen: Nachweis einer tetraploiden Tumorzellpopulation mit einer kleinen oktaploiden G2M-Fraktion.

Abb. 2: Tetraploide Tumorzellpopulation vor und nach Tumorzellselektion (Fall 9)



3.1.1.1. Nachweis tetraploider Tumore

Im Falle tetraploider Tumoren ermöglicht die Zytokeratin-Doppelfärbung die in der Einfachfärbung teils schwierige Darstellung des oktaploiden Peaks (Abb.2). Ohne Doppelfärbung würden diese Fälle als „diploid mit erhöhter G2M-Fraktion“ eingestuft. Erst nach Zytokeratin-Doppelfärbung lässt sich nachweisen, dass der G0/G1-Peak der Epithelpopulation bei $4n$ liegt und sich mit dem G2M-Peak der Nicht-Tumorzellen überlagert. Dies war in einem von 26 untersuchten Tumoren dieses Kollektivs der Fall. In diesem Fall war nur nach Doppelfärbung auch ein oktaploider Peak entsprechend der G2M-Fraktion der Tumorzellen nachweisbar. Dies ist von Bedeutung, da der Nachweis eines oktaploiden Peaks letztlich erst die Tetraploidie dokumentiert und von einem G2M-Arrest unterscheidet.

3.1.1.2. Nachweis „near-diploider“ Tumore

Die zweite Gruppe sind die near-diploiden Populationen mit einem DNA-Index von 1.1 bis 1.3. Nur in einem dieser Fälle konnte ohne Doppelfärbung eine Aneuploidie nachgewiesen werden. In den 3 anderen Fällen war der Nachweis erst nach der Doppelfärbung möglich (Tab.2).

Abb. 3 zeigt einen Fall mit einem niedrigen Anteil euploider Nicht-Tumorzellen und einem höheren Anteil near-diploider, Zytokeratin-positiver Tumorzellen mit einem DNA-Index von 1.106. Diese Tumorphysionen sind die sogenannten „Schulterfraktionen“ in der Literatur. In diesem speziellen Fall in Abb.2 ist der Schulterpeak zweimal so hoch wie der Peak der Referenzpopulation („head-peak“). Unter Berücksichtigung der von Hiddemann et al. 1984 beschriebenen Kriterien, ist Aneuploidie nur korrekt analysiert, wenn zwei getrennte Peaks sichtbar sind. Dies wurde erst mit Hilfe der Doppelfärbung erreicht. (Abb.2d).

Tab. 2: Vergleich der Ploidie vor und nach Gaten für Zytokeratin-positive Tumorzellen

Nach dem Gaten auf Zytokeratin lässt sich ein Anstieg der aneuploiden Fraktion von 73,1 auf 84,6% (Summe der near-diploiden, aneuploiden, tetraploiden Fraktionen in %) verzeichnen. N=26

Ploidie		Vor Gaten		Nach Gaten	
		Fälle	%	Fälle	%
Diploid	DI: 0,9-1,1	7	26,9	4	15,4
Near-diploid	DI: 1,1-1,3	1	3,8	4	15,4
Aneuploid	DI: 1,3-1,9	12	46,2	8	30,8
Tetraploid	DI: 1,9-2,1	4	15,4	8	30,8
Hypertetraploid	DI >2,1	2	7,7	2	7,6

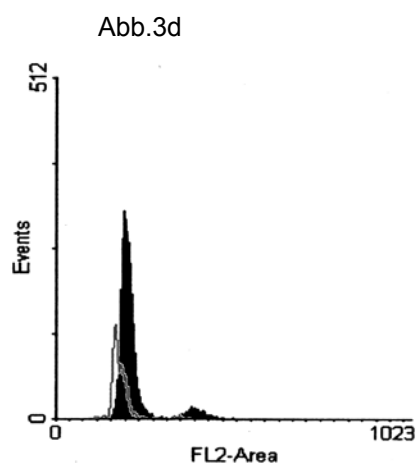
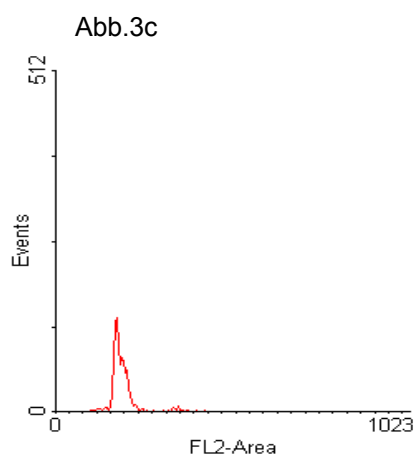
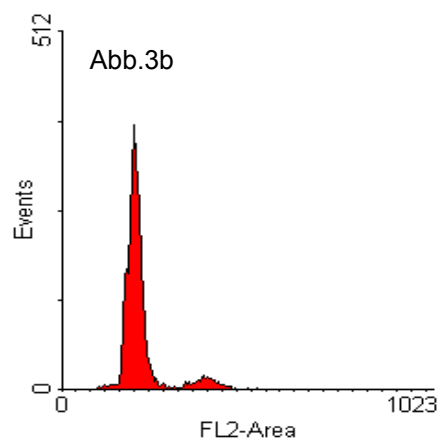
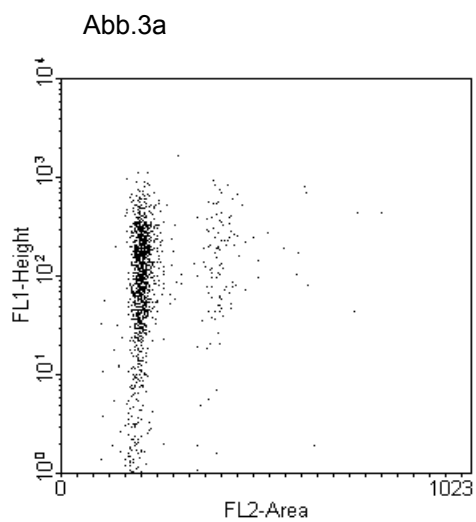
Abb.3a: Dotplot für die Doppelfärbung von DNA und Zytokeratin. Die Zytokeratin-positiven ($FI1 > 3 \times 10^1$) zeigen nur einen minimal höheren DNA-Index ($FI2$ -Area) verglichen mit den Zytokeratin-negativen.

Abb.3b: Darstellung des Zellzyklus in der Einfachfärbung. Die Tumorzellen stellen sich als Schulterfraktion des diploiden G0/1 Peaks dar. Sie können vom Analyseprogramm nicht isoliert erfasst werden.

Abb.3c: Isolierte Darstellung der Zytokeratin-negativen, bestehend aus den diploiden Nicht-Tumorzellen und wenigen ungefärbten Tumorzellen. Der G0/1 Peak der diploiden Referenzpopulation liegt bei Kanal 189.

Abb.3d: Kombinierte Darstellung der Zytokeratin negativen und positiven Zellen. Der G0/1 Peak der Tumorzellen liegt bei Kanal 208. Der tatsächliche DNA-Index des Tumor beträgt demnach 1,106. Schraffiert dargestellt die Zytokeratin-negative Population von Abb.2c.

Abb. 3: Near-diploiden Tumor (Fall 3)



3.1.1.3. Bestimmung des DNA-Index

Nach dem Gaten für Zytokeratin ergaben sich signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) im mittleren DNA-Index, der in dieser Studie von 1,36 auf 1,42 anstieg (Tab.3, Abb.3). Dies geht auf eine exaktere Erfassung des euploiden G0/1 Peaks nach Doppelfärbung zurück. Die Lymphozyten (Zytokeratin-negative Population), welche als Referenzpopulation benötigt werden, wurden von den Tumorzellen getrennt (Zytokeratin-positive Population). Dies erlaubte eine genaue Kalkulation des DNA-Index der Referenzpopulation. In 96% (25 von 26) der untersuchten Fälle war die Kanalnummer des diploiden G0/1 Peaks der Zytokeratin-positiven niedriger als die Kanalnummer des diploiden G0/1 Peaks der ungegateten Gesamtpopulation.

