

**Genetische Veränderungen als prognostische Marker in  
therapeutisch bestrahlten Plattenepithelkarzinomen  
des Kopf-Hals-Bereiches**

**Dissertation**

Der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von  
**Verena L. Bauer**

Mai 2008

Erstgutachter: Prof. Dr. Johannes Wienberg

Zweitgutachter: Prof. Dr. Thomas Cremer

Tag der mündlichen Prüfung: 30.03.2009

*Für meine Eltern*

## INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	XI
Abkürzungsverzeichnis .....	XII
<b>A EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>B MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>11</b>
B.1 PATIENTENMATERIAL .....	11
B.2 HÄUFIG VERWENDETE LÖSUNGEN .....	13
B.2.1 DAPI/Vectashield .....	13
B.2.2 EDTA 0,5 M .....	13
B.2.3 Ethanol 70%.....	13
B.2.4 Ethanol 90%.....	13
B.2.5 Formamid/2xSSC 50% für 3 Küvetten .....	13
B.2.6 Formamid/2xSSC 70% .....	14
B.2.7 Natriumacetat 3 M.....	14
B.2.8 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) 10x .....	14
B.2.9 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) 1x .....	14
B.2.10 Phosphat-Nonidet P40-Puffer (PN-Puffer).....	15
B.2.11 PN-Magermilch-Puffer (PNM-Puffer) .....	15
B.2.12 Standard Saline-Citrat-Puffer (SSC) 20 x .....	15
B.2.13 Standard Saline-Citrat-Puffer (SSC) 2 x .....	15
B.3 CGH (VERGLEICHENDE GENOMISCHE HYBRIDISIERUNG).....	16
B.3.1 Sonden für die CGH.....	16
B.3.1.1 Tumor-DNA.....	16
B.3.1.1.1 Entparaffinierung der Gewebeschnitte für die CGH .....	16
B.3.1.1.2 Mikrodissektion der Gewebeschnitte .....	17
B.3.1.1.3 Isolierung der Tumor-DNA.....	18
B.3.1.1.4 Konzentrationsmessung der Tumor-DNA.....	19
B.3.1.1.5 Gesamtgenomische Amplifikation der Tumor-DNA.....	20
B.3.1.1.5.1 Genomphi-Amplifikation .....	21
B.3.1.1.5.2 Whole Genome Amplifikation (WGA) .....	22
B.3.1.1.5.3 Agarose-Gelelektrophorese .....	23

B.3.1.1.5.4	Aufreinigung der amplifizierten DNA .....	24
B.3.1.2	Referenz-DNA.....	26
B.3.1.2.1	Lymphozytenabtrennung .....	26
B.3.1.2.2	Isolation der Referenz-DNA.....	27
B.3.1.2.3	Konzentrationsmessung der Referenz-DNA.....	27
B.3.1.2.4	Gesamtgenomische Amplifikation der Referenz-DNA.....	27
B.3.1.3	Markierung der Tumor- und Referenz-DNA durch Nick-Translation .	28
B.3.1.4	Fällung und Denaturierung der CGH-Sonden.....	29
B.3.2	Objektträger für die CGH .....	31
B.3.2.1	Herstellung von Metaphasepräparaten .....	31
B.3.2.2	Denaturierung der Metaphasepräparate .....	33
B.3.3	Hybridisierung .....	34
B.3.4	Waschen und Detektion der CGH-Präparate.....	35
B.3.5	Auswertung der CGH.....	36
B.3.6	Statistische Methoden.....	38
B.3.6.1	Hierarchische Cluster Analyse .....	38
B.3.6.2	Überlebenszeitanalyse.....	39
B.3.6.3	Cox Regression .....	39
B.3.6.4	Korrelation der CGH-Daten mit verschiedenen klinischen Daten .....	39
B.3.6.5	Untersuchung von Co-Aberrationen .....	40
B.3.6.6	Benjamini-Hochberg FDR (False Discovery Rate).....	40
B.4	ARRAY-CGH .....	41
B.4.1	BAC-Arrays .....	41
B.4.1.1	Verwendete Arrays .....	41
B.4.1.1.1	Sanger 1 Mb BAC Array .....	41
B.4.1.1.2	CMR Hs1 Mb BAC Array .....	42
B.4.1.1.3	UCSF Human BAC Array 1.4 Mb v 3.1.....	42
B.4.1.2	Multiplex-PCR zu Qualitätskontrolle von DNA vor der Array-CGH ...	42
B.4.1.3	Markierung der Test- und Referenz-DNA .....	45
B.4.1.4	Aufreinigung der markierten DNA .....	46
B.4.1.5	Überprüfen der Inkorporationsrate.....	47
B.4.1.6	Fällung und Denaturierung der Sonden.....	47
B.4.1.7	Hybridisierung .....	49
B.4.1.8	Scannen und Analyse der Arrays .....	51
B.4.1.9	Auswertung der Arraydaten mit der Web-basierten Plattform CAPweb .....	52

B.4.2	Oligonukleotid-Array: GeneChip® Mapping 10K Array Xba 142 2.0 .....	54
B.4.2.1	Restriktionsverdau mit Xba I .....	55
B.4.2.2	Adaptor-Ligation.....	56
B.4.2.3	Linker-Adapted-PCR.....	57
B.4.2.4	Aufreinigung der PCR Produkte.....	58
B.4.2.5	Fragmentierung.....	59
B.4.2.6	Markierung der Test-DNA .....	61
B.4.2.7	Hybridisierung .....	61
B.4.2.8	Waschen und Detektion.....	63
B.4.2.9	Scannen und Analyse .....	65
B.4.2.10	Qualitätskontrolle der Hybridisierung .....	66
B.5	FISH (FLUORESZENZ <i>IN SITU</i> HYBRIDISIERUNG) .....	68
B.5.1	Bacterial Artificial Chromosomes (BACs) .....	68
B.5.1.1	Anzucht der BACs.....	69
B.5.1.2	Isolation der Plasmid-DNA.....	70
B.5.1.3	Aufreinigung der Plasmid-DNA .....	72
B.5.1.4	Konzentrationsbestimmung der BACs .....	73
B.5.1.5	Markierung der BACs durch Nick-Translation.....	73
B.5.1.6	Fällung und Denaturierung der BAC Sonde .....	73
B.5.2	Objektträger für die FISH.....	74
B.5.2.1	Metaphasepräparate für Testhybridisierungen .....	75
B.5.2.1.1	Herstellung der Metaphasepräparate .....	75
B.5.2.1.2	Denaturierung der Metaphasepräparate.....	75
B.5.2.2	Gewebeschnitte .....	75
B.5.2.2.1	Entparaffinierung und Hitzebehandlung der Gewebeschnitte ...	75
B.5.2.2.2	Pronase E Verdau .....	76
B.5.2.2.3	Denaturierung der Gewebeschnitte .....	77
B.5.3	Hybridisierung.....	77
B.5.3.1	Testhybridisierung.....	77
B.5.3.1.1.1	Waschen und Detektion der Testhybridisierung.....	78
B.5.3.2	Hybridisierung auf Gewebeschnitte .....	79
B.5.3.2.1	Waschen und Detektion der Gewebeschnitte.....	79
B.5.4	Auswertung der FISH.....	80
B.5.4.1	Auswertung der Testhybridisierung .....	80
B.5.4.2	Auswertung der Gewebeschnitte .....	81

B.6 QUANTITATIVE ECHTZEIT-PCR (QRT-PCR) ZUR BESTIMMUNG DER MRNA- EXPRESSION .....	83
B.6.1 RNA-Isolation.....	84
B.6.1.1 RNA-Isolation aus Paraffingewebe .....	84
B.6.1.2 RNA-Isolation aus Zelllinien.....	86
B.6.1.3 Konzentrationsmessung der RNA.....	87
B.6.2 Reverse Transkription (RT)-PCR.....	88
B.6.3 QRT-PCR: Taqman® Analyse .....	90
B.6.4 Auswertung der Real-Time-RT-PCR .....	93
B.7 IMMUNHISTOCHEMIE (IHC).....	95
B.7.1 Entparaffinierung der Gewebeschnitte.....	96
B.7.2 Hitzebehandlung der Gewebeschnitte .....	96
B.7.2.1 Hitzebehandlung mit Citratpuffer .....	97
B.7.2.2 Hitzebehandlung mit Tris-EDTA-Puffer.....	97
B.7.3 Antikörperreaktion.....	98
B.7.4 Detektion des Antikörpers.....	99
B.7.5 Auswertung der IHC.....	100
B.8 ZELLKULTUR.....	101
B.8.1 Allgemeine Methoden: Kultivierung von Zellen.....	101
B.8.2 Verwendete Zelllinien.....	103
B.8.2.1 Zelllinie Cal-33 .....	103
B.8.2.2 Zelllinie BHY .....	104
B.8.3 Charakterisierung der verwendeten Zelllinien.....	105
B.8.3.1 Koloniebildungs-Test .....	105
B.8.3.2 Array-CGH .....	106
B.8.3.3 Spektrale Karyotypisierung (SKY).....	106
B.8.3.3.1 Thiocyanat- und RNase-Vorbehandlung der Metaphase- präparate .....	107
B.8.3.3.2 Hybridisierung, Waschen und Detektion.....	108
B.8.3.3.3 Auswertung der SKY .....	110
B.8.3.4 Real-Time RT-PCR.....	110
B.9 HERSTELLUNG TRANSGENER ZELLINIEN.....	111
B.9.1 Selektive Amplifikation des <i>FANCA</i> Gens aus cDNA .....	111
B.9.2 Klonierung des <i>FANCA</i> Gens in den Vektor pSC-A .....	113

B.9.3	Poly-Adenylierung des PCR-Produktes .....	115
B.9.4	Isolierung des poly-adenylierten PCR-Produktes .....	115
B.9.5	Ligation von <i>FANCA</i> in den Vektor und Transformation .....	117
B.9.6	Isolation des pSC-A Vektors mit inseriertem PCR-Produkt .....	118
B.9.7	Restriktionsanalyse des Plasmids mit EcoRI .....	120
B.9.8	Sequenzierung des klonierten <i>FANCA</i> Gens.....	121
B.9.9	Klonierung des <i>FANCA</i> Gens in den pcDNA3.1(+)-Expressionsvektor ..	123
B.9.9.1	Ligation von <i>FANCA</i> in einen Expressionsvektor und Transformation kompetenter Zellen .....	124
B.9.9.2	Isolation des pcDNA3.1(+) Vektors mit inseriertem Gen .....	126
B.9.9.3	Restriktionsanalyse des Expressionsvektors mit Nco I.....	126
B.9.10	Isolation des Expressionsvektors für die Transfektion.....	128
B.9.10.1	Anzucht eines Klons mit korrektem Expressionsvektor .....	128
B.9.10.2	Plasmidisolierung mit Hilfe des Plasmid-Maxi-Kits der Firma Qiagen .....	128
B.9.11	Transfektion .....	130
B.9.11.1	Linearisierung des Expressionsvektors .....	131
B.9.11.2	G418 Konzentrationstest .....	132
B.9.11.3	Transfektion der Zelllinien.....	134
B.9.11.3.1	Überprüfung der Transfektionseffizienz.....	136
B.9.11.3.2	Selektion mit G418 .....	138
B.10	PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG DER MIT <i>FANCA</i> TRANSFIZIERTEN ZELLINIEN.....	139
B.10.1	Erstellung von Überlebenskurven nach Bestrahlung .....	139
<b>C</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>142</b>
C.1	ETABLIERUNG MOLEKULARGENETISCHER METHODEN .....	142
C.1.1	Gesamtgenomische Amplifikation von DNA aus formalinfixiertem Paraffingewebe .....	142
C.1.2	Evaluierung verschiedener Array-Plattformen .....	144
C.2	ERGEBNISSE DER CHROMOSOMALEN CGH-ANALYSEN VON KOPF-HALS- TUMOREN .....	151
C.2.1	Häufigkeit chromosomaler Veränderungen .....	151
C.2.2	Cluster Analyse.....	154



C.2.3	Korrelation der rezidivfreien Überlebenszeit mit klinischen Parametern und chromosomalen Kopienzahlveränderungen .....	158
C.2.4	Korrelation der chromosomalen Kopienzahlveränderungen mit klinischen Parametern .....	161
C.2.5	Korrelationen zwischen chromosomalen Kopienzahlveränderungen .....	163
C.3	VALIDIERUNG VON KOPIENZAHLVÄNDERUNGEN .....	164
C.3.1	Array-CGH Analysen von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches .....	164
C.3.2	FISH-Experimente zur Verifizierung von chromosomalen Aberrationen .....	168
C.3.3	QRT-PCR-Analyse der <i>FANCA</i> Expression .....	175
C.3.4	Immunhistochemische Untersuchung von HNO-Tumoren .....	177
C.3.4.1	Methodische Etablierung der Immunhistochemie (IHC).....	177
C.3.4.2	Untersuchung der <i>FANCA</i> -Expression in HNO-Tumoren mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 16q.....	182
C.4	FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR <i>FANCA</i> -EXPRESSION .....	187
C.4.1	Charakterisierung der Zelllinien .....	187
C.4.1.1	Koloniebildungstest.....	187
C.4.1.2	Array-CGH .....	189
C.4.1.3	SKY- und FISH-Analyse.....	195
C.4.1.3.1	Vergleich der Ergebnisse der Array-CGH-, SKY- und FISH-Analyse der Zelllinie Cal-33 .....	195
C.4.1.4	Bestimmung der <i>FANCA</i> -Expression mittels Quantitativer Real Time-PCR .....	198
C.4.2	Transfektion der Zelllinien BHY und Cal-33.....	199
C.4.3	Untersuchung der Strahlensensitivität der mit <i>FANCA</i> transfizierten Zellen .....	208
<b>D</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>211</b>
D.1	METHODISCHE ETABLIERUNGEN .....	211
D.2	ZYTOGENETISCHE MARKER IN PLATTENEPITHELKARZINOMEN DES KOPF-HALS-BEREICHES .....	217
D.3	VALIDIERUNG VON KANDIDATENGENEN .....	225
D.4	UNTERSUCHUNG DES KANDIDATENGENS <i>FANCA</i> IN FUNKTIONELLEN STUDIEN MIT ZELLINIEN.....	229

<b>E</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>234</b>
<b>F</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>237</b>

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1: Spektrale Darstellung einer DNA-Probe nach der Konzentrationsmessung im NanoDrop® Spektrophotometer. ....	20
Abbildung 2: Exemplarische Darstellung einer Agarose-Gelelektrophorese nach der Nick-Translation. ....	29
Abbildung 3: Exemplarische Darstellung der CGH-Auswertung. ....	37
Abbildung 4: Exemplarische Darstellung der Multiplex-Amplifikate nach der Gelelektrophorese. ....	44
Abbildung 5: Prinzip der Amplifizierung durch kontinuierliche Strangverdrängung (Schock et al., 2005). ....	45
Abbildung 6: Gescannter Sanger 1 Mb-BAC-Array. ....	52
Abbildung 7: Übersichtsschema Affymetrix GeneChip® Mapping 10K 2.0 Array. ....	55
Abbildung 8: Darstellung des GeneChip® Arrays (Affymetrix). ....	63
Abbildung 9: Kontrollelemente zum Überprüfen der Hybridisierungsqualität (Affymetrix). ....	67
Abbildung 10: Testhybridisierung von Digoxigenin-markierten BAC Sonden. ....	81
Abbildung 11: Spektrale Darstellung einer RNA-Probe nach der Konzentrationsmessung im NanoDrop® Spektrophotometer. ....	88
Abbildung 12: Schematische Darstellung einer Reversen Transkription. ....	89
Abbildung 13: Schematische Darstellung des Prinzips von Taqman® Sonden. ....	91
Abbildung 14: Exemplarisches Beispiel einer Probenanordnung für die QRT-PCR. ...	93
Abbildung 15: Verdünnungsreihe des Standards für die QRT-PCR. ....	93
Abbildung 16: Graphische Darstellung einer QRT-PCR. ....	94
Abbildung 17: Klonierung des PCR-Produktes in den linearisierten Vektor pSC-A und schematische Darstellung des Vektors nach der Transformation (Stratagene). ....	114
Abbildung 18: EcoR I Schnittstellen des pSC-A Vektors. ....	120
Abbildung 19: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pcDNA3.1(+) (Invitrogen). ....	124
Abbildung 20: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pcDNA3.1(+) mit und ohne Insert. ....	127
Abbildung 21: G418 Konzentrationstest bei den Zelllinien BHY und Cal-33. ....	134
Abbildung 22: Darstellung der verschiedenen Transfektionsansätze pro Zelllinie. ....	136

Abbildung 23: Schematische Darstellung des Vektors pFred25 (Drexler, 2002). .....	137
Abbildung 24: Multiplex-PCR der Amplifikate aus WGA- und GenomiPhi-PCR. ....	143
Abbildung 25: Vergleich der Array-CGH von amplifizierter DNA mittels GenomiPhi- und WGA-Kit. ....	144
Abbildung 26: Evaluierung von SNP-Arrays zur Array-CGH-Analyse von DNA aus formalinfixiertem Gewebe.....	147
Abbildung 27: Evaluierung der UCSF 1.4 Mb BAC-Arrays zur Array-CGH-Analyse von FFPE-DNA. ....	149
Abbildung 28: Evaluierung der 1 Mb BAC-Arrays (Sanger und CMR Hs1) zur Array-CGH-Analyse von FFPE-DNA.....	150
Abbildung 29: Gesamtheit der durch die CGH ermittelten chromosomalen Veränderungen bei 117 Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. ....	152
Abbildung 30: Exemplarische Darstellung von „High Level Amplifikationen“ auf den Chromosomen 3 und 11.....	152
Abbildung 31: Hierarchische Cluster Analyse von 117 HNO-Tumoren.....	155
Abbildung 32: Kaplan-Meier-Überlebenskurven für Patienten mit und ohne DNA-Zugewinn auf den Chromosomen 1q43 und 16q23-24 und Deletion auf Chromosom 18q22.....	160
Abbildung 33: Signifikante Korrelation zwischen Resektionsstatus und Deletion auf Chromosom 16q24.....	162
Abbildung 34: Signifikante Unterschiede der chromosomalen Veränderungen zwischen anämischen und nicht anämischen Patienten.....	162
Abbildung 35: Array-CGH Profile für Chromosom 1.....	165
Abbildung 36: Array-CGH Profile von Chromosom 16. ....	166
Abbildung 37: Array-CGH Profile von Chromosom 18. ....	167
Abbildung 38: Tumorgewebe-FISH von BAC RP11-354M24.....	171
Abbildung 39: Tumorgewebe-FISH von BAC RP11-79A1. ....	172
Abbildung 40: Tumorgewebe-FISH von BAC RP11-781H20. ....	173
Abbildung 41: Tumorgewebe-FISH von BAC RP11-476G08.....	174
Abbildung 42: Relative Expression von <i>FANCA</i> .....	176
Abbildung 43: Hitzebehandlung der Gewebe mit Tris-EDTA- und Citratpuffer. ....	179
Abbildung 44: Immunhistochemischer Nachweis von <i>FANCA</i> auf einem Gewebe-Array von HNO-Tumoren. ....	180

Abbildung 45: Vergleich von IHC und FISH an Geweben eines HNO-Gewebe-Arrays.....	181
Abbildung 46: Immunhistochemischer Nachweis der FANCA-Expression an Tumorgewebe von HNO-Tumoren mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 16q. ....	183
Abbildung 47: Immunhistochemischer Nachweis der FANCA-Expression an Tumorgewebe von HNO-Tumoren ohne chromosomale Imbalancen auf 16q. ....	184
Abbildung 48: Immunhistochemischer Nachweis der FANCA-Expression an Tumorgewebe von HNO-Tumoren mit Deletionen auf 16q. ....	185
Abbildung 49: Tumorerheterogenität bei Tumor HN31565/97 in der IHC-Färbung. ....	186
Abbildung 50: Koloniebildungstest der Zelllinie Cal-33. ....	188
Abbildung 51: Koloniebildungstest der Zelllinie BHY. ....	188
Abbildung 52: Array-CGH-Analyse der Zelllinie Cal-33.....	191
Abbildung 53: Array-CGH-Analyse der Zelllinie BHY.....	193
Abbildung 54: Gemeinsame Veränderungen der Tumorzelllinien BHY und Cal-33...	194
Abbildung 55: SKY-Analyse der Zelllinie Cal-33. ....	196
Abbildung 56: FISH-Analyse der Zelllinie Cal-33. ....	198
Abbildung 57: Selektive Amplifikation des <i>FANCA</i> -Gens aus cDNA. ....	200
Abbildung 58: EcoRI Restriktionsverdau der isolierten pSC-A-Klonierungsvektoren.	201
Abbildung 59: Exemplarische Darstellung der Sequenzierungsdaten des klonierten <i>FANCA</i> -Gens. ....	202
Abbildung 60: NcoI Restriktionsverdau der pcDNA3.1(+)/ <i>FANCA</i> Expressionsvektoren. ....	203
Abbildung 61: Transfektionseffizienz der Zelllinie Cal-33. ....	205
Abbildung 62: Transfektionseffizienz der Zelllinie BHY.....	206
Abbildung 63: Einfluss von G418 auf das Wachstum der Zelllinien BHY und Cal-33.	207
Abbildung 64: Transfektion der Zelllinie Cal-33. ....	207
Abbildung 65: Transfektion der Zelllinie BHY.....	208
Abbildung 66: Überlebenskurve von Cal-33-Zellen nach Gamma-Bestrahlung. ....	210

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Klinische Befunde des Patientenkollektivs .....	11
Tabelle 2:	Verwendete BAC-Bibliotheken und ihre Vektoren.....	69
Tabelle 3:	Antikörper für die BAC-FISH .....	79
Tabelle 4:	Charakteristika der Zelllinie Cal-33 nach Angaben des DSMZ.....	103
Tabelle 5:	Charakteristika der Zelllinie BHY nach Angaben des DSMZ.....	105
Tabelle 6:	Antikörper für die SKY .....	109
Tabelle 7:	Pipettierschema der selektiven <i>FANCA</i> -Amplifikation aus cDNA. ....	113
Tabelle 8:	Die häufigsten DNA-Veränderungen in 117 HNO-Tumorfällen (mindestens 20% der Fälle). .....	153
Tabelle 9a:	Konsensusbereiche und HLA in Cluster 1. ....	156
Tabelle 9b:	Konsensusbereiche und HLA in Cluster 2. ....	157
Tabelle 10:	Signifikante Hazardverhältnisse für die Korrelation klinischer Parameter mit einer rezidivfreien Überlebenszeit. ....	159
Tabelle 11:	Statistische Kenngrößen für die Korrelation chromosomaler Veränderungen mit dem rezidivfreien Überleben nach Korrektur der p- Werte mit FDR.....	161
Tabelle 12:	BAC-Klone für FISH Analysen. ....	169
Tabelle 13:	Ergebnisse der FISH-Analysen für Chromosom 16q. ....	170
Tabelle 14:	Ergebnisse der QRT-PCR-Analyse.....	176
Tabelle 15:	Plating Efficiencies der Zelllinien Cal-33 und BHY.....	187
Tabelle 16:	Chromosomale Veränderungen der Zelllinie Cal-33 und BHY.....	190
Tabelle 17:	BAC-Klone für die FISH-Analyse von Cal-33. ....	197
Tabelle 18:	Transfektionseffizienzen der Zelllinien Cal-33 und BHY. ....	204
Tabelle 19:	Überlebensraten der Zellen nach der Gamma-Bestrahlung.....	209
Anhang 1:	Allgemeine TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung von HNO- Tumoren.....	249
Anhang 2:	Ergebnisse der chromosomalen CGH-Analyse von 117 Kopf-Hals- Tumoren.....	251

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
ak	autoklaviert
Amp	Amplifikation
AWS	Adaptive Weights Smoothing
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
CCD	Charged Coupled Device
bidest.	bidestilliert
Bio	Biotin
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	complementary DNA
CGH	Comparative Genomic Hybridisation
Cy3, Cy5	Cyanin 3, 5
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol-2-HCl
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
Del	Deletion
Dig	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxynucleosid-triphosphat
DOP-PCR	Degenerierte Oligonukleotid PCR
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EBV	Eppstein-Barr-Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERG	Eppendorf Reaktionsgefäß
FA	Formamid
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FDR	False Discovery Rate
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FFPE	Formalin-fixed paraffin embedded; formalinfixiert, in Paraffin eingebettet
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
G	Guanin
G418	Geneticin
x g	Fallbeschleunigung
g	Gramm
GCOS	GeneChip® Operating Software

GDAS	GeneChip® Analysis Software
GFP	Green Fluorescent Protein
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
GLAD	Gain and Loss Analysis of DNA
Cs	Cäsium
Gy	Gray
h	Stunde
HLA	High Level Amplifikation
HNO	Hals-Nasen-Ohren
HPV	Humane Papillomviren
IHC	Immunhistochemie
ISCN	International System for human cytogenetic nomenclature
ISH	<i>in situ</i> hybridisation
kb	Kilobasenpaar
konz.	Konzentriert
k-sfm	Serumfreies Keratinocytenmedium
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LOH	Loss of Heterozygosity; Heterozygotie-Verlust
M	Molar
Mb	Megabasen
MCS	Multiple Cloning Site
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MM 1.0	Mastermix 1.0
µm	Mikrometer
mmol	Millimol
N	Normale
N <sub>2</sub>	Stickstoff
ng	Nanogramm
NT	Nick-Translation
OT	Objektträger
p.a.	pro analysi
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction; Polymerasekettenreaktion
PE	Plating Efficiency
PN	Phosphat-Nonidet
PNM	Phosphat-Nonidet mit Magermilchpulver
QRT	Quantitative Real-time
RNase	Ribonuclease



RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SAPe	Streptavidin R-Phycoerythrin
sec	Sekunde
SKY	Spektrale Karyotypisierung
SSC	Standard Saline-Citrat-Puffer
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS	Sequence Detection System
SNP	Single Nukleotide Polymorphism
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris EDTA
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase
TES	Tris-EDTA-Saline
TBS	Tris Buffered Saline
TdT	Terminale Desoxynukleotidyl Transferase
TE	Tris-EDTA
TMAcL	Tetrametyl-Ammoniumchlorid
TNM	Tumor, Nodus, Metastasis
Tris	Tris-(hydroxy)aminoethan
tRNA	Transfer RNA
U	Uracil
UV	ultraviolett
WGA	Whole Genome Amplification; Gesamtgenomische Amplifikation
VAMP	Visualization and Analysis of array-CGH Molecular Profiles
Vol.	Volumen

## A EINLEITUNG

Maligne Erkrankungen im Kopf-Hals-Bereich machen etwa 6% aller Krebserkrankungen weltweit aus und stellen mit etwa 540 000 Neuerkrankungen und 270 000 Sterbefällen pro Jahr eine wesentliche Ursache für Morbidität und Mortalität dar (Steward und Kleihues, 2003). Über 90% aller bösartigen Tumorerkrankungen des Kopf-Hals-Bereiches sind so genannte Plattenepithelkarzinome, welche sich im oberen Aerodigestivtrakt entwickeln. Der Begriff „Kopf-Hals-Tumore“ beschreibt eine Gruppe ätiologisch und histologisch unterschiedlicher Tumore verschiedener anatomischer Lokalisationen im Bereich des Kopfes und des Halses (Burian et al., 2002). Im Speziellen gehören dazu maligne Erkrankungen des Mundbodens, der Mundhöhle, der Lippen, der Zunge, des Zahnfleisches, des Gaumens, der Speicheldrüsen, des Rachens (Pharynx), des Kehlkopfes (Larynx), des Mittelohrs sowie der Nasenhöhle und der Nasennebenhöhle (Reiche, 2003). Im allgemeinen Sprachgebrauch beschreibt der Terminus „Kopf-Hals-Tumore“ Plattenepithelkarzinome der am häufigsten betroffenen Regionen der Mundhöhle, des Pharynx (Oro- und Hypopharynx) und des Larynx (Burian et al., 2002).

Die Entstehung dieser Tumore ist multifaktoriell bedingt und wird mit einer Vielzahl von Noxen in Verbindung gebracht. So gelten der Konsum von Zigaretten und Alkohol nach wie vor als Hauptrisikofaktoren, wobei sich das Risiko bei kombiniertem Verbrauch potenziert (Olsen et al., 1985). Auch eine unzureichende Mundhygiene, der Gebrauch von Kautabak sowie bestimmte Ernährungsmuster können eine Tumorentstehung begünstigen. Neben diesen bekannten Noxen wird auch ein Zusammenhang zwischen einer Virusinfektion und der Karzinomentstehung im Hals-Kopf-Bereich diskutiert (Witekkind et al., 2001). So wird z.B. die Entstehung von Nasopharynx-Karzinomen mit einer Epstein Barr Virus (EBV)-Infektion assoziiert (Yap et al., 2007). Auch humanen Papillomviren (HPV), insbesondere HPV-16, wird eine wesentliche Rolle in der Karzinomentstehung einiger Tumorsubgruppen zugeschrieben (Ragin et al., 2007; Premoli-De-Percoco et al., 1998). Eine Vielzahl von Studien befasst sich mit dieser Thematik, da eine HPV-Infektion Auswirkungen auf die Prognose der Patienten zu haben scheint. So konnten Fakhry et al. (2008) in einer prospektiven klinischen Studie mit 96 Patienten eine erhöhte Überlebensrate von Patienten mit HPV-positiven Tumoren im Gegensatz zu Patienten mit HPV-negativen Tumoren beobachten. Applebaum et al. (2007) finden keine Assoziation zwischen HPV-positiven HNO-Tumoren und den Risikofaktoren Alkohol und Tabak. Es wird diskutiert, dass es sich bei HPV-positiven Tumoren um eine Subgruppe von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich handelt, und dass mindestens zwei Wege der Karzinogenese, die entweder durch Alkohol- und Ta-

bakabusus oder durch eine HPV-Infektion initiiert werden, existieren (Ragin et al., 2006). Männer sind im Vergleich zu Frauen etwa sieben Mal so häufig von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches betroffen, wobei sich die höchsten Erkrankungsraten in der fünften bis siebten Lebensdekade beobachten lassen (Pisani et al., 1999; Wittekind et al., 2001). Einige Studien berichten allerdings über eine zunehmende Angleichung der Tumorinzidenzen bei Frauen und Männern, was vermutlich auf ein sich immer mehr angleichendes Konsumverhalten bezüglich der Hauptrisikofaktoren Alkohol und Rauchen zurückzuführen ist (El-Husseiny et al., 2000).

Plattenepithelkarzinome, auch Stachelzellenkrebs, Spinaliome oder spinozelluläre Karzinome genannt, sind maligne Tumore der Haut und Schleimhaut, die sich aus den Zellen des Stratum Spinosum (Stachelzellenschicht), einer Schicht der Epidermis (Oberhaut), entwickeln. Sie werden in verhornende und nicht-verhornende Karzinome eingeteilt, wobei der Grad der Verhornung mit dem Malignitätsgrad der Tumore abnimmt. Die Tumorentstehung der Plattenepithelkarzinome verläuft über mehrere potenzielle Vorstufen (präkanzeröse Läsionen), die von einer epithelialen Hyperplasie ausgehen und sich über eine Dysplasie zum *Carcinoma in situ* und letztendlich zum invasiven Karzinom entwickeln. Dabei handelt es sich um histologisch definierte Veränderungen, welche im Vergleich zum normalen Epithel ein erhöhtes Risiko der malignen Entartung aufweisen, wobei ein Übergang zur nächsten Stufe nicht zwingend stattfindet. Eine Hyperplasie entsteht durch vermehrte Zellteilung und einer damit einhergehenden Vergrößerung des Gewebes. Mit dem Übergang zur Dysplasie kommen eine Veränderung der Gewebestruktur und ein Verlust der Zelldifferenzierung hinzu. Der Übergang von einer Dysplasie zum *Carcinoma in situ* ist fließend und zeichnet sich durch hohe Zellteilungsrate in allen Zellschichten, sowie einem weiteren Verlust des Differenzierungsgrades aus. Die maligne Transformation dieser Läsion zu einem invasiven Karzinom, welches die Basalmembran durchbricht und in benachbartes Gewebe infiltriert, kann einer Latenzzeit von mehreren Jahren unterliegen (Pschyrembel, 2004). In der nächsten Umgebung von HNO-Tumoren können häufig weitere Karzinome oder präkanzeröse Läsionen beobachtet werden, was Slaughter et al. (1953) dazu veranlasste den Begriff der „Feldkanzerisierung“ zu prägen. Dieser beschreibt den Zusammenhang zwischen langjähriger Exposition eines Gewebes mit kanzerogenen Stoffen, wie z.B. Tabak oder Alkohol, und dem Auftreten von Mehrfachtumoren auf Grund von flächig exponierten und dadurch veränderten Gewebearealen. Dieses Phänomen wurde durch den molekularen Nachweis ganzer neoplastischer Geweberegionen im HNO-Bereich nachgewiesen (Ha und Califano, 2003; Braakhuis et al., 2003). Weitere Studien postulieren ein alternatives Modell der „expandierenden Felder“, welches, im Gegensatz zu Slaughters Theorie der durch Noxenexposition transformierten Gewebe-

areale, auf der Annahme einer klonalen Expansion einer veränderten Vorläuferzelle in das umliegende Gewebe beruht (Tabor et al., 2002; Scholes et al., 1998).

Die Stadieneinteilung der malignen Erkrankungen des Kopf-Hals-Bereiches erfolgt nach der TNM (Tumor, Nodus, Metastasis)-Klassifikation der Union Internationale Contre le Cancer (UICC; Sobin und Wittekind, 2002), wobei diese für jede Lokalisation gesondert definiert ist. Eine vereinfachte Darstellung der TNM-Klassifikation und ihrer allgemein gültigen Prinzipien ist Anhang 1 zu entnehmen.

Die klassische Therapie von Kopf-Hals-Tumoren basiert auf den drei Säulen Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie, wobei multimodale, interdisziplinäre Kombinationsbehandlungen den heutigen Behandlungsstandard darstellen (Kessler et al., 2007). Die Behandlungsweise wird bei jedem Patienten individuell bestimmt und erfolgt nach den Befunden bildgebender Verfahren (Computertomographie, Magnetresonanztomographie) und in Abhängigkeit von Tumorlokalisierung, histologischer und pathologischer Diagnose, sowie Alter und Allgemeinzustand des Patienten. Im Idealfall erfolgt die Therapieplanung durch ein interdisziplinäres Ärzteteam, in dem Onkologe, Radiologe, Pathologe und Chirurg gemeinsam über den Behandlungsverlauf entscheiden. Dabei stehen lokoregionale Tumorkontrolle und Erhalt der anatomischen Funktionen bei möglichst geringem Rezidivrisiko im Vordergrund (Dimery und Hong, 1993). Die Chirurgie stellt nach wie vor das wichtigste Standbein im therapeutischen Konzept von HNO-Tumoren dar, dessen Ziel die vollständige Entfernung des Tumors einschließlich vorhandener Lymphknotenmetastasen (R0-Resektion) ist (Burian et al, 2003). Ein operativer Eingriff, bei dem zusätzlich zur Blockresektion des Tumors auch alle regionären Lymphknoten entfernt werden, wird als radikale „Neck Dissection“ bezeichnet. Wann immer es Ausdehnung und Lokalisation des Tumors erlauben, wird diese so funktionserhaltend wie möglich (funktionelle Neck Dissection) durchgeführt. Heute wird zwischen elektiver, selektiver und (modifiziert) radikaler Neck Dissection unterschieden. Die Strahlentherapie erfolgt in erster Linie als perkutane Therapie mit Linearbeschleunigern. Sie wird entweder als alleinige Behandlungsmethode bei inoperablen Tumoren oder in Kombination mit einer Chemotherapie, sowie als zusätzliche Maßnahme vor (neoadjuvant) oder nach (adjuvant) einer R0-Resektion eingesetzt (Burian et al, 2003). Ist eine komplette Resektion des Primärtumors aufgrund von Lokalisation und/oder Größe nicht durchführbar (R1, R2), werden zusätzliche Strahlen- oder Chemotherapien als „additive Therapien“ bezeichnet. Therapiekonzepte mit simultaner Radio- und Chemotherapie haben sich in der Behandlung von HNO-Tumoren besonders bewährt. Dabei konnten in den letzten Jahren besonders Studien mit neoadjuvanten Radio-Chemotherapien über positive Therapieergebnisse berichten (Eich et al., 2008). So zeigen Kessler et al. (2007) und Mohr et al. (1994), dass neoadjuvant mit Radiochemo-

therapie behandelte Patienten eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit auf ein langfristig tumorfreies Überleben im Vergleich zu adjuvant behandelten Patienten haben. Primär irresektable Tumoren können in einigen Fällen durch eine neoadjuvante Therapie und die daraus resultierende Tumorverkleinerung resektabel gemacht werden. Insgesamt sollte das Ziel einer jeden Tumorthherapie die bestmögliche Kontrolle der Tumorerkrankung bei maximalem Erhalt der Lebensqualität sein.

Trotz der erheblichen Fortschritte in der HNO-Tumorthherapie haben sich die Gesamtüberlebensraten und damit die Gesamtprognose in den letzten 20 bis 30 Jahren nur wenig verbessert (Jemal et al., 2003, Burian et al., 2002, Jemal et al., 2008). Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten für Kopf-Hals-Tumore liegen nach wie vor durchschnittlich bei ca. 50%. In diesem Zusammenhang wurden in einer Vielzahl von Studien nach Prognosefaktoren gesucht, welche den Krankheitsverlauf unabhängig von anderen Parametern und in einer vorhersehbaren Art und Weise beeinflussen. Dabei wird zwischen patientenabhängigen (Alter, Geschlecht, Begleiterkrankungen etc.) und tumorabhängigen Prognosefaktoren (anatomische Ausbreitung, histologisches Grading etc.) unterschieden.

Zu den klinisch-pathologischen Parametern, deren prognostische Bedeutung bei Kopf-Hals-Tumoren als gesichert gilt, gehören die Stagingparameter der UICC. Dabei zeigen besonders die Residualtumorklassifikation sowie der Lymphknotenstatus einen außerordentlichen Einfluss auf das Überleben der Patienten (Platz et al., 1983, Millesi et al., 1998, Wittekind et al., 2001). Auch die Lokalisation des Tumors spielt eine große Rolle; zwischen den Fünf-Jahres-Überlebensraten von Patienten mit Karzinomen der Stimmlippe und Patienten mit Hypopharynxkarzinomen zeigt sich eine erhebliche Diskrepanz (80% zu 20%). Eine ganze Reihe weiterer potenzieller Prognosefaktoren werden kontrovers diskutiert. Veness (1999) stellt eine schlechtere Überlebensrate jüngerer im Vergleich zu älteren Patienten fest. Ebenso verschlechtert auch prä- und posttherapeutischer Alkoholabusus und Zigarettenkonsum die Prognose (El-Husseiny et al., 2000). Des Weiteren werden histopathologisches Grading, DNA-Gehalt des Zellkerns und Polyploidien mit einer verminderten Überlebens- und erhöhten Rezidivrate in Verbindung gebracht (Dimery und Hong, 1993). Natürlich stellt auch das Ansprechen des Tumors auf eine bestimmte Therapieform einen Faktor dar, der bedeutend auf die Überlebensrate der Patienten Einfluss nimmt. Eich et al. (2008) zeigen z.B. einen signifikanten Unterschied in der Zwei-Jahres-Überlebenszeit zwischen Patienten, deren Tumoren durch ionisierende Strahlung therapierbar waren, und Patienten, deren Tumore offensichtlich eine Strahlenresistenz aufwiesen. In diesem Zusammenhang wiederum berichten mehrere Studien über die Relevanz des Hämoglobinwertes vor einer

primären Radio- oder Radio-Chemotherapie (Henke et al., 1999; Frommhold et al., 1998; Dietz et al., 2000).

Insgesamt betrachtet lässt sich die Prognose der Patienten anhand der etablierten klinisch-pathologischen Parameter auf Grund der teilweise widersprüchlichen Ergebnisse aus unterschiedlichen Studien nur ungenügend bestimmen (Bockmühl et al., 2000; Wreesmann et al., 2004). Da die Entstehung und Progression der Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich durch eine Akkumulation von genetischen Veränderungen, welche u.a. eine Aktivierung von Proto-Onkogenen und eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen zur Folge haben, erfolgt, liegt ein besonderes Augenmerk auf der Erforschung der zugrundeliegenden molekulargenetischen Mechanismen und möglicher genetischer Prognosefaktoren. Durch eine verbesserte Abschätzung der Tumoreigenschaften wie z.B. Metastasierungspotential und Strahlensensitivität ist es möglich, die Prognose der Patienten durch eine individualisierte Tumorthherapie positiv zu beeinflussen.

1996 stellten Califano et al. ein genetisches Modell der Kanzerogenese von Tumoren im HNO-Bereich vor. Mit Hilfe der so genannten „loss of heterozygosity“ (LOH)-Analyse, einer PCR-basierten Mikrosatelliten-Analyse zum Nachweis von Heterozygotie-Verlusten (LOH), wurden zehn chromosomale Loci untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei LOH auf den Chromosomen 9p, 3p und 17p um sehr frühe Veränderungen beim Übergang vom normalen zum dysplastischen Gewebe handelt. Das sequenzielle Auftreten weiterer LOH auf den Chromosomen 11q, 13q, 14q, 6p, 8 und 4q führt zum *Carcinoma in situ* und letztendlich zum invasiven Karzinom. In einer Proteom-Studie konnten kürzlich bei einem Vergleich von Normal- und Tumorgewebe aus dem Kopf-Hals-Bereich eine Reihe von Proteinen identifiziert werden, welche bei der Karzinogenese dieser HNO-Tumoren involviert zu sein scheinen (Patel et al., 2008). Dabei handelt es sich um Proteine, die in zellulären Prozessen wie epithelial-mesenchymale Transition, Zellmigration, Signal-Transduktion, Proteolyse, DNA-Synthese und Stoffwechsel mitwirken. In genetischen Expressionsstudien (Übersicht in Choi und Chen, 2005) wurde ebenfalls eine Vielzahl an Genen identifiziert, deren Expression in Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches verändert ist. In Expressionsstudien wird die aus den Tumorproben isolierte RNA durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und quantitativ analysiert. Die am Häufigsten veränderten Gene codierten dabei für Proteine des Zytoskeletts, der extrazellulären Matrix und der epidermalen Differenzierung, sowie für Entzündungsmediatoren und Moleküle der Zelladhäsion. Neuere Studien berichteten darüber hinaus über unterschiedliche Expressionsmuster in primären Tumoren und Metastasen (Roepman et al., 2006 und Liu et al., 2008).

Die meisten diagnostischen Studien sind retrospektiver Art und müssen an archiviertem Tumormaterial durchgeführt werden. Ein Nachteil dieser formalinfixierten Paraffingewebe (FFPE-Gewebe) sind die durch das Formalin induzierten Molekül-Quervernetzungen, die die molekulare Analyse von DNA, RNA und Proteinen stark beeinträchtigen. Bei langjähriger Lagerung der Gewebe kann eine teils massive Degradierung der DNA beobachtet werden (Ferrer et al., 2007), wodurch die noch möglichen molekulargenetischen Analysen stark eingeschränkt werden. Die Vergleichende Genomische Hybridisierung (Comparative Genomic Hybridisation, CGH), einer Sonderform der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH), ermöglicht die Untersuchung von DNA aus FFPE-Tumorgewebe auf molekularer Ebene, um chromosomale Imbalancen in Form von DNA-Zugewinnen und DNA-Verlusten aufzudecken (Kallioniemi et al., 1992). Dabei werden eine Tumor-DNA und eine normale Referenz-DNA unterschiedlich mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und gleichzeitig auf Metaphasepräparate eines gesunden Spenders hybridisiert. Die chromosomalen Veränderungen lassen sich anhand der Fluoreszenzintensitäts-Unterschiede entlang der Metaphasechromosomen erkennen. Bindet in einem Bereich mehr Tumor- als Referenz-DNA, überwiegt die Fluoreszenz der Tumor-DNA in diesem Bereich und zeigt einen DNA-Zugewinn im Tumor an. Bei DNA-Verlusten verhält es sich genau umgekehrt. Aufgrund der biologischen Bedeutung solcher chromosomaler Veränderungen bei der Karzinogenese von Tumoren (DNA-Zugewinne können u.a. zur Aktivierung von Proto-Onkogenen führen, Deletionen zum Verlust von Tumorsuppressorgenen) und wegen der Verwendbarkeit der Methode an FFPE-Gewebe, wurde die CGH in einer Vielzahl von Studien zur molekularen Charakterisierung von archiviertem Tumormaterial verwendet (Übersicht in Zitzielsberger et al., 1997). So konnte gezeigt werden, dass in HNO-Tumoren eine Reihe spezifischer Aberrationen – wie DNA-Zugewinne auf den Chromosomen 3q, 5p, 7, 8q, 9p und 11q und DNA-Verluste auf 3p, 5q, 8p, 9p, 11q und 18q – auftreten (Übersicht in Patmore et al., 2005). Bestimmte chromosomale Veränderungen konnten signifikant mit klinischen Parametern und einem rezidivfreien Überleben der Patienten korreliert werden. Zum Beispiel wurden DNA-Zugewinne auf den Chromosomen 3q, 10p, 11p, 11q13, 12q, 17q und 20q sowie Deletionen auf den Chromosomen 4q, 5q, 6q, 8p, 9p, 11q23, 14q, 18q, 19p, 21q und 22q in verschiedenen Arbeiten mit einer schlechteren Prognose der Patienten in Verbindung gebracht (Meredith et al., 1995; Bockmühl et al., 2000; Ashman et al., 2003; Wreesmann et al., 2004; Parikh et al., 2007).

Das maximale Auflösungsvermögen der CGH liegt etwa in der Größenordnung einer chromosomalen Bande, was einem DNA-Gehalt von ca. 10 Mb entspricht (Petersen et al., 1996). Veränderte chromosomale Bereiche führen daher meist zu einer großen Anzahl an potenziell veränderten Kandidatengenen, welche in weiteren experimentel-

len Ansätzen, wie z.B. der FISH-basierten positionellen Klonierung (Zitzelsberger et al., 2004), überprüft werden müssen. Da solche Verfahren sehr zeit- und kostenaufwändig sind, wurden in den letzten Jahren zunehmend neuere Methoden zur chromosomalen Charakterisierung von Tumoren eingesetzt, welche eine molekularzytogenetische Analyse in einer höheren molekularen Auflösung erlauben. Die Weiterentwicklung der chromosomalen CGH zur matrixbasierten CGH (Array-CGH; Pinkel et al., 1998), bei der die Metaphasen der chromosomalen CGH durch Ziel-DNA-Fragmente (cDNA, BACs (Bacterial Artificial Chromosomes), Oligonukleotide, SNPs (Single Nucleotide polymorphisms)) auf einem speziellen Objektträger ersetzt werden, erhöhte das Auflösungsvermögen von ca. 10 Mb auf 1 Mb (1 Mb BAC-Arrays, Fiegler et al., 2003) oder, je nach gewählter Array-Plattform, noch höher. Veränderte chromosomale Bereiche bei HNO-Tumoren konnten somit bereits in einigen Studien durch die höhere Auflösung der Array-CGH weiter eingegrenzt werden, wodurch neue Kandidatengene ermittelt werden konnten (Kato, 2003; Liu et al., 2006; Nakaya et al., 2007).

Neuere Studien belegen neben den genetischen Faktoren der Karzinogenese auch eine Beteiligung von epigenetischen Veränderungen bei der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches (Weber et al., 2007). Bei epigenetischen Veränderungen kommt es zu veränderten Expressionsmustern, ohne dass diesen genetische Aberrationen in Form von Mutationen oder Genkopienzahl-Veränderungen zugrunde liegen. Daran können kovalente Modifikationen der Aminosäurereste der Histone, um welche die DNA gewickelt ist, und Veränderungen im Methylierungsmuster von Cytosinbasen in CpG-Dinukleotiden beteiligt sein. So wurde die Methylierung von CpG-Clustern („CpG-Inseln“) im Promotorbereich von Genen mit dem so genannten „gene silencing“, bei dem es zu keiner Expression des betroffenen Gens kommt, assoziiert (Gronbaek et al., 2007). In diversen Studien konnte eine Hypermethylierung, also eine übermäßige Methylierung von Cytosinbasen, im Promotorbereich diverser Tumorsuppressorgene bei HNO-Tumoren nachgewiesen werden (Worsham et al., 2006). Zu diesen Tumorsuppressorgenen, deren Expression durch Hypermethylierung unterdrückt wird, gehören *APC*, *TIMP3*, *KLK10*, *TP73*, *CDH13*, *IGSF4*, *ESR1*, *FHIT*, *DAPK1*, *p16*, *p14*, *RASSF1A*, *RAR $\beta$ 2*, *MGMT* und *CDH1*. Neben dem Effekt der promotorspezifischen Hypermethylierung wurde in Kopf-Hals-Karzinomen auch eine genomweite Hypomethylierung, also eine das normale Maß unterschreitende Methylierung, beobachtet. Dieses epigenetische Phänomen beschränkt sich nicht nur auf transkriptionelle Kontrollregionen, sondern lässt sich auch in repetitiven DNA-Elementen, wie heterochromatischen Regionen oder Retrotransposons, nachweisen (Ehrlich, 2002). Hypomethylierung wird mit einer zunehmenden genomischen Instabilität und daraus resultierenden interchromosomalen Umbauten in Zusammenhang ge-



bracht. Auch die Aktivierung von Proto-Onkogenen, deren Expression normalerweise durch eine promotorspezifische Methylierung reguliert wird, wird diskutiert (Hsiung et al., 2007). Im Gegensatz zu genetischen Aberrationen sind z.B. Verluste der Expression von Tumorsuppressorgenen durch epigenetische Veränderungen potenziell reversibel. Dieser Aspekt macht epigenetische Phänomene besonders für die Entwicklung neuer Therapeutika bei der Behandlung von HNO-Tumoren interessant (Gronbaek et al., 2007).

Bei den bisher erwähnten Methoden zur molekularen Charakterisierung von Kopf-Hals-Karzinomen werden strukturelle Chromosomenaberrationen wie z.B. Translokationen nicht berücksichtigt. Durch solche strukturellen Umlagerungen in Tumoren können fusionierte Genprodukte entstehen, wie es z.B. bei dem Philadelphia-Chromosom der Fall ist, welches in Patienten mit Chronisch Myeloischer Leukämie (CML) nachzuweisen ist (Sherbenou et al., 2007). Dabei findet ein interchromosomaler Austausch zwischen den Chromosomen 9 und 22 statt, wodurch es zur Bildung der Fusionsgene *BCR-ABL* auf Chromosom 22 und *cABL-BCR* auf Chromosom 9 kommt. Dies führt zu einem veränderten Genprodukt mit erhöhter Tyrosinkinase-Aktivität, welches zur unkontrollierten und vermehrten Proliferation der betroffenen Zelle führt (Nowell, 2007). Anhand einer Analyse der Tumorzellen durch Spektrale Karyotypisierung (SKY) kann diese Klasse von chromosomalen Veränderungen untersucht werden (Schröck et al., 1996). Dabei ist es möglich, alle Chromosomen einer Zelle in einem einzigen Experiment aufgrund einer 24-Farben-FISH, bei der für jedes Chromosom eine mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen spezifisch-markierte Sonde existiert, zu visualisieren. Mit Hilfe der SKY konnten in den vergangenen Jahren eine ganze Reihe an strukturellen Veränderungen in verschiedenen Tumorgruppen identifiziert werden (Schröck und Padilla-Nash, 2000; Bayani und Squire, 2002). Auch in HNO-Tumorzellen wurden z.B. Translokationen mit Beteiligung der Chromosomen 1, 13, 14, 8 und 9 und chromosomale Bruchpunkte auf den Chromosomen 1, 3p, 5q, 6q, 8, 9p, 10q, 11q, 13q, 14q und 15q nachgewiesen (Singh et al., 2001). Squire et al. (2002) berichten von häufigen strukturellen Umlagerungen auf den Chromosomen 3q, 5, 7, 8, 9p, 10p, 13, 14, 15, 16, 18q und 22, während Singh et al. (2001) bei der SKY-Analyse von nur drei Zelllinien insgesamt 66 Translokationen und 96 chromosomale Bruchpunkte nachweisen konnten. Diese Zahlen demonstrieren die Komplexität der in HNO-Tumoren vorherrschenden chromosomalen Veränderungen und die Wichtigkeit einer umfassenden genetischen Analyse zur molekularen Charakterisierung der Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich.

Für die Untersuchung von strukturellen Aberrationen mittels der SKY-Analyse sind Metaphasepräparate der zu untersuchenden Tumorzellen erforderlich, welche sich aus

FFPE-Gewebe nicht mehr gewinnen lassen. Dafür eignen sich HNO-Zelllinien, welche aus frischem Tumormaterial gewonnen werden können. Ein weiterer Vorteil in der Verwendung von Tumorzelllinien besteht, neben der Möglichkeit zur Analyse von strukturellen Umlagerungen, in der Verifizierung von Kandidatengenen anhand von funktionellen Studien. Durch die Entwicklung von geeigneten Zellkultur-Modellen können die Auswirkungen von Genveränderungen, z.B. durch Knock-out-Experimente von Tumorsuppressorgenen oder durch Überexpression von z.B. Proto-Onkogenen, phänotypisch analysiert werden.

Anhand solcher Zellkultur-Modelle wurde bereits eine Vielzahl von Studien in der Tumorforschung durchgeführt. Diese hat unter anderem zur Entdeckung von Agenzien geführt, die beispielsweise die in HNO-Tumoren häufig überexprimierte EGFR (Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor)-Tyrosinkinase hemmen (Janmaat und Giaccone, 2003). Anhand von HNO-Tumorzelllinien konnte auch gezeigt werden, dass diese Hemmung von EGFR das Tumorstadium stark vermindert (Ford und Grandis, 2003). Es existiert eine ganze Reihe von primären und von Metastasen abgeleiteten Tumorzelllinien des Kopf-Hals-Bereiches, die für molekulare oder funktionelle Analysen zur Verfügung stehen.

Aufgrund der molekularen Analyse von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches haben sich bereits eine Reihe prognostischer Marker ergeben, welche auf eine vielversprechende Anwendung in der Tumorthherapie hoffen lassen. Zu diesen Biomarkern gehören u. a. p53, Cyclin-D1, p16, Cox-2 Enzyme, EGF-Rezeptor, VEGF-Rezeptoren, FHIT sowie Matrix-Metalloproteinasen und die Identifikation HPV-positiver Tumore (Thomas et al., 2005). Solche prognostischen Marker sind besonders dadurch von Nutzen, dass sie an Routinematerial (Biopsien, Resektate) mit Hilfe verschiedener analytischer Verfahren (z.B. Immunhistochemie (IHC), Expressionsanalysen oder FISH) untersucht werden können und Informationen über den voraussichtlichen klinischen Verlauf der Erkrankung liefern. Allerdings ist die Identifizierung solcher prognostischer Faktoren, insbesondere im Hinblick auf eine mögliche Strahlenresistenz, noch unzureichend.

Daher war es Ziel der vorliegenden Arbeit, 117 strahlentherapeutisch behandelte Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle, des Larynx und des Pharynx mittels CGH auf DNA-Zugwinne und DNA-Verluste zu untersuchen und die daraus resultierenden Daten mit den bekannten klinisch-pathologischen Parametern und dem rezidivfreien Überleben der Patienten zu korrelieren. Dies sollte die Erforschung prognostischer Marker ermöglichen, die auch mit der Strahlenempfindlichkeit der Tumoren in Verbindung stehen. Signifikante Veränderungen sollten mit Hilfe der höher auflösenden Array-CGH näher untersucht werden, um potenzielle Kandidatengene identifizieren zu können.

Veränderungen dieser Gene sollten dann auch durch FISH-Untersuchungen und Expressionsanalysen auf mRNA- und Protein-Ebene verifiziert werden. Darüber hinaus sollten im Zellkulturmodell phänotypische Auswirkungen einzelner Genveränderungen aufgedeckt werden. Obwohl es schon zahlreiche molekulargenetische Untersuchungen an epithelialen Hals-Kopf-Tumoren gibt, bot sich mit der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit, ein einzigartiges Tumorkollektiv, das ausschließlich strahlentherapeutisch behandelt wurde, dessen klinischer Verlauf über einen langen Zeitraum gut dokumentiert wurde und das eine Korrelation mit dem Anämiestatus der Patienten erlaubte, auf seine prognostischen Faktoren hin zu untersuchen.

## B MATERIAL UND METHODEN

### B.1 Patientenmaterial

In der vorliegenden Arbeit werden Plattenepithelkarzinome aus den Bereichen Mundhöhle, Rachen (Pharynx) und Kehlkopf (Larynx) untersucht. Die Gewebeproben stammen aus einem Kollektiv von mehreren hundert Tumoren der Radiologischen Klinik und des Instituts für Pathologie der Universität Freiburg, und wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Henke und Herrn Dr. Mattern für die molekularen und zytogenetischen Analysen zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um ein Kollektiv einer multi-zentrischen Studie (Henke et al., 2003) mit strahlentherapierten (ohne Chemotherapie) Patienten. Die Tumorproben wurden vor der Strahlentherapie entnommen. Die klinischen Verlaufsdaten des Kollektivs sind im Hinblick auf das Überleben und den Therapieerfolg gut dokumentiert (Tab. 1). Als klinische Parameter dienen hierbei das Auftreten eines Lokalrezidivs und das krankheitsfreie (rezidivfreie) Überleben nach erfolgter Strahlentherapie.

**Tabelle 1. Klinische Befunde des Patientenkollektivs**

	Gesamt [%]	Lebend		Verstorben	
		Ohne Tumor	Mit Tumor	Aufgrund Tumorerkrankung	Aufgrund anderer Erkrankung
Anzahl	117	47	7	29	34
Weiblich	13 [11,1]	8	1	3	1
Männlich	104 [88,9]	39	6	26	33
Raucher	56 [47,9]	20	3	13	20
Nichtraucher	46 [39,3]	17	4	14	11
n.s.	15 [12,8]	10	-	2	3
<b>Hämoglobinwert:</b>					
Nicht-anämische Fälle	49 [41,9]	28	-	4	17
Anämische Fälle	68 [58,1]	19	7	25	17
Strahlentherapie	114 [97,4]	47	7	27	33
Lokalrezidiv nach Strahlentherapie	24 [20,5]	-	4	20	-
<b>Tumorlokalisation:</b>					
Larynx	12 [10,3]	4	1	4	3
Hypopharynx	32 [27,4]	15	1	8	8
Oropharynx	44 [37,6]	17	3	9	15
Mundhöhle	29 [24,8]	11	2	8	8
<b>Größe des Primärtumors*</b>					
pT1	14 [12,0]	8	-	2	4
pT2	35 [29,9]	15	4	7	9
pT3	23 [19,7]	11	1	7	4
pT4	42 [35,9]	11	2	13	16
n.s.	3 [2,6]	2	-	-	1

	Gesamt [%]	Lebend		Verstorben	
		Ohne Tumor	Mit Tumor	Aufgrund Tumorerkrankung	Aufgrund anderer Erkrankung
<b>Lymphknotenbefall</b>					
pN0	16 [12,8]	5	1	5	5
pN1	29 [24,8]	12	2	7	8
pN2	68 [58,1]	29	3	16	20
pN3	4 [3,4]	1	1	1	1
<b>Histologische Differenzierung*</b>					
G1	3 [2,6]	1	-	1	1
G2	62 [53,0]	24	3	21	14
G3	44 [37,6]	21	3	6	14
n.s.	8 [6,8]	1	1	1	5
<b>Resektionsstatus*</b>					
R0	40 [34,2]	28	2	5	5
R1	13 [11,1]	6	1	3	3
R2	4 [3,4]	1	-	2	1
Primäre Strahlentherapie	60 [51,3]	12	4	19	25

n.s.: nicht spezifiziert

\* Erklärung der TNM-Klassifikation: siehe Anhang 1; p = Pathologische Klassifikation; die Klassifikation erfolgt postoperativ am Operationspräparat

## B.2 Häufig verwendete Lösungen

### B.2.1 DAPI/Vectashield

4,6-Diamino-2-phenylindol-2-HCl 1 mg/ml (Sigma)	1 µl
Vectashield Eindeckmedium (Vector)	999 µl
Lichtschutz	

### B.2.2 EDTA 0,5 M

EDTA (Sigma)	186,1 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	500 ml
pH 8 mit NaOHkonz. (Merck)	
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml
ak	

### B.2.3 Ethanol 70%

Ethanol absolut p.a. (Merck)	70 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	30 ml

### B.2.4 Ethanol 90%

Ethanol absolut p.a. (Merck)	90 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	10 ml

### B.2.5 Formamid/2xSSC 50% für 3 Küvetten

Formamid deionisiert (Sigma)	125 ml
SSC 20x	25 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	100 ml
pH 7 mit 1 N HCl (Merck)	

**B.2.6 Formamid/2xSSC 70%**

Formamid deionisiert (Sigma)	70 ml
SSC 20x	10 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	20 ml
pH 7 mit 1 N HCl (Merck)	

**B.2.7 Natriumacetat 3 M**

Natriumacetat (Merck)	246 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 800 ml
pH 4,8 mit Eisessig (Merck)	
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml
ak	

**B.2.8 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) 10x**

Natriumchlorid (Merck)	80 g
Kaliumchlorid (Merck)	2 g
Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H <sub>2</sub> O (Merck)	14,4 g
Kaliumdihydrogenphosphat (Merck)	15 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 800 ml
pH 7 mit 1 N HCl (Merck)	
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad1000 ml
ak	

**B.2.9 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) 1x**

PBS 10x	100 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	900 ml

**B.2.10 Phosphat-Nonidet P40-Puffer (PN-Puffer)**

Natriumdihydrogenphosphat (Merck)	6,9 g
H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st.	ad 500 ml
Natriumhydrogenphosphat	88,9 g
H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st.	ad 500 ml

Die beiden Phosphatkomponenten werden gemischt bis ein pH von 8 erreicht ist. Das Volumen wird bestimmt und dann 0,1% Nonidet P-40 (Fluka) dazugegeben.

**B.2.11 PN-Magermilch-Puffer (PNM-Puffer)**

PN-Puffer	500 ml
Magermilchpulver (Biorad)	25 g
Natriumazid (Merck)	0,1 g

**B.2.12 Standard Saline-Citrat-Puffer (SSC) 20 x**

NaCl (Merck)	175,3 g
Natrium Citrat-Dihydrat (Merck)	88,2 g
H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st.	ad 800 ml
pH 7 mit 1 N HCl (Merck)	
H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st.	ad 1000 ml
ak	

**B.2.13 Standard Saline-Citrat-Puffer (SSC) 2 x**

SSC 20x	40 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st.	360 ml



### **B.3 CGH (Vergleichende Genomische Hybridisierung)**

Die Vergleichende Genomische Hybridisierung (oder comparative genomic hybridization, CGH) ist eine molekularzytogenetische Methode, mit welcher DNA-Zugewinne und DNA-Verluste in genetisch veränderten Zellen erfasst werden können (Kallioniemi et al., 1992). Die Technik stellt eine Sonderform der FISH (Fluoreszenz *In Situ* Hybridisierung, siehe B.5) dar, bei der die gesamtgenomische DNA von veränderten und normalen Zellen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert wird. Die Tumor-DNA bzw. Referenz-DNA wird mittels Nick-Translation oder einer anderen Markierungstechnik mit markierten Nukleotiden versehen, wobei die Tumor-DNA mit Biotin und die Referenz-DNA mit Digoxigenin markiert wird. Beide DNAs werden in einem Mischverhältnis von 1:1 auf Metaphasen eines gesunden Spenders hybridisiert. Während der Hybridisierung konkurrieren die Fragmente von Test- und Referenz-DNA um freie Bindungsstellen auf den Chromosomen der Metaphase und binden dann in einer Verdrängungsreaktion entsprechend ihrer Häufigkeit. Die Zugabe von nicht markierter Cot-1 DNA verhindert die Hybridisierung an hochrepetitive Sequenzen im Zentromerbereich der Chromosomen. Durch computergestützte Bildverarbeitung wird die Fluoreszenz entlang der einzelnen Chromosomen erfasst und bildlich dargestellt. Basierend auf t-Statistik werden so genannte Schwellenwerte für jedes Chromosom erstellt, bei deren Überschreitung eine chromosomale Veränderung angezeigt wird.

#### **B.3.1 Sonden für die CGH**

##### **B.3.1.1 Tumor-DNA**

Das zu untersuchende Tumorgewebe lag in Form von formalinfixierten Paraffin-Gewebeschnitten vor.

##### **B.3.1.1.1 Entparaffinierung der Gewebeschnitte für die CGH**

###### MATERIAL

- Ethanol absolut p.a. (Merck)
- Ethanol 70% (B.2.3)
- Formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Tumorgewebeschnitte auf Objektträgern (OT)

- Isopropanol (Merck)
- Phosphate buffered salt solution 1 x konzentriert (PBS) (B.2.9)
- Xylol (Merck)

#### DURCHFÜHRUNG

Als Erstes werden die OT 2 x 20 min in Xylol, dann 5 min in Isopropanol gestellt. Im Anschluss daran folgt eine Inkubationszeit für jeweils 5 min in 100% und 70% Ethanol. Die Gewebeschnitte sind nun entparaffiniert und können für eine DNA Isolation weiterverwendet werden.

#### **B.3.1.1.2 Mikrodissektion der Gewebeschnitte**

#### MATERIAL

- ATL-Puffer des QIAamp DNA Mini Kits (Qiagen)
- Chirurgisches Einmal-Skalpell (Braun)
- Entparaffinierte Tumorgewebeschnitte
- Hämatoxilin und Eosin (HE)-gefärbte Gewebeschnitte
- Injektionsnadel Sterican® 0,90 x70 mm (Braun)
- Mikroskop (Zeiss, Axiophot)

#### DURCHFÜHRUNG

Zunächst werden entsprechend viele Eppendorf Reaktionsgefäße (ERGs) mit 180 µl ATL-Puffer vorbereitet. Die HE-Färbungen der Gewebeschnitte (vom Pathologischen Institut der Universität Freiburg zur Verfügung gestellt) werden als Vergleich herangezogen, um innerhalb der Schnitte Tumorgewebe von normalem Epithel zu unterscheiden. Durch die Mikrodissektion wird gewährleistet, dass die am Ende zu untersuchende Probe einen Tumorgehalt von mindestens 80% aufweist. Unter dem Mikroskop werden die entsprechenden Gewebeareale mit Hilfe eines Skalpells, einigen Tropfen ATL-Puffer und einer Injektionsnadel vom OT abgelöst und in das bereitstehende ERG mit ATL-Puffer überführt.

### **B.3.1.1.3 Isolierung der Tumor-DNA**

#### MATERIAL

- QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)  
AL-Puffer (Lysepuffer)  
Proteinase K  
AW1-Puffer (Waschpuffer 1)  
AW2-Puffer (Waschpuffer 2)
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>, ak
- Ethanol absolut p.a. (Merck)
- Heizblock: Haep Labor Consult, HBT 130
- Heizblock/Schüttler: Thermomixer Compact (Eppendorf)
- Mikrodissizierte Tumorschnitte in 180 µl ATL-Puffer
- Zentrifuge 5415 D (Eppendorf)

#### DURCHFÜHRUNG

Erst einmal werden die für die späteren Schritte benötigten Heizblöcke auf die richtige Temperatur gebracht. Zur Lyse der Gewebeschnitte werden 20 µl Proteinase K zu den Tumorschnitten in 180 µl ATL-Puffer gegeben. Es folgt eine Inkubation im schüttelnden Heizblock bei 56°C, bis sich das Gewebe vollständig gelöst hat. Um die Effizienz der Lyse zu erhöhen bzw. die Dauer zu reduzieren, werden die Proben in regelmäßigen Abständen gut durchgemischt. Sind keine Gewebereste mehr zu erkennen, werden die Proben kurz abzentrifugiert, um durch die Wärme entstandene Tropfen an den Rändern und Verschlüssen der ERGs zu beseitigen. Im Anschluss daran werden 200 µl AL-Puffer dazugegeben, die Proben werden durchgemischt und bei 70°C im Heizblock für 10 min inkubiert. Nach erneutem Abzentrifugieren werden 200 µl Ethanol (100%) hinzu pipettiert, kurz gemischt und abzentrifugiert. Als Nächstes werden die Proben auf die Extraktionssäulen übertragen, welche in 2 ml Auffang-ERGs gestellt werden. Um einen Mengenverlust zu verhindern, muss beim Auftragen der Proben darauf geachtet werden, dass keine Flüssigkeit an die Verschlüsse der Säulen gelangt. Die Proben werden 1 min in der Zentrifuge bei 5.000 x g zentrifugiert, die entstandenen Filtrate werden verworfen und die Säulen in neue 2 ml Eppendorfgefäße gestellt. Die zu isolierende DNA bleibt an der Säule gebunden und wird in den folgenden zwei Schritten zunächst mit AW1-Puffer und dann mit AW2-Puffer gewaschen. Nach jedem Waschschrift wird zentrifugiert, zunächst mit 5.000 x g für 1 min (AW1-Puffer) und dann mit 7.800 x g für 3 min (AW2-Puffer); die 2 ml Auffanggefäße werden jedes Mal aus-

gewechselt. Um sicher zu gehen, dass die Säulen nun frei von jeglichem Puffer sind, werden sie erneut, diesmal ohne Zugabe von Flüssigkeit, bei 7.800 x g für 1 min zentrifugiert.

Die Elution erfolgt in 2 Schritten mit jeweils 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> in 1,5 ml ERGs. Nach Auftragen des Wassers erfolgt eine fünfminütige Inkubation bei RT, um ein Lösen der DNA in den Säulen zu ermöglichen, bevor die Proben für 1 min bei 5.000 x g zentrifugiert werden. Die isolierte DNA liegt jetzt in 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> vor.

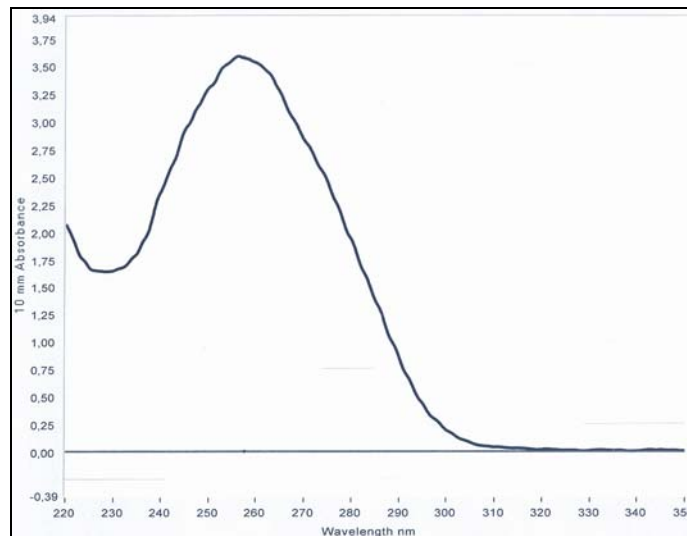
#### **B.3.1.1.4 Konzentrationsmessung der Tumor-DNA**

##### MATERIAL

- NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies)
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

##### DURCHFÜHRUNG

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten Tumor-DNA erfolgt im NanoDrop® Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Der Vorteil des NanoDrop® Spektrophotometers besteht darin, dass lediglich 1-2 µl der DNA Lösung zur Extinktionsmessung benötigt werden. Diese Menge reicht aus, um zwischen unterem und oberem Säulenfuß eine Flüssigkeitssäule entstehen zu lassen, durch welche der Lichtstrahl der Xenonlichtquelle zur Absorptionsmessung geschickt wird. Als Referenzwert dienen 1-2 µl reines H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>, mit welchem das Gerät vor den eigentlichen Messungen geeicht wird. Die Reinheit der gemessenen DNA wird durch die Verhältnisse der Absorptionen bei 260/280 nm und 260/230 nm definiert. Ersteres sollte im Idealfall zwischen 1,8 und 2,0 liegen und zeigt bei Abweichungen Proteinkontaminationen an. Verschleppen verschiedener organischer Stoffe, wie Isolationspuffer oder Ethanol, werden durch ein Verhältnis <2 des Quotienten der Extinktionen bei 260/230 nm gemessen. Die Konzentrationsangabe erfolgt dann in ng/µl. In Abbildung 1 ist ein typisches Spektrum einer gemessenen, reinen DNA dargestellt.



**Abbildung 1: Spektrale Darstellung einer DNA-Probe nach der Konzentrationsmessung im NanoDrop® Spektrophotometer.**

Die Konzentrationskurve (Absorbtion bei verschiedenen Wellenlängen) nach Messung im NanoDrop® Spektrophotometer ergibt ein Absorbtionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm.

#### **B.3.1.1.5 Gesamtgenomische Amplifikation der Tumor-DNA**

Aufgrund einer limitierten Anzahl von Gewebeschnitten kann oft nur sehr wenig Tumor-DNA gewonnen werden. In solchen Fällen muss die gesamtgenomische DNA mit Hilfe einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) vervielfältigt werden. Das Prinzip einer PCR beruht auf einer Vervielfältigung der Ausgangs-DNA mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase und durch einen immer wiederkehrenden Zyklus aus drei Schritten (Mullis, 1985,1987). Bei der Denaturierung werden die beiden komplementären Stränge der zu amplifizierenden DNA durch Erhitzung auf ca. 95°C voneinander getrennt. Es folgt ein Herabsetzen der Temperatur, wodurch sich die Primer an ihre komplementären Sequenzen in der Ausgangs-DNA anlagern können. Dieser Schritt wird „Annealing“ oder „Hybridisierung“ genannt und dient als Ausgangssituation für die letzte Phase der PCR, der so genannten Elongation. Dafür wird die Temperatur auf 72°C erhöht, wodurch das Temperaturoptimum der verwendeten hitzestabilen PCR-Polymerase erreicht wird. Die Polymerase beginnt nun die Primer zu verlängern, in dem sie weitere komplementäre Nukleotide an ihre freien 3'-Enden anbaut. Durch mehrmalige Wiederholung dieser drei Schritte kann die Ausgangs-DNA exponentiell vervielfältigt werden. Die PCR-Amplifikation von DNA aus formalinfixiertem Paraffingewebe ist durch die häufig fragmentierte DNA auf Grund der Formalinfixierung oft problematisch. Um die

gesamtenomische DNA der HNO-Tumoren zu amplifizieren, werden deshalb zwei verschiedene PCR-Methoden getestet.

#### **B.3.1.1.5.1 Genomphi-Amplifikation**

Das GenomiPhi DNA Amplifikations-Kit soll lineare genomische DNA durch eine isothermische Strang-Verdrängungs-Reaktion mit Hilfe der DNA-Polymerase des Bakteriophagen Phi29 vervielfältigen. Dazu sind die klassischen PCR Zyklen nicht erforderlich, die Reaktion läuft bei 30°C ab. Durch die „Proofreading“-Aktivität der verwendeten Phi29 DNA-Polymerase wird eine sehr genaue, fehlerarme Replikation gewährleistet.

#### MATERIAL

- DNA aus HNO-Tumorgewebe
- GenomiPhi DNA Amplification Kit (Amersham Biosciences)  
Proben-Puffer  
Reaktions-Puffer  
Enzym-Mix  
Kontroll-DNA
- Größenstandard 100 bp (GeneRuler™, MBI Fermentas)
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>
- PCR-Maschine GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- PCR-Reaktionsgefäße Thermo-Tube 0,2 ml (Abgene)

#### DURCHFÜHRUNG

Es wird 1 µl an DNA in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> benötigt. Die Konzentration muss mindestens 1 ng/µl betragen, hier werden 10 ng eingesetzt und mit 9 µl des Probenpuffers versetzt. Als erstes erfolgt die Denaturierung bei 95°C für 3 min, danach werden die Proben sofort auf Eis gekühlt, um ein Renaturieren der DNA-Stränge zu verhindern. Auf Eis werden dann 9 µl des Reaktions-Puffers und 1 µl des Enzym-Mixes (Phi29-DNA-Polymerase und Primer) zu den Proben gegeben und die Gemische für 16-18 h bei 30°C im Thermocycler inkubiert. Im Anschluss daran erfolgt eine Hitzeinaktivierung der Polymerase- und Exonukleaseaktivität des Enzyms bei 65°C für 10 min, wonach die amplifizierte DNA bei -20°C gelagert werden kann.

### **B.3.1.1.5.2 Whole Genome Amplifikation (WGA)**

Diese Methode der gesamtgenomischen Amplifikation verspricht eine bis zu 500-fache Vervielfältigung der eingesetzten Ausgangs-DNA. Sie basiert auf einer zufälligen Fragmentierung der eingesetzten genomischen DNA und der Umwandlung der entstandenen DNA-Fragmente in eine so genannte „Omniplex<sup>®</sup>“-Bibliothek durch die Ligation von universellen Primern an die Enden der entstandenen Fragmente. Diese besteht aus kleinen, von universellen Primer-Bindungsstellen flankierten DNA-Molekülen und wird dann unter Verwendung universeller Oligonukleotid-Primer in einer PCR mit limitierter Zyklenzahl amplifiziert.

#### MATERIAL

- GenomePlex<sup>®</sup> Complete Genome Amplification (WGA) Kit (Sigma)
  - 10 x Fragmentation Buffer
  - 1 x Library Preparation Buffer
  - Library Stabilization Solution
  - Library Preparation Enzyme
  - 10 x Amplification Master Mix
  - WGA DNA Polymerase
  - H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>
  - Control Human Genomic DNA (Kontroll-DNA)
- Größenstandard 100 bp (GeneRuler<sup>™</sup>, MBI Fermentas)
- PCR-Maschine GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- PCR-Reaktionsgefäße Thermo-Tube 0,2 ml (Abgene)
- Tumor-DNA

#### DURCHFÜHRUNG

Zunächst wird die Ausgangs-DNA auf eine Konzentration von 10 ng/μl verdünnt. Diese Angabe bezieht sich speziell auf DNA aus fixiertem Gewebe, da eine größere Menge an beschädigter (fragmentierter) DNA eingesetzt werden muss, um ein gutes Ergebnis zu erzielen. Außerdem sollte die eingesetzte fragmentierte DNA mindestens Fragmentgrößen von 200 bp aufweisen. Zu 10 μl der Ausgangs-DNA (10 ng/μl) wird 1 μl des Fragmentierungs-Puffers gegeben und das Gemisch für 4 min bei 95°C inkubiert und dann sofort auf Eis gekühlt. Es wird kurz zentrifugiert und mit der Herstellung der „Omniplex<sup>®</sup>“-Bibliothek aus den DNA-Fragmenten begonnen. Dazu werden zu der fragmentierten Ausgangs-DNA 2 μl des „Library Preparation“ Puffers und 1 μl der „Library Stabilization“ Lösung gegeben und für 2 min bei 95°C inkubiert. Danach wird die Probe wieder auf Eis gekühlt und kurz abzentrifugiert. Auf Eis wird nun 1 μl des „Libra-

ry Preparation“ Enzyms hinzu pipettiert und in einer PCR-Maschine wie folgt inkubiert: 16°C für 20 min, 24°C für 20 min, 37°C für 20 min, 75°C für 5 min, 4°C für ∞. Nach Herstellung der „Omniplex<sup>®</sup>“-Bibliothek wird erneut kurz abzentrifugiert, worauf entweder direkt die PCR-Amplifikation erfolgen kann oder aber die Proben bei -20°C für drei Tage gelagert werden können. Für die PCR werden zu den 15 µl der „Omniplex<sup>®</sup>“-Bibliothek 7,5 µl des Amplifikations Master Mixes, 47,5 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> und 5 µl der WGA DNA Polymerase gegeben. Es wird vorsichtig durchgemischt, kurz abzentrifugiert und für 3 min bei 95°C, für 15 sec bei 94°C und 5 min bei 65°C (14 Zyklen), und für ∞ bei 4°C inkubiert. Nach der PCR erfolgt eine Agarose-Gelelektrophorese (B.2.1.1.5.3), um die Qualität des PCR Produktes zu prüfen. Es werden 8 µl der amplifizierten DNA gegen einen 100 bp-Größenstandard aufgetragen; die Fragmentgrößen des PCR-Produktes sollten bei 100-1000 bp liegen.

### **B.3.1.1.5.3 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Gelelektrophorese (erstmalig beschrieben von Ostling et al., 1984) ist eine molekularbiologische Methode, mit welcher geladene Moleküle unterschiedlicher Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden können. Dies kann beispielsweise in einem horizontalen Agarosegel erfolgen, wobei beim Anlegen einer Spannung die durch ihre Phosphatreste negativ geladene DNA in Richtung der positiv geladenen Anode wandert. Dabei wirken die Poren des Gels, deren Größe durch die Agarosekonzentration bestimmt wird, wie ein Netzwerk, durch das die Fragmente hindurch gelangen müssen. Dabei können kleinere Fragmente die Poren schneller passieren als große und legen so pro Zeiteinheit eine größere Strecke zurück. Die Größe der DNA-Fragmente wird im Vergleich zu einem Marker bekannter Fragmentgröße ermittelt. Sichtbar gemacht wird die DNA durch 3,8-Diamino-6-ethyl-5-phenylphenantridiumbromid (Ethidiumbromid). Ethidiumbromid ist eine DNA-bindende Substanz, die zwischen die Basenpaare eines doppelsträngigen DNA-Moleküls interkaliert und unter UV-Bestrahlung fluoresziert.

#### MATERIAL

- Agarose (Seakem<sup>®</sup> LE Agarose, Cambrex)
- Geldokumentationssystem BioDoc Analyze (Biometra)
- Elektrophoreseapparatur 3000xl (Biorad)
- Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer), 50x konzentriert  
2 M Tris (Merck)

243,0 g/l



---

0,25 M Natriumacetat (Merck)	20,5 g/l
0,05 M Ethylendiaminotetraacetat (EDTA Merck) mit Essigsäure <sub>konz.</sub> (Merck) auf pH 8,0 einstellen	18,6 g/l

- Auftragspuffer (6x Loading Dye Solution, MBI Fermentas)
- Größenstandard (GeneRuler™, MBI Fermentas)
- Ethidiumbromid 10 mg/ml (Sigma)

#### DURCHFÜHRUNG

Zunächst wird der 1 x TAE-Elektrophoresepuffer hergestellt. Dann werden 4,5 g Agarose abgewogen und mit 300 ml 1 x TAE-Puffer vermischt (um ein 1,5%iges Agarosegel zu erhalten werden 1,5 g Agarose / 100 ml 1 x TAE-Puffer benötigt). Das Ganze wird in der Mikrowelle kurz aufgekocht bis sich die Agarose vollständig gelöst hat und keine Schlieren mehr erkennbar sind. Nach kurzem Abkühlen wird die flüssige Agarose in die Elektrophoresekammer mit eingesetztem Kamm gegossen. Sobald das Agarosegel fest geworden ist, wird es vollständig mit Elektrophoresepuffer (100 ml 1 x TAE-Puffer + 50 µl Ethidiumbromid) überschichtet.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt so lange, bis der Farbmarker des Auftragspuffers sich auf ca. 2/3 der Gellänge befindet. Letztendlich werden die DNA-Fragmente mit dem eingelagerten Ethidiumbromid in einem Transilluminator unter UV-Bestrahlung (360 nm) sichtbar gemacht und mit einer Kamera aufgenommen.

#### **B.3.1.1.5.4 Aufreinigung der amplifizierten DNA**

Die amplifizierte Tumor-DNA wird mit Hilfe des QIAquick PCR Aufreinigungs Kits der Firma Qiagen aufgereinigt und so von nicht eingebauten dNTPs, von Primern, Salzen und Enzymen der PCR-Reaktion befreit. Das Prinzip der Aufreinigung besteht aus einer Siliziummembran mit selektiven Bindungseigenschaften, welche bei hoher Salzkonzentration und einem pH-Wert  $\leq 7,5$  Nukleinsäuren reversibel bindet, während andere Bestandteile die Membran passieren können ohne gebunden zu werden. Das Lösen der an die Siliziummembran gebundenen DNA erfolgt wiederum in Abhängigkeit vom pH-Wert (pH 7,0 – 8,5) und bei geringer Salzkonzentration.