Dies hatte großen Einfluss auf die Einteilung in die unterschiedlichen Gruppen der Ploidie. Auch bei den nicht-diploiden Tumoren ließen sich in vielen Fällen zwei Populationen Zytokeratin-positiver Zellen nachweisen. Die eine Population bildete im ungegateten Gesamtkollektiv einen gemeinsamen Peak mit dem G0/1-Peak der Nicht-Tumorzellen (Referenzpopulation) und war erst nach Gaten als getrennte Population nachweisbar. Durch die Überlagerung wird die Position der euploiden Referenzpopulation in der Einfachfärbung häufig auf zu hohe Kanalnummern festgesetzt, sodass der DNA-Index aller Tumorphyspopulationen zu niedrig berechnet wird. Dabei erhöhten sich auch die DNA-Indices der zweiten aneuploiden Population in 14 von 15 der nicht-diploiden Fälle, die Zahl der tetraploiden Tumoren von 3 auf 7.

Von der Doppelfärbung profitieren darüber hinaus die Gruppe der kleinen aneuploiden Populationen, die in der Einfachfärbung durch die Begleitpopulationen verdeckt bleiben würden, sowie die der hypodiploiden, die fälschlich als diploide Referenzpopulationen gewertet würden.

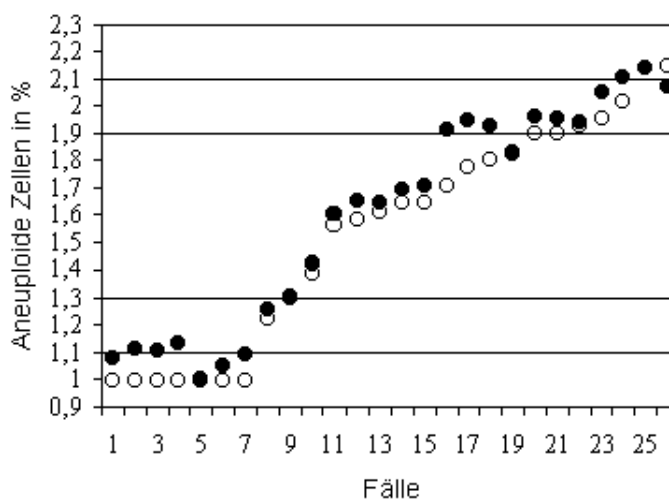
Tab. 3: Gegenüberstellung der Zellzyklusparameter vor und nach dem Gaten auf Zytokeratin-positive Zellen

Es zeigte sich in der isolierten Auswertung der Zytokeratin – positiven Populationen eine deutliche Erhöhung der Proliferationsfraktion, dargestellt durch S-Phase-Fraktion (SPF), G2M-Fraktion (G2M) und Wachstumsfraktion (SPF+G2M=GF), $p = 0,002$. Der DNA-Index (DI) erhöhte sich für die Zytokeratin – positiven Populationen signifikant, $p < 0,001$. N=26

Parameter	Einfachfärbung	Isolierte Darstellung CK-positiver	P
SPF %	13,3	19,7	0,002
G2M %	6,7	8,9	0,111
GF %	19,8	28,1	0,001
DI	1,36	1,42	< 0,001

Abb. 4: Veränderungen des DNA-Index nach DNA-Zytokeratin-Doppelfärbung

Die Werte des DNA-Index der Tumorpopulationen nach Gaten (schwarze Kreise) stellen sich mit einer Ausnahme oberhalb der Werte in der Einzelfärbung dar (offene Kreise). $p < 0,001$. N=26



3.1.2. S-Phase-Fraktion

Mit Hilfe der isolierten Darstellung der Zytokeratin-positiven Zellen fand sich am Frischmaterial eine signifikante Erhöhung der Proliferationsrate ($p=0,001$). Insbesondere die prognostisch bedeutsame S-Phasen-Fraktion stieg signifikant ($p=0,002$) von 13,3% in der Einfachfärbung auf 19,7% in der Auswertung der Zytokeratin-positiven Populationen an (Tab.3).

Eine tendenzielle Erhöhung ergab sich für die G2M-Fraktion, die von 6,7% auf 8,9% nach dem Gaten anstieg. Eine statistisch signifikante Änderung konnte jedoch nicht nachgewiesen werden ($p=0,111$).

3.1.3. Variationskoeffizient

Für die vergleichende Analyse von Einfach- und Doppelfärbung waren am Frischmaterial 26 von 28 Fällen auswertbar. Dabei betrug der mittlere Variationskoeffizient bei der Einfachfärbung 6,4, bei der Doppelfärbung 6,9 für die Zytokeratin-positiven ($p=0,123$) und 5,71 für die zugehörigen Referenzpopulationen ($p=0,003$). In 2 der mit Mikrowellen und Zitrat behandelten Fälle fand sich kein sicherer Zytokeratin-positiver Zellanteil.

3.2. Ergebnis der DNA-p53-Doppelfärbung

In allen 9 Fällen, für die immunhistochemisch p53 nachgewiesen wurde, war dies auch durchflusszytometrisch möglich. Parallel zur DNA-Zytokeratin-Doppelfärbung erfolgte eine Auswertung der DNA-p53-Doppelfärbung.

Abb.5a: Isoantikörper-Kontrolle

Abb.5b: Histogramm der DNA in der Einfachfärbung. Zwei Populationen, eine diploide und eine aneuploide sind dargestellt.

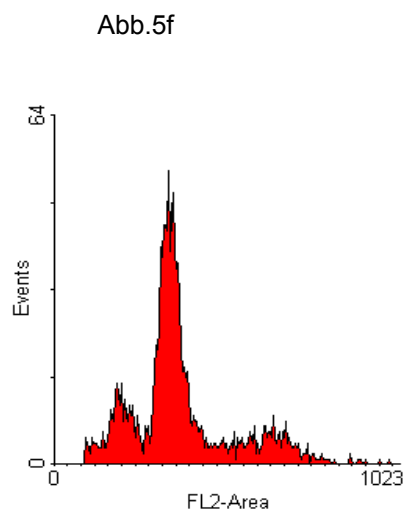
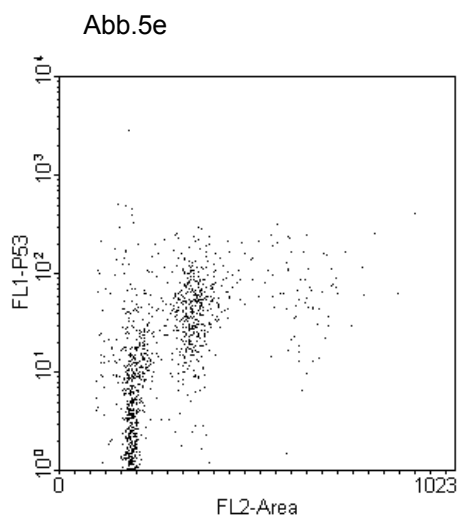
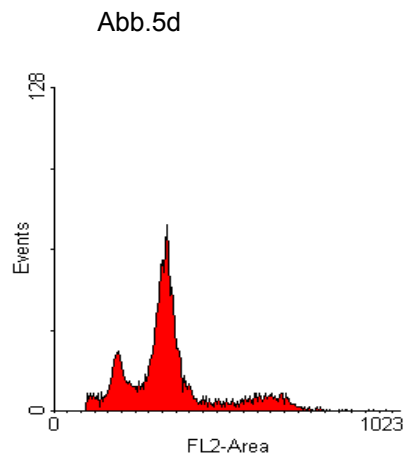
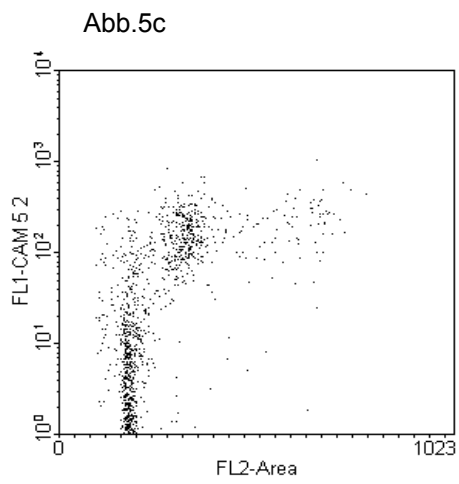
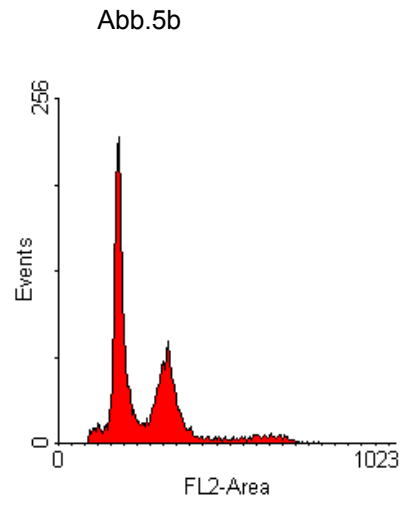
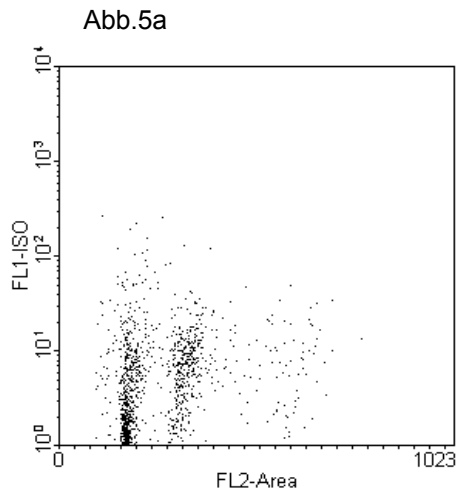
Abb.5c: Dotplot der Doppelfärbung für DNA und Zytokeratin. Eine kleinere diploide und eine tetraploide Tumorsubpopulation stellen sich Zytokeratin-positiv dar.