MATERIAL

- Ethanol p.a. (Merck)
- ERGs 1,5 ml (Eppendorf)
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>
- Natriumacetat (B.2.7)
- QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)  
QIAquick Aufreinigung-Säulchen  
PBI Puffer (Bindungspuffer)  
PE Puffer; unbedingt bei Erstgebrauch mit 100%igen Ethanol zu verdünnen  
(Waschpuffer)  
2 ml Auffanggefäße
- Zentrifuge 5415 D (Eppendorf)

DURCHFÜHRUNG

Als erstes wird das PCR-Amplifikat mit dem fünffachen Volumen an PBI Puffer versetzt und gut durchmischt. Dieser Bindungspuffer enthält die für die Bindung notwendige Salzkonzentration und den richtigen pH-Wert. Sollte sich die Lösung nach Zugabe des PBI Puffers von gelb nach orange oder violett verfärben, so müssen 10 µl 3M Natriumacetat (pH 5,0) dazugegeben werden, um den optimalen pH-Wert (gelbe Farbe) wiederherzustellen. Die Lösung wird dann auf eine Aufreinigungssäule in einem 2 ml Auffanggefäß übertragen und für 1 min bei 17.900 x g zentrifugiert, wobei die DNA an die Siliziummembran gebunden wird. Der Durchfluss wird verworfen und die Säule wieder auf dem Auffanggefäß platziert. Es folgt ein Waschschrift mit 750 µl PE Puffer, bei dem vor allem die Salze entfernt werden. Es wird erneut für 1 min zentrifugiert, der Durchfluss wieder verworfen und noch einmal für 1 min zentrifugiert um sicher zu gehen, dass kein PE Puffer in der Säule zurück bleibt. Dann wird die Säule in ein neues ERG gestellt und 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> genau auf die Mitte der Säule pipettiert. Es wird 5-10 min bei RT inkubiert, um ein Lösen der DNA von der Membran zu ermöglichen. Zuletzt wird noch einmal für 1 min zentrifugiert. Die amplifizierte Tumor-DNA liegt nun aufgereinigt in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> vor und kann auf ihre Konzentration hin überprüft werden (B.3.1.1.4).

### **B.3.1.2 Referenz-DNA**

Als Referenz-DNA dient die DNA aus Lymphozyten eines gesunden Spenders. Vor der DNA-Isolierung, die wie die Isolierung der Tumor-DNA mittels des QIAamp Mini Kits von Qiagen erfolgt, muss zunächst eine Lymphozytenabtrennung aus Spenderblut durchgeführt werden.

#### **B.3.1.2.1 Lymphozytenabtrennung**

##### MATERIAL

- Abzug (Gelaire® BSB 4A, Flow Laboratories)
- Ficoll-Trennlösung Dichte 1,077+/- 0,001 g/ml (Biochrom)  
Jeweils 3 ml in Zentrifugenröhrchen portionieren
- HBSS; Hank's Balanced Salt Solution w/o Phenol Red (Gibco), 37°C
- Heparinisierte Spritze  
Heparin-Natrium 25000 I.E./5ml (Braun)  
Spritze 20 ml  
Vor der Blutabnahme werden 2 ml Heparin aufgezogen
- Spenderblut
- Sterilbank Laminair (Heraeus)
- Zentrifuge (Sigma Laboratories Centrifuges 3-15)
- Zentrifugenröhrchen 15 ml (Falcon)

##### DURCHFÜHRUNG

Zunächst wird das entnommene Spenderblut in ein oder mehrere Zentrifugenröhrchen (pro Röhrchen 3 ml Blut) überführt und 1:1 mit Hank's (37°C) verdünnt. Nun werden maximal 6 ml dieser Blutsuspension auf die vorbereiteten Zentrifugenröhrchen mit Ficoll-Trennlösung (hochmolekulares Zucker-Plastillinpolymer) überschichtet, so dass zwei scharf abgetrennte Phasen erkennbar sind. Dabei lässt man die Blutsuspension vorsichtig an der Röhrchenwand herunterlaufen, um eine Durchmischung von Blutsuspension und Ficoll-Trennlösung zu vermeiden. Nun folgt eine 30-minütige Zentrifugation bei 290 x g bei RT. Durch die spezifische Dichte der Ficoll-Trennlösung wird die Abtrennung der Lymphozyten von den restlichen Blutzellen ermöglicht. Nach der Zentrifugation sind vier verschiedene Phasen erkennbar: Im Niederschlag am Boden der Gefäße befinden sich Granulo- und Erythrozyten, die anhand ihrer molekularen Größe durch die Ficoll-Trennlösung hindurch wandern können. Darauf folgt die Ficoll-

Phase und dann die Schicht der abgetrennten Lymphozyten, die der Ficoll-Trennlösung aufliegt. Im Überstand befinden sich weitere Blutbestandteile wie z.B. Blutplättchen und Eiweißkomplexe. Die Lymphozytenschicht, die als weißer Ring über der Ficoll-Phase zu erkennen ist, wird mit Hilfe einer Pipette ohne die obere Serumphase abgenommen und in spitze Zentrifugenröhrchen überführt. Es wird nun wieder bei 290 x g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig bis auf einen kleinen Rest abgenommen und das Pellet in Hank's (37°C) resuspendiert. Es folgt ein Waschschritt mit 5 ml Hank's, dem wieder ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 125 x g für 15 min folgt. Nach dem Abnehmen des Überstandes kann mit der DNA-Isolation aus dem Lymphozytenpellet fortgefahren werden.

#### **B.3.1.2.2 Isolation der Referenz-DNA**

Die Isolierung der Referenz-DNA erfolgt wie unter B.3.1.1.3. beschrieben.

#### **B.3.1.2.3 Konzentrationsmessung der Referenz-DNA**

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten Referenz-DNA erfolgt im NanoDrop® Spektrophotometer wie unter B.3.1.1.4. beschrieben.

#### **B.3.1.2.4 Gesamtgenomische Amplifikation der Referenz-DNA**

Die Amplifikation der Referenz-DNA erfolgt wie unter B.3.1.1.5 beschrieben.

Die Aufreinigung der amplifizierten Referenz-DNA erfolgt wie unter B.3.1.1.5.4 beschrieben.

### **B.3.1.3 Markierung der Tumor- und Referenz-DNA durch Nick-Translation**

Durch Nick-Translation erfolgt die Markierung der Tumor-DNA mit Biotin-16-dUTP und der Referenz-DNA mit Digoxigenin-11-dUTP. Das Prinzip der Nick Translation beruht darauf, dass das Enzym DNase I in niedriger Konzentration und in Anwesenheit von  $MgCl_2$  statistisch verteilte Einzelstrangbrüche („Nicks“) in ein doppelsträngiges DNA-Molekül einfügt und dass die *E.coli* DNA-Polymerase I in der Lage ist, die entstandenen 3'-Enden zu verlängern und den „alten“ Strang durch ihre Exonucleaseaktivität abzubauen (Rigby et al. 1977). Für diese Neusynthese verwendet das Enzym von außen zugeführte Nukleotide, von denen eines mit einem Reportermolekül gekoppelt ist. Die Detektion erfolgt dann indirekt durch Antikörper gegen das jeweilige Reportermolekül.

#### MATERIAL

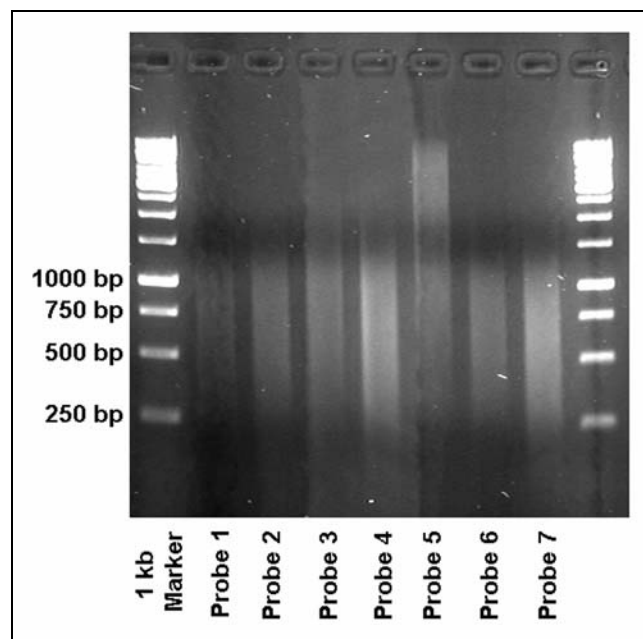
- 1 µg Tumor-DNA
- 1 µg Referenz-DNA
- Biotin-Nick Translation Mix ( Bio-Nick-Mix, Roche)
- Digoxigenin-Nick Translation Mix (Dig-Nick-Mix, Roche)
- 1/100 Vol 0,5 M EDTA pH 8,0 (B.2.2)
- Größenstandard 1 kb (GeneRuler™, MBI Fermentas)
- $H_2O_{bidest.}$ , ak
- PCR Maschine GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- PCR-Reaktionsgefäße Thermo-Tube 0,2 ml (Abgene)

#### DURCHFÜHRUNG

Die Nick-Translation für 1 µg Sonde wird in einem Volumen von 20 µl angesetzt. Um eine vorzeitige Enzymaktivität auszuschließen, werden alle Schritte auf Eis durchgeführt. Pro Ansatz werden 1 µg zu markierende DNA, 4 µl des jeweiligen Translationsmixes (Bio-Nick-Mix für die Tumor-DNA, Dig-Nick-Mix für die Referenz-DNA) und  $H_2O_{bidest.}$  (ad 20 µl) eingesetzt. Die Ansätze werden durchgemischt, kurz abzentrifugiert und dann für 90 min in der PCR-Maschine bei 15°C inkubiert. Während der Inkubationszeit wird das 1,5%ige Agarosegel für die Größenkontrolle der entstandenen Fragmente vorbereitet. Die markierten Proben werden nach der Nick-Translation auf Eis gestellt, um die Reaktion vorläufig zu beenden. Es werden dann 3 µl der Nick-Ansätze

mit 4 µl Auftragspuffer zusammen mit einem 1 kb-Marker (2µl Auftragspuffer, 1,2 µl Marker) auf das Agarosegel aufgetragen (siehe B.3.1.1.5.3.).

Ist die richtige Fragmentgröße von 500 bp bis 1000 bp erreicht, muss die Reaktion beendet werden, um die Entstehung zu kleiner Fragmente zu verhindern. Bei zu großen Fragmenten werden die Proben nachinkubiert, bis die notwendige Fragmentgröße erreicht ist (Abb. 2). Um die Enzyme zu deaktivieren, werden 1/100 Volumen 0,5 M EDTA in die 20 µl Ansätze pipettiert und für 10 min bei 65°C in der PCR-Maschine inkubiert.



**Abbildung 2: Exemplarische Darstellung einer Agarose-Gelelektrophorese nach der Nick-Translation.**

Nach der Nick-Translation sollte der Hauptanteil der entstandenen Fragmente bei 500-1000 bp liegen. Dieses trifft für die Proben 1-4 und 6 und 7 zu. Die Fragmente in Probe 5 sind noch zu groß, deshalb ist in diesem Fall für 10 min nachinkubiert worden.

#### **B.3.1.4 Fällung und Denaturierung der CGH-Sonden**

Die Tumor- und Referenz-DNA werden gemeinsam in Gegenwart von Heringsperma DNA und humaner Cot-1 DNA gefällt. Der Überschuss an Cot-1 DNA dient besonders im Centromerbereich zur Absättigung hochrepetitiver Sequenzen, für die eine große interindividuelle Variabilität gegeben ist und die daher in der CGH nicht ausgewertet werden.

MATERIAL

- Ethanol absolut p.a. (Merck)
  - Glykogen 20 mg/ml (Roche)
  - H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>
  - Hering Sperma DNA 11 mg/ml (Sigma)
  - Heizblock HBT 130 (Haep Labor Consult)
  - Heizblock/Schüttler: Thermomixer Compact (Eppendorf)
  - Humane Cot-1 DNA 1 mg/ml (Invitrogen)
  - Markierte Tumor- und Referenz-DNA
  - Mastermix 1.0 (MM 1.0)
  - Formamid deionisiert (Sigma) 5 ml
  - Dextransulfat (Serva) 1 g
  - 20 x SSC pH 7,0 (B.2.12) 1 ml
- mischen, einige Stunden auf 70°C erwärmen, um das Dextransulfat zu lösen  
pH 7,0 einstellen, ad 7 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>, ak

DURCHFÜHRUNG

Aus den Nick-Ansätzen werden 800 ng biotinmarkierte Tumor-DNA und 800 ng digoxigeninmarkierte Referenz-DNA entnommen und zusammen in ein neues 1,5 ml ERG pipettiert. Dazu werden 1 µl Heringsperma DNA, 30 µl humane Cot-1 DNA gegeben und mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> auf 100 µl aufgefüllt. Danach erfolgt die Zugabe von 2% Glykogen und 2,5 x Vol 100%igem, bei -20°C gelagertem Ethanol. Die Fällung erfolgt entweder bei -20°C über Nacht oder bei -80°C für 30 min.

Im Anschluss daran werden die Proben mit 12.500 x g für 30 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das DNA-Pellet getrocknet. Dann wird das Pellet in 3 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> und 7 µl MM 1.0 aufgenommen und bei 37°C für mindestens 45 min im Schüttler gelöst. Nachdem das Hybridisierungsgemisch fertig gelöst ist, wird die Sonde bei 76°C im Heizblock für 7 min denaturiert. Die Proben werden kurz abzentrifugiert und für 45 min bei 37°C ohne Schütteln im Thermomixer inkubiert.

### B.3.2 Objektträger für die CGH

Für die CGH werden Metaphasepräparate eines gesunden Spenders benötigt. Dabei ist es wichtig, dass die Metaphasen gleichmäßig über den gesamten OT verteilt sind, da später mehrere Proben pro OT aufgetragen werden sollen. Des Weiteren muss darauf geachtet werden, dass sich nicht zu viele Reste von Zytoplasma um die Metaphasen herum befinden, da diese die spätere Hybridisierung stören würden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die CGH sowohl kommerzielle (Vysis) als auch selbst hergestellte Metaphasepräparate verwendet.

#### B.3.2.1 Herstellung von Metaphasepräparaten

Die Herstellung der Metaphasepräparate für die spätere Hybridisierung erfolgt aus den Lymphozyten eines gesunden Spenders.

#### MATERIAL

- Colzemidlösung (5 µg/ml)  
N-Desacetyl-N-methylcolchinin 5 µg/ml (Ciba) 0,5 mg  
PBS 1x (B.2.9) ad 100 ml
- Corex<sup>®</sup>-Zentrifugenröhrchen aus Glas 30 ml (Gentaur)
- Eisessig p.a. (Merck)
- Fetal Calf Serum (FCS, Sigma)
- Carnoy's Fixativ, vor Gebrauch immer frisch herstellen  
Eisessig (Merck) 1 Teil  
Methanol (Merck) 3 Teile
- Gummistöpsel zum verschließen der Zentrifugenröhrchen
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>, ak
- HBSS; Hank's Balanced Salt Solution w/o Phenol Red (Gibco), 37°C
- Heparinisierte Spritze  
Heparin-Natrium 25.000 I.E./5ml (Braun)  
Spritze 20 ml  
Vor der Blutabnahme werden 2 ml Heparin aufgezogen
- Hypotone Lösung  
KCl (Merck) 5,59 g  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 1000 ml
- Klimakammer (Espec)
- Kulturflaschen T<sub>25</sub> (Greiner)
- Messzylinder
- Methanol (Merck)



- Mikroskop (Zeiss Axioplan)
- Objektträger (Menzel Superfrost Color)
- Pasteurpipetten steril (Falcon)
- Penicillin 1 Mega (Grünenthal)  
Gelöst in 5 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>
- Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml (Gibco)
- PHA-M; Phythämagglutinin-M lyophilisiert (Gibco)  
Gelöst in 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>
- RPMI-Medium mit Glutamin (Gibco)
- Spenderblut
- Streptomycin 1g (Grünenthal)  
Gelöst in 5 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>
- Wasserbad (Lauda MAG)
- Zentrifuge (Heraeus Sepatech Megafuge 1.0)
- Zentrifugenröhrchen 15 ml (Falcon)

#### DURCHFÜHRUNG

Zunächst wird dem Spender mittels einer heparinisierten Spritze venöses Blut entnommen, welches dann kultiviert wird. Das Kulturmedium setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen: 100 ml RPMI-Medium, 20 ml FCS, 100 µl Penicillin (= 20.000 IE) und 500 µl Streptomycin (= 10 mg). Daraus werden nun je 4,5 ml in ein T<sub>25</sub>-Kulturfläschchen gegeben. Es erfolgt nun in jede Flasche die Zugabe von 0,13 ml PHA-M und 0,5 ml Vollblut oder abgetrennten Lymphozyten (siehe B.3.1.2.1). Der fertige Ansatz wird vorsichtig geschüttelt und im Brutschrank bei 37°C bei einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5% für 48 h inkubiert. 3 h vor Ende der Inkubationszeit werden zu jeder Kultur 150 µl Colzemidlösung gegeben, um die Zellen in der Metaphase zu stoppen. Dies ist aufgrund der tubulinhemmenden Wirkung des Colzemids möglich, wodurch der Spindelapparat aufgelöst wird und die Chromosomen in der Metaphase blockiert bleiben, so dass die Chromatiden nicht zu den Zellpolen gelangen können.

Für die Präparation werden die Kulturen in spitze Zentrifugenröhrchen überführt, bei 175 x g für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und verworfen. Das Pellet wird 2 x mit je 5 ml Hank's gewaschen, wobei jedes Mal bei 175 x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen wird. Danach werden jeweils 5 ml hypotone Lösung in die Röhrchen gegeben und sofort nach Zugabe durch 2-3-maliges Aufziehen mit einer Plastik-Pasteurpipette durchmischt. Es folgt eine 7-minütige Inkubation im Wasserbad bei 37°C. Dann werden die Proben für 8 min bei 190 x g zentrifugiert, der

Überstand wird vorsichtig abgesaugt und verworfen. Mit Inkubation, Zentrifugation und Absaugen sollte die hypotone Behandlung der Zellen nicht länger als 15 min dauern. Nach dem Absaugen werden sofort 5 ml Fixativ dazugegeben und sogleich gut durchmischt, um ein Verklumpen der Lymphozyten zu verhindern; es wird erneut bei 175 x g für 10 min zentrifugiert. Dann wird das Pellet wieder in 5 ml Fixativ resuspendiert und das Zentrifugenröhrchen mit einem Gummistöpsel gut verschlossen. Es erfolgt nun die Fixierung der Metaphasen wahlweise für 20 min bei RT oder über Nacht bei 4°C. Nach der Inkubation wird erneut bei 175 x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand bis auf einen kleinen Rest entfernt. Nun werden alle Pellets vereinigt, mit Fixativ gewaschen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird nun in einer entsprechenden Menge an Fixativ aufgenommen, bis eine opalisierende Zellsuspension entsteht. Jetzt wird die Lymphozytenlösung im Klimaschrank (konstante Luftfeuchtigkeit von 50% und Temperatur von 25 °C) auf die OT aufgestrichen. Dazu werden OT mit Wasser benetzt und die Zellsuspension mit einer Pipettenspitze aufgestrichen und durch Kippbewegungen verteilt. Nach vollständiger Trocknung des Präparats wird die Metaphasendichte im Mikroskop (Phasenkontrast) überprüft und entsprechend der gewünschten Dichte verändert (Verdünnung bei zu hoher und erneute Zentrifugation bei zu niedriger Dichte).

Wenn alle OT trocken sind, werden sie für 7 Tage im Brutschrank bei 37°C gelagert. Zur längeren Lagerung werden sie unter Stickstoff bei -20°C eingefroren.

### **B.3.2.2 Denaturierung der Metaphasepräparate**

#### MATERIAL

- Ethanol absolut p.a. (Merck)
- Ethanol 90% (B.2.4)
- Ethanol 70% (B.2.3)
- Ethanolreihe: 70% (- 20°C), 90% (4°C), 100% (4°C)
- Formamid 70%ig/2 x SSC, maximal 2 Wochen alt (B.2.6)
- Küvetten (Glaswerk Wertheim)
- Messzylinder (Schott)
- Metaphasepräparate
- 20 x SSC (B.2.12)
- Wasserbad 37°C (Memmert)

### DURCHFÜHRUNG

Um die Metaphasepräparate zu denaturieren wird ca. 30 min vor Gebrauch 70%iges Formamid/2 x SSC in einer Küvette auf 72°C erwärmt. Für jeden zusätzlichen OT muss die Temperatur um 1°C erhöht werden, allerdings sollten nicht mehr als 5 OT gleichzeitig denaturiert werden. Die Denaturierungszeit der OT variiert je nach Alter der Präparate und Beschaffenheit der Chromosomen und muss für jede Metaphasenpräparation individuell bestimmt werden. Bei den selbst hergestellten OT erwies sich eine Denaturierungszeit von 30 s als optimal, Metaphasepräparate von Vysis werden 2 min lang denaturiert. Um die Denaturierung zu stoppen, werden die OT in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) für je 2 min dehydriert. Die OT werden vorsichtig mit N<sub>2</sub> getrocknet und auf eine 37°C warme Heizplatte gelegt und beschriftet. Um die Areale der Proben auf den Präparaten abzutrennen, werden mit einem Diamantstift Trennlinien für die Auftragsflächen auf der Rückseite der OT gezogen.

### **B.3.3 Hybridisierung**

#### MATERIAL

- Deckgläser 18 x 18 mm (Superior)
- Denaturierte CGH-Sonde
- Denaturierte Metaphasepräparate
- Fixogum (Marabu)
- Heizplatte (LGH)

#### DURCHFÜHRUNG

Die CGH-Sonden werden vor der Hybridisierung noch einmal kurz abzentrifugiert. Die Proben werden mit der Pipette noch einmal gut durchmischt und dann auf die denaturierten Metaphasepräparate aufgetragen. Das Deckglas wird luftblasenfrei aufgelegt und mit Fixogum umrandet, um ein Austrocknen zu verhindern. Die OT werden nun in einer Metallkassette im 37°C warmen Wasserbad für 48-72 h inkubiert.

**B.3.4 Waschen und Detektion der CGH-Präparate**MATERIAL

- Antikörper
  - Avidin-FITC DCS (Vector) 5 µl
  - Anti-Digoxigenin-Rhodamin (Boehringer) 5 µl
  - PNM-Puffer 990 µl
  - Mischen, für 3 min bei 7.800 x g zentrifugieren, Entnahme aus Überstand
- DAPI/Vectashield (B.2.1)
- Deckgläser (Superior)
- ERG (Eppendorf)
- Feuchte Kammer
- Formamid 50% in 2 x SSC, 3 Küvetten, pH 7 (B.2.5)
- Phosphat-Nonidet P40-Puffer (PN-Puffer) (B.2.10)
- Plastikfolie; zurechtgeschnitten auf Hybridisierungsflächen der OT
- PNM-Puffer (PN-Magermilch-Puffer) (B.2.11)
- Quadriperm<sup>®</sup> Zellkulturschalen (Vivascience)
- 20 x SSC (B.2.12)
- 2 x SSC, 4 Küvetten, pH 7 (B.2.13)
- 0,2 x SSC, 2 Küvetten
- 20 x SSC 2 ml
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>, ak 198 ml
- Wärmeschrank (Memmert)
- Wasserbad (Jukabo SW1)

DURCHFÜHRUNG

Eine halbe Stunde vor Versuchsbeginn werden die Lösungen hergestellt und im Wasserbad auf 42°C erwärmt. Dann wird vorsichtig das Fixogum mit Hilfe einer Pinzette von den hybridisierten OT entfernt und diese werden für ca. 5 min in 2 x SSC gestellt, so dass sich die Deckgläser ablösen. Die OT werden dann 3 x 10 min in 50% Formamid gewaschen. Dann werden sie kurz in 2 x SSC gespült, um Formamidreste in den folgenden Küvetten zu vermeiden. Es folgen dann 5 min in 2 x SSC und 2 x 5 min in 0,2 x SSC. Zuletzt werden die OT für 5 min in PN-Puffer bei RT inkubiert.

Während des Waschens wird eine feuchte Kammer vorbereitet und in einem Trockenschrank (37°C) vorgewärmt. Des Weiteren wird unter Lichtschutz die Antikörperlösung hergestellt und bis zum Gebrauch lichtgeschützt aufbewahrt.

Die OT werden aus der PN-Lösung in die feuchte Kammer gelegt, mit 150 µl PNM-Puffer überschichtet, mit einer zurechtgeschnittenen Plastikfolie bedeckt und bei 37°C inkubiert. Dieser Schritt dient dem Abblocken überschüssiger Bindestellen für die Antikörper und soll unspezifische Signale verhindern. Nach 20 min wird die Plastikfolie entfernt, überschüssige Flüssigkeit abgetropft und 150 µl der Antikörperlösung aufgetragen. Es folgt eine Inkubation für 45 min bei 37°C, bei der die Antikörper an ihre Antigene binden sollen. Im Anschluss daran werden die OT 2 x 5 min in PN-Puffer gewaschen, 3 x in verschiedenen Küvetten mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> geschwenkt und dann unter Lichtschutz an der Luft getrocknet. Letztendlich werden die OT mit 20 µl DAPI/Vectashield eingedeckt und in einer mit Alufolie (Lichtschutz!) umwickelten Quadripermschale aufbewahrt. Die OT sind nun bereit für die Aufnahme der Bilder am Mikroskop. Kann diese nicht gleich im Anschluss erfolgen, so können die OT auch für einige Wochen bei – 20°C gelagert werden.

### **B.3.5 Auswertung der CGH**

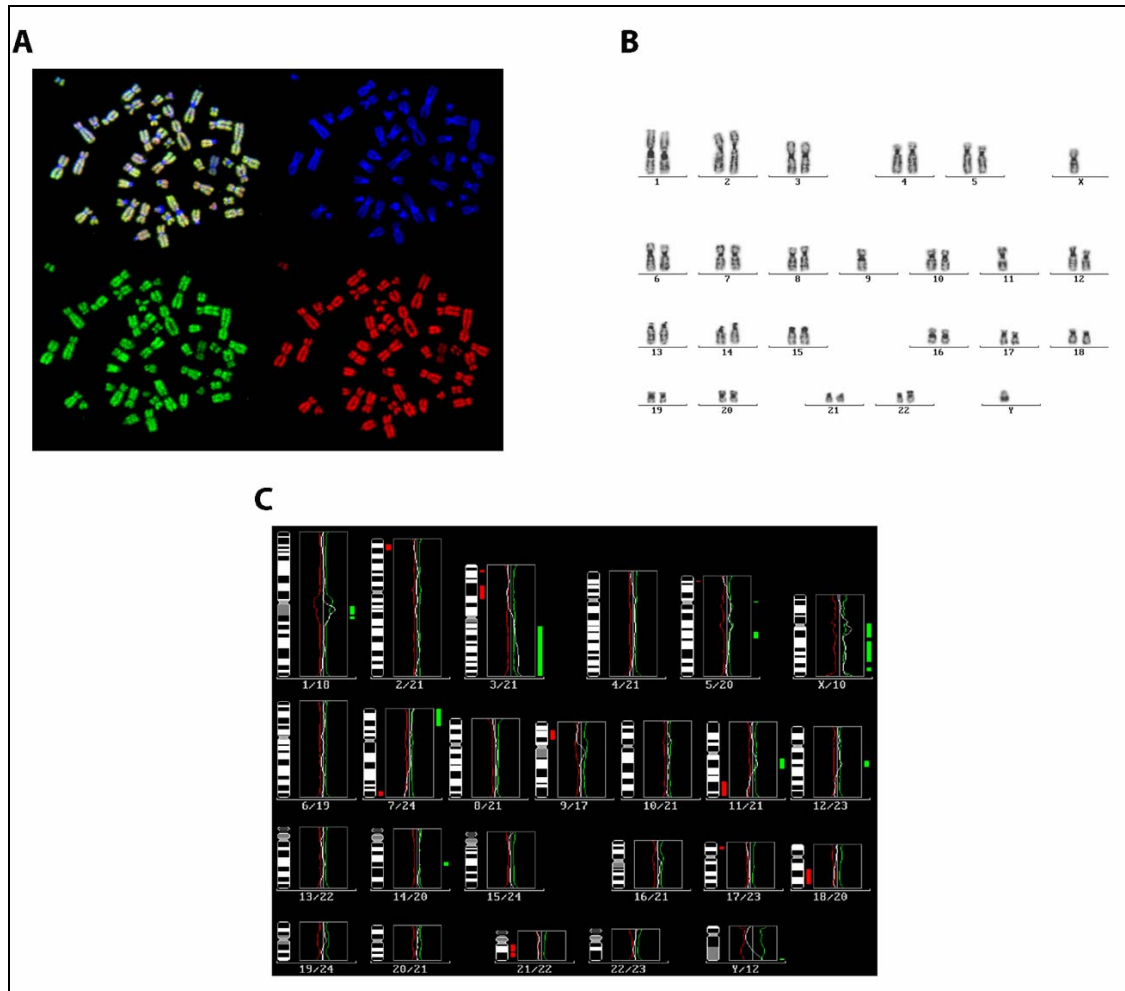
#### MATERIAL

- CGH-Präparate
- Fluoreszenzmikroskop (Zeiss)
- Immersionsöl Immersol<sup>®</sup> (Zeiss)

#### DURCHFÜHRUNG

Zur Auswertung werden mindestens zehn Metaphasen mit einem Fluoreszenzmikroskop mit CCD (Charged Coupled Device)-Kamera aufgenommen, gespeichert und dann mittels computergestützter digitaler Bildverarbeitung bearbeitet. Mit einer entsprechenden Software (Isis, Metasystems) werden dabei Abweichungen vom 1:1 Verhältnis zwischen roter und grüner Fluoreszenz in Form von Intensitätsunterschieden entlang der Metaphasechromosomen erfasst. In unveränderten Bereichen erscheinen die Chromosomen in einer rot-grünen Mischfarbe. Sind Veränderungen vorhanden, so überwiegt bei einem Zugewinn an genetischem Material die grüne Fluoreszenz, bei einem Verlust hingegen die rote Fluoreszenz. Zu jeder aufgenommenen Metaphase wird am Computer ein Ideogramm gelegt und abgespeichert. Aus allen Einzelideogrammen wird dann das eigentliche CGH-Profil (= Summenprofil) generiert, von wel-

chem die chromosomalen Veränderungen der Test-DNA abgelesen werden (siehe Abb. 3).



**Abbildung 3: Exemplarische Darstellung der CGH-Auswertung.**

(A) Im Fluoreszenzmikroskop aufgenommene Co-Hybridisierung von HNO-Tumor- und Referenz-DNA auf ein Metaphasepräparat eines gesunden Spenders in Mischfarbe, DAPI-Gegenfärbung der Chromosomen (blau), FITC-detektierte Tumor-DNA (grün) und Cy3-detektierte Referenz-DNA (rot). (B) Exemplarisches Karyogramm eines HNO-Tumors (HN43) in inverser DAPI-Färbung. (C) Beispielhaftes CGH-Profil eines HNO-Tumors (HN43). DNA-Zugewinne sind als grüne Balken, DNA-Verluste als rote Balken zu erkennen.

### **B.3.6 Statistische Methoden**

Um eine mögliche signifikante Korrelation zwischen den durch die CGH ermittelten genomischen Imbalancen und den bekannten klinischen Parametern zu untersuchen, werden einige statistische Verfahren herangezogen.

Für eine Korrelation der ermittelten chromosomalen Veränderungen mit den klinischen Parametern (Tumorgroße (pT), Beteiligung der Lymphknoten (pN), Differenzierungsgrad des Tumors (G), Lokalisation (Larynx, Oropharynx, Hypopharynx oder Mundhöhle) und Resektionsstatus (R)) und mit der Überlebenszeit der Patienten werden die Kaplan-Meier-Überlebensanalyse, der Log-Rang-Test und die Cox-Regression angewendet. Die p-Werte werden mittels FDR (False Discovery Rate; auch q-Wert genannt) korrigiert und als signifikant gewertet, wenn sie  $\leq 0,05$  sind.

#### **B.3.6.1 Hierarchische Cluster Analyse**

Die hierarchische Cluster Analyse (unüberwachtes Klassifizierungsverfahren) stellt ein multivariates Analyseverfahren zur Ermittlung von Gruppen (Clustern) von Daten oder Objekten dar, welche die Gesamtheit der Elemente in eine Anzahl von Klassen mit ähnlichen Eigenschaften unterteilt (Deichsel und Trampisch, 1985). Dabei werden die Klassen der Daten nicht vorgegeben und die Anzahl der zu erwartenden Cluster ist im Vorfeld unbekannt. Für die Cluster Analyse der CGH-Daten wurden die Aberrationen von Bandenauflösung auf Chromosomenarmauflösung reduziert. DNA-Zugewinne wurden mit 1, DNA-Verluste mit -1 und unveränderte Chromosomanarme mit 0 gekennzeichnet. Die Cluster Analyse wurde mit dem R-Paket Arbeitsverfahren *hclust* ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) unter Standardeinstellungen (Euklidischer Abstand und kompletter Kopplung) durchgeführt. Die chromosomalen Veränderungen der zwei ermittelten Hauptcluster werden untereinander verglichen und es werden charakteristische Aberrationen für jeden Cluster unter Verwendung von Anhaltewerten (= Vorkommen in mindestens 20% der Patienten, Relation zwischen beiden Clustern mindestens 1:3) ermittelt.

### **B.3.6.2 Überlebenszeitanalyse**

#### Kaplan-Meier Überlebenskurven und Log-Rang-Test

Zur graphischen Darstellung der rezidivfreien Überlebenszeitverteilung werden Kaplan-Meier-Stufenkurven errechnet (Kaplan und Meier, 1958). Bei diesem univariaten Verfahren wird die Wahrscheinlichkeit berechnet, dass ein Ereignis (= Überleben) bis zu einem bestimmten Zeitpunkt bzw. in einem Zeitintervall eintritt. Das entscheidende hierbei ist, dass die Beobachtungsintervalle nicht fest vorgegeben sind, sondern von den Ereignissen definiert werden. Auch können Patienten berücksichtigt werden, welche gesund und lebend aus der Studie ausgeschieden sind, deren weiterer Krankheitsverlauf jedoch unbekannt ist („zensierte“ Patienten). Das rezidivfreie Überleben wird für jede chromosomale Aberration, die in mindestens fünf Patienten auftritt, berechnet. Von einer Rezidivbildung wird ausgegangen, wenn die TumorgroÙe innerhalb des Bestrahlungsareals um 25% zunimmt, und die Zeit bis zum Auftreten des Rezidivs wird definiert als die Zeit zwischen Ende der Strahlentherapie und Rezidivbildung oder Tod des Patienten. Die Überlebenskurve von Patienten mit einer bestimmten Veränderung wird mittels des Log-Rang-Tests mit der Überlebenskurve von Patienten ohne diese Veränderung verglichen (Kalbfleisch und Prentice, 1980; Harms, 1998).

### **B.3.6.3 Cox Regression**

Die Cox Regression (auch proportionales Hazard Modell genannt) ist eine Methode zur Analyse von Überlebensdaten, bei der der Effekt mehrerer Einflussgrößen auf eine Zielvariable (hier Überleben) untersucht wird (Cox, 1972). Für jede Einflussvariable (chromosomale Veränderung und klinischer Parameter) werden Hazard-Verhältnisse errechnet, die das relative Sterberisiko von Patienten zwischen zwei Gruppen (z.B. „keine Veränderung“ gegen „DNA-Zugewinn“) oder zwischen zwei aufeinanderfolgenden Niveaus einer ordinalen Variablen (z.B. TumorgroÙe pT1, pT2, pT3, pT4) wiedergeben. Die Cox-Regression wird univariat (eine Variable) und multivariat (mehrere Variablen) angewendet.

### **B.3.6.4 Korrelation der CGH-Daten mit verschiedenen klinischen Daten**

Potenzielle Assoziationen zwischen den ermittelten chromosomalen Veränderungen und den bekannten klinischen Daten der Patienten werden mit verschiedenen nicht-parametrischen Tests untersucht. Für die ordinalen Parameter TumorgroÙe (pT) und



Beteiligung der Lymphknoten (pN) wird der Jonckheere-Terpstra Trend Test, für die nominalen Parameter Lokalisation (Larynx, Oropharynx, Hypopharynx oder Mundhöhle), Differenzierungsgrad des Tumors (G) und Resektionsstatus (R) der Chi-Quadrat-Test herangezogen (Lehmann, 1975).

#### **B.3.6.5 Untersuchung von Co-Aberrationen**

Die Unabhängigkeit von DNA-Veränderungen, welche signifikant mit einer Rezidivbildung und dem Überleben korrelieren, von anderen chromosmalen Aberrationen wird mit Hilfe des exakten Fisher Tests untersucht (Sachs und Hedderich, 2006).

#### **B.3.6.6 Benjamini-Hochberg FDR (False Discovery Rate)**

Die FDR (False Discovery Rate) von Hochberg und Benjamini (1995) ist ein Fehlerkontrollkriterium in multiplen Testproblemen. Sie kontrolliert den erwarteten Anteil an fälschlicherweise verworfenen Hypothesen. In dieser Arbeit wird mit der Hilfe der FDR die Signifikanz der ermittelten Korrelationen zwischen chromosmalen Veränderungen und klinischen Parametern und zwischen Aberrationen und Überleben korrigiert. Korrigierte p-Werte  $\leq 0,05$  werden als signifikant gewertet.

## **B.4 Array-CGH**

Die Array-CGH oder Matrix-CGH ist eine Weiterentwicklung der unter B.3 beschriebenen chromosomalen CGH. Das Prinzip bleibt gleich, es werden chromosomale Veränderungen in Form von DNA-Zugewinnen und DNA-Verlusten einer Test-DNA im Vergleich zu einer Referenz-DNA ermittelt. Während bei der chromosomalen CGH Metaphasechromosomen das Genom repräsentieren, sind es bei der Array-CGH hunderte oder tausende kleine DNA Fragmente, immobilisiert auf einem Objektträger, welche direkt einer genomischen Sequenz zugeordnet werden können. Je nachdem in welchen Abständen diese DNA-Elemente auf dem Genom gewählt werden und wie groß diese sind, kann eine enorme Verbesserung der molekularen Auflösung im Vergleich zur chromosomalen CGH (7-10 Mb; Snijders et al., 2003) erzielt werden. Somit stellt die Array-CGH eine empfindliche Methode für die hoch auflösende Darstellung genomischer Imbalancen von Tumor-DNA dar (Coe et al., 2007; Solinas-Toldo et al., 1997; Pinkel et al., 1998), mit der Zugewinne und Verluste mit einer Größe von mindestens 100 kb detektiert werden können. Folglich wird die Auflösung im Vergleich zur chromosomalen CGH um das 100-fache erhöht. Es gibt eine ganze Reihe verschiedener Array-CGH Techniken, welche sich in den DNA-Elementen auf den Arrays unterscheiden. So gibt es z.B. BAC-Arrays, cDNA-Arrays, Cosmid-Arrays, Oligonucleotid-Arrays und SNP-Arrays. Jede dieser Techniken weist andere Merkmale und Vorteile auf und manche eignen sich für bestimmte Fragestellungen besser als andere (Pinkel and Albertson, 2005)

### **B.4.1 BAC-Arrays**

#### **B.4.1.1 Verwendete Arrays**

##### **B.4.1.1.1 Sanger 1 Mb BAC Array**

Diese Arrays wurden freundlicherweise von Cordelia Langford des Wellcome Trust Sanger Centres in Cambridge (UK) zur Verfügung gestellt. Auf diesem Array befinden sich ca. 3.400 „Bacterial Artificial Chromosomes“ (BACs, siehe B.5.1), die das menschliche Genom in einer Auflösung von 1 Mb repräsentieren (Fiegler et al., 2003). Die Insertgröße der Plasmide beträgt etwa 130 kb und jeder BAC ist mit zwei „Spots“ auf dem Array vertreten. Die Herstellung dieser Arrays erfolgt wie bei Fiegler et al., 2007 beschrieben. Die isolierten BACs werden in drei separaten Degenerierten Oligonukleo-

tid (DOP)-PCR Reaktionen amplifiziert, wobei Primer verwendet werden, welche vorzugsweise an menschliche, nicht aber an *E.coli*-DNA binden. Somit enthält das generierte PCR Produkt einen höheren Anteil der in die BACs klonierten menschlichen DNA-Inserts. Nach Vereinigung der PCR Produkte der DOP-PCR Reaktionen wird in einer weiteren PCR-Reaktion eine Aminogruppe an die DNA-Stücke angehängt, welche dann beim „Spotten“ die kovalente Bindung der DNA-Fragmente an die spezielle Oberfläche der Glasobjektträger (CodeLink-aktivierte OT, GE Healthcare) ermöglicht. Neben den BACs werden auch *Drosophila*-Klone auf den Array gespottet. Diese dienen als Kontrolle für eine spezifische Hybridisierung, da die hybridisierte humane DNA nicht binden sollte.

#### **B.4.1.1.2 CMR Hs1 Mb BAC Array**

Dieser Array stammt vom Institut für Pathologie der Universität Cambridge. Die Herstellung erfolgt wie unter B.4.1.1.1 beschrieben, auch hier werden die Klone der Sanger 1 Mb BAC Bibliothek verwendet. Auf diesem Array ist jeder einzelne BAC allerdings viermal vertreten, so dass sich auf einem OT ca. 13.600 Spots befinden.

#### **B.4.1.1.3 UCSF Human BAC Array 1.4 Mb v 3.1**

Dieser kommerzielle BAC-Array der Universität von San Francisco besteht aus 2.464 BAC Klonen, wobei jeder Klon dreimal vertreten ist. In diesem Fall werden zwei Arrays auf einen Objektträger gespottet, so dass pro Hybridisierung zwei Fälle ausgewertet werden könnten.

#### **B.4.1.2 Multiplex-PCR zu Qualitätskontrolle von DNA vor der Array-CGH**

Die Multiplex-PCR ist eine Methode, mit welcher die Qualität von DNA aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe bezüglich auf ihre Tauglichkeit in der Array-CGH hin getestet werden kann (van Beers et al., 2006). Arbeitet man mit DNA aus fixiertem Paraffingewebe (FFPE-DNA) wird man immer wieder mit Fällen konfrontiert, welche sich einfach nicht oder nur schlecht mit molekularen Methoden analysieren lassen. Diese Tatsache wird darauf zurückgeführt, dass solche DNA zum einen oftmals in verschiedenem Ausmaß fragmentiert vorliegt und zum anderen, dass es durch den Vorgang der Fixierung zu Molekülvernetzungen kommt. Natürlich ist es wünschenswert, bereits vor einem aufwändigen Experiment zu wissen, wie es um die Qualität der DNA bestellt ist bzw. ob diese für eine bestimmte Fragestellung geeignet ist oder nicht.

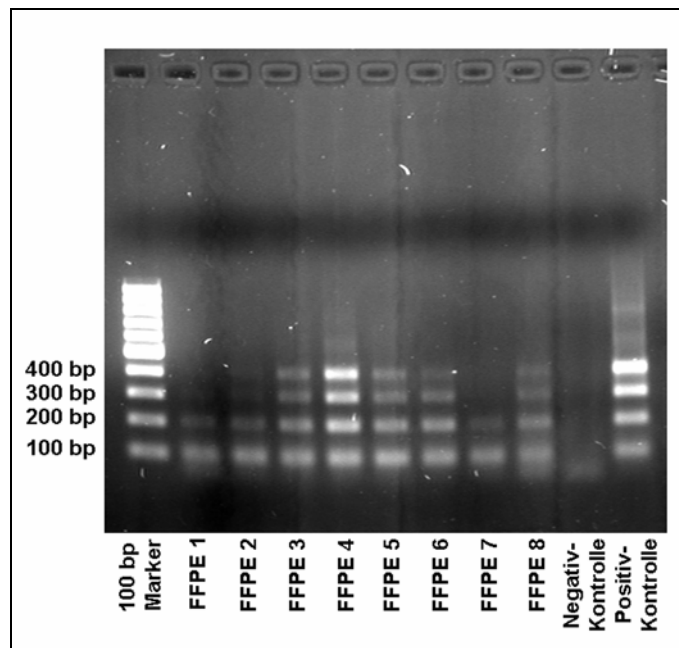
Hierfür werden Primersets verwendet, welche in der PCR 100 bp-, 200 bp-, 300 bp- und 400 bp-Fragmente von nicht überlappenden Zielsequenzen innerhalb des GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) Gens auf Chromosom 12 produzieren. DNA-Fälle, die aufgrund ihres zu hohen Fragmentierungsgrades oder einer Molekülvernetzung kein, ein 100 bp- oder ein 200 bp-Fragment erzeugen, werden nicht in ein array-CGH Experiment eingesetzt. Fälle, welche ein 100 bp-, ein 200 bp- und ein 300bp-Fragment zeigen, werden für eine Analyse mittels Array-CGH verwendet. Gleiches gilt für Fälle, die alle vier Fragmente aufweisen (100 bp, 200 bp, 300 bp und 400 bp; Abb. 4).

### MATERIAL

- AmpliTaq® Gold DNA Polymerase 5 U/μl (Applied Biosystems)
- AmpliTaq® Gold PCR-Puffer
- MgCl<sub>2</sub> 25 mM
- Auftragspuffer (6x Loading Dye Solution, MBI Fermentas)
- DNA 100 ng
- Größenstandard 100 bp (GeneRuler™, MBI Fermentas)
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>
- dNTPs 1 mM
- dNTPs 10 mM (Fermentas) 10 μl
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> 90 μl
- PCR-Maschine GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- PCR-Reaktionsgefäße Thermo-Tube 0,2 ml (Abgene)
- Primer-Mix (100-400 bp) 0,133 μM/Primer
- 100 bp fwd 5'-GTT CCA ATA TGA TTC CAC CC-3' 100 mM (Metabion) 10 μl
- 100 bp rev 5'-CTC CTG GAA GAT GGT GAT GG -3' 100 mM (Metabion) 10 μl
- 200 bp fwd 5'-AGG TGG AGC GAG GCT AGC -3' 100 mM (Metabion) 10 μl
- 200 bp rev 5'-TTT TGC GGT GGA AAT GTC CT-3' 100 mM (Metabion) 10 μl
- 300 bp fwd 5'-AGG TGA GAC ATT CTT GCT GG -3' 100 mM (Metabion) 10 μl
- 300 bp rev 5'-TCC ACT AAC CAG TCA GCG TC -3' 100 mM (Metabion) 10 μl
- 400 bp fwd 5'-ACA GTC CAT GCC ATC ACT GC-3' 100 mM (Metabion) 10 μl
- 400 bp rev 5'-GCT TGA CAA AGT GGT CGT TG -3' 100 mM (Metabion) 10 μl
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> 720 μl
- Sterilbank (BDK)

DURCHFÜHRUNG

Die einzelnen Pipettierschritte erfolgen auf Eis. Es werden zusammen in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben: 100 ng DNA, 3 µl AmpliTaq® PCR-Puffer, 3,2 µl Primer-Mix, 1,8 µl MgCl<sub>2</sub>, 6 µl dNTPs, 0,2 µl AmpliTaq® Gold DNA-Polymerase und H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 30 µl. Es wird vorsichtig gemischt und kurz abzentrifugiert, bevor die Proben in den PCR-Block gestellt werden. Dort wird unter folgenden Bedingungen inkubiert: 10 min bei 95°C, 4 min bei 94°C, 1 min bei 94°C, (1 min bei 56°C, 3 min bei 72°C) x 35 Zyklen, 7 min bei 72°C und 15°C für ∞. Im Anschluss an die PCR wird ein 1%iges Agarosegel zur Auftrennung der Amplifikate, wie unter B.3.1.1.5.3 beschrieben, verwendet. Als Referenz wird hier ein 100 bp DNA Marker mit aufgetragen, durch welchen man die Größe der entstandenen DNA-Fragmente vergleichen kann.

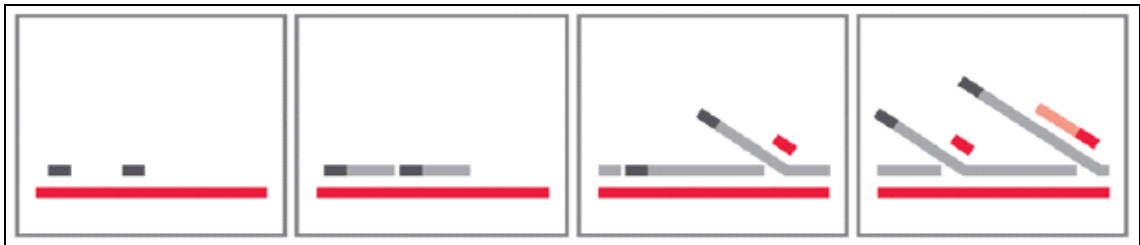


**Abbildung 4: Exemplarische Darstellung der Multiplex-Amplifikate nach der Gelelektrophorese.**

Nach der Multiplex-PCR werden die entstandenen Fragmentgrößen elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert. DNA-Proben, welche eine ungenügende Qualität für die Array-CGH aufweisen (FFPE 1, 2 und 7; nur bis zu 200 bp Fragmente) werden aussortiert. Proben mit drei oder vier Banden (FFPE 3, 4, 5, 6 und 8) können in die Array-CGH eingesetzt werden.

### B.4.1.3 Markierung der Test- und Referenz-DNA

Mit Hilfe des so genannten „Random Primed Labelling“ wird die DNA für die Array-CGH direkt mit Fluorochromen markiert. Dabei werden degenerierte, zufällig an die DNA bindende, Primer (Oktamere) verwendet, welche dann mit Hilfe der großen Untereinheit der DNA Polymerase I aus *E. coli* (Klenow-Fragment) verlängert werden. Die dazugegeben, an ein Fluochrom gekoppelten, dCTPs werden dabei in die DNA eingebaut, welche bei dieser Reaktion bis um ein 40-faches vervielfältigt wird. Das Prinzip dieser Amplifikation beruht auf einer kontinuierlichen Strangverdrängung („strand displacement“), bei der andauernd neue, einzelsträngige DNA-Bereiche als Vorlage für eine Elongation entstehen (Abb. 5).



**Abbildung 5: Prinzip der Amplifizierung durch kontinuierliche Strangverdrängung (Schock et al., 2005).**

Nach Anlagerung eines Primers wandert das Enzym während der DNA-Synthese entlang des Templates und verdrängt dabei den neuen komplementären Strang, der an anderer Stelle anhand eines weiteren Primers synthetisiert wurde. Dieser verdrängte, jetzt einzelsträngige Strang kann nun seinerseits als neue Matrize für eine Strangsynthese dienen.

### MATERIAL

- BioPrime® DNA Labelling System (Invitrogen)
- Cyanine 3-dCTP, 25 nM (Perkin Elmer Life Sciences)
- Cyanine 5-dCTP, 25 nM (Perkin Elmer Life Sciences)
- H<sub>2</sub>O<sub>bide</sub>st.
- Humane Referenz, weiblich oder männlich, gepoolt, von mehreren gesunden anonymen Spendern (Promega)
- dCTP-Mix (1 µM dCTP, 2 µM dGTP, 2 µM dATP, 2 µM dTTP)
 

dCTP 100 mM (MBI Fermentas)	10 µl
dGTP 100 mM (MBI Fermentas)	20 µl
dATP 100 mM (MBI Fermentas)	20 µl
dTTP 100 mM (MBI Fermentas)	20 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st.	930 µl

- ERGs 1,5 ml (Eppendorf)
- Heizblock (Haep Labor Consult, HBT 130)
- Klenow-Fragment 40 U/ $\mu$ l (BioPrime<sup>®</sup> DNA Labelling System, Invitrogen)
- NaCl 1M  
NaCl (Merck) 29,22 g  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 500 ml
- PCR-Maschine GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- PCR-ReaktionsgefäÙe Thermo-Tube 0,2 ml (Abgene)
- Random Primer Lösung 2,5x (BioPrime<sup>®</sup> DNA Labeling System, Invitrogen)

#### DURCHFÜHRUNG

Alle Schritte werden auf Eis durchgeführt. Zunächst gibt man 300-450 ng der zu markierenden Tumor- und Referenz-DNA je in ein 1,5 ml ERG. Es folgt die Zugabe von 3  $\mu$ l NaCl, 60  $\mu$ l Random Primer Lösung und H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 130  $\mu$ l. Die Reagenzien werden durchmischt, kurz abzentrifugiert und für 5 min bei 100°C im Heizblock denaturiert. Durch kurzes Zentrifugieren wird verdampfte Flüssigkeit gesammelt und die Proben werden 2-3 min auf Eis gekühlt. Nun werden 15  $\mu$ l des dCTP-Mixes, 2  $\mu$ l Cy3-dCTP (Tumor-DNA) oder 2  $\mu$ l Cy5-dCTP (Referenz-DNA) und 3  $\mu$ l Klenow Fragment dazugegeben, vorsichtig gemischt und abzentrifugiert. Die Proben werden in PCR-ReaktionsgefäÙe überführt und im PCR-Block für 16-20 h bei 37°C inkubiert. Danach werden die Proben aufgereinigt oder aber bei -20°C gelagert, wobei unbedingt auf Lichtschutz zu achten ist.

#### **B.4.1.4 Aufreinigung der markierten DNA**

##### MATERIAL

- ERGs 1,5 ml (Eppendorf)
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>
- Markierte Tumor- und Referenz-DNA
- MicroSpin<sup>™</sup> G-50 Sephadex<sup>™</sup>-Säulchen (GE Healthcare)
- Zentrifuge 5415 C (Eppendorf)

## DURCHFÜHRUNG

Als Erstes werden Säulenpuffer (TE Puffer) und Sephadex™ vorsichtig durchmischt, der untere Verschluss der Säulchen entfernt, die Deckel eine viertel Drehung geöffnet und die Säulchen in ein ERG gestellt. Dann werden die Säulchen bei 735 x g für 1 min zentrifugiert, wodurch sich die eigentliche Aufreinigungssäule aus Sephadex™ aufbaut. Der Durchfluss (TE Puffer) wird verworfen und die Säulchen in neue, bereits beschriftete ERGs gestellt. Nun werden die markierten DNAs vorsichtig zentral auf die Säulchen übertragen, wobei darauf geachtet werden muss, dass die Pipettenspitze nicht die Säule berührt. Das Volumen einer markierten DNA-Probe beträgt 150 µl, wobei eine Aufreinigungssäule maximal 50 µl fasst. Darum werden pro markierter DNA-Probe drei Aufreinigungssäulen benötigt, auf welche dann je 50 µl der Probe übertragen werden. Es folgt eine zweiminütige Zentrifugation bei 735 x g, bei der überschüssige Nukleotide, Primer und Enzyme in der Säule verbleiben und wonach sich die aufgereinigten Proben in den ERGs befinden und die Säulen entsorgt werden können.

### **B.4.1.5 Überprüfen der Inkorporationsrate**

Das Überprüfen der Inkorporationsrate der markierten DNAs erfolgt am NanoDrop® Spektrophotometer ähnlich wie unter B.3.1.1.4 beschrieben. Allerdings wird neben der Extinktion bei 260 nm (Konzentration der DNA) auch die Extinktion bei 635 nm (Cy3) und 532 nm (Cy5) gemessen. So kann die Effizienz der Markierung der DNA vor der Hybridisierung überprüft werden. Die Inkorporationsrate sollte >3 pmol/µl und die DNA-Konzentration bei ~100 ng/µl liegen.

### **B.4.1.6 Fällung und Denaturierung der Sonden**

## MATERIAL

- Markierte, aufgereinigte Tumor- und Referenz-DNA
- Ethylendiamintetraacetic acid (EDTA) 0,5 M (B.2.2)
- Ethanol absolut p.a. (Merck)
- Ethanol 70% (B.2.3)
- H<sub>2</sub>O<sub>bide</sub>st. (Gibco)
- Heizblock (Haep Labor Consult, HBT 130)
- Heringsperma DNA, ultraschall-fragmentiert 10 mg/ml (Invitrogen)
- Humane Cot-1 DNA 1 mg/ml (Invitrogen)



- Hybridisierungspuffer (50 % FA, 7% Dextransulfat, 0,1 % Tween 20, 2 x SSC, 25 mM EDTA)
 

Formamid deionisiert (Sigma)	50 ml
Dextransulfat 25 % (Sigma)	28 ml
Tween <sup>®</sup> 20 (Sigma)	0,1 ml
20 x SSC	10 ml
Tris 10 mM pH 7,4	1 ml
EDTA 0,5 M pH 8	5 ml
ad 100 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> , sterilfiltriert	
- Kühlzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus Instruments)
- Natriumacetat 3M pH 4,8 (B.2.7)
- Pr -Hybridisierungsmix
 

Hering Sperma DNA ultraschall-fragmentiert (Invitrogen)	50 Öl
Natriumacetat 3M pH 4,8	5 Öl
Ethanol absolut p.a. (Merck)	110 Öl

 30 min bei – 80 C f llen, 30 min bei 16 000 x g zentrifugieren, mit 70%igem Ethanol waschen, erneut für 5 min zentrifugieren, Pellet trocknen und in 6 Öl HefetRNA und 68 Öl Hybridisierungsmix für mehrere Stunden lösen. Der Mix wird dann bei – 20 C gelagert.
- Schüttelblock Thermomixer Compact (Eppendorf)
- Heizblock HBT 130 (Haep Labor Consult)
- 20 x SSC (B.2.12)
- TRIS, 10 mM
 

Trizma Base (Sigma)	121,1 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml
pH 7,4 mit 1 M HCl (Merck), ak	
- tRNA der Hefe 100  g/Öl (Invitrogen)

### DURCHFÜHRUNG

Für die Fällung werden zunächst 150 Öl einer Cy5-markierten Referenz-DNA zu 150 Öl einer Cy3-markierten Tumor-DNA gegeben. Dazu gibt man 43,5 Öl Natriumacetat, 135 Öl Cot-1 DNA und 1000 Öl 100%igen, gekühlten Ethanol. Die Fällung erfolgt wahlweise über Nacht bei -20 C oder für 30 min bei -80 C. Danach folgt eine 30-minütliche Zentrifugation bei 16.000 x g und 4 C. Der Überstand wird vorsichtig abgekippt und die gef llte DNA, welche nun als violette Pellet zu erkennen ist, wird mit 500 Öl 70%igen, gekühlten Ethanol gewaschen und erneut für 15 min zentrifugiert. Dadurch werden  berschussige Salze entfernt. Der Überstand wird vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, ohne das Pellet zu berühren. Das Pellet wird getrocknet und in 6 Öl tRNA der Hefe und 68 Öl Hybridisierungsmix für mindestens 2 h bei 37-40 C im Schüttelblock gelöst. Der Pr -Hybridisierungsmix, der auf Vorrat hergestellt und bei -20 C gelagert werden kann, wird aufgetaut und ebenfalls im Schüttelblock gelöst. Wenn sich die DNA

vollständig gelöst hat, können Sonde und Prä-Hybridisierungsmix für 10 min bei 70°C denaturiert werden.

#### B.4.1.7 Hybridisierung

Die Hybridisierung und die darauf folgenden Waschschriffe erfolgen automatisiert mit Hilfe einer Hybridisierungsstation der Firma Tecan (HS 400), auf deren Hybridisierungsmodule (21 mm x 50 mm) das Protokoll angepasst ist. Die Hybridisierungsstation wird durch das Computerprogramm „HS Control Manager“ gesteuert.

#### MATERIAL

- Array(s)
- Denaturierte Sonde
- Denaturierter Prä-Hybridisierungsmix
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (Gibco)
- Hybridisierungsstation HS 400 (Tecan)
- SSC 20x (B.2.12)
- Waschlösung 1: 50% FA/2 x SSC pH 7
 

Formamid (Fluka)	50 ml
20 x SSC	10 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	40 ml
Mit 1 N HCl (Merck) auf pH 7 einstellen	
- Waschlösung 2: 40% FA/2 x SSC pH 7
 

Formamid (Fluka)	80 ml
20 x SSC	20 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	100 ml
Mit 1 N HCl (Merck) auf pH 7 einstellen	
- Waschlösung 3: 2 x SSC/0,1% SDS
 

20 x SSC	40 ml
25% SDS	1,6 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	358,4 ml
- Waschlösung 4: 0,1 x SSC
 

20 x SSC	2 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	398 ml

## DURCHFÜHRUNG

Während Sonde(n) und Prä-Hybridisierungsmix(e) lösen, werden die einzelnen Waschlösungen wie oben beschrieben hergestellt. Sie werden benötigt, um unspezifisch gebundene Sonde nach der Hybridisierung zu entfernen. Vor der Hybridisierung ist es notwendig, das Leitungssystem und die Injektionsventile der Hybridisierungsstation mit H<sub>2</sub>O zu reinigen. Hierfür wird das Reinigungsprogramm „Rinse“ der Station verwendet, wofür alle Schläuche in ein Becherglas mit ca. 1000 ml H<sub>2</sub>O getaucht werden. Es ist darauf zu achten, dass während dieses Schrittes Dummy-OT in alle Hybridisierungskammern eingespannt sind. Nach der Reinigung werden die Schläuche aus der Flüssigkeit gezogen, damit das System die Apparatur mit Stickstoff trocknen kann (der Druck der Stickstoffzufuhr hat 2,7 bar zu betragen). Manuell werden anschließend die Injektionsventile mit H<sub>2</sub>O gesäubert und gründlich mit Stickstoff getrocknet. Nun können die Waschlösungen an das Gerät angeschlossen werden und bei Bedarf wird die Heizplatte angeschaltet. Die Array(s) werden in die Hybridisierungsapparatur eingespannt und unter dem Programmschritt „Prime“ wird Waschlösung 1 luftblasenfrei in das Leitungssystem der HS 400 gefüllt. Werden nicht alle Positionen der Hybridisierungsapparatur in Anspruch genommen, so müssen in die leeren Posten unbedingt normale OT eingelegt werden. Ca. fünf Minuten vor Ende der Denaturierungszeit von Sonde(n) und Hybridisierungsmix(en) wird das eigentliche Hybridisierungsprogramm der HS 400 aktiviert:

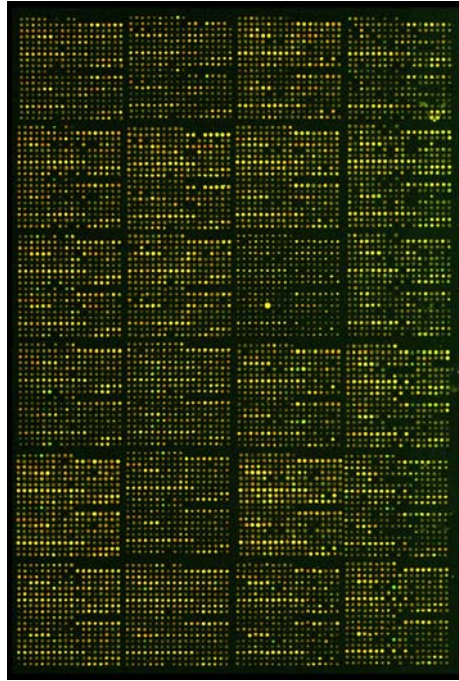
1. Waschen: 37°C, 15 Sekunden (Waschlösung 1), Bewegung der Waschlösung
2. Injektion 70 µl Prä-Hybridisierungsmix: 37°C
3. Hybridisierung: 37°C, 45 Minuten
4. Injektion von 70 µl CGH-Sonde: 37°C
5. Hybridisierung: 37°C, 40 Stunden
6. Waschen: 47°C, 1,5 Minuten (Waschlösung 2), zweimal, 30 Sekunden Bewegung
7. Waschen: 47°C, 1,5 Minuten (Waschlösung 3), viermal, 30 Sekunden Bewegung
8. Waschen: 30°C, 30 Sekunden (Waschlösung 4), Bewegung der Waschlösung
9. Trocknen der OTs, 30°C, 2 Minuten

Nach dem ersten Waschschrift werden 70 µl des Prähybridisierungsmixes in die Hybridisierungskammer(n) zum Vorpuffern des Arrays gegeben. Dadurch kann sich die eigentliche Sonde später gleichmäßig über die Oberfläche des OT verteilen, was zu einer Reduzierung von Hybridisierungsartefakten führt. Währenddessen inkubiert die denaturierte Sonde bei 37°C ohne Schütteln. Nach 45 min wird die Sonde in die Hybri-

disierungskammer gegeben, die Hybridisierung erfolgt bei 37°C für 40 h. Die Sonde wird während der Hybridisierung in der Hybridisierungskammer hin und her bewegt, um die Effizienz der Hybridisierung zu erhöhen; aus diesem Grund ist der hier verwendete Hybridisierungspuffer auch weniger viskos als herkömmliche Hybridisierungspuffer. Nach der Hybridisierung und den nachfolgenden Waschschritten befindet sich der Array in einer Stickstoff-Schutzatmosphäre und ist dadurch von der oxidierenden Wirkung von Sauerstoff und Ozon geschützt. Werden die hybridisierten Arrays aus der Maschine entnommen sollten sie möglichst umgehend gescannt werden.

#### **B.4.1.8 Scannen und Analyse der Arrays**

Nach erfolgter Hybridisierung und den automatisierten Waschschritten in der HS 400 werden die Arrays entnommen und mit einem Scanner der Firma Axon Instruments (GenePix 4100 A) gescannt. Dank des „Dualen Laser Scanning Systems“ kann gleichzeitig bei zwei Wellenlängen gescannt werden (532 nm für Cy5 und 635 nm für Cy3). Die gescannten TIF-Bilder (Abb. 6) mit zwei Ebenen werden mit Hilfe der dazugehörigen Software GenePix Pro 6.0 analysiert und die entstandenen Ergebnisdateien im GenePix-Result-File (.gpr) Format abgespeichert. Dafür wird zunächst das so genannte „Array List File“ benötigt, welches Informationen über den Aufbau des Arrays und über die Anordnung der BACs in den Spots enthält. Mit Hilfe der Funktion „Find Array, Align Features“ kann das Programm das theoretische Gitter des „Array List Files“ mit dem gescannten Bild zur Deckung bringen und somit die Information eines jeden gescannten Spots in Bezug auf Lokalisation im Genom und Fluoreszenzintensität erfassen. Die im Programm integrierte Suchfunktion ermöglicht ein analysieren der Kontroll-Spots (*Drosophila*) und somit eine frühzeitige Aussage über die Spezifität der Hybridisierung. Bei der Analyse eines Bildes werden die Mediane der Vordergrundfluoreszenz innerhalb eines Spots, und die Mediane der Hintergrundfluoreszenz in einem ringförmigen Bereich um einen jeden Spot herum ermittelt. Die oben bereits genannte Ergebnisdatei (.gpr) enthält als wichtigste Angaben die Fluoreszenzintensitäten (Vorder – und Hintergrund) der einzelnen Spots und die so genannte „Flagging“-Information. Diese gibt Auskunft darüber, ob ein bestimmter Spot in die Auswertung mit einbezogen wird oder nicht. Die Parameter, nach welchen Spots herausgefiltert werden, lassen sich händisch definieren.



**Abbildung 6: Gescannter Sanger 1 Mb-BAC-Array.**

Die Abbildung zeigt das Bild eines gescannten BAC-Arrays, bei dem die roten und grünen Fluoreszenzsignale überlagert sind, wodurch es zu der gelben Mischfarbe der Spots kommt. Die Spots sind in Quadranten angeordnet und jeder BAC ist zweimal auf dem Array vertreten.

#### **B.4.1.9 Auswertung der Arraydaten mit der Web-basierten Plattform CAPweb**

Die mit GenePix Pro 6.0 erstellten Ergebnisdateien werden mit Hilfe von CAPweb (CGH array Analysis Platform on the Web), einer Webserver basierten Plattform (Liva et al., 2006; <http://bioinfo.curie.fr/CAPweb>), ausgewertet. Wie bei der chromosomalen CGH (B.3) geht es um die Erfassung von DNA-Zugewinnen oder DNA-Verlusten in der Test-DNA, welche sich durch ein Abweichen des Fluoreszenzverhältnisses vom Verhältnis 1:1 bemerkbar machen. Dieses Verhältnis wird in dem zur Basis 2 logarithmierten Quotienten (Ratio) angegeben, bei dem die Nulllinie (= keine Veränderung) bei 0 liegt. Bei einem DNA-Zugewinn ist der Quotient folglich  $> 0$ , bei einem DNA-Verlust  $< 0$ . Durch experimentelles Rauschen bedingt, liegen die Ratios unveränderter Spots selten exakt bei 0, sondern streuen um den Nullwert herum. Aus diesem Grund ist es notwendig Schwellenwerte zu setzen, welche über- oder unterschritten werden müssen um eine DNA-Veränderung anzuzeigen.

Für die Auswertung mit CAPweb müssen zunächst die Ergebnisdatei (.gpr) und eine so genannte „Clone List“ Datei geladen werden. Letztere enthält alle nötigen Informationen über die verwendeten BAC Klone (Name, Chromosom, physikalische Position).

Die eigentliche Auswertung des Datensatzes erfolgt dann in zwei Schritten. Im ersten Schritt wird das R-Paket MANOR (MicroArray Normalization of CGH-array data, programmiert für die Statistikplattform R; Neuvial, 2006) verwendet.

Zunächst erfolgt ein Filtern des Datensatzes um Klone auszuschließen, die nicht den Qualitätskriterien entsprechen („Flagging“). Die wichtigsten Parameter hierbei sind der so genannte Hintergrundschwellenwert und der Schwellenwert der Standardabweichung. Bei ersterem werden alle Klone aus dem Datensatz entfernt, deren Quotient aus Vordergrund- und Hintergrundsignal einen bestimmten Wert unterschreitet (in der Regel 3). Der Schwellenwert der Standardabweichung schließt die Werte all jener Klone aus, deren Replikate Fluoreszenzintensitäten haben, die um einen bestimmten Faktor abweichen (in der Regel 10%). Die restlichen Werte werden durch MANOR normalisiert. Dieser Segmentierungsalgorithmus besteht aus drei Schritten:

1. Abschätzung eines örtlichen Trends auf dem Array
2. Segmentierung des Arrays in Bereiche mit ähnlichen Trend-Werten
3. Identifikation von Bereichen, welche bezüglich ihres mittleren  $\text{Log}_2$ -Ratios in die eine oder andere Richtung verzerrt sind

Dabei wird der Array (zweidimensional) in eine Anzahl an Bereichen unterteilt, die bezogen auf das Mittel der Fluoreszenzintensitäten einheitlich sind. Es wird angenommen, dass sich die BAC-Klone in zufälliger Reihenfolge auf dem Array befinden. Somit kann eine Erhöhung oder eine Erniedrigung der Fluoreszenzintensität innerhalb eines Bereiches auf dem Array keine biologische Ursache in Form von DNA-Zugewinnen oder DNA-Verlusten haben. Die Werte der unterschiedlichen Bereiche werden dann jeweils für sich normalisiert. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass örtliche Effekte, die beispielsweise beim Waschen oder durch Verunreinigungen des Arrays entstehen können, ausgeglichen werden.

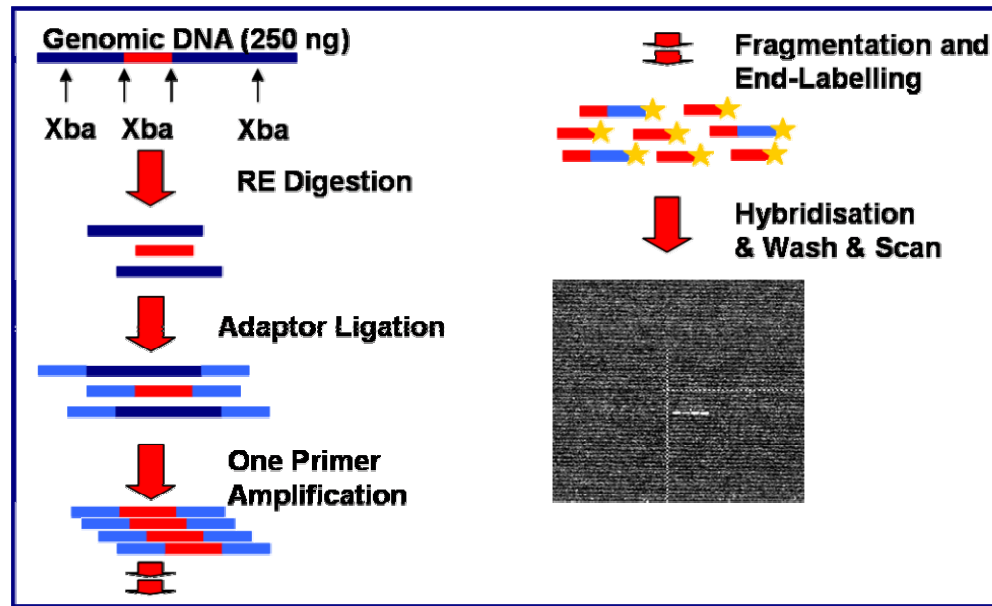
Im zweiten Schritt der Auswertung mit CAPweb werden die im Paket MANOR gefilterten und normalisierten Werte an das R-Paket GLAD (Gain and Loss Analysis of DNA, Hupé et al., 2004) übergeben. Hier erfolgt eine Segmentierung des Datensatzes, wobei die einzelnen Segmente unveränderte, duplizierte, amplifizierte oder deletierte Regionen repräsentieren. Von besonderem Interesse sind die jeweiligen Grenzen eines Segments, da diese die chromosomalen Endpunkte eines veränderten Bereiches darstellen. Die Berechnung von GLAD basiert auf dem so genannten Adaptive Weights Smoothing (AWS), wobei der Wert eines BAC-Klons in Abhängigkeit zu den Werten der auf dem Chromosom benachbarten BAC-Klonen analysiert wird. Dann wird entschieden, ob dieser BAC-Klon dem Segment des vorangegangenen Klons oder dem des nachfolgenden Klons zugeordnet werden soll.

Die Visualisierung der normalisierten und segmentierten Array-Daten erfolgt durch die Visualisierungssoftware VAMP (Visualisierung und Analyse des Molekular Profiles, JAVA Applikation; La Rosa et al., 2006). VAMP stellt eine Oberfläche dar, mit der zum einen die errechneten Werte eines oder vieler Arrays mit zahlreichen Optionen optisch dargestellt werden können und zum anderen R-Pakete angesteuert werden, die z.B. Clusteranalyse, Bruchpunktbestimmung oder die Bestimmung von Konsensusregionen ermöglichen. Die Ergebnisse können mit VAMP zu Dokumentations- und Präsentationszwecken exportiert werden.

#### **B.4.2 Oligonukleotid-Array: GeneChip® Mapping 10K Array Xba 142 2.0**

Bei dieser Art von Arrays bestehen die einzelnen „Spots“ aus kurzen Oligonukleotiden, die das Genom in einer bestimmten Auflösung darstellen. Diese 25 bp-Oligonukleotide, welche photolithographisch direkt auf dem Array synthetisiert werden, repräsentieren jeweils einen bestimmten „Single Nucleotide Polymorphism“ (SNP). Ein SNP ist jede polymorphe Variabilität eines einzelnen Nukleotids, die in einer Population mit einer Häufigkeit von mindestens 1% auftritt. Auf dem Array sind ca. 10.200 verschiedene, über das Genom verteilte SNPs vertreten, welche aus der Datenbank „The SNP Consortium“ (TSC) ausgewählt wurden. Angewendet werden solche SNP-Arrays größtenteils in Linkage-Analysen und Genotypisierungs-Studien, aber auch in der Tumorgenetik finden sie zunehmend Verwendung. Auch die verschiedenen Intensitäten der hybridisierten SNPs können, wie bei einer Array-CGH, untersucht werden. Der größte Unterschied zur klassischen Array-CGH ist hier, dass es keine Co-Hybridisierung mit einer Referenz-DNA gibt, sondern dass die Daten der Test-DNA mit den Werten von über hundert Individuen („Library File“) verglichen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit soll herausgefunden werden, ob diese Art von Arrays auch für Array-CGH Untersuchungen von DNA aus formalinfixiertem Paraffingewebe geeignet sind. Eine Übersicht des Arbeitsablaufes des Affymetrix-Protokolls ist in Abbildung 7 dargestellt.



**Abbildung 7: Übersichtsschema Affymetrix GeneChip® Mapping 10K 2.0 Array.**

In dieser Darstellung ist der Ablauf eines kompletten experimentellen Ansatzes dargestellt. Zunächst erfolgt eine Komplexitätsreduzierung durch einen Restriktionsverdau der genomischen DNA mit anschließender Ligation der Adaptersequenzen, welche in der nachfolgenden PCR als Primerbindestellen dienen. Nach erfolgreicher PCR wird die DNA fragmentiert und markiert. Die Hybridisierung erfolgt in einem speziellen Hybridisierungssofen, das Waschen der hybridisierten Arrays halbautomatisiert mit Hilfe einer Waschstation. Nach dem Scannen wird das Experiment ausgewertet.

#### B.4.2.1 Restriktionsverdau mit Xba I

Dieser Schritt dient der bis zu 50-fachen Komplexitäts-Reduzierung des Genoms.

#### MATERIAL

- BSA 10x  
BSA 100x (New England Biolabs) 100 µl  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (Gibco) 900 µl
- DNA in reduziertem EDTA TE-Puffer, Konzentration 50 ng/µl  
DNA 5 µg  
Ethanol absolut p.a. (Merck) 250 µl  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 100 µl  
Natriumacetat 3M (B.2.7) 10 µl  
Ethanol 70% (B.2.3)  
Bei -20°C über Nacht oder -80°C für 30 min fällen; 30 min bei 4°C und 13 000 rpm zentrifugieren, zweimal mit 70%igem Ethanol waschen, Pellet trocknen und in 100 µl red. EDTA TE-Puffer lösen.
- Reduzierter EDTA TE-Puffer (0,1 mM EDTA; 10 mM Tris HCl; pH 8)  
EDTA 0,5 M (B.2.2) 100 µl  
Tris HCl 1M (Merck) 5 ml  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 500 ml



- PCR-Maschine GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- PCR-Reaktionsgefäße Thermo-Tube 0,2 ml (Abgene)
- Xba I 20 000 U/ml (New England Biolabs)  
NE Puffer 2 10x  
BSA 100x

#### DURCHFÜHRUNG

Zunächst muss die zu analysierende DNA auf die richtige Konzentration von 50 ng/µl gebracht werden. Da die isolierten DNAs grundsätzlich mit Wasser eluiert werden (siehe B.3.1.1.3), wird eine entsprechende Menge an DNA gefällt und in reduziertem EDTA TE-Puffer aufgenommen und gelöst. Dann wird pro Probe in ein PCR Reaktionsgefäß gegeben: 10,5 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>, 2 µl NE Puffer 2, 2 µl 10x BSA, 5 µl genomische DNA und 5 µl Xba I. Bei mehreren Proben wird ein Mastermix erstellt. Die Ansätze werden gründlich gemischt und kurz abzentrifugiert, bevor sie in die PCR-Maschine gestellt werden. Dort inkubieren sie bei 37°C für 120 min, bei 70°C für 20 min und bei 4°C ∞. Nach dem Restriktionsverdau werden die Proben bei -20°C gelagert.

#### **B.4.2.2 Adaptor-Ligation**

Bei der so genannten Adaptor-Ligation werden kurze Sequenzen an die überhängenden Enden der verdauten DNA-Fragmente ligiert, welche dann in der nachfolgenden PCR als Primerbindestellen dienen.

#### MATERIAL

- Adaptor Xba 5 µM (Affymetrix)
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (Gibco)
- PCR-Maschine GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- Restringierte DNA
- T4 DNA Ligase (New England Biolab)  
T4 DNA Ligase Puffer

#### DURCHFÜHRUNG

Auf Eis werden zu den restriktionsverdauten Ansätzen 1,25 µl Adaptor Xba I, 2,5 µl T4 DNA Ligase Puffer und 1,25 µl T4 DNA Ligase dazugegeben. Es wird vorsichtig gemischt und kurz abzentrifugiert. Dann erfolgt die Ligation im PCR-Block bei 16°C für

120 min, 70°C für 20 min und 4°C ∞. Auch hier können die Ansätze bei -20°C gelagert werden.

### B.4.2.3 Linker-Adapted-PCR

#### MATERIAL

- AmpliTaq Gold<sup>®</sup> PCR Kit (Applied Biosystems)  
AmpliTaq Gold<sup>®</sup> 5U/μl  
MgCl<sub>2</sub> 25 mM  
PCR Gold Puffer 10x
- Auftragspuffer (6x Loading Dye Solution, MBI Fermentas)
- dNTPs 2,5 mM  
dNTPs 10 mM (Fermentas) 250 μl  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (Gibco) 750 μl
- Größenstandard 1 kb (GeneRuler<sup>™</sup>, Fermentas)
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (Gibco)
- Ligierte DNA Proben
- TBE Gel 2%  
Agarose (Seakem<sup>®</sup> LE Agarose, Cambrex) 4 g  
TBE Puffer 1x 400 ml
- TBE Puffer 5x  
Trizma base (Sigma) 54 g  
Borsäure (Merck) 27,5 g  
EDTA 0,5 M (B.2.2) 20 ml  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 1000 ml  
ak
- TBE Puffer 1x  
TBE Puffer 5x 200 ml  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> 800 ml
- PCR-Maschine GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- PCR-Reaktionsgefäße Thermo-Tube 0,2 ml (Abgene)
- Primer 10 μM (Affymetrix)

#### DURCHFÜHRUNG

Als erstes muss der Ligationsansatz (25 μl) mit 75 μl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> verdünnt werden. Laut Protokoll der Firma Affymetrix soll der PCR Puffer II verwendet werden; hier wird der normale AmpliTaq Gold Puffer eingesetzt. Des Weiteren sollen laut Hersteller pro Probe vier PCR Reaktionen angesetzt werden; aufgrund der meist schlechten DNA Qualität aus Paraffingewebe und um eine höhere Ausbeute zu erzielen, werden hier pro

Probe fünf bis sechs PCR Reaktionen angesetzt. Alle Pipettierschritte erfolgen auf Eis. Pro Ansatz werden in ein PCR Reaktionsgefäß pipettiert: 10 µl PCR Puffer, 10 µl dNTPs, 10 µl MgCl<sub>2</sub>, 7,5 µl Primer, 2 µl AmpliTaq Gold<sup>®</sup>, 50,5 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> und 10 µl der verdünnten, ligierten DNA. Die Ansätze werden vorsichtig durchmischt und kurz abzentrifugiert. Das PCR-Programm läuft wie folgt: 10 min bei 95°C, (20 s bei 95°C, 15 s bei 59°C, 15 s bei 72°C)x35, 7 min bei 72°C und 4°C ∞. Laut Affymetrix-Protokoll startet die PCR mit 3 min bei 95°C; hier wird mit 10 min bei 95°C begonnen, da es sich bei der AmpliTaq<sup>®</sup> Gold um eine so genannte „Hot start“ Polymerase handelt, die erst hitzeaktiviert werden muss, um eine effiziente Enzymaktivität aufzuweisen. Nach der PCR werden die Amplifikate mit Hilfe eines 2%iges Agarose in TBE Puffer aufgetrennt, um die Ausbeute der Reaktion zu überprüfen. Die Gel-Elektrophorese wird wie unter B.3.1.1.5.3 beschrieben durchgeführt, nur dass kein TAE-, sondern TBE-Puffer verwendet wird. Pro PCR Ansatz werden 3 µl DNA und 3 µl Auftragspuffer auf das Gel aufgetragen. Die PCR Produkte sollten zwischen 400 – 1000 bp liegen und werden bei -20°C gelagert.

#### **B.4.2.4 Aufreinigung der PCR Produkte**

Um ein reines PCR Produkt zu erhalten, muss die DNA von Resten von Salzen, Enzym, dNTPs oder Primern befreit werden.