Abb.5d: DNA-Histogramm der Zytokeratin-positiven Tumorzellen. Der Anteil der Aneuploiden wurde auf 71,8% berechnet.

Abb.5e: Dotplot der Doppelfärbung von DNA und p53. Der diploide Anteil ist nahezu vollständig p53-negativ. Die Mehrzahl der p53-positiven Zellen liegen im aneuploiden Bereich.

Abb.5f: DNA-Histogramm der DNA-Färbung der p53-positiven Tumorzellen. Der Anteil der Aneuploiden an allen p53-positiven Tumorzellen wurde auf 93% berechnet.

Abb. 5: Doppelfärbungen für DNA und p53 sowie DNA und Zytokeratin an ein und demselben Tumor (Fall 17):



3.2.1. Anteil p53-positiver Zellen an der Proliferationsfraktion

Die vergleichenden Zellzyklusanalysen der Zytokeratin-positiven und der p53-positiven Tumorzellen ergaben ein interessantes Ergebnis: p53-positive Tumorzellen zeigten jeweils niedrigere Proliferationsfraktionen in der S-Phasen-Fraktion und besonders in der G2M-Fraktion (Tab.4). Die Differenz zwischen den Angaben der Zytokeratin- und der p53-Färbung erwies sich hier als nahezu signifikant ($p=0,086$).

Insgesamt sank die G2M-Phase von durchschnittlich 10% bei den Zytokeratin-positiven auf 6% bei p53-positiven Populationen. In Abb. 5 beispielsweise nahm die G2M-Fraktion von 9,6% in der Zytokeratin-Färbung (Abb. 5d) auf 7,9% in der p53-Färbung ab (Abb. 5f).

Ein vollkommener Arrest der Zellen in der G0/G1- und frühen S-Phase ergibt sich demnach nicht. Im Vergleich zu den übrigen Phasen der Zellzyklus spricht dies jedoch für eine geringere Proliferation von p53-positiven Tumorzellen.

Tab. 4: Gemittelte Zellzyklusparameter im Vergleich zwischen der Zytokeratin- und der p53-Färbung.

Es zeigte sich ein Absinken der Mittelwerte der Proliferationsfraktionen, insbesondere der G2M-Fraktion, für die p53-gefärbten Zellen. Dabei liess sich jedoch keine signifikante Änderung feststellen ($p<0,05$). N=9

Parameter	CK-positive	p53-positive	P
SPF %	29,0	24,4	0,454
G2M %	10,0	6,0	0,086
GF %	39,0	29,0	0,173

3.2.2. Anteil aneuploider Zellen an p53-positiven Tumorzellen

Bei der Bestimmung des prozentualen Anteils aneuploider Zellen an den p53-positiven Tumorzellen zeigte sich, dass der überwiegende Anteil der p53-positiven Zellen zu den aneuploiden gehörte. In Abb. 5f beläuft er sich beispielweise auf 93% der Zellen. Im Vergleich dazu liegt der Anteil aneuploider Zellen bei den Zytokeratin-gefärbten Zellen deutlich darunter, für Abb. 5d bei 71,8%.

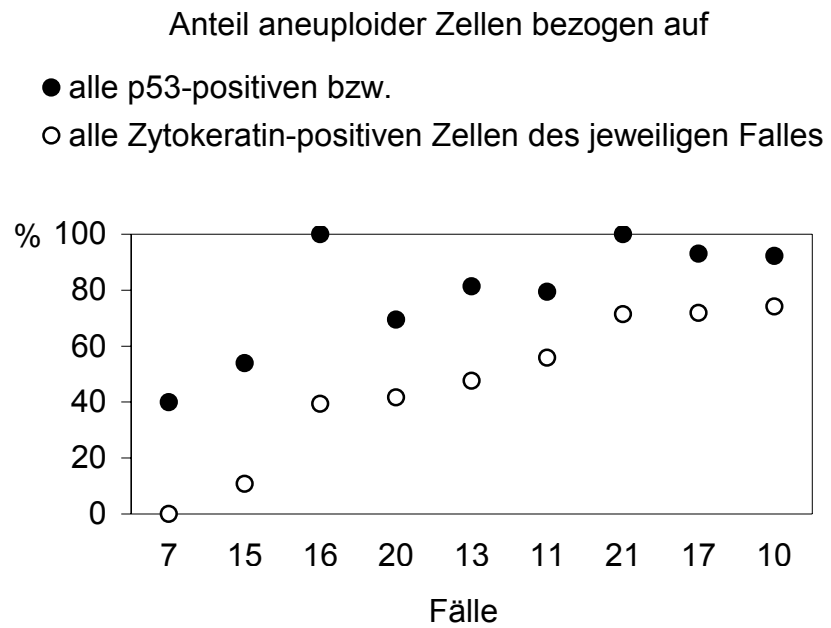
Durchschnittlich lag der Anteil aneuploider Zellen bei den p53-positiven Tumorzellen bei 78,8%. Im Falle der Zytokeratin-positiven Zellen derselben Tumoren waren die Aneuploiden dagegen nur mit 45,8% vertreten. Die dabei hervortretende Differenz erwies sich als signifikant ($p < 0,001$) (Abb.6). Damit unterstützten die Ergebnisse die bekannte Tatsache, dass Aneuploidie und p53-Nachweis in positiver Korrelation zueinander stehen. Der durchschnittliche DNA-Index der p53-positiven Tumorsubpopulationen (erfasst in der DNA-Zytokeratin-Doppelfärbung) lag bei den hier vertretenen Fällen bei 1,428.

3.2.3. Anteil p53-positiver Zellen in Durchflusszytometrie und Immunhistochemie

Die Ergebnisse zeigten, dass die beschriebene Aufarbeitungsmethode nach Lan sowohl die DNA-Zytokeratin- als auch die DNA-p53-Doppelfärbung erlaubt. Im Vergleich zur Immunhistochemie kam es jedoch nach der Aufarbeitung des Materials für die DNA-p53-Doppelfärbung zu einer deutlichen Abnahme des Anteils p53-positiver Zellen. Er sank von 57,78 % in der Immunhistochemie auf 19,24 % in der Durchflusszytometrie.

Abb. 6: Prozentualer Anteil aneuploider Zellen an p53-positiven Tumorzellen.

Der Anteil der Aneuploiden liegt bei den p53 positiven regelmässig höher als bei den Zytokeratin-positiven Zellen des selben Falles. N = 9.



4. DISKUSSION

4.1. Notwendigkeit der DNA-Zytokeratin-Doppelfärbung in der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse

Im ersten Teil dieser Arbeit wird die Notwendigkeit der Zytokeratin-Doppelfärbung in der Zellzyklusanalyse durch die DNA-Durchflusszytometrie demonstriert.