#### MATERIAL

- Aufreinigungsplatten Multiscreen<sup>®</sup> Montage PCRµ96 (Millipore)
- EB-Puffer (Qiagen)
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>
- NanoDrop<sup>®</sup> Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies)
- PCR-Folie selbstklebend, Eppendorf<sup>®</sup> (Sigma)
- PCR-Produkte
- Vakuumpumpe (KNF Neuberger)
- Schüttelblock Thermomixer Compact (Eppendorf)

DURCHFÜHRUNG

Die Aufreinigungsplatte wird an eine Vakuumpumpe angeschlossen und nicht benötigte „Wells“ müssen abgeklebt werden, damit sich ein Vakuum aufbauen kann. Pro Probe wird ein „Well“ benötigt, in welches der Reihe nach die fünf bis sechs PCR Ansätze einer Probe pipettiert werden. Durch das erzeugte Vakuum wird die Flüssigkeit mit den Verunreinigungen durch die Filter gezogen, während die DNA auf den Filtern liegen bleibt. Nachdem die letzte PCR Reaktion einer Probe filtriert ist, wird die DNA mit 45-50 µl EB Puffer gelöst. Um so wenig DNA wie möglich zu verlieren, wird die Platte mit EB-Puffer 10 min bei RT geschüttelt, bevor die DNA Lösung in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt wird. Dann erfolgt die DNA Quantifizierung wie unter B.3.1.1.4 beschrieben. Die DNA Ausbeute sollte bei ~20 µg liegen. Sollte das Volumen nach der Aufreinigung weniger als 45 µl betragen, so sollte dieses mit EB-Puffer aufgefüllt werden. In die spätere Hybridisierung werden nach Herstellerprotokoll nur 6 µg DNA eingesetzt. Deshalb wird auch mit DNA-Ausbeuten mit weniger als 20 µg weitergearbeitet und die Volumina der folgenden Schritte werden entsprechend angeglichen.

**B.4.2.5 Fragmentierung**MATERIAL

- Auftragspuffer (6x Loading Dye Solution, MBI Fermentas)
- Fragmentierungs-Reagenz DNase I (Affymetrix)
- Fragmentierungs-Puffer 10x (Affymetrix)
- Größenstandard 1 kb (GeneRuler™, Fermentas)
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (Gibco)
- PCR-Maschine GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- PCR-Reaktionsgefäße Thermo-Tube 0,2 ml (Abgene)
- TBE Gel 4%  
   NuSieve® 3:1 Agarose (Cambrex) 8 g  
   TBE Puffer (B.4.2.3.) 200 ml

DURCHFÜHRUNG

Da die Fragmentierungsreaktion sehr empfindlich ist und verhindert werden soll, dass die Fragmente zu klein werden, müssen die Pipettierschritte so zügig wie möglich durchgeführt werden. Der PCR-Block soll auf 37°C vorgeheizt werden und alle Reagenzien sind auf Eis zu halten. Zunächst muss die Menge an einzusetzendem Fragmentierungs-Reagenz nach folgender Formel errechnet werden:

$$Y = \frac{0.048 \text{ U}/\mu\text{l} \times 125 \mu\text{l}}{X \text{ U}/\mu\text{l}}$$

Y = einzusetzende  $\mu\text{l}$  des Fragmentierungs-Reagenz

X = Konzentration des Fragmentierungs-Reagenz ( $\text{U}/\mu\text{l}$ ); kann variieren und muss auf bei Lieferung abgelesen werden; hier 3  $\text{U}/\mu\text{l}$

0.048  $\text{U}/\mu\text{l}$  = Endkonzentration des Fragmentierungs-Reagenz im Reaktionsansatz

125  $\mu\text{l}$  = Endvolumen an verdünntem Fragmentierungs-Mix für 20 Reaktionen

Da die im Protokoll angegebenen 125  $\mu\text{l}$  für 20 Reaktionen angesetzt sind, wird dieses Volumen runtergerechnet. Allerdings empfiehlt es sich, das Volumen nicht kleiner als 30  $\mu\text{l}$  werden zu lassen, da ansonsten das einzusetzende Volumen an Fragmentierungs-Reagenz zu gering wird, was wiederum zu Pipettierungenauigkeiten führt. 30  $\mu\text{l}$  Endvolumen an verdünntem Fragmentierungs-Mix reicht für vier Proben und benötigt 0,48  $\mu\text{l}$  an Fragmentierungs-Reagenz. Da diese Berechnung von  $\sim 20 \mu\text{g}$  zu fragmentierender DNA ausgeht, wird bei geringeren DNA Mengen das einzusetzende Volumen an Fragmentierungs-Reagenz proportional umgerechnet. Dabei wird nach drei Konzentrationsstufen gestaffelt: 1.  $> 15 \mu\text{g}$ , 2. 10 – 15  $\mu\text{g}$  und 3.  $< 10 \mu\text{g}$ .

Nach den Berechnungen werden zu den 45  $\mu\text{l}$  aufgereinigter DNA 5  $\mu\text{l}$  des Fragmentierungspuffers dazugegeben und das Reaktionsgefäß auf Eis gestellt. Der Fragmentierungs-Mix wird nach den weiter oben geschilderten Berechnungen zusammen pipetiert. Laut Protokoll für 20 Reaktionen werden also 2  $\mu\text{l}$  Fragmentierungs-Reagenz und 12,5  $\mu\text{l}$  Fragmentierungspuffer zu 110,5  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  gegeben. Der Ansatz wird gut

durchmischt und kurz abzentrifugiert. Dann werden 5 µl des Fragmentierungs-Mixes zu der DNA gegeben und wieder wird gut gemischt und abzentrifugiert. Danach werden die Proben so schnell wie möglich im vorgeheizten PCR-Block platziert und dort für 30 min bei 37°C, 15 min bei 95°C und für ∞ bei 4°C inkubiert. Im Anschluss daran werden 7 – 8 µl der Fragmentierung mit 4 µl Auftragspuffer und einem 1 kb Größenstandard auf ein 4%iges Agarosegel aufgetragen, um die Fragmentgröße zu überprüfen, welche bei ~ 25 -200 bp liegen sollten.

#### **B.4.2.6 Markierung der Test-DNA**

##### MATERIAL

- ERGs (Eppendorf)
- GeneChip DNA Markierungs-Reagenz (Affymetrix)
- PCR-Maschine GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- Terminale Desoxynukleotidyl Transferase (TdT) 30 U/µl (Affymetrix)
- Terminale Desoxynukleotidyl Transferase Puffer 5x (Affymetrix)

##### DURCHFÜHRUNG

Der Markierungs-Mix wird hergestellt, indem pro Probe 14 µl TdT-Puffer, 2 µl Markierungs-Reagenz und 3,4 µl TdT zusammen in ein ERG gegeben werden. Der Ansatz wird vorsichtig durchmischt und kurz abzentrifugiert, bevor pro Probe 19,4 µl des Markierungs-Mixes zu der fragmentierten DNA dazugegeben werden. Nach kurzem Durchmischen werden die Proben in die PCR-Maschine gestellt und wie folgt inkubiert: 2 h bei 37°C, 15 min bei 95°C und für ∞ bei 4°C. Die markierten Proben werden dann bei -20°C gelagert.

#### **B.4.2.7 Hybridisierung**

##### MATERIAL

- Arrays (Affymetrix)
- Denhardt's Lösung 50x
- Ficoll Typ 400 (Pharmacia) 5 g
- Polyvinylpyrrolidone PVP-40 (Sigma) 10 g
- BSA Fraktion V (Sigma) 10 g
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> 500 ml

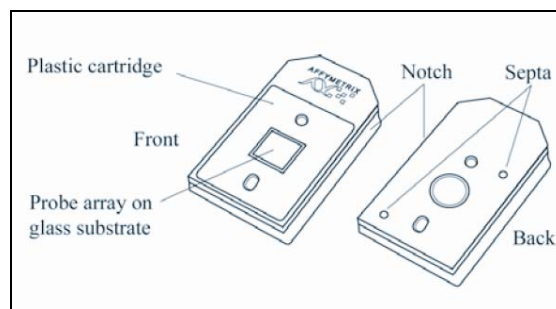
Beim Lösen eventuell erwärmen.  
Steril filtrieren (0,2 µm)

- DMSO 100% (Sigma)
- EDTA 0,5 M (B.2.2)
- ERGs (Eppendorf)
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (Gibco)
- Hering Sperma DNA 11 mg/ml (Sigma)
- Heizblock: Haep Lobor Consult, HBT 130
- Humane Cot-1 DNA 1 mg/ml (Invitrogen)
- Hybridisierungssofen GeneChip<sup>®</sup> 640 (Affymetrix)
- MES Hydrat (Sigma)
- MES Natriumsalz (Sigma)
- Oligonukleotid Kontroll-Reagenz (Affymetrix)
- Sterilfilter Stericup<sup>™</sup> 0,45 µm (Millipore)
- Tetrametyl-Ammoniumchlorid (TMACL) 5 M (Sigma)
- Tween<sup>®</sup>-20 3%
- Tween<sup>®</sup>-20 (Sigma) 3 ml
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (Gibco) 97 ml

### DURCHFÜHRUNG

Als Erstes muss eine 12x MES Stocklösung hergestellt werden. Diese kann unter Lichtschutz im Kühlschrank gelagert werden, bis ein Farbumschlag nach Gelb stattfindet. Es werden zusammen gegeben: 70,4 g MES Hydrat, 193,3 g MES Natriumsalz und 800 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>. Der pH Wert sollte zwischen 6,5 und 6,7 liegen, das Volumen wird mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> auf 1000 ml gebracht und die Lösung steril filtriert (0,2 µm Sterilfilter). Der Hybridisierungs-Mix wird anders als im Protokoll des Herstellers in größerer Menge auf Vorrat hergestellt und bei -20°C gelagert. Dafür werden zusammen pipettiert: 96 µl 12x MES Stocklösung, 104 µl DMSO, 104 µl 50x Denhardt's Lösung, 24 µl EDTA, 24 µl Hering Sperma DNA, 16 µl Oligonukleotid Kontroll-Reagenz, 24 µl Cot-1 DNA, 8 µl 3% Tween-20 und 1120 µl TMACL. Der Hybridisierungs-Mix wird sehr gut gemischt und kurz abzentrifugiert. Für Proben, die einen DNA-Gehalt von 20 µg besitzen werden nun laut Hersteller 190 µl des Hybridisierungs-Mixes zu den 70 µl an markierter DNA gegeben. Aus diesem Ansatz werden später allerdings nur 80 µl (~6 µg) für die Hybridisierung in den Array gegeben. Aus diesem Grund wird nur die Hälfte des Ansatzes hergestellt (95 µl der Hybridisierungs-Mixes werden zu 35 µl markierter DNA gegeben). Bei Proben, die nach der PCR geringere DNA Mengen aufweisen, wird so umgerechnet,

dass eben auch in diesen Fällen 6 µg an DNA hybridisieren können. Dabei ist natürlich zu beachten, dass die Zutaten des Hybridisierungs-Mixes am Ende in den richtigen Konzentrationen im Sondengemisch vorliegen: 0,056 M 12x MES, 5% DMSO, 2,5x Denhardt's Lösung, 5,77 mM EDTA, 0,115 mg/ml Hering Sperma DNA, 1x Oligonukleotid Kontroll-Reagenz, 11,5 µg/ml Cot-1 DNA, 0,0115% Tween-20 und 2,69 M TMACL. Sind die Sondenlösungen in ERGs hergestellt, werden entsprechend viele Arrays auf RT temperiert, da sonst die im Array enthaltenen Gummisepten brechen können. Die Sonden werden bei 95°C im Heizblock für 10 min denaturiert und sofort für 10 s auf Eis gestellt. Dann wird kurz abzentrifugiert und die Sonden bei 48°C für 2 min inkubiert. Letztendlich werden 80 µl Sondenmix luftblasenfrei in den Array gegeben. Dabei muss auf einer Seite eines der Gummisepten mit einer Pipettenspitze eingedrückt werden, um durch die Belüftung die Eingabe der Sonde am zweiten Gummiseptum zu ermöglichen (siehe Abb. 8). Die Arrays werden in den Hybridisierungsöfen gehängt und bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 60 rpm und 48°C für 16-18 h inkubiert.



**Abbildung 8: Darstellung des GeneChip® Arrays (Affymetrix).**

Die Abbildung zeigt die Vorder- sowie die Rückseite eines GeneChip®-SNP-Arrays. Der eigentliche Array wird von einer Plastik-Kassette umgeben und ist auf der Vorderseite durch einen Glaseinsatz zu erkennen. Durch die Septen auf der Rückseite der Plastik-Kassette wird die Hybridisierungslösung auf den Array gegeben.

#### B.4.2.8 Waschen und Detektion

Das Waschen des GeneChip® Mapping 10K 2.0 Arrays und die Detektion erfolgen automatisiert in der Waschstation 450 von Affymetrix. Diese läuft computergesteuert über die so genannte „GeneChip Operating Software“ (GCOS), ebenfalls von Affymetrix.



MATERIAL

- Biotinylierter Anti-Streptavidin Antikörper der Ziege 0,5 mg/ml (Vector)
- Denhardt's Lösung 50x (B.4.2.7)
- ERGs braun (Lichtschutz) (Eppendorf)
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (Gibco)
- MES Hydrat (Sigma)
- MES Natriumsalz (Sigma)
- NaCl 5M  
NaCl (Merck) 292,5 g  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 1000 ml
- Streptavidin R-Phycoerythrin SAPE (Molecular Probes)
- SSPE 20x (Cambrex)
- Sterilfilter Stericup™ 0,45 µm (Millipore)
- Tischzentrifuge (G. Kisker)
- Tween®-20 3%  
Tween®-20 (Sigma) 3 ml  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (Gibco) 7 ml
- Tween®-20 10%  
Tween®-20 (Sigma) 10 ml  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (Gibco) 90 ml

DURCHFÜHRUNG

Zunächst werden die beiden Waschlösungen A und B hergestellt. Waschlösung A (6x SSPE, 0,01% Tween-20) besteht aus 300 ml 20x SSPE, 1 ml 10% Tween-20 und 699 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>, Waschlösung B (0,6x SSPE, 0,01% Tween-20) aus 30 ml 20x SSPE, 1 ml 10% Tween-20 und 696 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>. Beide Lösungen werden durch einen 0,2 µm Filter steril filtriert und bei RT gelagert. Für den so genannten „Array Holding“ Puffer gibt man 8,3 ml der 12x MES Stocklösung, 18,5 ml 5 M NaCl und 0,1 ml 10% Tween-20 zu 73,1 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>. Nach der Hybridisierung der Arrays wird die Sondenlösung mit einer Pipette wieder entnommen und 80 µl des „Array Holding“ Puffers werden in die Arrays gegeben. Nun werden die Antikörperlösungen vorbereitet. Als erstes wird hier der Färbe-Puffer aus 666,7 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>, 300 µl 20x SSPE, 3,3 µl 3% Tween-20 und 20 µl 50x Denhardt's Lösung hergestellt. Nun werden 5 µl SAPE und 5 µl biotinyliertes-Antistreptavidin in zwei getrennten braune ERGs zu je 495 µl Färbe-Puffer gegeben gut gemischt und abzentrifugiert. In ein drittes ERG werden 800 µl „Array Holding“ Puffer pipettiert. Jedes Modul der FS450 Waschstation (insgesamt vier) verfügt über drei

Halterungen für die Detektionslösungen. Die SAPE-Antikörperlösung wird an Position 1, die biotinylierte Antistreptavidinlösung an Position 2 und der „Array Holding“ Puffer an Position 3 eingehängt. Jetzt werden auch die Arrays in die Waschstation eingesetzt und die Waschlösungen an die entsprechenden Schläuche angeschlossen. Als erster Programmschritt erfolgt das so genannte „Primen“, bei dem die einzelnen Kanäle der Waschstation mit den entsprechenden Puffern luftblasenfrei gefüllt werden. Danach wird das eigentliche Wasch- und Detektionsprotokoll gestartet:

1. Waschschrift #1: Sechs Zyklen mit fünf Schwenkungen / Zyklus mit Waschlösung A bei 25°C
2. Waschschrift #2: Sechs Zyklen mit fünf Schwenkungen / Zyklus mit Waschlösung B bei 45°C
3. Erste Färbung mit SAPE-Lösung für 10 min bei 25°C
4. Waschschrift #3: Sechs Zyklen mit fünf Schwenkungen / Zyklus mit Waschlösung A bei 25°C
5. Zweite Färbung mit Biotinylierter-Antistreptavidin Lösung für 10 min bei 25°C
6. Dritte Färbung mit SAPE-Lösung für 10 min bei 25°C
7. Waschschrift #4: Zehn Zyklen mit sechs Schwenkungen / Zyklus mit Waschlösung A bei 30°C
8. Füllen des Arrays mit „Arrays Holding“ Puffer

Wenn das Programm fertig ist, werden die Arrays aus der Waschstation entnommen und ein Reinigungsprogramm mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  wird gestartet. Die Arrays müssen unbedingt auf Luftblasen untersucht werden, da diese den anschließenden Scan-Vorgang erheblich behindern können. Sind Luftblasen vorhanden, so muss der „Array Holding“ Puffer mit einer Pipette entnommen und wieder luftblasenfrei nach pipettiert werden.

#### **B.4.2.9 Scannen und Analyse**

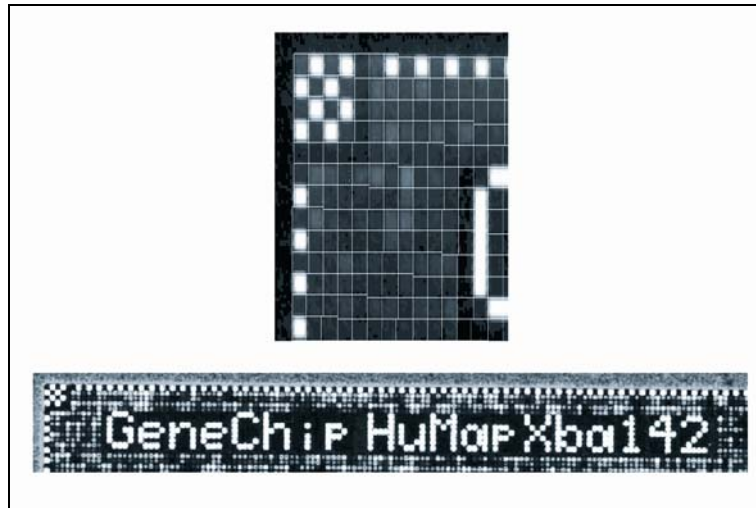
Das Scannen der Arrays erfolgt mit dem GeneChip Scanner 3000 der Firma Affymetrix, welcher ebenfalls über GCOS gesteuert wird. Der Laser benötigt eine Aufwärmzeit von mindestens 10 min. Bevor die Arrays in den Scanner eingesetzt werden, müssen die zwei Gummisepten abgeklebt werden um sicher zu gehen, dass kein Flüssigkeitsverlust im Scanner auftritt. Wird der Scanvorgang gestartet, so werden die eingestellten Arrays automatisch der Reihe nach gescannt und so genannte „.cel Files“ in GCOS gespeichert. Die Analyse der Scannerdaten erfolgt auf 2 Ebenen: Mit GCOS erfolgt das Waschen und Scannen der Arrays, sowie die automatische Erstellung der bereits er-

wähnten „.cel Files“. In der GeneChip DNA Analysis Software (GDAS) werden die Daten analysiert, eine Ergebnisdatei erstellt und dann in andere Auswertesoftware exportiert. Um die vom Scanner erstellten Dateien am eigenen PC mit GCOS/GDAS analysieren zu können, benötigt man das so genannte „Data Transfer Tool“. Dieses exportiert Daten aus GCOS heraus und importiert sie als so genannte CAB-Dateien in GDAS. Des Weiteren müssen die so genannten „GeneChip Mapping 10k Library Files“ in GDAS importiert werden. Bei der Analyse der Daten in GDAS wird ein Report erstellt, in welchem der Prozentsatz der auf dem Array detektierten SNPs („Call Rate“), der Prozentsatz der durch die Qualitätskontrolle passierten SNPs („Signal Detection Rate“) und die Prozentsätze der SNPs für die jeweiligen Genotypen (AA, AB oder BB) dargestellt sind. Die Auswertung der Kopienzahlveränderungen erfolgt mit Hilfe der „DNA-Chip-Analyzer“ Software (dChip; Li und Wong, 2001; Lin et al., 2004).

#### **B.4.2.10 Qualitätskontrolle der Hybridisierung**

Um festzustellen, ob ein Experiment funktioniert hat, kann eine Reihe an Parametern überprüft werden, welche mit dem experimentellen Vorgang und der Hybridisierung assoziiert ist. Wie weiter oben beschrieben wird in jeden Hybridisierungs-Mix das Oligonukleotid Kontroll-Reagenz gegeben. Der darin enthaltene B2 Oligo hybridisiert auf dem Array an bestimmten Stellen und generiert so ein Kontrollmuster (am Rand des Arrays, in den Ecken und als Schriftzug; siehe Abb. 9), welches als positive Hybridisierungskontrolle dient. Des Weiteren wird dieses Muster von der Software benutzt, um ein Gitter über das Bild zu legen und so die Positionen der einzelnen SNPs mit der Kartierungsinformation zu verbinden.

Die „Call Rate“, welche nach der Analyse der Daten in GDAS im automatisch generierten Report angezeigt wird, ist ein weiterer Indikator für ein gut oder nicht gelungenes Experiment. Liegt sie über 92%, so haben alle Teilschritte des experimentellen Ansatzes gut funktioniert. Proben, die eine „Call Rate“ unter 85% zeigen, sollten mit Vorsicht oder gar nicht ausgewertet werden.



**Abbildung 9: Kontrollelemente zum Überprüfen der Hybridisierungsqualität (Affymetrix).**

Die Abbildung zeigt die Hybridisierung des im Oligonukleotid Kontrollreagenz enthaltenen B2 Oligos an definierte Strukturen des GeneChip® Arrays. Dadurch ergibt sich zum Einen das im oberen Bildteil dargestellte Rautenmuster, zum Anderen an verschiedener Stelle der Schriftzug „GeneChip HuMap Xba142“. Die erfolgreiche Hybridisierung des B2 Oligos dient als Hybridisierungskontrolle.

## **B.5 FISH (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung)**

Durch die *in situ* Hybridisierung (ISH) ist es möglich, Nukleinsäuresequenzen direkt am biologischen Präparat, also *in situ*, nachzuweisen. Im Gegensatz zu den filterbasierenden Hybridisierungen müssen die Nukleinsäuren nicht erst extrahiert werden, sondern können direkt am Präparat untersucht werden. Der große Vorteil besteht darin, dass dadurch zytogenetische Analysen in Einzelzellen möglich sind. Bei einer ISH wird mit Gewebeschnitten, Zellausstrichen oder Zellkulturen gearbeitet, die nach entsprechender Vorbehandlung auf OT fixiert werden. Die Nukleinsäuren werden dann durch Hitzebehandlung denaturiert und mit einem Sondenmix für die entsprechenden Gewebeschnitte hybridisiert. Bei der Entwicklung der ISH 1969 durch Gall/Pardue und John et al. wurden die Sonden noch radioaktiv markiert, um die gewünschten Nukleinsäureabschnitte sichtbar zu machen. Heute wird überwiegend mit nicht radioaktiv-, sondern mit fluoreszenzmarkierten Sonden gearbeitet (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung; FISH). Dabei sind auch indirekte Markierungen mit Biotin und Digoxigenin möglich. Diese Haptene werden in die DNA eingebracht, indem sie an ein Nukleotid gekoppelt werden, welches in die Nukleinsäuremoleküle eingebaut wird. Der visuelle Nachweis erfolgt dann mittels gegen Biotin und Digoxigenin gerichteten Antikörpern, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Im Rahmen dieser Arbeit wird die FISH hauptsächlich zur Validierung amplifizierter chromosomaler Bereiche mit Hilfe von BAC-Sonden (Bacterial Artificial Chromosomes) eingesetzt.

### **B.5.1 Bacterial Artificial Chromosomes (BACs)**

Der Begriff „BAC“ steht für ein künstlich erzeugtes Bakterienchromosom, das auf den strukturellen Bestandteilen eines F-Plasmids aus *E. coli* basiert. Ein solcher Klonierungsvektor kann Fremd-DNA bis zu einer Größe von 300 kb enthalten. Ein BAC-Vektor (pBAC) enthält die regulatorischen Gene *oriS* und *repE*, welche der unidirektionalen Replikation dienen, sowie *parA* und *parB*, die die Kopienzahl pro Bakterienzelle auf eine oder zwei beschränken (low copy plasmid). Des Weiteren beinhaltet der BAC-Vektor einen Antibiotika-Resistenzmarker und ein Klonierungssegment, in welches die jeweilige Fremd-DNA eingefügt werden kann (Shizuya et al., 1992).

Durch Transformation eines solchen Vektors in Bakterienzellen und deren Kultivierung kann eine größere Menge der inserierten Fremd-DNA gewonnen werden. Die Auswahl von geeigneten BAC-Klonen für bestimmte Chromosomenbereiche kann unter [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) erfolgen. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit BACs aus der

humanen 1 Mb Sanger Bibliothek (The Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, UK) und der humanen 32 k Re-Array Bibliothek (BAPAC Resources Center, Children's Hospital Oakland Research Institute, Oakland, USA) gearbeitet, um chromosomale Veränderungen zu verifizieren. Die verwendeten Klonierungsvektoren der in diesen BAC-Bibliotheken enthaltenen BACs können Tabelle 2 entnommen werden.

**Tabelle 2: Verwendete BAC-Bibliotheken und ihre Vektoren.**

BAC-Bibliotheken	Vektor
RP1, 3, 4, 5	pCYPAC2
RP6	pPAC4
RP11, 13	pBACe3.6
CTA,	pBAC108L
CTB, C, D	pBeloBAC11
LL22NC01, 03	Lawrence 16

### B.5.1.1 Anzucht der BACs

#### MATERIAL

- BAC-Klone in Glycerinkultur (Human 1Mb-Sanger BAC Library oder Human 32k-BAC Library)
- Chloramphenicol 2 mg (Sigma)  
Lösen in 2 ml Ethanol = Stammlösung 10 mg/ml
- Duran<sup>®</sup> Erlenmeyerkolben mit Kappe (Schott)
- Gewindepräparatglas (35 x12 mm) mit Aluschraubkappe (Schütt)
- Glycerin steril (Sigma)
- Impfösen steril (Neolab)
- Kanamycin 50 mg (Sigma)  
Lösen in 2 ml Ethanol = Stammlösung 25 mg/ml
- LB-Flüssigmedium  
LB Broth (USB) 20 g  
ad 1 l mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>  
autoklavieren
- LB-Agar  
LB Broth (USB) 20 g

ad 1 l mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>  
Agar solidifying agent (Difco) 15 g  
autoklavieren

- Petrischalen (Greiner Bio One)
- Schüttler (Innova™ 2000 Platform Shaker, New Brunswick Scientific GmbH) in einem 37°C Brutschrank (Mettler)
- Zentrifugenröhrchen 30 ml

### DURCHFÜHRUNG

Die Anzucht der transgenen Bakterien erfolgt in 35 ml LB-Medium mit Chloramphenicol (12,5 µg/ml oder 20 µg/ml) oder Kanamycin (25 µg/ml). Dafür werden für die verschiedenen Konzentrationen 43,75 µl (12,5 µg/ml), 70 µl (20 µg/ml) oder 35 µl (25 µg/ml) der entsprechenden Antibiotikum-Stocklösung zu den 35 ml LB-Medium (oder 35 ml LB-Agar) gegeben. Das Animpfen der Kulturen erfolgt mit Hilfe einer Impföse, die zunächst in die Glycerinkultur und dann in das entsprechende Medium getaucht wird. Damit ein ständiges Auftauen der BAC-Bibliotheken verhindert wird, werden die benötigten BACs parallel auf Agarplatten ausgestrichen. Die Agarplatten werden mit 35 ml LB-Agar pro Petrischale und den weiter oben beschriebenen Antibiotikakonzentrationen hergestellt. Falls die Anzucht wiederholt werden muss, kann somit auf die Kolonien der Agarplatte zurückgegriffen werden. Nach 16 h Inkubationszeit bei 37°C werden die Kulturen in Zentrifugenröhrchen überführt; die Bakterien haben sich ausreichend vermehrt, wenn das LB-Medium getrübt ist. Dann folgt eine 30-minütige Zentrifugation bei 13.000 x g und 4°C, der Überstand wird verworfen und das Pellet bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C eingefroren. Die Agarplatten werden bei 4°C gelagert.

#### **B.5.1.2 Isolation der Plasmid-DNA**

Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgt durch alkalische Lyse der Zellen nach einem abgewandelten Protokoll von Birnboim/Dolby, 1979.

MATERIAL

- Chloroform/Isoamylalkohol Gemisch (24:1)
  - Chloroform (Merck) 96 ml
  - Isoamylalkohol (Merck) 4 ml
- Ethanol absolut p.a. (Merck)
- Glucose-Puffer
  - Glucose 50 mM (Sigma) 6 g
  - EDTA 10 mM (Merck) 3,73 g
  - Tris 25mM (Merck) 3,03 g
  - ad 1 l mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>
- Heizblock
- Lysozym-Lösung 5 mg/ml (Sigma) 100 µl
- NaOH-SDS-Lösung
  - NaOH 1 M (Merck) 200 µl
  - Natriumdodecylsulfat 25% (SDS; Merck) 40 µl
  - ad 1 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>
  - eiskalt
- Natriumacetat 3 M pH 4,8 (B.2.7)
- Nylonfilter 40 µm (BD Biosciences)
- Phase Lock Gel Heavy 2 ml (Eppendorf)
- Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1 Gesättigt mit 10 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA (Sigma)
- Ribonuklease A-Lösung 10 mg/ml (Roche)
- Tris-EDTA-Puffer
  - Tris 10 mM (Merck) 1,2 g
  - EDTA 1 mM (Merck) 0,37 g
  - ad 1 l mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>, pH 7,5
  - autoklavieren
- Tris-EDTA-Saline-Puffer (TES-Puffer)
  - Tris 10 mM (Merck) 1,21 g
  - NaCl 10 mM (Merck) 0,58 g
  - EDTA 1 mM (Merck) 0,37 g
  - ad 1 l mit, pH 7,6 mit HCl 1N (Merck) einstellen
  - autoklavieren
- 25% Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)
  - SDS (Merck) 250 g
  - in ca. 600 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> bei 60-100°C lösen
  - abkühlen lassen, ad 1 l mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>
- Zentrifuge (Biofuge fresco, Heraeus Instruments)
- Zentrifuge (Beckmann, Model J2-21)



### DURCHFÜHRUNG

Zunächst wird das Zellpellet in 5 ml TES-Puffer gewaschen und für 30 min bei 6.000 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden in 2 ml Glucose-Puffer und 2 ml Lysozym-Lösung suspendiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT erfolgt die Zugabe von 4 ml eiskalter NaOH/SDS-Lösung (Lysepuffer). Nach Durchmischung werden sofort 3 ml eiskalte Natriumacetat-Lösung dazugegeben. Nach erneutem Mischen folgt eine 15-minütige Inkubation auf Eis. Danach werden Proteine und die chromosomale DNA abzentrifugiert (15 min bei 6.000 x g, 4°C). Der Überstand wird durch Nylonfilter (4 µm) in ein neues Gefäß überführt, mit dem doppelten Volumen Ethanol versetzt und für 10-15 min auf Eis inkubiert. Darauf folgt eine 30-minütige Zentrifugation bei 4°C und 16.000 x g. Der Überstand wird verworfen und das Pellet getrocknet. Die Lösung des Pellets erfolgt in 1 ml TE-Puffer über Nacht bei 4°C im Kühlschrank. Am nächsten Tag erfolgt der RNase Verdau. Zunächst wird jede Probe in zwei ERGs à 500 µl überführt und 5 µl RNase A-Lsg. dazugegeben. Die Lösungen werden gut durchmischt und für 1 h bei 37°C im Heizblock inkubiert. Währenddessen werden die Phase Lock Gel Gefäße für 5 min bei 12.000 x g abzentrifugiert. Die Proben werden in die Phase Lock Gel Gefäße überführt und mit demselben Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch versetzt, kräftig gemischt und für 5 min bei RT zentrifugiert (12.000 x g). Der letzte Schritt wird wiederholt und die obere, wässrige Phase wird vorsichtig abgenommen und in ein neues Phase Lock Gel Gefäß überführt. Nun wird mit 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt, um eventuelle Phenolreste aus der wässrigen Phase zu entfernen. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 12.000 x g werden die Proben in ERGs überführt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgt durch die Zugabe von 2 Volumen eiskaltem Ethanol und 30-minütiger Inkubation bei -80°C. Der Überstand wird verworfen und das DNA-Pellet mit 1 ml 70%igem Ethanol (-20°C) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (12.000 x g für 15 min, 4°C) wird die DNA getrocknet, in 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> aufgenommen und bei 4°C über Nacht gelöst.

#### **B.5.1.3 Aufreinigung der Plasmid-DNA**

### MATERIAL

- DNA Clean & Concentrator<sup>TM</sup>-25 Aufreinigungs Kit (Zymo Research)  
DNA Bindungspuffer  
DNA Waschpuffer

Zymo-Spin II™ Säulchen  
Auffanggefäße

- Ethanol p.a. (Merck)
- Zentrifuge 5425 D (Eppendorf)

#### DURCHFÜHRUNG

Die isolierte Plasmid-DNA wird mit Hilfe des DNA Clean & Concentrator™-25 Aufreinigung Kits aufgereinigt und konzentriert. Zunächst werden die mitgelieferten 24 ml Waschpuffer mit 96 ml an 100%igem Ethanol versetzt um den gebrauchsfertigen Waschpuffer zu erhalten. Die Plasmidlösung wird mit dem zweifachen Volumen DNA Bindungspuffer gemischt und auf die Säulchen überführt. Es wird für 30 s bei 16.000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Es folgen zwei Waschschriffe mit jeweils 200 µl Waschpuffer mit jeweiliger Zentrifugation. Zuletzt werden 35 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> auf die Säulchen pipettiert und für 5-10 min bei RT inkubiert. Die Elution erfolgt durch 30-sekündige Zentrifugation bei 16.000 x g.

#### **B.5.1.4 Konzentrationsbestimmung der BACs**

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten doppelsträngigen Plasmid-DNA erfolgt im NanoDrop Spektrophotometer wie unter B.3.1.1.4 beschrieben.

#### **B.5.1.5 Markierung der BACs durch Nick-Translation**

Nach der Konzentrationsbestimmung werden die isolierten BACs durch Nick-Translation (siehe B.3.1.3.1) mit Digoxigenin-11-dUTP oder Biotin-11-dUTP markiert.

#### **B.5.1.6 Fällung und Denaturierung der BAC Sonde**

#### MATERIAL

- Glykogen 20 mg/ml (Roche)
- Heizblock: Haep Labor Consult, HBT 130
- Heizblock/Schüttler: Thermomixer Compact (Eppendorf)
- Hering Sperma DNA 11 mg/ml (Sigma)
- Humane Cot-1 DNA 1 mg/ml (Invitrogen)
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

- Hybridisierungsmix: Mastermix 1.0 (MM 1.0) 5 ml
- Formamid deionisiert (Sigma) 1 g
- Dextransulfat (Serva) 1 ml
- 20 x SSC pH 7,0
- mischen, einige Stunden auf 70°C erwärmen, um das Dextransulfat zu lösen
- pH 7,0 einstellen, ad 7 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ak
- Kühlzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus)
- Markierte BAC-Sonden
- 20 x SSC (B.2.12)
- Wasserbad 37°C (Mettler)

### DURCHFÜHRUNG

Zunächst werden pro BAC-Sonde 800 ng der markierten Plasmid-DNA in ein 1,5 ml ERG überführt und mit 15 µl humaner Cot-1 DNA und 2 µl Heringsperma DNA gemischt. Nachdem mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> auf 100 µl aufgefüllt wurde, werden 2 µl Glykogen (2%) und 250 µl 100% Ethanol (2,5 x Vol, -20°C) dazugegeben. Verwendet man in einem Ansatz zwei verschieden markierte Sonden, so werden in die oben beschriebene Fällung einfach 800 ng DNA pro Sonde eingesetzt und die Menge an H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> angepasst. Die Fällung erfolgt wahlweise über Nacht bei -20°C oder für 30 min bei -80°C. Es folgt ein Zentrifugationsschritt bei 12.500 x g für 30 min bei 4°C, der Überstand wird verworfen. Nach Trocknen des DNA-Pellets wird es in 7 µl MM 1.0 und 3 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> aufgenommen und gelöst (mindestens 30 min bei 37°C im Schüttler). Die Denaturierung erfolgt für 7 min bei 76°C im Heizblock. Danach werden die Proben kurz abzentrifugiert und für 45 min bei 37°C ohne Schütteln bis zur Hybridisierung vorinkubiert.

### **B.5.2 Objektträger für die FISH**

Die markierten BAC-Sonden sollen auf Gewebeschnitte der HNO-Tumoren hybridisiert werden, um DNA-Zugewinne in bestimmten chromosomalen Regionen nachzuweisen. Davor müssen die markierten Sonden zunächst auf ihre Spezifität getestet werden. Dafür werden die Sonden auf normale Metaphasen eines gesunden Spenders hybridisiert und die Bindungsstellen auf den Chromosomen im Karyogramm überprüft. So lassen sich Fehlkartierungen und Kreuzhybridisierungen mit anderen Chromosomen ausschließen.

### B.5.2.1 Metaphasepräparate für Testhybridisierungen

#### B.5.2.1.1 Herstellung der Metaphasepräparate

Siehe Abschnitt B.3.2.1.

#### B.5.2.1.2 Denaturierung der Metaphasepräparate

Siehe B.3.2.2.

### B.5.2.2 Gewebeschnitte

Die Gewebeschnitte aus formalinfixiertem Paraffingewebe von Kopf-Hals-Tumoren wurden vom Pathologischen Institut der Universität Freiburg zur Verfügung gestellt. Bevor solche Schnitte für eine FISH verwendbar sind, werden sie zunächst der Entparaffinierung und einem Pronase E Verdau unterzogen, wodurch die Zellen für die Sonde zugänglich gemacht werden.

#### B.5.2.2.1 Entparaffinierung und Hitzebehandlung der Gewebeschnitte

##### MATERIAL

- Citratpuffer 10 mM  
 Stammlösung A: Citronensäure 0,1 M (Merck) 19,2 g  
 ad 1 l mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>
- Stammlösung B: Natriumcitratdihydrat 0,1 M (Sigma) 29,4g  
 ad 1 l mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>
- Stammlösung A 18 ml  
 Stammlösung B 82 ml  
 ad 500 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>  
 pH 6,0 mit 1 N NaOH einstellen
- Ethanol absolut p.a. (Merck)
- Ethanol 70% (B.2.3)
- Ethanol 90% (B.2.4)
- Isopropanol (Merck)
- OT mit Gewebeschnitten
- PBS 1x (B.2.9)
- Xylol (Merck)

DURCHFÜHRUNG

Zunächst werden alle notwendigen Lösungen hergestellt und der Citratpuffer wird in ein großes Becherglas gegeben, in das später eine spezielle Apparatur mit den OT gestellt wird. Es sollte bereits im Vorfeld überprüft werden, bei welcher Mikrowelleneinstellung der Citratpuffer leicht köchelt, um ein späteres Abschwimmen der Gewebeschnitte durch zu starke Blasenbildung beim Erhitzen zu verhindern. Als erstes werden die Gewebeschnitte wie unter B.3.1.1.1 beschrieben entparaffiniert. Nachdem die OT kurz in 1x PBS gewaschen wurden, werden die Schnitte für 15 min in Citratpuffer gekocht. Dies dient dem Durchlässigwerden der Zellen, damit die Sonden bei der Hybridisierung an die DNA binden können. Danach erfolgt wieder ein Waschschrift in 1x PBS, wonach die OT entweder getrocknet und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren, oder mit Pronase E verdaut werden.

**B.5.2.2.2 Pronase E Verdau**MATERIAL

- Glycin-Lösung, RT  
Glycin (Sigma) 200 mg  
1 x PBS (siehe B.2.3.2.1) 100 ml
- Mikroskop (Zeiss Axioplan)
- Paraformaldehyd/Sörensenpuffer 1:9  
Paraformaldehyd 37% (Merck) 10 ml  
Sörensenpuffer 80 ml
- 1 x PBS (B.2.9) 3 Küvetten
- Pronase E-Lösung  $37^{\circ}\text{C}$   
Pronase (Merck) 50 mg  
1 x PBS (siehe B.2.3.2.1) 100 ml
- Sörensenpuffer  
Stammlösung A: KHPO (Merck) 9,08 g  
ad 1 l mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$   
Stammlösung B: NaHPO (Merck) 11,88 g  
ad 1 l mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$   
Stammlösung A 28,8 ml  
Stammlösung B 61,2 ml
- Wasserbad,  $37^{\circ}\text{C}$  (Memmert)

### DURCHFÜHRUNG

Bevor die OT für 3 min in Pronase E verdaut werden, muss diese in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt werden. Die OT werden in 1x PBS gestellt, und es wird dann unter dem Mikroskop der Zustand der Schnitte beurteilt und gegebenenfalls über einen längeren Pronase E-Verdau entschieden. Um den Verdau zu stoppen, werden die Gewebe für 5 min in Glycin gestellt und kurz in 1x PBS gespült. Zur Fixierung folgen 5 min im Paraformaldehyd/Sörensenpuffer-Gemisch. Nach dem abschließenden Waschschrift in 1x PBS (5 min) werden die OT entweder an der Luft oder mit Stickstoff getrocknet. Die Gewebeschnitte werden nun bei -20°C gelagert.

#### **B.5.2.2.3 Denaturierung der Gewebeschnitte**

### MATERIAL

Siehe Abschnitt B.3.2.2.

### DURCHFÜHRUNG

Die Denaturierung der Gewebeschnitte erfolgt wie die Denaturierung der Metaphasepräparate, nur dass die Denaturierungszeit hier 12 min beträgt.

#### **B.5.3 Hybridisierung**

Bei der Hybridisierung werden die markierten, denaturierten Sonden auf die ebenfalls denaturierten Metaphasenpräparate oder Gewebeschnitte gebracht, so dass sich die Sonden an ihre homologen Abschnitte im Genom anlagern können.

##### **B.5.3.1 Testhybridisierung**

### MATERIAL

- Deckgläser 18 x 18 mm oder kleine runde Ø 1 cm (Superior)
- Denaturierte Metaphasenpräparate
- Denaturierte, vorinkubierte BAC-Sonde(n)
- Feuchte Kammer (37°C)

- Fixogum (Marabu)
- Wasserbad (GFL)

#### DURCHFÜHRUNG

Die Metaphasepräparate werden wie unter B.3.3 beschrieben hybridisiert. Je nach Deckglasgröße werden 10 µl (18 x 18 mm) oder 2,5 µl (kleine runde Deckgläschen Ø 1 cm) an denaturiertem Sondengemisch aufgetragen. Die Deckgläser werden luftblasenfrei aufgelegt und mit Fixogum versiegelt. Die Hybridisierung erfolgt für mindestens 48 h bei 37°C in der feuchten Kammer.

#### **B.5.3.1.1 Waschen und Detektion der Testhybridisierung**

##### MATERIAL

Bis auf die Antikörper sind alle verwendeten Materialien unter B.3.4 beschrieben.

- Anti-Digoxigenin-Cy3 1,7 mg/ml (Jackson ImmunoResearch)
- Biotinyliertes-anti-Streptavidin 0,5 mg/ml (Vector)
- Streptavidin-DTAF1,54 mg/ml (Jackson ImmunoResearch)
- Maus-anti-Ratte-Cy3 1,4 mg/ml (Jackson ImmunoResearch)
- Ratte-anti-Maus-Cy3 0,9 mg/ml (Jackson ImmunoResearch)

##### DURCHFÜHRUNG

Die OT werden nach Ablösen der Deckgläser in 2x SSC für 3 x 15 min in 50% Formamid gewaschen. Dann werden sie kurz in 2x SSC, gespült um Formamidreste in den folgenden Küvetten zu vermeiden. Es folgen dann 15 min in 2x SSC und 15 min in PN-Puffer. Zuletzt werden die OT für 15 min in PN-Puffer bei RT gestellt. Während der Waschschrte werden die Antikörperlösungen verdünnt (Tab. 3) und dann in einem Verhältnis 1:1 gemischt, um die gebrauchsfertigen Antikörpergemische herzustellen. Des Weiteren wird eine feuchte Kammer bei 37°C vorbereitet.

**Tabelle 3. Antikörper für die BAC-FISH**

<b>Antikörper</b>	<b>Antikörperlösung [µl]</b>	<b>PNM [µl]</b>
Anti-Digoxigenin-Cy3	4	496
Streptavidin-DTAF	10	240
Ratte-anti-Maus-Cy3	10	240
Biotinyliertes-anti-Streptavidin	10	240
Maus-anti-Ratte-Cy3	10	240
<b>Antikörperschicht</b>	<b>Verdünnte Antikörperlösungen 1:1</b>	
Schicht 1	Anti-Digoxigenin-Cy3 + Streptavidin-DTAF	
Schicht 2	Ratte-anti-Maus-Cy3 + Biotinyliertes-anti-Streptavidin	
Schicht 3	Maus-anti-Ratte-Cy3 + Streptavidin-DTAF	

Die Detektion der BAC-FISH beinhaltet mehrere Schritte mit verschiedenen Antikörpern, um die Signale zu verstärken. So werden nach dem Blocken mit PNM zunächst 100 µl der unter Schicht 1 (siehe Tab. 3) beschriebenen Antikörperlösung auf die OT aufgetragen und bei 37°C für 20 min in einer feuchten Kammer unter Lichtschutz inkubiert. Danach folgen 2 Waschschritte in PN-Puffer von jeweils 5 min, um überschüssige Antikörper zu entfernen, bevor die nächste Schicht aufgetragen wird. Nachdem die Antikörper der letzten Schicht abgewaschen sind, werden die OT 3 x kurz in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gespült, an der Luft getrocknet und mit DAPI/Vectashield eingedeckt. Die OT sind nun bereit für die Auswertung am Mikroskop.

### **B.5.3.2 Hybridisierung auf Gewebeschnitte**

Die Hybridisierung der Gewebeschnitte erfolgt wie unter B.3.3 beschrieben.

#### **B.5.3.2.1 Waschen und Detektion der Gewebeschnitte**

#### MATERIAL

Siehe B.3.4.



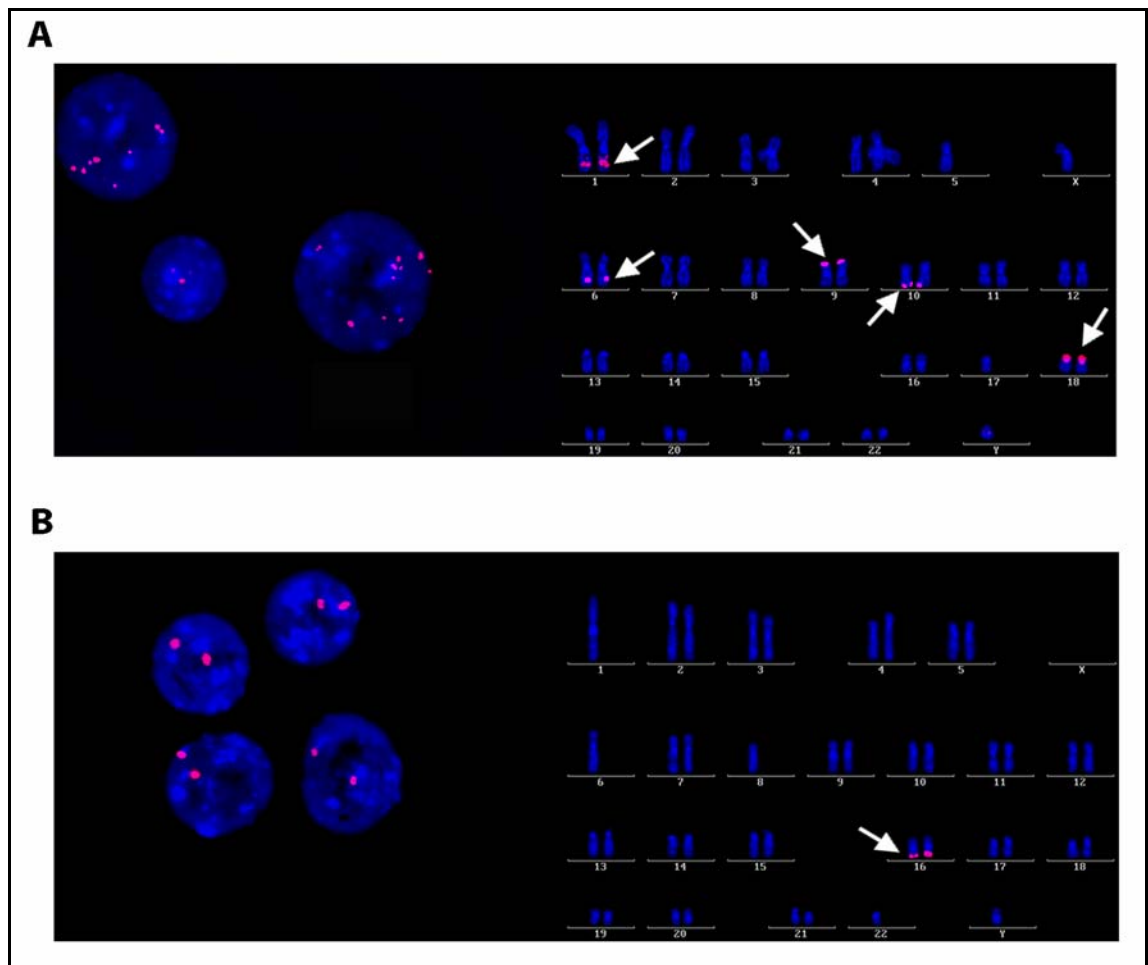
## DURCHFÜHRUNG

Das Waschen und die Detektion der Gewebeschnitte erfolgt weitgehend wie unter B.3.4 beschrieben. Allerdings wird bei der Detektion von hybridisierten Gewebeschnitten nach jeder Antikörperschicht und dem anschließenden waschen in PN Puffer für 10 min mit PNM geblockt, um die Hintergrundfluoreszenz zu minimieren. Des Weiteren werden fünf und nicht drei Antikörperschichten aufgetragen, wobei die Antikörperschichten 4 und 5 der in Tab. 3 beschriebenen Schichten 2 und 3 entsprechen.

### **B.5.4 Auswertung der FISH**

#### **B.5.4.1 Auswertung der Testhybridisierung**

Die Auswertung der Testhybridisierung erfolgt an einem Fluoreszenzmikroskop mit CCD-Kamera (Zeiss). Pro Hybridisierung werden einige Bilder (Metaphasen und noch intakte Zellkerne) aufgenommen und mit einer geeigneten Software (Isis, Metasystems) analysiert. Es werden Karyogramme gelegt und die Lokalisation der hybridisierten BACs überprüft (Abb. 10). Im Falle von intra- oder interchromosomalen Kreuzhybridisierungen können die jeweiligen BACs nicht für eine Gewebe-FISH eingesetzt werden.



**Abbildung 10: Testhybridisierung von Digoxigenin-markierten BAC Sonden.**

(A) Kreuzhybridisierung der Digoxigenin-markierten BAC-Sonde für Chromosom 18p, dargestellt im Interphase-Kern und im Karyogramm. Neben der spezifischen Hybridisierung auf 18p bindet die Sonde zusätzlich auf den Chromosomen 1q, 6q, 9p und 10q (Fluoreszenzsignale in den Karyogrammen sind durch weiße Pfeile markiert). (B) Spezifische Hybridisierung der Digoxigenin-markierten BAC-Sonde für Chromosom 16q.

#### B.5.4.2 Auswertung der Gewebeschnitte

Die Auswertung der Gewebe-FISH erfolgt an einem Epifluoreszenzmikroskop mit Apotome<sup>®</sup>-Einrichtung (Zeiss). Das beim Apotome verwendete Bildgebungsverfahren wird als „Gitterprojektion“ oder „strukturierte Beleuchtung“ bezeichnet. Dabei wird eine Gitterstruktur mit definierter Gitterkonstante in die Fokusebene des zu untersuchenden Objektes projiziert und in drei definierten Schritten lateral in der Probe bewegt. Eine CCD-Kamera nimmt an jeder Position des Gitters ein Bild auf, wobei die Bildanteile oberhalb und unterhalb der Fokusebene jeweils herausgerechnet werden, so dass nur Objekte im Fokus sichtbar sind. Diese Bilder werden dann zu einem Ergebnisbild verrechnet, welches einen optischen Schnitt durch das Präparat darstellt (Bildstapel). Sol-

che Bilder weisen ein verbessertes Verhältnis von Signal zu Hintergrund, sowie eine um den Faktor 2 verbesserte Auflösung in axialer (Z-) Richtung auf. Mit der geeigneten Software (Axiovision, Zeiss) werden mindestens zehn Bildstapel pro Sonde in allen Farbkanälen (DAPI, Cy3, FITC) aufgenommen. Dadurch wird sichergestellt, dass genügend Zellen für die Auswertung zur Verfügung stehen. Durch Auszählen der Signale pro Zelle wird die Kopienzahl des DNA-Abschnittes bestimmt, an den die BAC-Sonde bindet. Um ein repräsentatives Ergebnis zu erzielen, werden pro Hybridisierung ca. 100 Zellen ausgezählt.

## B.6 Quantitative Echtzeit-PCR (QRT-PCR) zur Bestimmung der mRNA-Expression

Die quantitative Echtzeit- oder „Real Time“-PCR (QRT-PCR) amplifiziert nach dem bekannten Prinzip der PCR (B.3.1.1.5) Nukleinsäuren, bietet aber zusätzlich die Möglichkeit einer Quantifizierung des Ausgangsproduktes. Diese Quantifizierung wird durch Mengen-Messungen entweder am Ende oder während eines PCR-Zyklus erreicht. Möchte man die Expression eines Gens auf mRNA-Ebene untersuchen, so muss die mRNA zunächst durch Reverse Transkription (RT-PCR) in cDNA (complementary DNA), welche in der nachfolgenden QRT-PCR als Ausgangsprodukt („Template“) eingesetzt wird, umgeschrieben werden. Die Quantifizierung des Amplifikats in der QRT-PCR kann durch verschiedene Ansätze wie z.B. dem Einsatz von interkalierenden Farbstoffen oder FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)-Sonden indirekt über eine Fluoreszenzmessung erfolgen. In dieser Arbeit werden zur Quantifizierung kommerzielle Taqman<sup>®</sup>-Sonden (Applied Biosystems) verwendet, deren Wirkungsweise auf dem FRET-Prinzip beruht. FRET ist ein physikalischer Prozess, bei welchem ein Donor-Fluorochrom (Reporter) einen Teil seiner Energie an ein Akzeptor-Fluorochrom (Quencher) abgibt (Förster, 1948; Clegg, 1992). Befinden sich Donor- und Akzeptor-Fluorochrom wie bei der verwendeten Sonde in räumlicher Nähe, so wird die vom Reporter emittierte Fluoreszenz vom Quencher aufgenommen und damit von der Messung abgeschirmt. In der Elongationsphase der PCR werden die Primer von einer Polymerase mit Exo-Nuklease-Aktivität verlängert. Erreicht diese eine gebundene Sonde erfolgt deren Abbau, wobei die gebundenen Reporter- und Quencher-moleküle frei werden und sich voneinander entfernen. Da die Intensität des Energietransfers unter anderem vom Abstand zwischen Reporter und Quencher abhängt; kann der Quencher mit größer werdender Entfernung nicht mehr die gesamte Energie absorbieren und messbares Fluoreszenzlicht wird vom Reporter emittiert. Dadurch erhöht sich mit jedem Zyklus die Gesamt-Fluoreszenz und mit Hilfe von Eichkurven kann die ursprüngliche Menge an Ausgangsmaterial, und damit die Expression der mRNA, bestimmt werden. Bei der Bestimmung der Gen-Expression wird zwischen relativer und absoluter Quantifizierung unterschieden. Bei der relativen Quantifizierung werden die mRNA-Mengen des zu messenden Gens relativ zu einer internen Kontrolle (Referenzgen) bestimmt, während bei der absoluten Quantifizierung die genaue Anzahl der Templates in einer Probe präzise festgestellt wird. Die Voraussetzung für eine absolute Quantifizierung ist allerdings eine geeignete Kontrolle, wie z.B. Normalgewebe im Vergleich zu Tumorgewebe desselben Patienten. Für die in dieser Arbeit untersuchten Tumorgewe-

be standen solche Kontrollen leider nicht zur Verfügung, so dass die Quantifizierung der mRNA relativ erfolgen musste.

### **B.6.1 RNA-Isolation**

In der vorliegenden Arbeit wird RNA aus Zelllinien und aus formalinfixiertem Paraffingewebe isoliert. Obwohl sich RNA aus formalinfixiertem Paraffingewebe isolieren lässt (Rupp und Locker, 1988), stellt sich eine reproduzierbare Quantifizierung der Genexpression als schwierig dar (Specht et al., 2001). Gründe dafür sind die durch den Vorgang der Fixierung hervorgerufenen Molekülvernetzungen zwischen Desoxynukleinsäuren und Proteinen, sowie die kovalente Modifizierung der RNA durch das Anhängen von Mono-Methylol-Gruppen an die Basen, wodurch es zu Problemen bei der RNA-Isolation, der Reversen Transkription und der Quantifizierung kommen kann (Masuda et al., 1999). Erschwerend kommt hinzu, dass es bereits vor der Formalinfixierung des Gewebes (z.B. durch operationsbedingte Ischämie) zu einer massiven Degradierung der RNA kommen kann (Mizuno et al., 1998). Es wurde aber gezeigt, dass sich RNA aus formalinfixiertem Paraffingewebe erfolgreich durch QRT-PCR Reaktionen analysieren lässt, bei denen der Bindungsabstand der verwendeten Primer nicht größer als 300 bp beträgt (Chung et al., 2006).

Wird mit RNA gearbeitet, werden die jeweiligen Arbeitsplätze im Vorfeld mit RNase-Zap<sup>®</sup> gesäubert. Dieses Reagenz entfernt effektiv die ubiquitär vorkommenden RNasen, welche bei Kontamination zu einer Degradierung der RNA führen würden.

#### **B.6.1.1 RNA-Isolation aus Paraffingewebe**

Die Isolierung der RNA aus formalinfixiertem Paraffingewebe basiert auf dem durch Rupp und Locker (1988) beschriebenen Protokoll, welches auf einer Phenol/Chloroform-Extraktion beruht. Diese klassische Methode zur Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren (siehe B.5.1.2) beruht auf der Tatsache, dass sich Nukleinsäuren aufgrund ihrer hydrophilen Gruppen in der wässrigen Phase der bei der Extraktion entstehenden biphasischen Mischung befinden, während Proteine und Zelldebris in der organischen Phase in Lösung gehen. Für eine Trennung der DNA von der RNA ist der pH-Wert des Phenol/Chloroform-Gemisches ausschlaggebend. Ein pH-Wert von 4,0-4,5 macht die DNA in der Phenolphase löslich, so dass sich ausschließlich die RNA in der wässrigen Phase befindet und isoliert werden kann.

Zunächst erfolgt die Entparaffinierung und Mikrodissektion der Gewebeschnitte wie unter B.3.1.1.1 und B.3.1.1.2 beschrieben, wobei die dafür notwendigen Lösungen mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> hergestellt werden.

### MATERIAL

- Entparaffinierung siehe B.3.1.1.1
- Ethanol 70% (B.2.3)
- Heizschüttler Thermomixer Compact (Eppendorf)
- Isoamylalkohol:Chloroform 1:24
 

Isoamylalkohol (Merck)	4 ml
Chloroform (Merck)	96 ml
- Isopropanol (Merck)
- Glykogen 20 mg/ml (Roche)
- Mikrodissektion siehe B.3.1.1.2
- Natriumacetat 3 M (B.2.7), aber pH 4,0!
- Phenol:Wasser UltraPure™, pH 4,0 (Invitrogen)
- Proteinase K-Lösung 50 mg/ml
 

Proteinase K, lyophilisiert 9,8 U/mg (Sigma)	25 mg
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> , RNase-frei (Gibco)	500 µl
À 50 µl aliquotieren, bei -20°C lagern	
- RNA-Lysepuffer 1x
 

RNA-Lysepuffer 5x	20 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> , RNase-frei (Gibco)	80 ml
- RNA-Lysepuffer 5x
 

EDTA 0,5 M, pH 8,0 (B.2.2)	0,25 ml
Tris 1M, pH 8,0	12,5 ml
SDS (Merck)	25 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> , RNase-frei (Gibco)	ad 250 ml
- Steril filtrieren 0,2 µm
- RNaseZap® (Ambion)
- Tris 1M, pH 8,0
 

Trizma Base (Sigma)	24,23 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> , RNase-frei (Gibco)	50 ml
Mit 1N HCl-Lösung auf pH 8,0 einstellen	
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> , RNase-frei (Gibco)	ad 200 ml
- Sterilfilter Stericup™ 0,2 µm (Millipore)
- Zentrifuge Biofuge fresco (Heraeus)

DURCHFÜHRUNG

Nach Entparaffinierung und Mikrodissektion der Gewebeschnitte werden zu jeder Probe 200 µl RNA-Lysepuffer und 20 µl Proteinase K-Lösung gegeben. Die Lyse erfolgt über Nacht bei 60°C im Heizschüttler. Ist das Gewebe komplett lysiert, werden die Proben mit 200 µl Phenol, 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol und 20 µl Natriumacetat versetzt. Es wird gründlich gemischt und für 6 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Der wässrige Überstand mit der darin gelösten RNA wird in ein neues ERG überführt, bevor 220 µl Isopropanol und 2 µl Glykogen dazugegeben werden. Die Fällung erfolgt für mindestens 2 h bei -20°C, im Idealfall wird über Nacht gefällt. Danach wird die RNA bei 16.000 x g für 30 min pellettiert und mit 180 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Es wird wieder für 15 min zentrifugiert, bevor der Überstand abgenommen und das Pellet bei RT getrocknet wird. Es wird in 25 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gelöst und bis zur Konzentrationsmessung (B.6.1.3) bei 4°C aufbewahrt.

**B.6.1.2 RNA-Isolation aus Zelllinien**

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen erfolgt durch eine Trizol®-basierte Methode, welche ein schnelles Extraktionsverfahren mit hoher Ausbeute an RNA darstellt. Das Reagenz ist ein mono-phasisches Gemisch aus Phenol und Guanidin-Thiocyanat und dient der Optimierung des von Chomczynski und Sacchi (1987) entwickelten Protokolls der RNA-Isolation in nur einem Schritt. Während der Lyse, bei welcher die Zellen aufgeschlossen und die Zellkompartimente aufgelöst werden, schützt das Trizol® die RNA vor einer möglichen Degradierung durch RNasen. Nach Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation ergibt sich ein Drei-Phasen-Gemisch, aus welchem RNA, DNA und auch Proteine gewonnen werden können. Die RNA befindet sich ausschließlich in der oberen wässrigen Phase, während sich die DNA in der intermediären Phase befindet. Proteine können bei Bedarf aus der organischen Phase isoliert werden.

MATERIAL

- Chloroform (Sigma)
- Ethanol 75%  
Ethanol absolut p.a. (Merck) 75 ml  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>, RNase-frei (Gibco) 15 ml
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>, RNase-frei (Gibco)
- Isopropanol (Merck)

- RNaseZap® (Ambion)
- Trizol® LS Reagenz (Invitrogen)
- Kühlzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus Instruments)

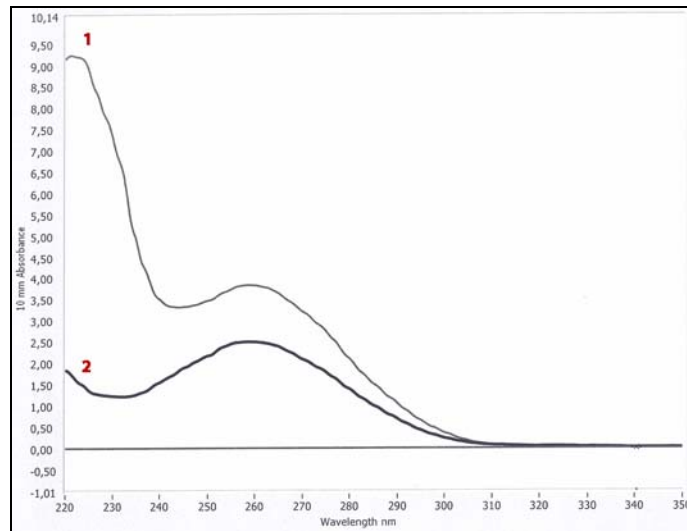
### DURCHFÜHRUNG

Die RNA-Isollierung erfolgt direkt aus einem Zellpellet (siehe B.8.1) durch Zugabe von 750 µl Trizol®. Ab einer Zellzahl  $\geq 10^7$  wird das Pellet auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt. Mit einer Pipette wird so lange gemischt, bis sich die Zellen aufgelöst haben. Nach vollständiger Lyse wird Chloroform dazugegeben (175 µl), das ERG zum Mischen invertiert und 15 min bei RT inkubiert. Dabei wird die Probe alle 5 min mit Hilfe eines Vortexers energisch gemischt. Es folgt ein Zentrifugationsschritt bei 4°C und 15 min bei 16.000 x g, nach welchem die obere, wässrige Phase, möglichst ohne die intermediäre Phase zu berühren, in ein neues ERG überführt wird. Zur Fällung werden 600 µl Isopropanol hinzupipettiert und für mindestens 15 min bei RT inkubiert, bevor der Niederschlag bei 16.000 x g für 15 min in der Zentrifuge bei 4°C pelletiert wird. Anschließend wird das Pellet zweimal mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen, worauf jedes Mal ein fünf-minütiger Zentrifugationsschritt bei 5.400 x g folgt. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen, das Pellet getrocknet und je nach Größe in 30-100 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> aufgenommen.

#### **B.6.1.3 Konzentrationsmessung der RNA**

Die Konzentration der RNA-Lösung wird ähnlich wie unter B.3.1.1.4 beschrieben mit Hilfe des NanoDrop® Spektrophotometers ermittelt. Auch hier dienen die 260/280- und 260/230-Quotienten als Kontrolle für den Reinheitsgrad der RNA (siehe Abb. 11). Im Gegensatz zu DNA sollte der 260/280-Wert bei RNA um die 2 liegen, was auf den Unterschied in der Basenzusammensetzung (anstatt der Base Thyminid kommt in RNA die Base Uracil vor) zurückzuführen ist. Werden die in den Nucleinsäuren vorkommenden Nucleotide einzeln gemessen, so zeigen sich deutliche Unterschiede in den berechneten 260/280 Quotienten (Leninger, 1975). Da das in der RNA existierende Uracil einen höheren 260/280-Wert hat als sein DNA-Pendant Thymin, liegt der 260/280-Wert bei RNA höher als bei DNA. Wird bei der Konzentrationsmessung der isolierten RNA eine organische Kontamination festgestellt (Abb. 11), so wird die Lösung erneut mit 750 µl Trizol® versetzt und wie unter B.6.1.2 oder B.6.1.1 beschrieben aufgereinigt.



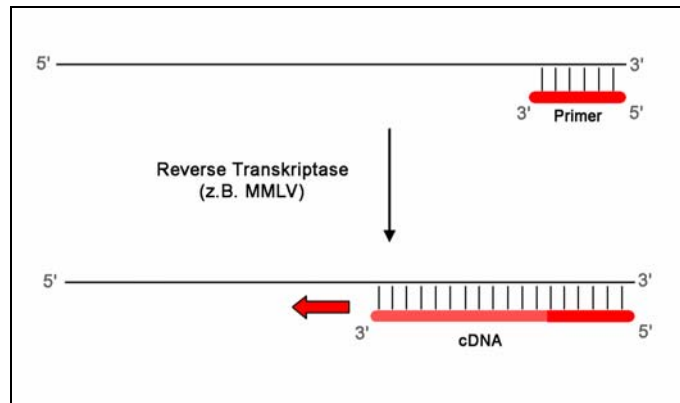


**Abbildung 11: Spektrale Darstellung einer RNA-Probe nach der Konzentrationsmessung im NanoDrop® Spektrophotometer.**

Kurve 1 zeigt das Spektrogramm einer RNA-Probe nach der Extraktion aus einem Zellpellet. Ein deutlich erkennbarer Peak bei 220-230 nm zeigt eine organische Kontamination durch Phenol oder Alkoholreste. Kurve 2 zeigt dieselbe RNA-Probe nach erneuter Aufreinigung, der zweite Absorptionspeak bei 230 nm ist verschwunden.

## B.6.2 Reverse Transkription (RT)-PCR

Bei einer „Reversen Transkription“ wird RNA durch das Enzym „Reverse Transkriptase“ in cDNA umgeschrieben (siehe Abb. 12). Dieses Enzym ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase aus Retroviren, die das Enzym benötigen, um ihr RNA-Genom als cDNA in das Genom der Wirtszelle integrieren zu können (Strachan und Read, 2004). In dieser Arbeit wird für die Reverse Transkription der „Superscript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR“ der Firma Invitrogen verwendet. Das in diesem Kit enthaltene Enzym ist eine Abwandlung der M-MLV (Moloney-Mausleukämievirus; Byrne et al., 1988) Reversen Transkriptase mit reduzierter RNase H-Aktivität und erhöhter Thermostabilität. RNase H ist eine Endonuklease, welche RNA/DNA-Hybride nach erfolgter reversen Transkription erkennt und die RNA abbaut. Durch die gentechnisch minimierte RNase-Aktivität der hier verwendeten Reversen Transkriptase wird ein RNA-Template nach Umschreibung in cDNA nicht abgebaut und kann nach Denaturierung der RNA/DNA-Hybride weiter als Matrize dienen, was einen höheren Ertrag an cDNA zur Folge hat. Durch die erhöhte Thermostabilität kann die Reaktion bei einer Temperatur von 42-60°C ablaufen, wodurch sowohl die Spezifität als auch die Menge an cDNA-Produkt erhöht wird.



**Abbildung 12: Schematische Darstellung einer Reversen Transkription.**

Durch eine Reverse Transkriptase wird komplementär zu der RNA-Matrize, ausgehend von einem entsprechenden Primer, die cDNA in 5'-3'-Richtung synthetisiert.

### MATERIAL

- Eis
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>, RNase-frei (Difco)
- RNA
- Superscript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen)  
*E.coli* RNase H  
 RT Enzymmix  
 RT Reaktionsmix 2x
- PCR Maschine GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- PCR-Reaktionsgefäße Thermo-Tube 0,2 ml (Abgene)
- RNaseZap® (Ambion)

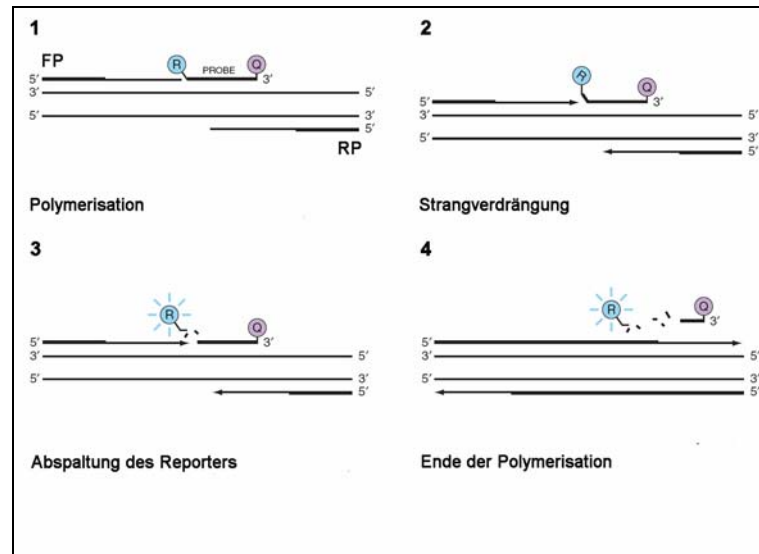
### DURCHFÜHRUNG

In die Reverse Transkription werden pro Probe 1 µg RNA eingesetzt. Dazu werden auf Eis in einem PCR-Reaktionsgefäß 10 µl des Reaktionsmixes, 2 µl des Enzymmixes und ad 20 µl RNase-freies H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gegeben. Der Ansatz wird vorsichtig gemischt und für 10 min bei 25°C im PCR-Block inkubiert. Es folgen 30 min bei 50°C und 5 min bei 85°C, bevor die Probe auf 4°C runtergekühlt wird. Dann wird 1 µl (2 U) RNase H dazugegeben, um die RNA nach erfolgter Reaktion abzubauen. Dazu wird noch einmal für 20 min bei 37°C inkubiert. Die cDNA wird aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### **B.6.3 QRT-PCR: Taqman® Analyse**

Die relative Quantifizierung der mRNA-Kopienzahl durch QRT-PCR erfolgt mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Taqman® Systems. Ein Sonden-Satz besteht aus der Sonde selbst und den Vorwärts- und Rückwärts-Primern für die PCR-Reaktion. Die Wirkungsweise der verwendeten so genannten „Double-Dye-Sonden“ beruht auf dem in B.6 erläuterten FRET-Prinzip und ist in Abbildung 13 dargestellt. Die FAM™-markierten (6-Carboxy-Fluoreszin) Sonden sind Exon-übergreifend, d.h. sie binden so auf der cDNA, dass sie Exongrenzen überspannen. Dadurch ist es möglich, Gesamt-RNA ohne vorherigen DNase-Verdau in die Reverse Transkription einzusetzen. Eine Kontamination der RNA mit genomischer DNA hat demzufolge keine Auswirkung auf die selektive Bestimmung der mRNA-Quantität. Für die relative Quantifizierung wird zusätzlich zur eigentlichen Zielsequenz eine endogene Kontrolle zur Normalisierung (aktive Referenz) der gemessenen Ziel-cDNA benötigt. Durch diese Normalisierung werden Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten cDNA berücksichtigt. Als solche interne Kontrollen werden so genannte nicht regulierte Haushaltsgene (z.B.  $\beta$ -Actin) verwendet. Für die Normalisierung des Reporter-Signals (passive Referenz) dient der Fluoreszenzfarbstoff ROX (Carboxyl-X-Rhodamin), welcher im PCR Master Mix in einer definierten Menge vorhanden ist.

Für die Berechnung der mRNA-Kopienzahl wird eine mit einer unabhängigen Probe erstellte Standardkurve verwendet. Die Quantität wird dann relativ zur Kopienzahl einer Kalibrator-Probe bestimmt.



**Abbildung 13: Schematische Darstellung des Prinzips von Taqman® Sonden.**

(1 und 2) Die Taqman® Sonde trägt an ihrem 5'-Ende einen Reporter (=Donor; FAM™) und an ihrem 3'-Ende einen Quencher (=Akzeptor). Aufgrund des FRET-Effektes wird, solange sich Reporter und Quencher in räumlicher Nähe befinden, keine messbare Fluoreszenz freigesetzt. (3) Während der Elongationsphase der PCR trifft die AmpliTaq® Polymerase auf die Sonde und trennt durch ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität das Reporteremolekül ab. (4) Durch die räumliche Trennung zum Quencher wird die vom Reporter emittierte Fluoreszenz nicht mehr abgefangen und kann von einem optischen Detektionsmodul erfasst werden.

## MATERIAL

- cDNA der zu untersuchenden Proben
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (Difco)
- 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems)
- Taqman® Gene Expression Assay *FANCA* Hs00164555\_m1  
Reverse Primer *FANCA*  
Forward Primer *FANCA*  
FAM™-markierte MGB Sonde *FANCA*
- Taqman® Gene Expression Assay *ACTB* Hs99999903\_m1  
Reverse Primer  $\beta$ -Actin  
Forward Primer  $\beta$ -Actin  
FAM™-markierte MGB Sonde  $\beta$ -Actin
- Taqman® Universal PCR Master Mix, 2x (Applied Biosystems)  
AmpliTaq Gold®  
Passive Referenz ROX  
dNTPs
- PCR-Puffer Reagenzien
- Thermo-Fast 96 Detection Plate (Applied Biosystems)
- Sterilbank BDK

## DURCHFÜHRUNG

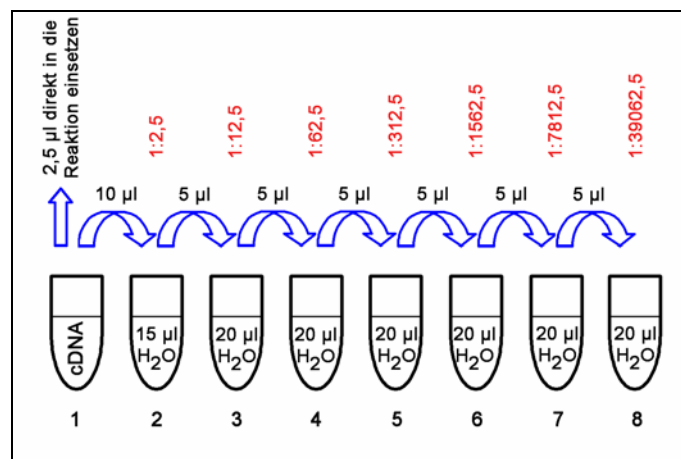
Als erstes wird in der „Sequence Detection System“ (SDS) Software von Applied Biosystems ein so genanntes „Platten Setup“ vorgenommen, nach welchem die Reagenzien dann in die 96-Loch Platte pipettiert werden (Abb. 14). Pro Probe werden 10 µl des Taqman® Universal PCR Master Mixes (enthält AmpliTaq® Polymerase), 1 µl des jeweiligen Taqman® Gene Expression Assays und 6,5 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> benötigt. Mit diesen Komponenten wird immer ein Master Mix hergestellt (auch bei nur zwei Proben), da sich kleinste Unregelmäßigkeiten in der Mengenzusammensetzung und Pipettier- Ungenauigkeiten ungünstig auf die Quantifizierung auswirken. 17,5 µl des Master Mixes werden dann in die entsprechenden Positionen der 96-Loch Platte pipettiert und mit 2,5 µl cDNA vermischt. Die Platte wird mit einer speziellen optischen Folie abgedichtet und kurz bei 200 x g abzentrifugiert. Die Platte wird im Thermocycler positioniert und das Laufprogramm über die SDS-Software initialisiert. Zunächst erfolgt eine Inkubation bei 50°C für 2 min und bei 95°C für 10 min. Dann werden die Proben für 15 s auf 95°C erhitzt und wieder auf 60°C gekühlt. Dieser Zyklus wird 45 Mal wiederholt, so dass ein Experiment nach ca. 2 h beendet ist.

Für die Berechnung der mRNA-Quantität muss eine Standardkurve mit einer unabhängigen Probe erstellt werden. Als sogenannter „Standard“ wird hier die Zelllinie RPEX1.5 verwendet, deren cDNA in einer Verdünnungsreihe verdünnt wird und dann wie weiter oben beschrieben in die QRT-PCR eingesetzt wird (Abb. 15). Es wird sowohl für das Zielgen *FANCA*, als auch für die endogene Kontrolle β-Actin eine Standardkurve mit diesem Standard erstellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B42-11 1 U	B42-11 1 U	B42-11 2 U	B42-11 2 U	B42-11 3 U	B42-11 3 U	B42-11 4 U	B42-11 4 U	B42-11 5 U	B42-11 5 U	B42-11 6 U	B42-11 6 U
B	B42-11 7 U	B42-11 7 U	B42-11 8 U	B42-11 8 U	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	NTC U	NTC U	GC U	GC U
C	BHY U	BHY U	CAL-33 U	CAL-33 U	HN_24419f U	HN_24419f U	HN_28400f U	HN_28400f U	HN_26410f U	HN_26410f U	HN_14452f U	HN_14452f U
D	HN_4400 U	HN_4400 U	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY
E	B42-11 1 U	B42-11 1 U	B42-11 2 U	B42-11 2 U	B42-11 3 U	B42-11 3 U	B42-11 4 U	B42-11 4 U	B42-11 5 U	B42-11 5 U	B42-11 6 U	B42-11 6 U
F	B42-11 7 U	B42-11 7 U	B42-11 8 U	B42-11 8 U	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY
G	BHY U	BHY U	CAL-33 U	CAL-33 U	HN_24419f U	HN_24419f U	HN_28400f U	HN_28400f U	HN_26410f U	HN_26410f U	HN_14452f U	HN_14452f U
H	HN_4400 U	HN_4400 U	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY

**Abbildung 14: Exemplarisches Beispiel einer Probenanordnung für die QRT-PCR.**

Jede Probe wird für eine genauere Quantifizierung in Dupli- oder Triplikaten angesetzt (blaue Markierung). Pro Platte werden eine Negativkontrolle und eine genomische Kontrolle (DNA) zu analysiert (rote Markierung), um die Spezifität der gemessenen Probenwerte zu garantieren. Jeder Taqman wird eine Farbe zugeteilt. Hellgrün: Standardkurve FANCA, dunkelgrün: Standardkurve  $\beta$ -Actin, pink: Test-cDNA FANCA, blau: Test-cDNA  $\beta$ -Actin.



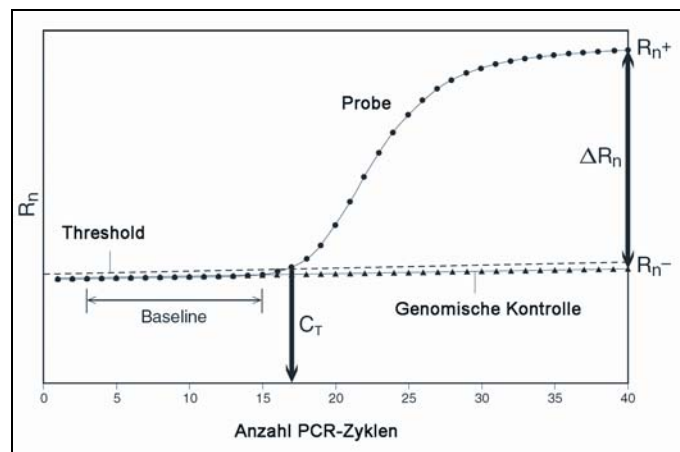
**Abbildung 15: Verdünnungsreihe des Standards für die QRT-PCR.**

Für die Erstellung der Standardkurve für die Erfassung der PCR-Effizienz wird die cDNA einer „Standardprobe“ sequenziell verdünnt. Aus jedem der Verdünnungsschritte 1-8 werden 2x 2,5 µl (Duplikate) in den Taqman® Assay eingesetzt.

### B.6.4 Auswertung der Real-Time-RT-PCR

Die relative Menge an FANCA-mRNA wird in Relation zu dem Haushaltsgen  $\beta$ -Actin berechnet. Dazu wird die Standardkurve des verwendeten Standards RPEX1.5 herangezogen, aus welcher die Menge einer unbekannt Probe extrapoliert werden kann. In Abbildung 16 ist der typische Verlauf einer QRT-PCR mit den verwendeten Termini dargestellt und erklärt.

Für die Auswertung werden die RNA-Mengen der Verdünnungsreihe logarithmiert und gegen die jeweiligen  $C_T$ -Werte aufgetragen. Daraus ergibt sich eine Gerade, die durch die Geradengleichung  $y = mx + b$  beschrieben wird.  $m$  gibt die Steigung der Geraden wieder und  $b$  beschreibt den Achsenabschnitt auf der Y-Achse bei dem die Gerade diese schneidet (Abb.16). Während  $m$  und  $b$  reelle Zahlen sind, stellen  $y$  und  $x$  Variablen dar. Als  $y$ -Wert wird der durchschnittliche  $C_T$ -Wert der in Duplikaten pipettierten Proben eingesetzt. Das Bestimmtheitsmaß „ $R^2$ “ der entstandenen Gerade wird aus der Kovarianz und den Einzelvarianzen berechnet und sollte möglichst nahe bei 1 liegen. Dieser Wert beschreibt einen exakten linearen Zusammenhang. Für die Berechnung der einzelnen RNA-Mengen der Proben werden deren  $C_T$ -Werte mit der jeweiligen Standardkurve in Beziehung gesetzt, indem die Geradengleichung nach  $x$  (= unbekannte RNA-Menge) aufgelöst wird. Es werden also pro Probe einmal die zwei  $C_T$ -Werte für das Zielgen mit der Standardkurve des Zielgens und die zwei  $C_T$ -Werte des Haushaltsgens mit der Standardkurve des Haushaltsgens in Beziehung gesetzt. Die erhaltenen Werte für jedes Gen werden delogarithmiert und gemittelt. Nun werden Ziel- und Haushaltsgen miteinander in Beziehung gesetzt, indem der Quotient von Zielgen/Haushaltsgen gebildet wird. Dieser wird zwischen den verschiedenen Proben und mit Referenzproben verglichen. Diese Gegenüberstellung erlaubt einen relativen Mengenvergleich der RNA verschiedener Proben.