4.1.1. Erfassung der Ploidie

Sowohl die Ploidie als auch die Proliferationsrate sind für die prognostische Aussagekraft der DNA Durchflusszytometrie von zentraler Bedeutung (Balslev 1994; Cornelisse, 1987; Eskelinen, 1992; Ewers, 1992). Beide erhöhten sich statistisch signifikant nach der DNA-Zytokeratin-Doppelfärbung. Es können 4 Gruppen von Tumoren unterschieden werden, in welchen sich die Sensitivität für Aneuploidie nach der Doppelfärbung erhöht. Zu ihnen zählen near-diploide Tumore, tetraploide Tumore, hypodiploide Tumoren und all jene Tumoren mit einem niedrigen Prozentsatz an aneuploiden Zellen. Für die beiden erstgenannten Gruppen konnten in dieser Arbeit Beispiele gefunden werden.

In der konventionellen Einfachfärbung der DNA-Durchflusszytometrie sind near-diploide Tumoren durch einen verbreiterten G0/G1 Peak repräsentiert. Eine solche Verbreiterung kann auf einer unpräzisen Darstellung einer

Zellpopulation beruhen oder auf zwei eng benachbarten Zellpopulationen, deren Peaks in einem gemeinsamen breiten Peak fusionieren. Die Variabilität der Färbung, die Reinheit der Zellvereinzellung und Messung üben einen Einfluss auf die Exaktheit der DNA-Messung aus. Der bedeutendste Faktor ist wahrscheinlich die DNA der fragmentierten Kerne, welche sich an die zu vermessenden Kerne anheftet. Diese Effekte verursachen eine Verbreiterung des DNA-Peaks in den Histogrammen, sodass benachbarte Populationen einen überlappenden Peak zeigen können. Dies wurde von Müller, Böcking et al. (1991) beschrieben als "rechtsseitige Schulterfraktion des G0/G1 Peaks". Er demonstrierte mit statischer Zytometrie einen überlappenden DNA-Kontext zweier Zellpopulationen: Tumorzellen und nicht-Tumorzellen. Die Doppelfärbung für DNA und Zytokeratin erlaubt nun auch in der Durchflusszytometrie zwischen nicht-Tumorzellen und Tumorzellen zu unterscheiden. In 3 Fällen änderte sich in dieser Arbeit die Klassifizierung des Tumors von diploid zu near-diploid, wodurch der Tumor zur aneuploiden Fraktion eingeordnet werden musste (Abb. 2, s. a. Glogovac 1996, Lee 1992). Diese neue Aufteilung eines breiten G0/G1 Peaks führte zu einem signifikanten Rückgang des Variationskoeffizienten der Referenzpopulation.

Zugleich erhöhte sich die Sensitivität zur Erfassung tetraploider Populationen. Der G2/M Peak diploider und der G0/G1 Peak tetraploider Populationen haben dieselbe Kanalnummer. Dies führt in der Einfachfärbung zu einer Fusion des G2/M Peaks der nicht-Tumorpopulation mit dem G0/G1 Peak der Tumorzellpopulation. Wenn kein oktaploider Anteil erkennbar ist, verrät nichts die Präsenz der tetraploiden Population. Diese Fälle werden häufig als euploide Tumoren mit erhöhter G2/M Fraktion fehlinterpretiert. Die Doppelfärbung ermöglicht es, zwischen einem diploiden Tumor mit hoher G2/M Fraktion und einem tetraploiden Tumor zu unterscheiden (Abb.2).

Weiterhin ließ sich bei den nicht-diploiden Tumoren häufig eine zweite Tumorsubpopulation nachweisen. Wie bereits für die near diploiden ausgeführt wurde, stellte ihr G0/G1-Peak in der Einfachfärbung einen gemeinsamen Peak

mit dem G0/G1-Peak der Referenzpopulation dar. An den untersuchten Fällen ließ sich nachvollziehen, dass der DNA-Index für sämtliche Tumorpopulationen durch die Überlagerung der G0/G1-Peaks in der Einfachfärbung häufig zu niedrig berechnet wurde. Dies beruhte hier ebenfalls darauf, dass die Kanalnummer der Referenzpopulation erst durch die isolierte Darstellung der Zytokeratin-negativen exakt ermittelt werden konnte. Nach der Doppelfärbung waren daher 4 Tumoren zusätzlich als tetraploid klassifizierbar (Tab.2). Dieser Informationsgewinn hat auf die prognostische Aussage der Durchflusszytometrie erheblichen Einfluss (Witzig 1991).

Ein genereller Vorteil der Durchflusszytometrie ist, dass sie es ermöglicht eine große Anzahl von Zellen zu untersuchen. Präsentieren nun die nicht-Tumorzellen die Mehrheit der zu messenden Zellen, kann eine kleine Fraktion aneuploider Zellen (unter 5%) in der Einfachfärbung untergehen. Ein solch kleiner Peak wird sichtbar, wenn die Zytokeratin-negativen Zellen von der Präsentation ausgeschlossen werden. Die Zahl dieser Tumoren mag einen kleinen Teil unter den Mammakarzinomen ausmachen, da in den meisten Fällen der Prozentsatz der Tumorzellen höher liegt. Dennoch kann die Erfassung dieses aneuploiden Tumors die prognostische Sensitivität der DNA-Durchflusszytometrie erhöhen.

Nur die Doppelfärbung für DNA und Zytokeratin erlaubt, zwischen einer hypodiploiden (DI unter 0.9) Population und einer euploiden Population zu unterscheiden. Dies ist möglich, da im Fall der Einfachfärbung der niedrigste Peak als diploider Referenzpeak für die Kalkulation des DNA-Index festgelegt ist. Auf diese Weise existiert kein DNA-Index unter 1.0. Durch die Doppelfärbung ist die nicht-Tumorpopulation klar zu sehen, da ihr Peak nach dem Gaten für die Zytokeratin-positiven abnimmt oder sogar verschwindet und sich nach dem Gaten für Zytokeratin-negative von der Mehrzahl der Tumorzellen abtrennen lässt. In diesem Kollektiv allerdings war kein solcher Fall vertreten.

4.1.2. Erfassung der Proliferationsfraktion

Die isolierte Analyse der Tumorzellen erhöhte die Genauigkeit der Kalkulation der Proliferationsfraktion (S-Phasen-Fraktion, G2M-Fraktion). Dies liegt daran, dass der Anteil der Tumorzellpopulation an der Gesamtpopulation zwischen 10% und über 90% variieren kann. Exakte Daten über die Höhe der Tumorzellfraktion neben Fibroblasten, endothelialen Zellen, Lymphozyten und anderen Zellfraktionen innerhalb des gesamten Gewebes, existieren in der Literatur nicht und sind auch in der üblichen durchflusszytometrischen Praxis nicht bekannt. Die Mehrzahl der Tumoren enthält zwischen 30% und 70% an neoplastischen Zellen (Berg 1959, Black 1956, Rowe 1984, Svennevig 1979), in Einzelfällen sind jedoch auch höhere und niedrigere Werte möglich. Die S-Phasen-Fraktion ist sowohl vom Anteil der Tumor- versus nicht-Tumorzellen abhängig, als auch von der Proliferationsfraktion beider Populationen.

In dieser Arbeit wurde eine direkte Einschätzung der Proliferationsfraktion der Tumorzellen mittels Einfachfärbung und Doppelfärbung durchgeführt. Sowohl die S-Phasen-Fraktion als auch die G2/M-Fraktion wurden in unserer Kalkulation berücksichtigt.

Die S-Phasen-Fraktion erhöhte sich durch die isolierte Kalkulation der Tumorzellen signifikant (Visscher 1990). Dies bedeutet, dass die meisten Lymphozyten eine niedrigere Proliferationsfraktion als Tumorzellen haben. Da das hier untersuchte Kollektiv viele wenig differenzierte Tumoren enthielt, wäre in anderen Kollektiven, besonders denen mit Mammakarzinomen ohne Lymphknotenmetastasierung, der entgegengesetzte Effekt denkbar. Diese Tumoren sind oft gut differenziert und besitzen eine niedrige Proliferationsrate, so dass die S-Phasen-Fraktion sich nach dem Gaten erniedrigen könnte. 7 der untersuchten Fälle ergaben dieses Ergebnis. Dieser Effekt ist besonders bedeutsam, da die S-Phasen-Fraktion in den Studien der letzten Jahre als unabhängiger prognostischer Faktor gewertet wurde (Eskelinen 1992, Ottestad 1993, Wingren 1994).