**Abbildung 16: Graphische Darstellung einer QRT-PCR.**

In der graphischen Darstellung einer QRT-PCR wird das Fluoreszenzsignal gegen die PCR-Zyklenzahl aufgetragen. Baseline: Beschreibt die ersten PCR-Zyklen ohne messbare Fluoreszenzunterschiede; Threshold: Grenzwert innerhalb  $\Delta R_n$ , der über der Baseline in der exponentiellen PCR-Phase liegen soll;  $C_T$ : Threshold Cycle – beschreibt den Zyklus, bei dem die Fluoreszenz den Threshold übersteigt;  $R_n$ : Normalisierte Reporterfluoreszenz – Quotient aus Emission des Reporters und der passiven Referenz;  $R_{n+}$ :  $R_n$ -Wert eines Ansatzes mit allen Komponenten und cDNA;  $R_{n-}$ :  $R_n$ -Wert des Kontrollansatzes ohne cDNA;  $\Delta R_n$ : Ausmaß der Signalstärke ( $R_{n+}$ )-(  $R_{n-}$ ).

## B.7 Immunhistochemie (IHC)

Die Immunhistochemie (IHC) ist ein biologisches Verfahren, mit welchem Proteine mit Hilfe von Antikörpern in Geweben oder zytologischen Präparaten *in situ* visualisiert werden können. Somit kann das Vorhandensein und die Lokalisation bestimmter Proteine nachgewiesen werden. Dieser Nachweis beruht auf der so genannten „Antigen-Antikörper-Reaktion“, bei welcher der Antikörper an sein Antigen (=Epitop) nach dem „Schlüssel-Schloß-Prinzip“ bindet. Dabei passen Antikörper und Epitop ineinander wie ein Schlüssel in das entsprechende Schloss. Ein Antikörper für eine IHC zeichnet sich durch eine hohe Spezifität und Affinität gegen sein Antigen aus und zeigt somit keine Kreuzreaktionen mit strukturell ähnlichen Epitopen. Um die Verbindung zwischen Antikörper und Antigen sichtbar zu machen, gibt es wie bei der FISH (siehe B.5) eine direkte und eine indirekte Nachweismethode. Bei der ersten und älteren Methode ist der an das Antigen bindende Primärantikörper direkt markiert, d.h. an ein Enzym oder ein Fluorochrom gekoppelt. Bei der heute am Häufigsten angewandten Methode der indirekten IHC bindet zunächst ein unmarkierter Primärantikörper an sein Epitop. Die Visualisierung erfolgt hier durch einen markierten Sekundär- oder Tertiärantikörper, welcher gegen den Primär- oder Sekundärantikörper gerichtet ist. Die Markierung erfolgt wie bereits weiter oben erwähnt durch die Konjugation des Antikörpers an ein Fluorochrom oder Enzym. Fluorochrome können direkt im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden, während es bei einer Enzymmarkierung (z.B. Peroxidasen, Phosphatasen) noch eines Zwischenschrittes bedarf. Durch Zugabe eines entsprechenden Chromogens findet eine chemische Reaktion statt, das Chromogen wird in einen Farbstoff umgewandelt und kann mit einem entsprechenden Filter im Mikroskop nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine IHC an formalinfixierten Paraffin-Gewebeschnitten der HNO-Tumorfälle mit einem DNA Zugewinn auf 16q durchgeführt, um eine mögliche Amplifikation des *FANCA*-Gens auf Proteinebene zu untersuchen. Da es keine eindeutig definierte Standardisierung bei IHC-Experimenten gibt (Werner et al, 2000), müssen diverse Variationen bei der Hitzebehandlung der Gewebeschnitte, der Antikörperverdünnung und der Inkubationszeit mit dem Primärantikörper ausgetestet werden. Auch muss zunächst überprüft werden, ob der Antikörper paraffingängig ist. Dazu wurden von Herrn Axel Walch des Pathologischen Instituts des Helmholtz Zentrum München Gewebe-Arrays mit 35 HNO-Gewebeproben zur Verfügung gestellt. Bei dem verwendeten Antikörper gegen *FANCA* handelt es sich um einen polyklonalen Antikörper aus Kaninchen, welcher gegen die Aminosäuren 1156-1455 am C-Terminus des Proteins gerichtet ist.



### **B.7.1 Entparaffinierung der Gewebeschnitte**

#### MATERIAL

- Ethanol absolut p.a. (Merck)
- Ethanol 90% (B.2.4)
- Ethanol 70% (B.2.3)
- Isopropanol (Merck)
- OT mit Gewebeschnitten
- Schüttelblock
- 1 x TBS  
Tris buffered salt 50 mM, pH 8 (TBS; Sigma) in 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen
- Xylol (Merck)

#### DURCHFÜHRUNG

Die Entparaffinierung der Gewebeschnitte für die IHC erfolgt weitgehend wie unter B.3.1.1.1 beschrieben. Durch ständiges Schütteln der Küvetten auf einem Schüttelblock verkürzen sich jedoch die Inkubationszeiten, so dass 2 x in Xylol für 10 min und jeweils für 5 min in Isopropanol, 100%igem, 90%igem und 70%igem Ethanol gewaschen wird. Aufgrund der alkalischen Phosphatase des verwendeten Detektionssystems werden die Schnitte nach dem Entparaffinieren nicht in PBS, sondern in TBS gestellt. Die enzymatische Reaktivität der Phosphatase würde durch die Phosphationen in einer PBS-Lösung stark inhibiert werden.

### **B.7.2 Hitzebehandlung der Gewebeschnitte**

Nach der Entparaffinierung werden die Gewebeschnitte in Citrat- oder Tris-EDTA-Puffer 40 min lang gekocht. Dieser Schritt dient der hitzeinduzierten Epitopdemaskierung, welche die durch die Fixierung der Gewebe verloren gegangene Immunreaktivität teilweise wieder herstellen kann, indem die durch das Formaldehyd entstandenen Quervernetzungen im Gewebe wieder gelöst werden (Werner, 2000). Welcher Puffer am besten geeignet ist, muss ausgetestet werden.

**B.7.2.1 Hitzebehandlung mit Citratpuffer**MATERIAL

- Citratpuffer 10 mM  
Stammlösung A: Citronensäure 0,1 M (Merck) 19,2 g  
ad 1 l mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>
- Stammlösung B: Natriumcitratdihydrat 0,1 M (Sigma) 29,4g  
ad 1 l mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>
- Stammlösung A 18 ml
- Stammlösung B 82 ml  
ad 1000 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>  
pH 6,0 mit 1 N NaOH einstellen
- Ethanol absolut p.a. (Merck)
- Ethanol 70% (B.2.3)
- Ethanol 90% (B.2.4)
- Isopropanol (Merck)
- Mikrowelle MWD 1820 Duo (Bauknecht)
- OT mit Gewebeschnitten
- 1 x TBS
- Tris buffered salt 50 mM, pH 8 (TBS; Sigma) in 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen
- Xylol (Merck)

DURCHFÜHRUNG

Die Durchführung erfolgt wie unter B.5.2.2.1 beschrieben, nur dass die Schnitte für 40 min bei 350 W in einer Mikrowelle gekocht werden.

**B.7.2.2 Hitzebehandlung mit Tris-EDTA-Puffer**MATERIAL

- Tris-EDTA-Saline-Puffer (TES-Puffer)  
Tris 10 mM (Merck) 1,21 g  
NaCl 10 mM (Merck) 0,58 g  
EDTA 1 mM (Merck) 0,37 g  
ad 1 l mit, pH 7,6 mit HCl 1N (Merck) einstellen  
autoklavieren

Die Materialien stimmen mit den unter B.6.2.1. beschriebenen überein, außer dass anstelle des Citratpuffers Tris-EDTA-Puffer eingesetzt wird.

DURCHFÜHRUNG

Die Durchführung erfolgt wie unter B.5.2.2.1 beschrieben, nur dass die Schnitte für 40 min bei 350 W in einer Mikrowelle in Tris-EDTA-Puffer gekocht werden.

**B.7.3 Antikörperreaktion**

Bevor der Antikörper auf die Gewebeschnitte gegeben werden kann, müssen diese durch Blocken mit einem 5%igem Serumgemisch der Ziege abgesättigt werden. Es wird immer mit dem Serum des Organismus geblockt, aus dem die sekundären Antikörper stammen. Die richtige Verdünnung des primären Antikörpers muss ausgetestet werden.

MATERIAL

- Primärer Antikörper: FANCA (H-300): sc-28215 (Santa Cruz Biotechnology)
- Antikörperverdünnung in Dako REAL™ Antibody Diluent:
 

1:25 →	4 µl FANCA + 96 µl Antibody Diluent
1:50 →	2 µl FANCA + 98 µl Antibody Diluent
1:100 →	1 µl FANCA + 99 µl Antibody Diluent
1:200 →	0,5 µl + 99,5 µl Antibody Diluent
- Blockinglösung:
 

Dako REAL™ Antibody Diluent (Dako)	950 µl
Serum der Ziege	50 µl
- Dako REAL™ Antibody Diluent (Dako)
- Feuchte Kammer
- Gewebeschnitte oder Gewebe-Arrays

DURCHFÜHRUNG

Zur Absättigung der Gewebeschnitte werden in der Regel 100 µl der Blockinglösung auf die Objektträger pipettiert und für 15-20 min in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Die Inkubationszeit kann bei starkem Hintergrund verlängert werden. Danach lässt man das Serum ablaufen und gibt 100 µl der verdünnten Antikörperlösung auf die Schnitte und inkubiert wahlweise 1 h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer.

### B.7.4 Detektion des Antikörpers

Das hier verwendete Detektionssystem der Firma Dako beruht auf einem indirekten Streptavidin-Biotin-Verfahren. Jeder biotinylierte Sekundärantikörper reagiert durch eine optimale Markierung mit sieben Biotinmolekülen. Diese wiederum haben mehrere, mit alkalischer Phosphatase konjugierte, Streptavidinmoleküle gebunden, wodurch die Empfindlichkeit des Detektionssystems erhöht wird.

#### MATERIAL

- Dako REAL™ Detecion System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse Biotinylierte Sekundärantikörperlösung (AB2), 100 ml gebrauchsfertig  
Streptavidin Alkalische Phosphatase (AP), 100 ml gebrauchsfertig  
Chromogen Red 1, 8 ml 28-fach konzentriert  
Chromogen Red 2, 8 ml 28-fach konzentriert  
Chromogen Red 3, 8 ml 28-fach konzentriert  
AP Substratpuffer, 250 ml gebrauchsfertig  
Levamisol-Lösung gepuffert, 1 ml 501-fach konzentriert
- Einschlussharz Pertex (Medite GmbH)
- Ethanol absolut p.a. (Merck)
- Ethanol 70% (B.2.3)
- Ethanol 90% (B.2.4)
- Gewebeschnitte, mit primärem Antikörper inkubiert
- Hämatoxylin nach Mayer (Fluka)
- Heizofen (Memmert)
- Küvetten (Glaswerk Wertheim)
- Substrat-Arbeitslösung (CHROM); Herzustellen direkt vor Gebrauch
 

Dako REAL™ AP Substratpuffer	750 µl
Levamisol	7 Tropfen
Dako REAL™ Chromogen Red 1	30 µl
Dako REAL™ Chromogen Red 2	30 µl
Dako REAL™ Chromogen Red 3	30 µl
- 1 x TBS  
Tris buffered salt 50 mM, pH 8 (TBS; Sigma) in 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen
- Xylol (Merck)

## DURCHFÜHRUNG

Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper werden die Gewebeschnitte zum Abwaschen der Antikörperlösung in eine Küvette mit TBS gestellt. Es wird kurz geschüttelt, das TBS unter festhalten der OTs ausgeleert und neues TBS nachgeschüttet. Nach erneutem Schütteln werden die OTs mit einem Papiertuch um die Gewebeschnitte herum abgetrocknet, so dass die Schnitte selbst noch feucht bleiben. Dann werden 2-3 Tropfen der sekundären, biotinylierten Antikörper-Lösung (AB2) auf die Schnitte gegeben und bei RT in der feuchten Kammer inkubiert. Durch die Oberflächenspannung des Flüssigkeitsfilms auf den Gewebeschnitten verteilt sich der Antikörper nur in diesem Bereich des OTs, so dass keine zusätzliche Abdeckung durch eine Folie oder ein Deckglas erforderlich ist. Nach 20 min werden die Schnitte in TBS gewaschen, bevor die Inkubation mit dem an alkalische Phosphatase konjugiertem Streptavidin (AP) für 15 min bei RT erfolgt. Während dieser Inkubation wird die Substrat-Arbeitslösung (CHROM) wie oben beschrieben hergestellt, welche unbedingt innerhalb von 20 min verbraucht werden muss. Die Zugabe des Levamisols führt zum Abblocken der im Gewebe vorkommenden endogenen Phosphatase, welche eine unspezifische Färbung hervorrufen würde. 100 µl der Substrat-Arbeitslösung lässt man dann für 10 min bei RT auf die Gewebeschnitte einwirken, bevor sie erneut in TBS gewaschen werden. Im Anschluss daran wird für 30 – 45 s in Hämatoxylin-Lösung gefärbt und sofort mit mineralisiertem H<sub>2</sub>O gespült. Zuletzt werden die OTs kurz in 70%igem, 90%igem, 100%igem und zweimal in Xylol gespült. Nun können die gefärbten Gewebeschnitte mit einem Einschlussharz eingedeckt und zum Trocknen zunächst 10 min bei RT, und dann für 1 h bei 60°C in einen Ofen gegeben werden.

### **B.7.5 Auswertung der IHC**

Die Auswertung der IHC erfolgt an einem Durchlichtmikroskop der Firma Zeiss. Dort, wo der primäre Antikörper an sein Epitop gebunden hat, wird durch das verwendete Chromogen ein kontrastreiches rotes Endprodukt erzeugt. Die Gegenfärbung durch Hämalaun stellt sich als blau dar.

## B.8 Zellkultur

### B.8.1 Allgemeine Methoden: Kultivierung von Zellen

#### MATERIAL

- Ampullen 1,0 ml Cryotube™ Vials (Nunc A/S)
- Brutschrank (Heraeus)
- Bunsenbrenner Fireboy Plus (Vitaris)
- Coulter Counter Z1 (Beckmann Coulter)
- Einfriermedium 30 ml (20% FCS, 10% DMSO), 4°C
 

FCS (Gibco)	6 ml
Kulturmedium	21 ml
DMSO (Sigma)	3 ml
- Einfriermodul mit Isopropanol: Nalgene™ Cryo 1°C (Nalge Nunc International)
- ERGs (Eppendorf)
- Kulturmedium (Gibco)
- Invertoskop MT2 (Olympus)
- NaCl 0,9%
 

NaCl	9 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> (Gibco)	1000 ml
Steril filtrieren (0,2 µm)	
- PBS 1x (B.2.9)
- Sterilbank Laminair® HBB 2472S (Heraeus)
- Trypsin-EDTA 0,5% (Gibco)
- Sterilfilter Stericup™ 0,2 µm (Millipore)
- Stickstofftank (Air Liquide Kryotechnik)
- Zählröhrchen (Coulter Beckmann) mit 19,8 ml 0,9%iger NaCl-Lösung
- Zellkulturflaschen (Greiner-bioone Cellstar®)
- Zentrifuge 3K15 (Sigma Laborzentrifugen)
- Zentrifugenröhrchen 15 ml (Falcon)

### DURCHFÜHRUNG

Die Zellen werden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert und bei entsprechender Dichte geerntet. Dafür wird das Kulturmedium unter der Sterilbank mit einer Glaspipette abgezogen und die Zellen erst mit PBS (T<sub>25</sub>-Kulturflasche: 5 ml, T<sub>75</sub>-Kulturflasche: 10 ml, T<sub>175</sub>-Kulturflasche: 15 ml), dann mit Trypsin (T<sub>25</sub>-Kulturflasche: 1,5 ml, T<sub>75</sub>-Kulturflasche: 2 ml, T<sub>175</sub>-Kulturflasche: 3 ml) gewaschen. PBS und Trypsin werden jeweils nach kurzem Schwenken der Kulturflaschen sofort wieder abgesaugt. Dann werden die Zellen trypsiniert (T<sub>25</sub>-Kulturflasche: 1,5 ml, T<sub>75</sub>-Kulturflasche: 2,5 ml, T<sub>175</sub>-Kulturflasche: 5 ml). Die Inkubation erfolgt im Brutschrank bei 37°C bis sich die Zellen vollständig vom Flaschenboden abgelöst haben (Kontrolle unter dem Mikroskop). Ist dies der Fall, wird die Zellsuspension mit einer 1 ml-Glaspipette durchgemischt, um ein Verklumpen der Zellen zu vermeiden. Dann wird das Trypsin durch Zugabe von mit Serum komplettiertem Medium neutralisiert (T<sub>25</sub>-Kulturflasche: 3 ml, T<sub>75</sub>-Kulturflasche: 5 ml, T<sub>175</sub>-Kulturflasche: 6 ml). Die Reaktion ist nun abgestoppt und das Trypsin wirkt sich nicht weiter toxisch auf die Zellen aus. Es wird durchgemischt und die Suspension in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Davon werden je 0,2 ml in ein Zählreaktionsgefäß (1:100 Verdünnung) gegeben. Durch mehrmaliges Umschwenken wird gemischt und dann im Coulter-Zellmessgerät durch eine Messung im elektrischen Feld die Zellzahl ermittelt. Je nach Zellzahl werden die Zellen weiterverarbeitet.

### Zellpellet für die Isolierung von RNA /DNA

Es wird eine entsprechende Zellzahl in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und bei 300 x g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wird in 1,8 ml PBS resuspendiert und in ein ERG überführt. Es wird wieder zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird nun bei -20°C (DNA, Western-Blot) oder -80°C (RNA) gelagert.

### Passagieren der Zellen

Die Zellen werden durch Zentrifugation pelletiert, in einer entsprechenden Menge Medium aufgenommen und in die bereits mit Medium befüllten Kulturflaschen (T<sub>25</sub>-Kulturflasche: 5 ml; 1-2x10<sup>5</sup> Zellen, T<sub>75</sub>-Kulturflasche: 15 ml; 1x10<sup>6</sup> Zellen, T<sub>175</sub>-Kulturflasche: 25 ml; 2-4x10<sup>6</sup> Zellen) überimpft. Die Kulturflaschen werden zum Durchmischen geschwenkt und in den Brutschrank gestellt. Nach einigen Stunden kann überprüft werden, ob die Zellen sich angeheftet haben.

## Cryopräservation von Zellen

Um die Zellen langfristig zu lagern, werden einige Ampullen einer jeden Zelllinie in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Zellsuspension wird nach dem Zählen wie oben beschrieben zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in einer entsprechenden Menge Einfriermedium aufgenommen ( $1 \times 10^6$  Zellen/Ampulle) und in jede Ampulle wird 1 ml Medium gegeben. Das DMSO im Einfriermedium verhindert eine Kristallbildung und macht die Zellmembran elastisch, so dass die Zellen während des Einfrierens bzw. Auftauens keinen Schaden nehmen. Sind die Ampullen befüllt, werden sie in ein spezielles Einfriermodul gestellt, welches dann zunächst für einige Stunden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gestellt wird. Dadurch werden die Zellen langsam gekühlt (ca.  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) und werden dann in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank langfristig gelagert.

## **B.8.2 Verwendete Zelllinien**

### **B.8.2.1 Zelllinie Cal-33**

Die Zelllinie Cal-33 wurde bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) käuflich erworben, die bekannten wissenschaftlichen Daten sind in Tabelle 4 dargestellt. Sie wurde aus einem vor der Therapie chirurgisch entfernten Fragment einer Zungenläsion eines Mannes mit mäßig differenziertem Plattenepithelkarzinom etabliert (Gioanni et al., 1988).

**Tabelle 4: Charakteristika der Zelllinie Cal-33 nach Angaben des DSMZ.**

<b>Befunde</b>	
Mycoplasmen	Negativ (DAPI, mikrobiologische Kultur, RNA Hybridisierung, PCR)
Immunologie	Cytokeratin-positiv, Desmin-, Endothel-, GFAP-, Neurofilament-, Vimentin-negativ
Zytogenetik	Menschlicher hyperdiploider Karyotyp mit 4% Polyploidie. $49(45-49)<2n>XY/XYY, +7, +9, -18, +20, +mar, add(X)(p22), add(3)(p22-24), i(7p), i(8q), add(9)(p24), del(9)(p2??2)$
Virus	PCR: EBV-, HBV-, HCV-, HIV-, HTL-I/II-, SMRV-negativ



Kultivierungsbedingungen der Zelllinie Cal-33MATERIAL

- Auftaumedium: DMEM/F-12 / 10% FCS
 

DMEM/F-12 (Gibco)	500 ml
FBS Fetales Rinderserum (Gibco)	55 ml
- Brutschrank (Heraeus)
- Kulturmedium: DMEM/10% FBS
 

DMEM 4,5 g/L Glukose (Gibco)	500 ml
FBS (Gibco)	55 ml
Penicillin/Streptomycin 10 000 U/ml (Gibco)	2,5 ml
- Kulturmedium: RPMI/10% FBS
 

RPMI 1640 mit L-Glutamin (Gibco)	500 ml
FBS (Gibco)	55 ml
Penicillin/Streptomycin 10 000 U/ml (Gibco)	2,5 ml
- Wasserbad (GFL)
- Zellkulturflaschen (Greiner-bioone Cellstar®)
- Zentrifuge 3K15 (Sigma Laborzentrifugen)
- Zentrifugenröhrchen 15 ml (Falcon)

DURCHFÜHRUNG

Nach Erhalt der tiefgefrorenen Zellen wird mit ihnen ähnlich verfahren wie unter B.8.2.1.1 beschrieben. Es unterscheiden sich lediglich die Kulturmedien, in denen die Zellen angezüchtet werden.

**B.8.2.2 Zelllinie BHY**

Die Zelllinie BHY wurde ebenfalls bei der DSMZ käuflich erworben, die wissenschaftlichen Daten sind in Tabelle 5 dargestellt. Es handelt sich um Zellen eines humanen oralen Plattenepithelkarzinoms (Zahnfach), welches hoch invasiv auch Kieferknochen und die Muskelschicht des Mundbodens befallen hat. Die Zelllinie wird als tumorigen in Nacktmäusen beschrieben und sollen im Weichagartest Kolonien bilden können (Kawamata et al., 1997).

**Tabelle 5: Charakteristika der Zelllinie BHY nach Angaben des DSMZ.**

<b>Befunde</b>	
Mycoplasmen	Kontamination mit Baytril behoben, dann negativ (DAPI, mikrobiologische Kultur, RNA Hybridisierung, PCR)
Immunologie	Cytokeratin-, cytokeratin-17-, cytokeratin-18-positiv, cytokeratin-7-, cytokeratin-8-, , Desmin-, Endothel-, GFAP-, Neurofilament-, Vimentin-negativ
Zytogenetik	Menschlicher hypotriploider Karyotyp mit 28% Polyploidie. 61-68<3n>XX, -Y, -1, -2, +4, -5, -6, +9, +11, -13, +15, -17, -18, +20, -21, +3-4 mar, del(X)(q11q21), add(1)(q11), ?inv(2)(p17q11), add(2)(q11), del(3)(p11p14.3)x2, i(4p), add(4)(q3?1), del(5)(q13), add(5)(p15)x1-2, der(8;19)(q10;q10), add(9)(q34), add(9)(p11), del(10)(p13), del(10)(q23), der(11)t(1;11)(q11;q25), add(12)(p11), add(12)(q13-21), add(13)(p11), add(16)(q24), del(16)(p13), add(17)(p12), add(18)(p11), add(19)(q13)-3-10 dmin in manchen Zellen
Virus	ELISA: Reverse Transkriptase negative PCR: EBV-, HBV-, HCV-, HIV-, HTL-I/II-, SMRV-negativ

*Kultivierungsbedingungen der Zelllinie BHY*

Die Kultivierung der BHY Zelllinie erfolgt wie unter B.8.2.1 beschrieben.

**B.8.3 Charakterisierung der verwendeten Zelllinien****B.8.3.1 Koloniebildungs-Test**

Der Koloniebildungs-Test oder die „Plating Efficiency“ (PE) einer Zelllinie ist das Verhältnis von anwachsenden, koloniebildenden Zellen zur Anzahl an ursprünglich ausplattierten Zellen. Die PE errechnet sich aus folgender Formel:

$$PE (\%) = \text{Anzahl gezählter Kolonien} / \text{Anzahl ursprünglich ausgesäter Zellen}$$

MATERIAL

- Brutschrank 37°C, 5% CO<sub>2</sub> (Heraeus)
- Giemsa-Lösung 10%ig  
   Giemsa (Merck) 10 ml  
   H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> 90 ml
- H<sub>2</sub>O
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>
- Kulturmedium
- Methanol (Merck)
- PBS 1x (B.2.9)
- Zellen definierter Anzahl
- Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen, Falcon® (Beckton Dickinson)

DURCHFÜHRUNG

Die Zellen werden in definierter Anzahl (z.B. 50, 100, 300) ausplattiert und unter normalen Bedingungen kultiviert. Bei Bedarf wird ein Mediumwechsel vollzogen. Nach etwa zehn Tagen werden die Zellen fixiert und gefärbt. Dafür werden sie zunächst mit PBS gewaschen, dann wird pro Vertiefung 2 ml Methanol auf die Zellen gegeben und für 30 min inkubiert. Das Methanol wird abgenommen und 3 ml 10%ige Giemsa-Lösung aufpipettiert. Nach erneuten 30 min werden die Vertiefungen erst mit Leitungswasser, dann mit destilliertem Wasser ausgespült. Nach dem Trocknen können die entstandenen Kolonien ausgezählt werden.

**B.8.3.2 Array-CGH**

Die Array-CGH der Zelllinien wird wie unter B.4 beschrieben durchgeführt. Es werden 1 Mb BAC Arrays verwendet.

**B.8.3.3 Spektrale Karyotypisierung (SKY)**

Die Spektrale Karyotypisierung (SKY; Schröck et al., 1996) ist eine molekularzytogenetische Methode, bei welcher alle 24 humanen Chromosomen in nur einem Experiment in unterschiedlichen Farben dargestellt werden können. Wie die CGH (B.3) stellt auch die SKY eine Sonderform der FISH (B.5) dar, bei der so genannte „Painting Sonden“ für alle Chromosomen verwendet werden, um chromosomale Austausch-Aberrationen

sichtbar zu machen. Bei einer SKY können insbesondere interchromosomale Veränderungen wie Translokationen und Insertionen erkannt, und die zu Grunde liegenden Bruchpunkte bandengenau bestimmt werden. Intrachromosomale Umbauten hingegen sind nur bedingt erfassbar, da hierbei keine Farbsprünge entstehen. Die chromosomenspezifische Anfärbung bei einer SKY erfolgt durch die Hybridisierung so genannter „Whole Chromosome Paint“- (WCP)-Sonden, welche mit einer für jedes Chromosom eigenen Kombination aus fünf Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Dadurch wird für jedes einzelne Chromosom eine einzigartige spektrale Markierung erzielt, welche mit Hilfe eines Interferometers erfasst werden kann.

#### **B.8.3.3.1 Thiocyanat- und RNase-Vorbehandlung der Metaphasepräparate**

Durch eine RNase Behandlung wird die endogene RNase der Zellen zerstört, was eine Verringerung der unspezifischen Sondenbindung zur Folge hat. Dadurch kann das Signal-Hintergrund-Verhältnis und somit das Hybridisierungsergebnis verbessert werden.

#### MATERIAL

- Deckgläser 24x25 mm ( )
- Feuchte Kammer im Wärmeschrank 37°C
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>
- Heizplatte
- Küvetten (Glaswerk Wertheim)
- Metaphasepräparate (Herstellung siehe B.3.2.1)
- PBS 1x (B.2.9)
- RNase-Lösung verdünnt
 

RNase 10 mg/ml (Fermentas)	0,5 µl
2xSSC (B.2.13)	99,5 µl
Aliquotieren, bei -20°C lagern	
- Thiocyanatlösung 1M
 

Natrium Thiocyanat (Sigma)	6,5 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> (Gibco)	ad 100 ml
Dunkel lagern	
- Wärmeschrank (Memmert)

DURCHFÜHRUNG

Nach Vorheizen der Heizplatte auf 95°C werden die zu behandelnden Metaphasepräparate für 1 h gebacken. Danach wird die Temperatur auf 90°C gesenkt und pro OT werden 100 µl der Thiocyanatlösung aufgetragen. Jeder OT wird mit einem Deckglas abgedeckt und für 10 min inkubiert; sollten die Ränder austrocknen wird noch etwas Lösung nachpipettiert. Dabei ist es wichtig das Deckglas nicht zu verschieben, da dadurch Kratzer im Präparat entstehen können. Anschließend werden die OT in eine Küvette mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gestellt, wo sich das Deckglas ablöst. Es folgen 2 Waschschrte in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> für 5 min bevor mit dem RNase-Verdau fortgefahren wird. Dafür werden die OT zunächst 2x 5 min in 2xSSC bei RT gewaschen, bevor auf jeden OT 100 µl der verdünnten RNase-Lösung gegeben werden und eine Inkubation für 6 min bei 37°C in einer feuchten Kammer erfolgt. Im Anschluss daran werden die OT 3 min in 2xSSC und 3 min in 1x PBS gewaschen. Die OT können nun direkt für die Hybridisierung denaturiert werden, oder mit einer aufsteigenden (70%, 90%, 100%) Alkoholreihe dehydriert und bei -20°C gelagert werden.

**B.8.3.3.2 Hybridisierung, Waschen und Detektion**MATERIAL

- Anti-Digoxigenin, monoklonaler Antikörper, 0,1 mg/ml (Roche)
- Cy5-konjugiertes Avidin 1 mg/ml (Biomol)
- Cy5.5-konjugiertes Avidin 1 mg/ml (Biomol)
- DAPI/Vectashield (B.2.1)
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>
- Hybridisierung: Siehe Material B.3.3
- Fixogum Montagekleber (Marabu)
- PN-Puffer (B.2.10)
- PNM-Puffer (B.2.11)
- SKYPaint™ DNA Kit H-10 für menschliche Chromosomen (Applied Spectral Imaging)
- SSC 0,5x  
SSC 2x (B.2.13) 100 ml  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> 300 ml
- SSC 4x/0,1% Tween  
SSC 20x (B.2.12) 100 ml

H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	400 ml
Tween <sup>®</sup> 20 (Sigma)	500 µl

- Wasserbad (GFL)

### DURCHFÜHRUNG

Die Hybridisierung der SKY erfolgt im Wesentlichen wie unter B.3.3 beschrieben, wobei die SKY-Sonde kommerziell erworben wird (Applied Spectral Imaging). Die Denaturierungszeit dieser Sonde beträgt bei 80°C 7 min. Danach erfolgt für mindestens 1 h eine Vorhybridisierung bei 37°C, bevor 10 µl der Sonde auf die denaturierten OT (B.3.2.2; BHY 9 min, Cal-33 6 min) aufgetragen werden.

Nach ca. 24 h Hybridisierung bei 37°C wird der Montagekleber vorsichtig entfernt und das Deckglas in 2xSSC bei RT abgelöst. Es folgen dann drei Waschschrte: 5 min in 0,5xSSC bei 75°C im Wasserbad, 2 min in 4xSSC/0,1% Tween bei RT und 2 min in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> bei RT. Dann wird wie unter B.3.4 beschrieben mit PNM-Puffer für 30 min geblockt. Währenddessen werden die Antikörper vorbereitet (siehe Tab. 6). Nach dem Blocken werden pro OT 50 µl der Antikörperschicht 1 aufgetragen, der OT mit einer zugeschnittenen Plastikfolie abgedeckt und für 45 min in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Bevor 50 µl der zweiten Antikörperschicht für 45 min aufgetragen wird, erfolgen zwei Waschschrte bei 37°C in PN-Puffer. Nach der Detektion werden die OT erneut 2x 2min in PN-Puffer gewaschen, getrocknet und mit DAPI/Vectashield eingedeckt.

**Tabelle 6: Antikörper für die SKY**

<b>Antikörper</b>	<b>Antikörperlösung [µl]</b>	<b>PNM [µl]</b>
Anti-Digoxigenin (1:250)	5	1245
Cy5-Avidin (1:100)	5	495
Cy5,5-Avidin (1:100)	5	495
<b>Antikörperschicht</b>	<b>Verdünnte Antikörperlösungen 1:1</b>	
Schicht 1	Anti-Digoxigenin	
Schicht 2	Cy5-Avidin + Cy5,5-Avidin	

#### **B.8.3.3.3 Auswertung der SKY**

Die Auswertung der SKY-Präparate erfolgt an einem Epifluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Zeiss) mit einer Interferometer-CCD-Kamera-Kombination (SpectraCube, Applied Spectral Imaging). Der nachgeschaltete Computer ist mit einer speziellen Auswertesoftware „SkyView“ (Applied Spectral Imaging) ausgestattet. Das Mikroskop verfügt über einen DAPI-Filtersatz und einen SKY1-Multibandpassfilter (Chroma Technology), wobei die Anregung von DAPI durch gefiltertes Licht einer HBO103 Quecksilberdampflampe, die der Fluorochrome durch entsprechend gefiltertes Licht einer XBO 75W/2 Xenondampflampe erfolgt. Pro zu untersuchendem Fall werden mindestens 15 Metaphasen aufgenommen und ausgewertet. Im farbigen Bild werden pro Pixel die Spektren gemessen und mit den Referenzspektren der verwendeten Fluorochrome verglichen, um dann bei der automatischen Karyotypisierung jeder chromosomalen Mischfarbe eine für das menschliche Auge eindeutige Falschfarbe zuzuordnen. Das Ergebnisbild einer SKY ist ein Karyogramm, welches für jedes Chromosom die G-Bänderung (inverse DAPI-Bänderung), das spektrale und das Falschfarbenbild beinhaltet. Anhand dieses Bildes können dann die chromosomalen Veränderungen als Farbsprünge im Karyogramm erkannt werden.

#### **B.8.3.4 Real-Time RT-PCR**

Die Real-Time RT-PCR der Zelllinien wird wie unter B.6.1.2 beschrieben durchgeführt.

## B.9 Herstellung transgener Zelllinien

Um den Effekt der Überexpression des Kandidatengens „*FANCA*“ funktionell zu untersuchen, sollen die in B.8.2 beschriebenen HNO-Tumorzelllinien transfiziert werden.

Transfektion bezeichnet die Aufnahme von DNA durch eukaryotische Zellen, in diesem Fall die Aufnahme eines stabilen Expressionsvektors, in welchen das *FANCA*-Gen inseriert ist. Die Transfektion von eukaryotischen Zellen kann durch verschiedene Verfahren wie der Calciumphosphat-Methode, der DEAE-Dextran-Methode, der Liposomen-Technik oder der Elektroporation von Zellen erfolgen (Lottspeich und Zorbas, 1998). In dieser Arbeit wird das Polyfect® Transfektions-Reagenz von Qiagen verwendet. Dazu wird das Gen zunächst selektiv amplifiziert, in einen Klonierungsvektor kloniert, in kompetente Bakterien transformiert, isoliert und analysiert. Ein Klon mit korrektem „Insert“ wird dann in großem Maßstab angezüchtet und das Plasmid erneut isoliert. Das Gen wird aus dem Plasmid geschnitten und in einen Expressionsvektor, welcher eine hohe Expression in Säugerzellen aufweist, ligiert. Dieser Expressionsvektor wird dann in Zelllinien transfiziert.

### B.9.1 Selektive Amplifikation des *FANCA* Gens aus cDNA

Als Erstes muss die Isolation des Kandidatengens erfolgen. Da man nur die tatsächlich exprimierten Anteile des Gens benötigt, wird das Gen aus der cDNA einer Zelllinie selektiv amplifiziert. Somit sind nur die Exon-, nicht aber die Intronsequenzen im PCR Produkt enthalten. Die Isolation der RNA und die Herstellung der cDNA erfolgt wie unter B.6.2 beschrieben. Es werden zwei Ansätze mit unterschiedlichen Polymerasen (Herculase® II Fusion DNA Polymerase und Paq5000™ DNA Polymerase) ausgetestet und mit dem besseren Resultat weitergearbeitet. Die Primer werden mit Hilfe des Online-Dienstes „Primer Search“ von Invitrogen so ausgesucht, dass die 3'-Primerbindungsstelle ca. 5 bp vor dem Startcodon (ATG) des Gens liegt.

#### MATERIAL

- Agarosegel 1,5% (B.3.1.1.5.3)
- Auftragspuffer (6x Loading Dye Solution, MBI Fermentas)
- cDNA aus RPEX1.5



- dNTP-Mix 10 mM
- dNTP-Mix 100 mM (MBI Fermentas) 100 µl
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> 900 µl
- Eis
- Elektrophoreseapparatur 3000xl (BioRad)
- Geldokumentationssystem BioDoc Analyze (Biometra)
- Größenstandard 1kb (GeneRuler™, MBI Fermentas)
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>.
- Herculase® II Fusion DNA Polymerase (Stratagene)
- 5 x Herculase II Fusions DNA Polymerase Puffer
- Paq5000™ DNA Polymerase (Stratagene)
- 10 x Paq5000™ Reaktionspuffer
- PCR-Reaktionsgefäße Thermo-Tube 0,2 ml (Abgene)
- PCR-Maschine GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- Primer, lyophilisiert und entsalzt, 100 µM (Metabion)
- *FANCA*-fwd 5'- A AGG CCA TGT CCG ACT-3'
- *FANCA*-rev 5'- CCG TCA GAA GAG ATG AGG CT-3'
- Primer verdünnt, 10 µM
- Primer 100 µM 100 µl
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> 900 µl
- Sterilbank (BDK)
- TAE-Puffer (B.3.1.1.5.3)

### DURCHFÜHRUNG

Zunächst werden die benötigten Reagenzien aufgetaut und die Primer und der dNTP-Mix wie oben beschrieben verdünnt. Die zwei Ansätze werden wie in Tabelle 7 beschrieben auf Eis zusammen pipettiert und gemischt.

**Tabelle 7: Pipettierschema der selektiven *FANCA*-Amplifikation aus cDNA.**

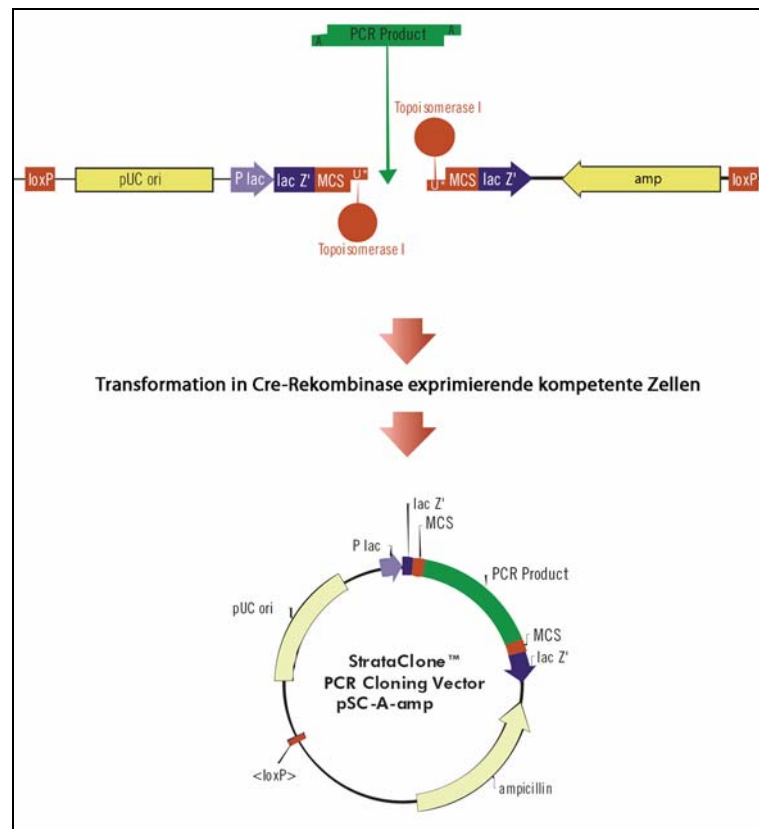
<b>Ansatz 1</b>	<b>Menge [µl]</b>	<b>Ansatz 2</b>	<b>Menge [µl]</b>
Paq5000™ DNA Polymerase	0,5	Herculase® II Fusion DNA Polymerase	0,5
10 x Paq5000™ Reaktions-	5	5 x Herculase II Fusions DNA	10
10 mM dNTP-Mix	1	10 mM dNTP-Mix	1
10 µM <i>FANCA</i> -fwd	1	10 µM <i>FANCA</i> -fwd	1
10 µM <i>FANCA</i> -rev	1	10 µM <i>FANCA</i> -rev	1
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	39,5	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	34,5
cDNA	2	cDNA	2

Die Amplifikation erfolgt im PCR-Maschine mit folgendem Programm: 95°C für 5 min, 95°C für 30 sec, (5°C für 30 sec, 72°C für 4 min) x 39, 72°C für 7 min und 4°C für ∞. Nach der PCR erfolgt eine Gelkontrolle mit 1,5%iger Agarose wie unter B.3.1.1.5.3 beschrieben.