4.1.3. Methodische Aspekte der DNA-Zytokeratin-Doppelfärbung

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Doppelfärbung für DNA und Zytokeratin an frisch gefrorenem Gewebe möglich ist. Bislang ist kein standardisiertes Präparationsprotokoll in der Literatur etabliert worden. Eine Standardisierung der Doppelfärbung ist insgesamt zur Vorbereitung für Studien mit einer größeren Anzahl von Karzinomen empfehlenswert.

Die Nutzung der DNA-Zytokeratin-Doppelfärbung ermöglicht es, einen der größten Nachteile der durchflusszytometrischen DNA-Analyse, verglichen zur herkömmlichen Analyse, zu minimieren: sie erlaubt, zwischen den einzelnen Zelltypen eines Tumors durchflusszytometrisch zu unterscheiden. Damit gelingt eine wesentlich exaktere Wiedergabe der Biologie der Tumorzellen. Es ist zu erwarten, dass die Möglichkeit, sich auf die Vermessung von Tumorzellen zu konzentrieren, die prognostische Aussagekraft der Zellzyklusparameter erhöht.

4.2. Möglichkeiten und Grenzen der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse p53-positiver Mammakarzinome

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der durchflusszytometrischen Charakterisierung von p53-positiven Mammakarzinomen.

4.2.1. Verlust p53-positiver Zellen bei der Aufarbeitung für die Durchflusszytometrie

In den durchflusszytometrischen Ergebnissen zeigte sich, dass nur ein geringer Anteil der immunhistochemisch p53-positiven Zellen, durchflusszytometrisch für das Antigen markiert worden war. Durchschnittlich 38% der in der Immunhistochemie p53-positiv gekennzeichneten Zellen wurden in der Durchflusszytometrie als p53-negativ gewertet.

Dies könnte zum einen für einen Verlust des p53-Proteins oder dem Verlust seiner Antigenität nach der Aufarbeitung der Zellen für die durchflusszytometrische Messung sprechen. Zum anderen könnte es bedeuten, dass der Zugang des Antiköpers zum Kern nur unzureichend vorbereitet war.

Interessiert die Höhe des Anteils p53-positiver Tumorzellen, kann sich die Durchflusszytometrie demnach nicht mit der Immunhistochemie messen.

Trotzdem ist die durchflusszytometrischen Analyse sinnvoll, da sich Aussagen ergeben, die immunhistochemisch nicht gewonnen werden können. In der hier vorliegenden Arbeit beispielsweise stand die Zellzyklusanalyse im Vordergrund, die trotz des geringeren Anteils p53-positiv gefärbter Zellen uneingeschränkt durchführbar ist.

4.2.2. Verteilung p53-positiver Zellen innerhalb des Zellzyklus

Die normale Funktion von p53 innerhalb des Zellzyklus ist außerordentlich breit untersucht (Chiarugi 1994, Bates 1996, Meyer-JS 1994, Dabbs-DJ 1995, Pich-A 1996). Im Gegensatz dazu gibt es kaum Zellzyklus-Untersuchungen p53-positiver Tumorzellen. P53 entfaltet im physiologischen Zustand seine Hauptfunktion an der Schwelle zwischen G1- und S-Phase (Chiarugi 1994, Bates 1996). Zu vermuten wäre, dass mutiertes p53 durch die Veränderung seiner Proteinstruktur nicht mehr in der Lage ist, den von ihm initiierten Arrest der defekten Zellen in der G1-Phase aufrecht zu erhalten. Aufgrund der Vielfalt anderer Faktoren, die auf den Zellzyklus Einfluss nehmen können, ist das weitere Verhalten der Tumorzellen nach der Mutation von p53 jedoch nicht absehbar. Wie der tatsächliche weitere Verlauf des Zellzyklus ist, wurde in der hier vorliegenden Arbeit untersucht.

Bei den untersuchten Mammakarzinomen befanden sich bei der Analyse der p53-positiven Zellen wesentlich weniger in der Proliferations-Phase (S-Phase und G2M-Phase) als bei Zytokeratin-positiven. Hervorzuheben ist die im Vergleich zu der Zellzyklusanalyse der Zytokeratin-positiven nahezu signifikante Abnahme von Zellen in der G2M-Fraktion.

Ob dies auf eine restliche Teilfunktion von p53 zurückgeht, ist nicht bekannt. Erwiesen ist bislang nur, dass auch bei mutiertem p53 die p53-Expression Zellzyklus-abhängig funktioniert (David-Pfeuty 1996). Der höchste p53-Gehalt findet sich sowohl beim Wild-Typ als auch bei mutiertem p53 in der G1-Phase. Nach dem Übergang in die S-Phase beginnt die p53-Expression im Kern zurückzugehen. Demnach liegen die höchsten Zellkern-Konzentrationen von mutiertem p53 zu dem Zeitpunkt vor, an dem der Wild-Typ seine höchste Aktivität entfaltet (G1- und frühe S-Phase). Während der Proliferation (S-Phase und G2M-Phase) ist p53 nur in geringem Masse im Kern vorhanden.

Für den geringeren Anteil p53-positiver Zellen in der Proliferationsfraktion können jedoch auch andere Prozesse während der S- und G2M-Phase ursächlich in Frage kommen. Ein Zusammenhang mit dem Zelltod genetisch alterierter Zellen in späteren Phasen des Zellzyklus ist nicht unwahrscheinlich.

Für die Überexpression von p53 ist bereits eine Korrelation mit einem erhöhten malignem Potential von Tumoren bekannt (Schimmelpenning H 1994). In mehreren Studien wurde es als Indikator für eine schlechte Prognose hinsichtlich der Rezidivfreiheit und auch der Überlebensrate von Patienten betrachtet (Lisboa BW 1997, Aseero BJ 1998, Hartmann A 1997). Ein Teil dieser Studien ergab allerdings, dass sie nicht als unabhängiger prognostischer Faktor gewertet werden darf (Bianchi S 1997). Dabei ist hervorzuheben, dass bereits ein Unterschied in der Aussagekraft zwischen Überexpression von p53 und dem Nachweis einer p53-Mutation nachgewiesen werden konnte (Kovach JS 1996).

Zur Klärung der Frage, wodurch der niedrige Anteil p53-positiver Zellen in der S- und G2M-Phase begründet ist, wären weitere Studien erforderlich, die zum einen vor Zellzyklusanalyse die Mutation des exprimierten p53 in einem Nachweis sichern und zum anderen eine entsprechend größere Fallzahl beinhalten sollten.

4.2.4. Methodische Besonderheiten der parallelen Aufarbeitung für Zytoplasma- und Kernfärbung

Die gleichzeitige, durchflusszytometrische Anfärbung von zytoplasmatischen Strukturen (z.B. Zytokeratin) und Kernmarkern (MIB1, p53) stellt an die Aufarbeitung der Zellen spezielle Anforderungen. Zum einen sollte sie die Strukturen des Zytoplasmas für die Bindung des Antikörper schonen und p53

nicht aus dem Kern herauswaschen. Zum anderen muss sie ausreichend aggressiv erfolgen, um ein Eindringen von Antikörpern in den Kern zu ermöglichen.

Prinzipiell wurden in dieser Arbeit diese Voraussetzungen durch die verwendete Methode nach Lan (1996) erfüllt. In jedem untersuchten Fall ließen sich sowohl Zytokeratin als auch p53 anfärben.

In zwei p53-positiven Fällen jedoch war die Zytokeratin-Färbung nur an diploiden und tetraploiden Strukturen möglich. Die aneuploiden Subpopulationen zeigten sich Zytokeratin-negativ. Diese Ergebnisse sprechen für einen Verlust der Bindungsstelle für den Zytokeratin-Antikörper cam 5.2. Hierfür sind verschiedene Erklärungen möglich:

1. Der Verlust der Antigen-Eigenschaft von Zytokeratin könnte durch die Aufarbeitung bedingt sein.

Eine Aufarbeitung, die aggressiv genug ist, eine Kernmembran zu perforieren, könnte zytoplasmatische Strukturen zerstören. Damit wäre eine Färbung von Zytokeratin nicht mehr möglich. Im Gegensatz dazu könnte bei Zellen, in denen reichlich Zytokeratin nachgewiesen wurde, der Weg der Antikörper durch eine Kernmembran nur unzureichend vorbereitet gewesen sein.

Die beiden beschriebenen Fälle (siehe oben) stehen jedoch dazu zum Teil im Widerspruch. Den Einflüssen durch die Aufarbeitung waren alle Zellen gleichermaßen unterworfen. Demnach hätten alle Zellen eines p53-positiven Falles, gleichermaßen wenig Zytokeratin aufweisen dürfen. Hier handelte es sich jedoch um Tumore, bei denen dennoch einzelne Populationen für Zytokeratin suffizient gefärbt waren. Für eine solche Verteilung ist die Aufarbeitungsart als alleinige Erklärung nicht ausreichend.

2. Aus den Studien der letzten Jahre ist bereits bekannt, dass p53-positive Mammakarzinome mit einer geringen histologischen Differenzierung einhergehen (Brotherick 1995, Dabbs 1995, Rosanelli 1995). Im Rahmen der Entdifferenzierung könnte es zur Maskierung, Mutation oder dem Verlust des

Zytokeratin-Antigens gekommen sein. Demnach wäre es möglich, dass p53 positive Zellen generell eine schwächere Bindung von Antikörpern gegen Zytokeratin aufweisen.

Insgesamt ist als Ursache der Zytokeratin-negativen Eigenschaft mancher p53-positiver Subpopulation eine Kombination dieser beiden Erklärungen am wahrscheinlichsten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die gemeinsame Aufarbeitung von Tumorzellen und vorhandenen Begleitpopulationen bewirkt eine Ungenauigkeit der Zellzyklusanalyse in der Einfachfärbung der DNA in der Durchflusszytometrie. Durch eine Doppelfärbung von DNA und Zytokeratin ist eine nahezu isolierte Darstellung der Tumorzellen möglich. Das Ziel im ersten Teil dieser Arbeit ist es, Ploidie und Zellzyklusparameter, insbesondere die S-Phase-Fraktion, systematisch zwischen Einfach- und Doppelfärbung am Frischmaterial von Mammakarzinomen zu vergleichen.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit den Zusammenhängen zwischen p53, Proliferation und Ploidie von Mammakarzinomen. Im Vordergrund stand zum einen die Verteilung von p53-positiven Zellen innerhalb des Zellzyklus, zum anderen der Zusammenhang zwischen der Überexpression von p53 und der Ploidie der Tumorzellen.

Von 28 untersuchten Fällen waren 26 für die DNA-Zytokeratin-Doppelfärbung komplett auswertbar. Bei 9 dieser 26 ausgewerteten Fälle konnte immunhistochemisch p53 nachgewiesen werden. Die Zellvereinzelnung erfolgte mit Hilfe gekreuzter Klängen an Gefriermaterial. Nach Fixierung der Zellen in Paraformaldehyd erfolgte die Permeabilisierung der Zellkerne durch Erhitzen in Zitratpuffer. Die Färbung der DNA erfolgte mit Propidium Jodid. Als zweiter Antikörper wurde FITC-konjugiertes anti-Zytokeratin (Antikörper CAM 5.2) bzw. anti-p53 (Klon DO-7) verwendet. Die Messungen wurden mit einem FACScan (Becton Dickenson, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Multicycle Software AV (Phoenix Flow Systems, San Diego, USA).

Die Auswertung der Zytokeratin-Doppelfärbung ergab im Vergleich zur Einfachfärbung einen Anstieg sowohl des Anteiles aneuploider Tumoren als

auch des mittleren DNA-Index. Die Proliferationsrate, insbesondere die S-Phasen-Fraktion erhöhte sich ebenfalls signifikant. Dies zeigt, dass die Tumorzellen eine höhere Proliferation als die tumorinfiltrierenden Zellen (Lymphozyten und Fibroblasten) aufweisen.

Die vergleichenden Zellzyklusanalysen der Zytokeratin-positiven und der p53-positiven Tumorzellen zeigte eine geringere Proliferationsfraktion in den p53-positiven Zellen, verglichen mit den p53-negativen Tumorzellen. Der überwiegende Anteil der p53-positiven Zellen zeigte eine Aneuploidie. Weiterhin ergaben sich in dieser Untersuchung Hinweise auf eine Zellzyklusabhängige Expression des p53-Proteins.

Die Doppelfärbung für DNA und Zytokeratin erlaubt in der Durchflusszytometrie zwischen nicht-Tumorzellen und Tumorzellen zu unterscheiden. Durch ihre Nutzung gelingt die exaktere Wiedergabe der Biologie von Tumoren. Es ist zu erwarten, dass dies die prognostische Aussagekraft der DNA-flowzytometrischen Parameter Ploidie und Proliferationsfraktion erhöht.

6. LITERATURLISTE

1. Aceero MJ; Gallego MG; Ballesteros PA; Gonzalez JF (1998). Vascular density as a prognostic indicator for invasive ductal breast carcinoma. *Virchows Archiv*; 432; 2; 113-7.
2. Balslev I, Christensen IJ, Rasmussen BB, Larsen JK, Lykkesfeldt AE, Thorpe SM, Rose C, Briand P, and Mouridsen HT (1994). Flow cytometric DNA ploidy defines patients with a poor prognosis in node-negative breast cancer. *Int J Cancer* 56: 16-25.
3. Bates S, Vousden KH (1999) Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 55 (1): 28-37
4. Bates S, Vousden KH (1996) p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 6(1): 12-8
5. Beerman H, Kluin M, Hermans J, van de Velde CJH, and Cornelisse CJ (1990). Prognostic significance of DNA-ploidy in a series of 690 primary breast cancer patients. *Int J Cancer* 65: 34-39.
6. Beerman H, Veldhuizen RW, Hermans J, Bonsing BA, and Ooms EC (1991). Flow cytometric and histomorphometric analysis of limitations of clinical breast cytometry. *Anal Cell Pathol* 3: 287-297.
7. Berg JW (1959). Inflammation and prognosis in breast cancer. A search for host resistance. *Cancer* 12: 714-720.
8. Bianchi S; Calzolari A; Vezzosi V; Zampi G; Cardona G; Cataliotti L; Bonardi R; Ciatto S (1997). Lack of prognostic value of p53 protein expression in node-negative breast cancer. *Tumori*; 83; 3; 669-72.
9. Black MM, Speer FD, and Opler SR (1956). Structural representations of tumor-host relationships in mammary carcinoma: biologic and prognostic significance. *Am J Clin Path* 26: 250-265.
10. Bonsing-BA; Corver-WE; Gorsira-MC; van-Vliet-M; Oud-PS; Cornelisse-CJ; Fleuren-GJ (1997). Specificity of seven monoclonal antibodies against p53 evaluated with Western blotting, immunohistochemistry, confocal laser scanning microscopy, and flow cytometry. *Cytometry* 28(1): 11-24.

11. Brotherick-I; Shenton-BK; Cowan-WK; Angus-B; Horne-CH; Higgs-MJ; Lennard-TW (1995). p53 expression measured by flow cytometry. A comparison of three monoclonal antibodies and the relationship with grade and DNA ploidy in breast cancer. *Cancer-Immunol-Immunother.* 41(3): 146-50
12. Cerra R, Zarbo RJ, and Crissman JD (1990). Dissociation of cells from solid tumors. In: Darzynkiewicz Z, and Crissman H A, editors. *Methods in Cell Biology.* San Diego: Academic Press Inc, 33: 1-10.
13. Chiarugi V, Magnelli L, Cinelle M, Basi G (1994) Apoptosis and cell cycle 40 (7-8): 603-12.
14. Coon JS, Landay AL, and Weinstein RS (1987). Biology of disease: Advances in flow cytometry for diagnostic pathology. *Lab Invest* 57: 453-479.
15. Cornelisse CJ, van de Velde CJH, Caspers RJC, Moolenaar AJ, and Hermans J (1987). DNA ploidy and survival in breast cancer patients. *Cytometry* 8: 225-234.
16. Dabbs-DJ (1995). Correlations of morphology, proliferation indices, and oncogene activation in ductal breast carcinoma: nuclear grade, S-phase, proliferating cell nuclear antigen, p53, epidermal growth factor receptor, and c-erb-B-2. *Mod-Pathol.* 8(6): 637-42
17. Dickson RB, Lippman ME (1995) Growth factors in Breast Cancer. *Endocrine Reviews.* 16: 559-589
18. David-Pfeuty T, Chakrani F, Ory K, Nouvian-Dooghe Y (1996). Cell cycle-dependent regulation of nuclear p53 traffic occurs in one subclass of human tumor cells and in untransformed cells. *Cell Growth Differ.* 7(9):1211-25
19. Eskelinen M, Lipponen P, Papinaho S, Aaltomaa S, Kosma VM, Klemi P, and Syränen K (1992). DNA flow cytometry, nuclear morphometry, mitotic indices and steroid receptors as independent prognostic factors in female breast cancer. *Int J Cancer* 51: 555-561.
20. Ewers SB, Attewell R, Baldetorp B, Borg A, Langstrom E, and Killander D (1992). Prognostic potential of flow cytometric S-phase and ploidy

- prospectively determined in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 20: 93-108.
21. Frei JV, and Martinez VJ (1993). DNA flow cytometry of fresh and paraffin-embedded tissue using Zytokeratin staining. *Mod Path* 6: 599-604.
 22. Glogovac JK, Porter PL, Banker DE, and Rabinovitch PS (1996). Zytokeratin labeling of breast cancer cells extracted from paraffin-embedded tissue for bivariate flow cytometric analysis. *Cytometry* 24: 260-267.
 23. Haag D, Feichter G, Goerttler K, and Kaufmann (1987). Influence of systematic errors on the evaluation of the S phase portions from DNA distributions of solid tumors as shown for 328 breast carcinomas. *Cytometry* 8: 377-385.
 24. Hartmann A; Blaszyk H; Kovach JS; Sommer SS, (1997). The molecular epidemiology of p53 gene mutations in human breast cancer. *Trends in Genetics*; 13; 1; 27-33.
 25. Harris CC (1991) Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Tnst* 88 (20) 1442-55.
 26. Hedley DW, Friedlander MI, Taylor IW, Rugg CA, and Musgrove EA (1983). Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 31: 1333-1335.
 27. Hiddemann W, Schumann J, Andreeff M, Barlogie B, Hermann CJ, Leif RC, Mayall BH, Murphy RF, and Sandberg AA (1984). Convention on nomenclature for DNA cytometry. *Cytometry* 5: 445-446.
 28. Isola J, Visakorpi T, Holli K, and Kalliomiemi OP (1992). Association of overexpression of tumor supressor protein p53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 84: 1109-1114.
 29. Kenyon S, Schmittling RJ, Siiman O, Burshteyn A, and Bolton WE (1994). Enhanced assessment of DNA / proliferative index by depletion of tumor

infiltrating leucocytes prior to monoclonal antibody gated analysis of tumor cell DNA. *Cytometry* 16: 175-183.

30. Kovach JS, Hartmann A; Blaszyk H; Cunningham J; Schaid D; Sommer SS (1996). Mutation detection by highly sensitive methods indicates that p53 gene mutations in breast cancer can have important prognostic value. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93; 3; 1093-6.
31. Kute TE, Quadri Y, Muss H, Zbieranski N, Cirrincione C, Berry DA, Barcos M, Thor AP, Liu E, Koerner F, et al (1995). Flow cytometry in node-positive breast cancer: cancer and leukemia group B protocol 8869. *Cytometry* 22: 297-306.
32. Lan HY, Hutchinson P, Tesch GH, Mu W, and Atkins RC (1996). A novel method of microwave treatment for detection of cytoplasmic and nuclear antigens by flow cytometry. *J of Immunol Meth* 190: 1-10.
33. Lawry J, Rogers K, Duncan JL, and Potter CW (1993). The identification of informative parameters in the flow cytometric analysis of breast carcinom. *Eur J Cancer* 29A, 719-723.
34. Lee AKC, Wiley B, Dugan JM, Hamilton WH, Loda M, Heatley GJ, Cook L, and Silverman ML (1992). Quantitative DNA analysis and proliferation in breast carcinomas. *Path Res Pract* 188: 428-232.
35. Lewis WE (1990). Prognostic significance of flow cytometric DNA analysis in node-negative breast cancer patients. *Cancer* 65: 2315-2320.
36. Lisboa BW; VogtInder S; Gilster T; Riethdorf L; Milde-Langosch K; Lning T 1997, Molecular and immunohistochemical analysis of p53 mutations in scrapings and tissue from preinvasive and invasive breast cancer. *Virchows Archiv*; 431; 6; 375-81.
37. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JrJF, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, GyrkaMA, Bischoff FZ, Tainsky MA, Friend SH (1990) Germ Line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas and other neoplasms. *Science* 250:1233-1238
38. Mettlin C (1994), The relationship of breast cancer epidemiology to screening recommendations. *Cancer Supp* 74 (1) 228-230.

39. Meyer JS; -He-W (1994). High proliferative rates demonstrated by bromodeoxyuridine labeling index in breast carcinomas with p53 overexpression. *J-Surg-Oncol.* 56(3): 146-52
40. Müller CP, Kropff M, Biesterfeld S, Chatelain R, Wagner A, Wohltmann D, and Böcking A (1991). Detection of high risk patients in chronic myelogenous leukemia by DNA-image cytometry. *Anticancer Res* 11: 617-623.
41. Opfermann M, Brugal G, and Vassilakos P (1987). Cytometry of breast carcinoma: Significance of ploidy balance and proliferation index. *Cytometry* 8: 217-224.
42. Ottestad L, Pettersen EO, Nesland JM, Hannisdal E, Fossa SD, and Tveit KM (1993). Flow cytometric DNA analysis as prognostic factor in human breast carcinoma. *Pathol Res Pract* 189: 405-410.
43. Ownby GL (1985), Radical differences in breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 75, 55-60.
44. Pfisterer J, Kommos F, Sauerbrei W, Menzel D, Kiechle M, Giese E, Hilgarth M, Pleiderer A (1995). DNA flow cytometry in node-positive breast cancer. Prognostic value and correlation with morphologic and clinical factors. *Anal Quant Cytol Histol* 17: 406-412.
45. Pich-A; Margaria-E; Chiusa-L; Ponti-R; Geuna-M (1996). DNA ploidy and p53 expression correlate with survival and cell proliferative activity in male breast carcinoma. *Hum-Pathol.* 27(7): 676-82.
46. Prechtel K (1993): Pathologie der Malignität und des Mammakarzinoms.; *Radiologe.* 33: 236-242.
47. Rosanelli-GP; Steindorfer-P; Wirnsberger-GH; Klimpfinger-M; Ratschek-M; Puerstner-P; Auner-H; Berhold-A (1995) Mutant p53 expression and DNA analysis in human breast cancer comparison with conventional clinicopathological parameters. *Anticancer-Res* 15(2): 581-6.
48. Rowe DJ and Beverley PC (1984). Characterisation of breast cancer infiltrates using monoclonal antibodies to human leucocyte antigens. *Br J Cancer* 49: 149-159.

49. Schimmelpenning H; Eriksson ET; Zetterberg A; Auer GU (1994). Association of immunohistochemical p53 tumor suppressor gene protein overexpression with prognosis in highly proliferative human mammary adenocarcinomas. *World Journal of Surgery*; 18; 6; 827-32; discussion 832-3.
50. Shackney-SE; Smith-CA; Pollice-AA; Janocko-LE; Singh-SG; Groft-DW; Brown-KA; Hartsock-RJ (1995). Preferred genetic evolutionary sequences in human breast cancer: a case study. *Cytometry*. 21(1): 6-13
51. Shankey TV, Rabinovitch PS, Bagwell B, Bauer KD, Duque RE, Hedley DW, Mayail BH, and Wheelless L (1993). Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. *Cytometry* 14: 472-477.
52. Shankey TV (1994). Antibodies to intermediate filament proteins as probes for multiparameter flow cytometry of human cancers.: Darzynkiewicz Z, and Crissman H A, editors. *Methods in Cell Biology*. San Diego: Academic Press Inc, 42: 209-229.
53. Shi SR, Key ME, and Kalra KL (1991). Antigen retrieval in formalin fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 39: 741-748.
54. Stal O, Carstensen J, Hatschek T, and Nordenskjöld B (1992). Significance of S-phase fraction and hormone receptor content in the management of young breast cancer patients. *Br J Cancer* 66: 706-711.
55. Svennevig JL, Lövik M, and Svaar H (1979). Isolation and characterization of lymphocytes and macrophages from solid, malignant human tumors. *Int J Cancer* 23: 626-631.
56. Toikkanen S, Joensuu H, and Klemi P (1989). The prognostic significance of nuclear DNA content in invasive breast cancer – a study with long-term follow-up. *Br J Cancer* 60: 693-700.
57. Visscher DW, Zarbo RJ, Jacobsen G, Kambouris A, Talpos G, Sakr W, and Crissman JD (1990). Multiparametric deoxyribonucleic acid and cell cycle analysis of breast carcinomas by flow cytometry. *Lab Invest* 62: 370-378.

58. Visscher DW, Sochacki P, Ottosen S, Wykes S, and Crissman JD (1995). Assessment and significance of diploid-range epithelial populations in DNA aneuploid breast carcinomas using multi-parametric flow cytometry. *Anal Cell Pathol* 8: 267-277.
59. Vogelstein B, Kinzler KW (1992). p53 function and dysfunction, *Cell* 70: 523-526
60. Wingren S, Stal O, and Nordenskjöld B (1994). Flow cytometric analysis of S-phase fraction in breast carcinomas using gating on cells containing Zytokeratin. *Br J Cancer* 69: 546-549.
61. Wingren S, Stal O, Sullivan S, Brisfors A, and Nordenskjöld (1994). S-phase fraction after gating on epithelial cells predicts recurrence in node-negative breast cancer. *Int J Cancer* 59: 7-10.
62. Winters Z, Mohube P, Gray C, Wright C, Teare J, Lange M, Mannell A, and Myburgh JA (1994). Tumour kinetics in breast cancer. *S Afr J Surg* 32: 135-140.
63. Witzig TE, Gonchoroff NJ, Thernau T, Gilbertson DT, Wold LE, Grant C, Grande J, Katzmann A, Ahmann DL, and Ingle JN (1991). DNA content flow cytometry as a prognostic factor for node-positive breast cancer. *Cancer* 68: 1781-1788.

Danksagung

Dem Pathologischen Institut und der Frauenklinik der Universität Würzburg gilt gleichermaßen mein Dank für die technischen Möglichkeiten, Laborkapazitäten und für das Material, dass mir für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurde. Mein besonderer Dank gilt dabei meinem Doktorvater Priv.-Doz. Dr. med. J. Müller für seine unermüdliche Unterstützung in den vergangenen Jahren.

Weiterhin möchte ich auch meiner ehemaligen Kommilitonin Melanie Jäger danken, die als „Kompagnon“ in guter Zusammenarbeit half, einen Teil unserer Arbeit in einem Vortrag auf dem pathologischen Kongress in Kassel 1998 vorzustellen und in einer gemeinsamen Ausarbeitung später zu veröffentlichen.

Mein Dank gilt auch den Medizinisch – Technischen - Assistentinnen des immunhistochemischen Labors, die uns das ABC der Laborarbeit lehrten und besonders bei der Suche nach p53-positiven Tumoren über ihre Routine-Arbeit hinaus mit ihren Färbungen unterstützten. Des Weiteren danke ich auch Thomas Rüdiger, der für die statistische Auswertung der Ergebnisse mehrfach Hilfestellung gab, sowie Andreas Simm aus dem Biozentrum der Universität Würzburg, der uns an seinen Erfahrungen bei der durchflusszytometrischen Erfassung des Zellzyklus richtungweisend teilhaben ließ, und Eva Bachmann, die insbesondere in den ersten Labortagen mit praktischen Tipps zur Seite stand.

Nicht zuletzt möchte ich all denjenigen im Institut und in meinem Freundeskreis danken, die durch ihr Interesse und ihr Verständnis dazu beitrugen, dass diese Arbeit trotz immer wieder entmutigender Zwischenergebnisse von mir gern beendet wurde.

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern, die mich bislang in allen Plänen unterstützt haben und denen ich an dieser Stelle dafür von Herzen danken möchte.

Publikationen und Vorträge

Notwendigkeit der Keratin-Doppelfärbung bei der DNA-Flowzytometrie von Mammakarzinomen

Vortrag vor der Arbeitsgemeinschaft Zytopathologie auf der 82. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie in Kassel am 06.06.1998: A. Hanke, M. Jäger, P. Kristen*, J.G. Müller, H.K. Müller - Hermelink:

Ott G, Kalla J, Hanke A, Muller JG, Rosenwald A, Katzenberger T, Kretschmar R, Kreipe H, Mülle - Hermelink HK:

The cytomorphological spectrum of mantle cell lymphoma is reflected by distinct biological features.

Leuk Lymphoma, 32(1-2):55-63

Tonn JC, Kerkau S, Hanke A, Bouterfa H, Mueller JG, Wagner S, Vince GH, Roosen K:

Effect of synthetic matrix-metalloproteinase inhibitors on invasive capacity and proliferation of human malignant gliomas in vitro.

Int J Cancer, 80(5):764-72

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Hanke
Vorname	Maria <u>Annegret</u>
Geburtstag und –ort	25.01.74 in Pirna
Familienstand	Ledig
Adresse	Robert-Koch-Allee 2 A305, 99438 Bad Berka

Schulbildung

1980-1986	Polytechnisches Oberschulkombinat Bahretal (Sachsen)
1986-1988	Polytechnische Oberschule Kleinmachnow (Brandenburg)
1988-1990	Erweiterte Spezialoberschule für Alt Sprachen (Humboldt-Gymnasium, Potsdam, Brandenburg)
1990-1992	Erweiterte Spezialoberschule für Alt Sprachen (Gerhart-Hauptmann-Gymnasium, Zwickau, Sachsen)
26.06.1992	Abitur

Studium der Humanmedizin

10/1992 – 08/1994	Vorklinisches Studium an der Universität Regensburg
14.09.1994	Ärztliche Vorprüfung
Seit 10/1994	Klinisches Studium an der Universität Würzburg
29.08.1995	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
26.03.1998	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/1998 – 08/1998	1. Abschnitt des Praktischen Jahres in der Neurologischen Klinik der Universität Würzburg
08/1998 – 09/1998	Beginn des 2. Abschnittes des Praktischen Jahres in der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg
09/1998 – 01/1999	3. Abschnitt des Praktischen Jahres in der Chirurgischen Abteilung des Krankenhauses Thusis, Kanton Graubünden, Schweiz
01/1999 – 03/1999	Fortsetzung des 2. Abschnittes des Praktischen Jahres in der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg
10.06.1999	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Promotion

Seit 09/1995	PD Dr. J. Müller, Pathologisches Institut der Universität Würzburg Thema: Die Notwendigkeit der Doppelfärbung für Cytokeratin und DNA bei der durchflusszytometrischen Untersuchung von Mammakarzinomen
--------------	--

Studienbegleitende Tätigkeiten

Krankenpflegedienst

09/1992 – 10/1992 Schwesternhelferin (Gynäkologie, Chirurgie, Urologie) im Ev. KH Oberhausen, Nordrhein-Westfalen

08/1993 Pflegedienstpraktikum (Chirurgie) im Ev. KH Oberhausen, Nordrhein-Westfalen

Famulaturen

03/1995 Famulatur in Innerer Medizin am Kreiskrankenhaus Werdau, Sachsen

04/1996 Famulatur am Path. Institut Würzburg

08/1996 Famulatur in Gynäkologie am Missionsärztlichen Institut Würzburg

09/1996 Famulatur in Chirurgie am Krankenhaus Thusis, Kanton Graubünden, Schweiz

Berufstätigkeit

Seit 7/1999 Ärztin im Praktikum in der Klinik für Neurologie der Zentralklinik Bad Berka, Thüringen

Fremdsprachen

Englisch

Russisch (Schulkenntnisse)

Latein (Schulkenntnisse)

Griechisch (Schulkenntnisse)

Bad Berka, den 15.06.00