### **B.9.2 Klonierung des *FANCA* Gens in den Vektor pSC-A**

Die Klonierung des Gens in einen Vektor erfolgt mit Hilfe des „StrataClone™ PCR Cloning Kits“ der Firma Stratagene. Dieses macht sich die kombinierten Aktivitäten der Topoisomerase I (*Vaccinia* Virus) und der Cre-Rekombinase (Bakteriophage P1) zu nutze. Topoisomerase I hilft *in vivo* bei der DNA Replikation, indem sie Einzelstrangbrüche erzeugt, die zu einer Entwindung der DNA führen. Dadurch wird die Spannung gelöst, welche die DNA Doppelhelix normalerweise in ihrer spiralisierten und superhelicalem Form festhält. Es bildet sich ein kovalentes DNA-Enzym-Zwischenprodukt, welches die geschnittenen DNA Einzelstränge letztendlich wieder an ihre Position im Doppelstrang ligiert. Diese Ligation kann auch mit einem heterologen DNA Fragment erfolgen (Schuman, 1994). Das Enzym Cre-Rekombinase sorgt für die Rekombination zwischen zwei *loxP* Erkennungsstellen (Abremski et al., 1983). Im Vektormix des Kits liegt der Vektor zunächst linearisiert in Form von zwei Fragmenten vor. Jedes Fragment hat an einem Ende einen modifizierten Uracil-Überhang, ist mit einem Topoisomerase I Molekül beladen und besitzt am anderen Ende eine *loxP* Erkennungssequenz. Die Uracil-Überhänge verbinden sich durch Basenpaarung und Topoisomerase I-induzierter Ligation mit den Adenin-Überhängen *Taq*-amplifizierter PCR-Produkte und

inserteren so ein DNA-Fragment in die Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors (siehe Abb. 17). Das resultierende lineare Vektorfragment wird dann in eine kompetente Zelllinie transformiert, welche das Enzym Cre-Rekombinase exprimiert. Durch Rekombination der beiden loxP Erkennungsstellen an beiden Enden des transformierten DNA-Fragments bildet sich der Vektor pSC-A, welcher eine Ampicillin-Resistenz und eine *lacZ'*  $\alpha$ -Komplementierungskassette zur Blau-Weiß-Selektion enthält (siehe Abb.17). Die kompetenten Zellen (SoloPack<sup>®</sup> kompetente Zellen) exprimieren wie bereits erwähnt die so genannte Cre-Rekombinase zur Zirkularisierung des Vektors. Sie tragen eine Mutation im LacZ Gen (*lacZ* $\Delta$ M15), die durch die eine *lacZ'*  $\alpha$ -Kassette des Vektors komplementiert wird.



**Abbildung 17: Klonierung des PCR-Produktes in den linearisierten Vektor pSC-A und schematische Darstellung des Vektors nach der Transformation (Stratagene).**

Zunächst liegen die Vektorkomponenten linearisiert in zwei Teilen vor. Mit Hilfe der Topoisomerase I wird die zu klonierende Fremd-DNA (grün) in die Multiple Cloning Site des Vektors ligiert. Nach Transformation des entstandenen linearen Vektor-Fragmentes in kompetente Bakterienzellen erfolgt durch das von den Bakterienzellen exprimierte Enzym Cre-Rekombinase die Rekombination der loxP-Erkennungsstellen und die Zirkularisierung des Vektors.

### **B.9.3 Poly-Adenylierung des PCR-Produktes**

Damit das PCR Produkt in die MCS des Vektors inseriert werden kann, müssen dessen 3'-Enden mit Hilfe der *Taq* DNA-Polymerase zunächst polyadenyliert werden.

#### MATERIAL

- PCR-Produkt
- PCR-Maschine GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- *Taq* DNA-Polymerase (Invitrogen)

#### DURCHFÜHRUNG

Zum PCR Ansatz (Herculase® II Fusion DNA Polymerase) werden 0,5 µl *Taq*-Polymerase gegeben und 10 min bei 72°C inkubiert. Nach der Polyadenylierung wird der Ansatz vollständig auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen (40 µl + 6 µl Auftragspuffer). Die Elektrophorese wird wie unter B.3.1.1.5.3 beschrieben durchgeführt.

### **B.9.4 Isolierung des poly-adenylierten PCR-Produktes**

Die Isolation des polyadenylierten *FANCA* Gens erfolgt nach elektrophoretischer Auftrennung aus dem Agarosegel mit Hilfe des Wizard® SV Gel und PCR Aufreinigungssystems. Es basiert auf der Tatsache, dass DNA in Gegenwart von Salzen an Silicium-Membranen bindet und somit von anderen Bestandteilen einer Reaktion (Enzyme, Primer, dNTPs) getrennt werden kann. Das im Bindungspuffer enthaltene Guanidin-Isothiocyanat sorgt für das Auflösen des Agarosegels, welches so bei der ersten Zentrifugation durch das Säulchen einfach mit dem Durchfluss verworfen werden kann.

#### MATERIAL

- Agarosegel 1% (B.3.1.1.5.3)
- Auftragspuffer (6x Loading Dye Solution, MBI Fermentas)
- Chirurgisches Einmal-Skalpell (Braun)
- Elektrophoreseapparatur 3000xl (Biorad)
- ERGs 1,5 ml (Eppendorf)

- Ethanol 95%  
Ethanol (Merck) 47,5 ml  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> 2,5 ml
- Ethidiumbromid 10 mg/ml (Sigma)
- Geldokumentationssystem BioDoc Analyze (Biometra)
- Größenstandard 1 kb GeneRuler™ (MBI Fermentas)
- Heizblock Thermomixer Compact (Eppendorf)
- Schutzbrille
- TAE-Puffer (B.3.1.1.5.3)
- Waage (Sartorius)
- Wizard® SV Gel und PCR Aufreinigungssystem (Promega)  
Aufreinigungssäulchen  
Bindungspuffer  
Waschlösung + 15 ml Ethanol 95%  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>
- Zentrifuge 5415 D (Eppendorf)

### DURCHFÜHRUNG

Zunächst wird wie unter B.3.1.1.5.3. beschrieben eine Gelelektrophorese mit einem 1%igen Agarosegel durchgeführt. Es wird der gesamte Ansatz aus B.8.2.1. (40 µl) mit 6 µl des Auftragspuffers auf das Gel aufgetragen. Nach ca. 1 h bei 65 V wird die DNA-Bande unter UV-Licht sichtbar gemacht, mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein 1,5 ml ERG überführt. Um DNA-Schäden zu vermeiden, sollte die Bestrahlung mit UV-Licht auf ein Minimum reduziert werden. Das Gewicht des ausgeschnittenen Stückes wird bestimmt, entsprechend (10 µl/10 mg) Bindungspuffer dazugegeben und gut durchmischt. Es folgt eine 10-minütige Inkubation bei 60°C im Heizblock, wonach das Agarosegel vollständig aufgelöst ist. Nun wird die Probe auf ein Aufreinigungssäulchen überführt und 1 min bei RT inkubiert, bevor bei 16.000 x g für 1 min zentrifugiert wird. Der Durchfluss wird verworfen, es werden 700 µl Waschlösung auf die Säule gegeben und erneut für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wird wieder verworfen und der Waschschrift mit 500 µl Waschlösung wiederholt, wobei anschließend für 5 min zentrifugiert werden muss, um die Säule vollständig zu trocknen. Der Durchfluss wird erneut entsorgt und es folgt ein letzter Zentrifugationsschritt für 1 min um restlichen Alkohol aus der Säule zu entfernen. Zuletzt wird mit 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> eluiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt wie unter B.3.1.1.4. beschrieben.

**B.9.5 Ligation von *FANCA* in den Vektor und Transformation**MATERIAL

- Ampicillin 50 mg/ml (Serva)
- Bunsenbrenner Fireboy Plus (Vitaris)
- Duran<sup>®</sup> Erlenmeyerkolben mit Kappe (Schott)
- Eis
- ERGs (Eppendorf)
- Impfösen (Neolab)
- LB-Ampicillin-Agarplatten 2 Stück
 

LB-Agar ~ 50°C	60 ml
Ampicillin 50 mg/ml	120 µl
30 ml/Petrischale	
- LB-Agar (B.5.1.1)
- LB-Ampicillin-Flüssigmedium
 

Ampicillin 50 mg/ml	20 µl
LB Medium	10 ml
- LB-Flüssigmedium (B.5.1.1)
- Petrischalen Ø 8,5 cm (Greiner Bio One)
- Polyadenyliertes PCR-Produkt
- Schüttler (Innova™ 2000 Platform Shaker, New Brunswick Scientific GmbH)
- S.O.C. Medium (Invitrogen)
- Sterilbank (Galaire<sup>®</sup> BSB 4A, Flow Laboratories)
- StrataClone™ Klonierungs-Puffer (Stratagene)
- StrataClone™ SoloPack kompetente Zellen (Stratagene)
- StrataClone™ Vektormix (Stratagene)
- Drygalski-Spatel
- Wasserbad 42°C (Memmert)
- Wärmeschrank 37°C (Memmert)
- X-Gal 2% in Dimethylformanid (DMF) (Boehringer)

## DURCHFÜHRUNG

Als Erstes wird der Ligations-Mix vorbereitet. Dafür werden 3 µl Klonierungs-Puffer, 2 µl PCR-Produkt (5-50 ng) und 1 µl Vektormix in ein ERG gegeben, vorsichtig durch hoch- und runterpipettieren gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Danach wird der Ansatz auf Eis gestellt. Für die Transformation werden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1 µl des Ligations-Mixes versetzt. Durch leichtes Schnippen mit dem Finger wird der Ansatz vorsichtig durchmischt und dann für 20 min auf Eis inkubiert. Währenddessen wird das SOC Medium im Wasserbad auf 42°C erwärmt. Nach der Inkubation erfahren die Zellen bei 42°C für 45 s einen Hitzeschock, durch welchen ihre Zellwand durchlässig für doppelsträngige DNA-Moleküle wird. Im Anschluss daran wird der Transformations-Mix 2 min auf Eis gekühlt und dann mit 250 µl SOC Medium versetzt. Nun werden die Zellen zur Erholung 1h bei 37°C geschüttelt, wobei das Reaktionsgefäß horizontal auf dem Schüttler festgeklebt wird, um während des Schüttelns eine bessere Sauerstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten. Während dieser Phase werden die LB-Ampicillin-Agarplatten vorbereitet. Nachdem die Platten abgekühlt sind, werden für die Blau-Weiß-Selektion 40 µl des X-Gal Reagenz auf jede Platte gegeben und mit dem Drygalski-Spatel verteilt. Zuletzt werden die transformierten Zellen mit Hilfe des Drygalski-Spatels ausplattiert: eine Platte mit 5 µl Zellen (verdünnt in 50 µl SOC Medium) und eine Platte mit 100 µl Zellen werden über Nacht bei 37°C angezogen.

Am nächsten Tag werden acht weiße Einzelkolonien mit inseriertem Vektor gepickt und auf drei neuen LB-Ampicillin-Agarplatten erneut über Nacht bei 37°C ausplattiert. Von jedem dieser Klone wird wiederum eine Kolonie in 9 ml LB-Ampicillin-Flüssigmedium in Erlenmeyerkolben überimpft und 16 h bei 37°C wachsen gelassen.

### **B.9.6 Isolation des pSC-A Vektors mit inseriertem PCR-Produkt**

Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgt mit Hilfe des „Qiaprep Miniprep“ Kits der Firma Qiagen. Das Prinzip dieses Systems basiert auf der alkalischen Lyse der Zellen und macht sich die Tatsache zu nutze, dass DNA bei hoher Salzkonzentration an Silizium bindet (Vogelstein und Gillespie, 1979). So werden die Zellen zunächst nach einem etwas modifizierten Protokoll von Birnboim und Doly (1979) unter alkalischen Bedingungen zunächst lysiert und dann in einem Schritt neutralisiert und mit Salzen angereichert. Nach Entfernen des lysierten Zelldebris kann die Lösung auf die Siliziummembran gegeben werden, wo sie an diese bindet. RNA, zelluläre Proteine oder Stoffwech-

selprodukte wandern hingegen durch die Membran hindurch. Nach einigen Waschschrritten wird die Plasmid-DNA dann bei geringer Salzkonzentration in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  eluiert.

### MATERIAL

- ERGs (Eppendorf)
- $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  (Gibco)
- QIAprep Miniprep Kit (Qiagen)
  - Puffer N3
  - Puffer PB
  - Puffer PE Konzentrat; muss mit 100%igem Ethanol versetzt werden!
  - Puffer P1; vor dem ersten Gebrauch muss RNase A dazugegeben werden!
  - Puffer P2
  - RNase A10 mg/ml
  - QIAprep Säulchen
- Zentrifuge 3-15 (Sigma Laboratory Centrifuges)
- Zentrifuge 5415 D (Eppendorf)
- Zentrifugen-Röhrchen 15 ml (Falcon)

### DURCHFÜHRUNG

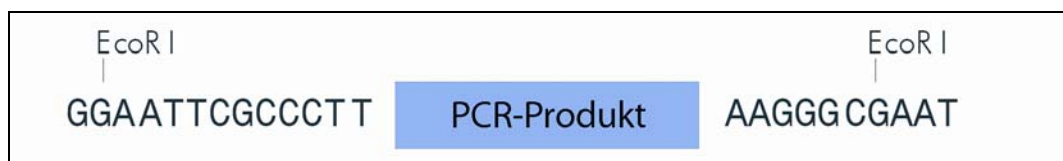
Die Übernachtskulturen der Bakterien in LB-Ampicillin-Flüssigmedium werden in 15 ml Zentrifugen-Röhrchen überführt und bei ca. 7.000 x g für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die Zellpellets in 250  $\mu\text{l}$  Puffer P1 aufgenommen und in ERGs überführt. Es wird so lange mit der Pipette oder dem „Vortexer“ gemischt, bis keine Zellklumpen mehr zu erkennen sind. Dann werden 25  $\mu\text{l}$  Puffer P2 hinzugegeben und die ERGs zum vorsichtigem Mischen so lange invertiert, bis die Lösung viskos und klarer geworden ist. Dieser Lyse-Schritt sollte allerdings nicht länger als 5 min dauern. Dann werden 350  $\mu\text{l}$  Puffer N3 dazu pipettiert und jedes ERG nach der Zugabe sofort einige Male invertiert, um eine lokale Fällung zu verhindern. Es folgt ein Zentrifugationsschritt bei  $\sim 17.000 \times \text{g}$  für 10 min, bei dem das Zelllysate sich am Boden des ERGs niedersetzt während sich die DNA im Überstand befindet. Dieser wird dann vorsichtig auf die QIAprep-Säulchen überführt und für 1 min zentrifugiert ( $\sim 17.000 \times \text{g}$ ). Die DNA ist nun an die Silizium-Membran der Säulchen gebunden, der Durchfluss wird demzufolge verworfen. Nun wird mit 500  $\mu\text{l}$  Puffer PB gewaschen, um Endonukleasen zu entfernen. Nach einminütiger Zentrifugation wird der Durchfluss wieder verworfen und die Säule mit 750  $\mu\text{l}$  Puffer PE gewaschen um Salze zu entfernen. Es wird für 1 min zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und, um sicher zu gehen dass alle Ethanol-Reste entfernt werden, noch einmal für 1 min zentrifugiert. Die Säulchen werden in neue



ERGs gestellt und es folgt die Elution in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>. Vor dem letzten Zentrifugationsschritt wird 5 min bei RT inkubiert, damit sich die DNA aus der Membran lösen kann. Die Konzentrationsbestimmung der Plasmidlösungen erfolgt wie unter B.3.1.1.4 beschrieben.

### B.9.7 Restriktionsanalyse des Plasmids mit EcoRI

Um zu überprüfen welche Klone das PCR-Fragment inseriert haben, wird eine Restriktionsanalyse mit dem Restriktionsenzym EcoR I durchgeführt. Die MCS des pSC-A Vektors ist von zwei EcoR I Schnittstellen flankiert (siehe Abb. 18), so dass bei einem Verdau mit diesem Enzym bei korrekter Insertion zwei Banden in einem Kontrollgel zu erkennen sein sollten. Die eine Bande ist das inserierte PCR-produkt (*FANCA* ~ 5000 bp) und die andere Bande der restliche Vektor.



**Abbildung 18: EcoR I Schnittstellen des pSC-A Vektors.**

Das in den Vektor pSC-A klonierte PCR-Produkt wird von zwei EcoRI-Schnittstellen flankiert, so dass bei einem EcoRI-Restriktionsverdau dieses aus dem Vektor ausgeschnitten werden kann.

### MATERIAL

- Agarosegel 1% (B.3.1.1.5.3)
- Auftragspuffer (6x Loading Dye Solution, MBI Fermentas)
- BSA 100x (New England Biolabs)
- EcoR I Restriktionsenzym 10 U/µl (MBI Fermentas)
- Elektrophoreseapparatur 3000xl (Biorad)
- Geldokumentationssystem BioDoc Analyze (Biometra)
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (Gibco)
- NE Puffer 1 10x (New England Biolabs)
- PCR-Maschine GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- PCR-Reaktionsgefäße Thermo-Tube 0,2 ml (Abgene)

- TAE-Puffer (B.3.1.1.5.3)

### DURCHFÜHRUNG

Bei mehreren Proben wird ein Mastermix erstellt. Pro Probe werden eingesetzt: 0,3 µl EcoR I, 1 µl NE Puffer 1, 0,1 µl BSA und 8,6 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>. Pro Probe werden ca. 200 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Es wird vorsichtig gemischt und für 2,5 h bei 37°C im PCR Block inkubiert. Dann wird eine Auftrennung auf einem 1%igem Agarosegel wie unter B.3.1.1.5.3 beschrieben durchgeführt, um die entstandenen Restriktionsfragmente zu überprüfen. Es wird der gesamte Restriktionsansatz auf das Gel aufgetragen.

### **B.9.8 Sequenzierung des klonierten *FANCA* Gens**

Das aus dem Vektor pSC-A extrahierte *FANCA*-Gen wird sequenziert, um eventuelle Fehler durch die Polymerase (Herculase<sup>®</sup>, siehe B.9.1) auszuschließen. Des Weiteren wäre es natürlich auch denkbar, dass die Zelllinie, aus der das Gen amplifiziert wurde, eine Veränderung im Gen aufweist. Die Sequenzierung erfolgt nach dem Didesoxy-Verfahren von Sanger (Sanger et al., 1977), welches auf der enzymatisch katalysierten Synthese (PCR) von unterschiedlich langen DNA-Fragmenten beruht, die an ihrem 3'-Ende mit einem fluoreszenzfarbstoffmarkierten Didesoxynukleotid terminiert werden. Die DNA-Fragmente werden dann in einer halbautomatisierten Sequenziermaschine in dünnen Kapillaren gelelektrophoretisch mit der Genauigkeit von einem Nukleotid Größenunterschied aufgetrennt. Die Sequenz wird durch die unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe der vier Basen rekonstruiert; je nach endständigem Didesoxynukleotid absorbieren und emittieren die Fragmente bei unterschiedlichen Wellenlängen und können so eindeutig zugeordnet werden. Hier erfolgt die Sequenzierung mit dem „Big-Dye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“, welches alle für die Sequenzierung notwendigen Reagenzien in einem vorgefertigten Sequenzierungsreagenz zur Verfügung stellt. Es müssen nur die zu sequenzierende DNA und die spezifischen Primer dazugegeben werden.

MATERIAL

- BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)  
BigDye<sup>®</sup> v3.1 "Ready Reaction Mix"  
Sequenzierungspuffer 5x
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Stratagene)
- EDTA 125 mM  
EDTA 0,5 M (B.2.2) 2,5 ml  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (Gibco) 7,5 ml
- Ethanol absolute p.a. (Merck)
- Ethanol 70% (B.2.3)
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (Gibco)
- PCR-Folie Eppendorf<sup>®</sup> selbstklebend (Sigma)
- PCR-Maschine GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- Primer:  
M13 fwd 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3' 100 pmol/μl (Metabion)  
M13 rev 5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3' 100 pmol/μl (Metabion)  
FANCA 1 fwd 5'-CTC CAG CGG AGA CCA GTC-3' 100 pmol/μl (Metabion)  
FANCA 1 rev 5'-GGA GAG AAG ACT GTA AAA AGC GAA-3' 100 pmol/μl (Metabion)  
FANCA 2 fwd 5'-ATC GTG AGG TGC TGG TTC G-3' 100 pmol/μl (Metabion)  
FANCA 2 rev 5'-ACC ACA CCA GAG CAG AGG TC-3' 100 pmol/μl (Metabion)  
FANCA 3 fwd 5'-AGG CTA CCA TGG CTG CAG-3' 100 pmol/μl (Metabion)  
FANCA 3 rev 5'-ACC AAA TCA GAA TTT TCT GAG TGG-3' 100 pmol/μl (Metabion)  
FANCA 4 fwd 5'-CTA CTG CCA GGC CTG CTC T-3' 100 pmol/μl (Metabion)  
FANCA 4 rev 5'-TGC TGC TGT ACA AAA TTT CAG G-3' 100 pmol/μl (Metabion)
- Plattenabdeckung Septa Seal (Applied Biosystems)
- 3730 ABI DNA Analyzer (Applied Biosystems)
- Sequenzierplatten 96-Loch mit Barcode (Applied Biosystems)
- Zentrifuge Minifuge RF(Heraeus Sepatech)

DURCHFÜHRUNG

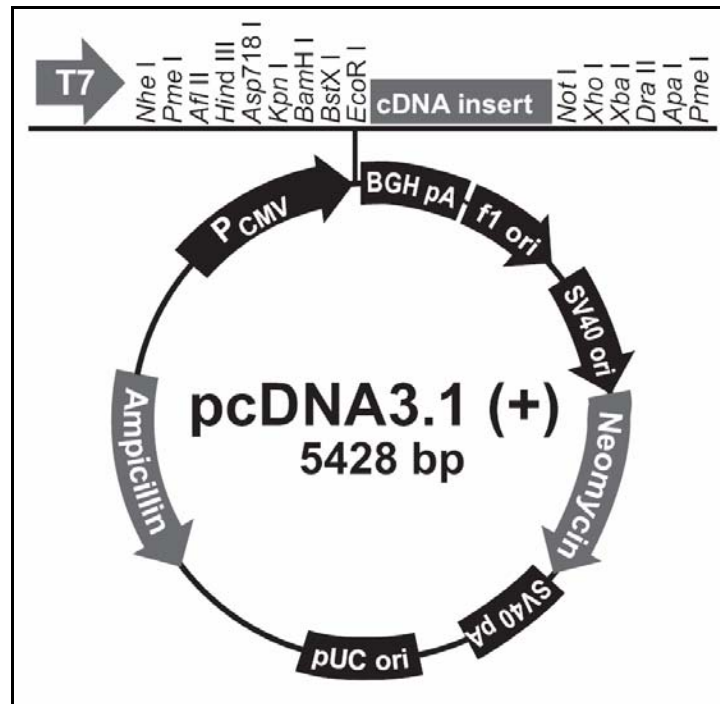
Die Sequenzierung erfolgt nach einem optimierten Protokoll des BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits. Für die PCR werden zunächst zehn Mastermixe (x 8 Proben) für die verschiedenen Primer hergestellt. Dafür werden auf Eis und unter Lichtschutz pro Primer zusammen pipettiert: 16 μl BigDye<sup>®</sup> v3.1, 0,8 μl Primer, 8 μl Puffer und 4 μl DMSO. Die Primer-Mixe werden in die Platte vorgelegt (3,6 μl pro Probe). Dann werden 200 ng DNA und ad 10 μl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> dazu gegeben und die Platte kurz zentrifugiert. Die PCR erfolgt nach folgendem Programm: 96°C für 4 min, (95°C für 30 s, 50°C für 20 s, 60°C für 4 min) x 60 Zyklen und 4°C für ∞ im PCR-Block.

Nach der PCR werden die Proben mit einer Ethanol/EDTA Fällung aufgereinigt. Die Platte wird abzentrifugiert und zu jeder Probe werden 5 µl EDTA und 60 µl Ethanol (100%) gegeben, gemischt für 15 min bei RT inkubiert. Dann wird die DNA für 15 min bei 3.000 x g und 4°C pelletiert und der Überstand durch sofortiges Invertieren auf einem Papiertuch entfernt. Die Proben werden mit 60 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird wie vorher entfernt. Die DNA wird nun unter Lichtschutz an der Luft getrocknet, bevor sie in 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gelöst wird. Die Platte wird mit einem Septum abgedichtet und kann nun sequenziert werden. Die Auswertung der Sequenzierung erfolgt mit Hilfe der frei zugänglichen Softwares „Staden Package“ ([www.staden.sourceforge.net](http://www.staden.sourceforge.net)) zur manuellen Korrektur der Sequenzen und „BioEdit 7.0.5.3“ ([www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html)) zum Vergleich der Sequenzen mit der Originalsequenz.

#### **B.9.9 Klonierung des *FANCA* Gens in den pcDNA3.1(+)-Expressionsvektor**

Damit das Gen in den transfizierten Zelllinien auf hohem Niveau exprimiert werden kann, muss dieses zunächst in einen Expressionsvektor integriert werden. In dieser Arbeit wird dafür der Expressionsvektor pcDNA3.1(+) (Invitrogen; siehe Abb. 19) verwendet. Dieser Vektor ist 5428 bp groß und ermöglicht die konstitutive Überexpression eines gewünschten Gens in Säugerzellen durch einen CMV (Human cytomegalovirus immediate-early)-Promotor. Eine Neomycin Resistenz ist vorhanden, wodurch stabile Zelllinien selektiert werden können.

Das ausgewählte Plasmid mit fehlerfreiem *FANCA*-Gen wird zunächst erneut mit EcoRI, wie unter B.9.7 beschrieben, geschnitten. Es werden zwei Ansätze à 1 µg über Nacht bei 37°C inkubiert. Die *FANCA*-Bande wird aus einem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel isoliert (B.9.4).



**Abbildung 19: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pcDNA3.1(+)** (Invitrogen).

Dargestellt sind die Charakteristika des pcDNA3.1(+)-Vektors, welche für die Replikation in kompetenten *E. coli* Zellen (pUC ori), für eine effiziente RNA-Transkription (T7 RNA Polymerase-Promotor, BGH (bovine growth hormone) Polyadenylierungssignal, SV40 Polyadenylierungssignal) und für eine effiziente Überexpression der klonierten cDNA in eukaryotischen Zellen (CMV Promotor) benötigt werden. Der Vektor besitzt eine Ampicillin- und eine Neomycin-Resistenz, wodurch die Selektion von Transformanten aus *E. coli* Zellen und von stabil transfizierten eukaryotischen Zellen ermöglicht wird. Außerdem sind die vorhandenen Restriktionsschnittstellen, welche die Multiple Cloning Site flankieren, aufgelistet.

### B.9.9.1 Ligation von *FANCA* in einen Expressionsvektor und Transformation kompetenter Zellen

Die Ligation des *FANCA*-Gens erfolgt mit Hilfe der T4-Ligase aus *E. coli*. Das Enzym katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen freien 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen und kann sowohl glatte, als auch überhängende Enden miteinander verbinden. Die Transformation erfolgt dann in chemisch kompetente *E. coli* Zellen (Mach1™-T1<sup>R</sup>), welche im Vergleich zu anderen Zellen eine schnellere Verdopplungszeit aufweisen.

MATERIAL

- Ampicillin 50 mg/ml (Serva)
- Bunsenbrenner Fireboy Plus (Vitaris)
- Duran<sup>®</sup> Erlenmeyerkolben mit Kappe (Schott)
- Eis
- ERGs (Eppendorf)
- *FANCA*-Gen, isoliert
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (Gibco)
- Impfösen (Neolab)
- LB-Ampicillin-Agarplatten 100 µg/ml (B.9.5)
- LB-Ampicillin-Flüssigmedium (B.9.5)
- One Shot<sup>®</sup> mach1<sup>™</sup>-T1<sup>®</sup> chemisch kompetente Zellen (Invitrogen)  
Mach1<sup>™</sup>-T1<sup>®</sup> Zellen (*E.coli*)  
S.O.C Medium
- Petrischalen Ø 8,5 cm (Greiner Bio One)
- PCR-Maschine GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- PCR-Reaktionsgefäße Thermo-Tube 0,2 ml (Abgene)
- Sterilbank (Galaire<sup>®</sup> BSB 4A, Flow Laboratories)
- T4 DNA Ligase (New England Biolabs)  
T4 DNA Ligase Reaktionspuffer 5x
- Drygalski-Spatel
- Schüttler (Innova<sup>™</sup> 2000 Platform Shaker, New Brunswick Scientific GmbH)
- Vektor pcDNA3.1(+), linearisiert mit EcoR I, 59 ng/µl (Invitrogen)
- Wasserbad 42°C (Mettler)
- Wärmeschrank 37°C (Mettler)

DURCHFÜHRUNG

Für die Ligation werden zwei Reaktionen angesetzt, eine mit dem *FANCA*-Gen und eine nur mit dem leeren Vektor. Pro Ansatz werden pipettiert: 4 µl T4 DNA Ligase Puffer, 24 ng *FANCA*, 0,17 µl Vektor (8 ng), 0,1 µl T4 DNA Ligase und H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 20 µl. Es wird vorsichtig gemischt und für 1 h bei 25°C inkubiert. Nach der Ligation werden 2 Reaktionsgefäße mit kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und 5 µl der DNA hinzugegeben. Es wird vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Dann werden die Zellen durch Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad durchlässig für die Vektoren gemacht und gleich danach wieder 2 min auf Eis inkubiert. Es werden 250 µl S.O.C. Me-

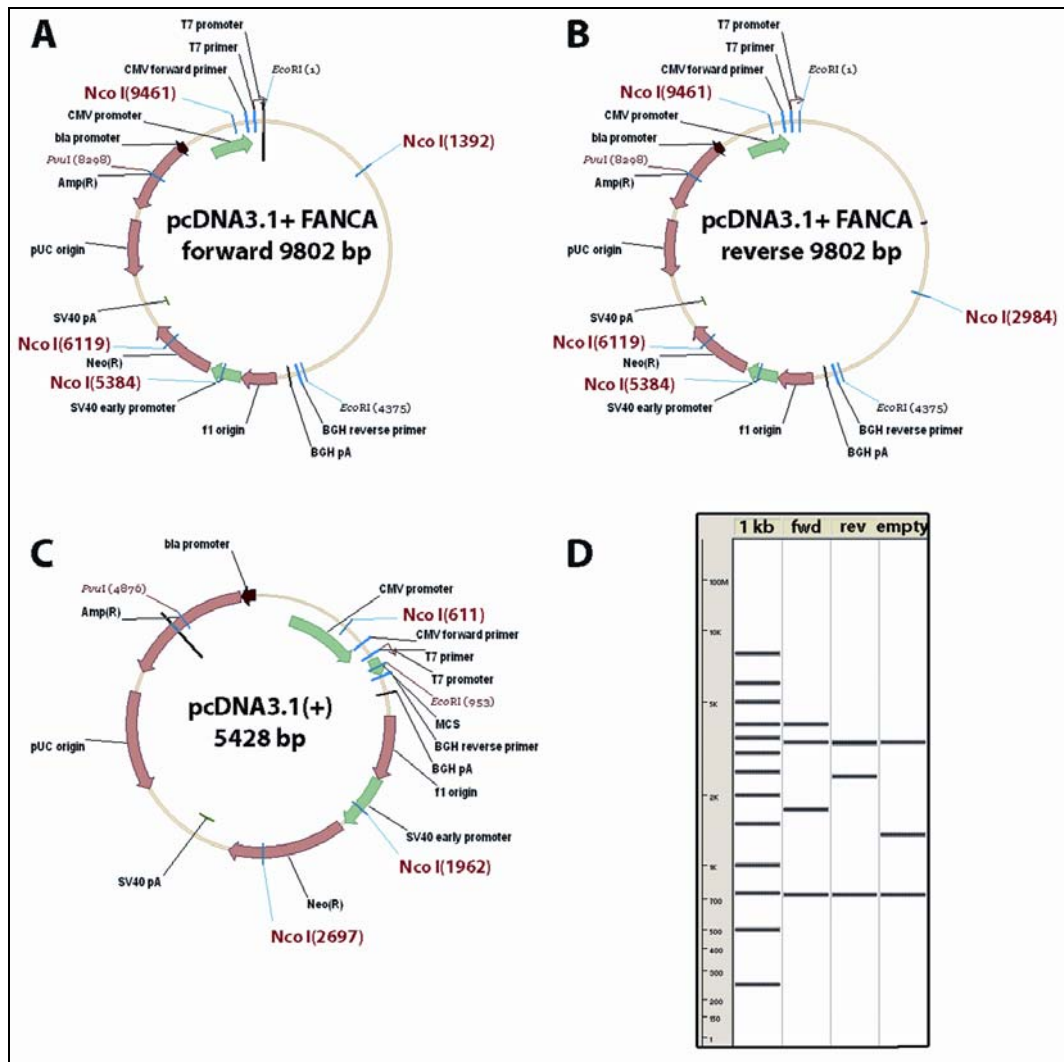
dium (RT) dazugegeben und wie unter B.9.5 beschrieben horizontal schüttelnd bei 37°C für 1 h inkubiert. Danach werden die Zellen auf 37°C warmen LB-Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C angezüchtet. Am nächsten Tag werden wie unter B.9.5 beschrieben sechs Kolonien gepickt und über Nacht in 20 ml LB-Ampicillin-Flüssigmedium kultiviert.

#### **B.9.9.2 Isolation des pcDNA3.1(+) Vektors mit inseriertem Gen**

Die Plasmidisolierung wird wie unter B.9.6 beschrieben durchgeführt. Vor der Zentrifugation der Kulturen wird jeder Klon noch einmal auf einer LB-Ampicillin-Agarplatte ausgestrichen und bei 37°C inkubiert.

#### **B.9.9.3 Restriktionsanalyse des Expressionsvektors mit Nco I**

Um einen Klon zu finden, welcher das *FANCA*-Gen in korrekter Richtung inseriert hat, wird ein Restriktionsverdau mit dem Enzym Nco I durchgeführt. Mit Hilfe der Software „Vector NTI 10.0“ kann man sich ein theoretisches Bandenmuster errechnen lassen, welches für pcDNA3.1(+)/*FANCA* in Abbildung 20 dargestellt ist. Nco I schneidet im *FANCA*-Gen nur einmal innerhalb der palindromischen Erkennungssequenz 5'...C<sup>▼</sup>CATGG...3' und führt zu einem Bandenmuster anhand dessen erkennbar ist, ob und in welcher Richtung *FANCA* inseriert hat.



**Abbildung 20: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pcDNA3.1(+) mit und ohne Insert.**

In der Abbildung sind die verschiedenen Möglichkeiten nach einer Klonierung von FANCA in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+) dargestellt. (A) FANCA in korrekter Orientierung inseriert. (B) FANCA in falscher Orientierung (rückwärts) inseriert. (C) Leerer Vektor ohne Insert. Je nach Orientierung des inserierten Fragmentes verändern sich die Abstände zwischen den NcoI-Schnittstellen innerhalb des Vektors. Die jeweils erwarteten Banden in einem Kontrollgel nach dem Restriktionsverdau mit NcoI sind in (D) aufgezeigt.

## MATERIAL

- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (Gibco)
- NEB Buffer 3 (New England Biolabs)
- Nco I 10 000 U/ml (New England Biolabs)
- Plasmid 200 ng



## DURCHFÜHRUNG

Für den Restriktionsverdau werden 200 ng Plasmid mit 1 µl NEB Puffer 3, 0,2 µl Enzym und H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 10 µl für 2 h bei 37°C im PCR-Block inkubiert. Danach wird wie unter B.3.1.1.5.3 ein Agarosegel gefahren, um die entstanden Fragmente zu analysieren.

### **B.9.10 Isolation des Expressionsvektors für die Transfektion**

#### **B.9.10.1 Anzucht eines Klons mit korrektem Expressionsvektor**

Ein Klon mit dem Expressionsvektor mit korrekt inseriertem *FANCA*-Gen wird nun im großen Maßstab angezüchtet, um eine ausreichende Menge an Plasmid für die spätere Transfektion zu erhalten.

## MATERIAL

- Ampicillin 50 mg/ml (Serva)
- Brutschrank (Memmert)
- Duran<sup>®</sup> Erlenmeyerkolben mit Kappe 2000 ml (Schott)
- Impfösen (Neolab)
- LB-Ampicillin-Flüssigmedium 100 µg/ml (B.9.5)
- Sterilbank (BDK)

## DURCHFÜHRUNG

Von einem Klon mit korrektem Vektor werden zwei Ansätze mit 250 ml LB-Ampicillin-Flüssigmedium angeimpft und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert.

#### **B.9.10.2 Plasmidisolation mit Hilfe des Plasmid-Maxi-Kits der Firma Qiagen**

Die Isolation des Expressionsvektors aus den 250 ml Kulturen erfolgt mit Hilfe des „Plasmid Maxi Kits“ der Firma Qiagen. Wie auch die bereits dargestellten Plasmidisolationen (B.5.1.2 und B.9.6) beruht das System der Isolation auf der von Birnboim und Doly (1979) beschriebenen alkalischen Lyse der Zellen. Nach der Zelllyse erfolgt unter entsprechenden Salz- und pH-Wert-Konditionen die Bindung der Plasmid-DNA an ein

spezielles anion-austauschendes Granulat der Säule. RNA, Proteine und andere niedermolekulare Verunreinigungen werden durch Waschschriffe bei mittlerer Salzkonzentration entfernt. Anschließend erfolgt die Elution der Plasmid-DNA mit einem „salzigen“ Puffer, durch eine Isopropanolfällung werden die Salze dann entfernt und das Plasmid konzentriert.

#### MATERIAL

- Eis
- ERGs 2 ml (Eppendorf)
- Ethanol absolut p.a. (Merck)
- Ethanol 70% (B.2.6)
- Durankolben 200 ml (Schott)
- Isopropanol (Merck)
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (Gibco)
- Natriumacetat 3 M (B.2.7)
- Plasmid Maxi Kit (Qiagen)  
Extraktionssäulen  
RNase A Lösung  
Puffer P1; vor erster Verwendung Zugabe der RNase A  
Puffer P2  
Puffer P3 auf Eis kühlen  
Puffer QBT  
Puffer QC  
Puffer QF
- Rundfilter S&S Ø 110 mm (Schleicher&Schnell)
- Übernachtkultur 250 ml
- Zentrifuge Biofuge Stratos (Heraeus)
- Zentrifugenröhrchen 50 ml (Falcon)

## DURCHFÜHRUNG

Die zwei Übernachtskulturen des Klons mit dem korrekten Expressionsvektor werden geteilt und für ca. 20 min bei 6.000 x g (4°C) abzentrifugiert. Hierfür werden 50 ml Zentrifugenröhrchen verwendet, d.h. die Zellpellets werden durch zwei aufeinanderfolgende Schritte gebildet. Diese werden dann in 10 ml Puffer P1 resuspendiert und mit 10 ml Puffer P2 versetzt. Durch Invertieren der Gefäße werden die Lösungen gemischt, 10 ml kalter Puffer P3 dazugegeben und nochmals gut durchgemischt. Es wird für 20 min auf Eis inkubiert, bevor ein Zentrifugationsschritt bei 4°C und 20.000 x g für 30 min folgt. Nun werden die Säulen mit Hilfe der im Kit enthaltenen Halterungen in je einen 200 ml Erlenmeyerkolben gehängt. Ein Filterpapier pro Probe wird zu einem Trichter gefaltet, auf die Säule gelegt und mit 10 ml QBT-Puffer befeuchtet. Dieser läuft dann aufgrund der Gravitationskraft auch durch das Granulat der Säule, wodurch dieses equilibriert wird. Dann wird der Überstand der Zentrifugation durch den Filter auf die Säulen aufgetragen. Ist alle Flüssigkeit in den Glaskolben gelaufen, kann der Filter entfernt werden und die Säule zunächst zweimal mit 30 ml Puffer QC gewaschen werden. Die Plasmid-DNA wird dann mit 15 ml Puffer QF eluiert und in einem neuen 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Die Fällung erfolgt mit 10,5 ml Isopropanol bei RT, es wird gut gemischt und dann für 30 min bei 4°C bei 20.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig dekantiert und das DNA-Pellet in 250 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gelöst und in ein ERG überführt. Das Zentrifugenröhrchen wird noch einmal mit 250 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gespült und die Flüssigkeit zu den ersten 250 µl gegeben. Zu der Lösung werden nun 50 µl Natriumacetat und ad 2 ml mit Ethanol 100% gegeben, gemischt und bei 4°C für 30 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Im Anschluß daran wird das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, zentrifugiert und dann getrocknet. Zuletzt wird die Plasmid-DNA in 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gelöst und die Konzentration bestimmt (B.3.1.1.4).

### **B.9.11 Transfektion**

Es sollen zwei Zelllinien (BHY und Cal-33; B.8.2) stabil transfiziert werden. Dazu muss der Expressionsvektor mit dem *FANCA*-Gen in das Genom der jeweiligen Wirtszelle integriert werden, da er sonst bei einer Zellteilung nicht stabil repliziert und an die Tochterzellen weitergegeben werden kann. Außerdem wird Fremd-DNA häufig durch intrazelluläre Mechanismen abgebaut. Kurz nach der Transfektion mit einem Expressionsplasmid kann es zu einer starken Expression des transferierten Gens kommen (transiente Expression). Nur etwa eine von 10<sup>4</sup> Zellen integriert das Plasmid als selte-

nes Ereignis in ihre chromosomale DNA (Lottspeich und Zorbas, 1998). Um diese stabil transfizierten Zellen anzureichern, wird ein geeignetes Selektionsverfahren benötigt, welches nicht-transfizierte Zellen aussortiert. Der hier verwendete pcDNA3.1(+) Vektor besitzt ein Neomycin-Resistenzgen, welches die Resistenz gegen das Aminoglycosid-Antibiotikum Geneticin (G418) vermittelt. G418 hemmt besonders die Proteinbiosynthese bei eukaryotischen Zellen, indem es an die 80S-Ribosomen bindet, wodurch ein Fehler bei der Transkription der tRNA auftritt. Durch diese Toxizität auf eukaryotische Zellen findet G418 keine Anwendung in der Medizin, wird aber bei Transfektionsexperimenten häufig zum Isolieren der stabil transfizierten Zellen aus der Gesamtpopulation angewandt (Southern und Berg, 1982).

### B.9.11.1 Linearisierung des Expressionsvektors

Es wird angenommen, dass ein circolärer Vektor, bevor er in die chromosomale DNA der transfizierten Zelle integriert wird, durch intrazelluläre Mechanismen geschnitten wird. Diese zufällige Schnittstelle kann dann natürlich unter Umständen in dem zu untersuchenden Gen liegen, wodurch dieses nicht mehr korrekt exprimiert werden könnte. Aus diesem Grund wird der Expressionsvektor pcDNA3.1(+)/*FANCA* bereits im Vorfeld mit einem Restriktionsenzym linearisiert, welches nur einmal an einer für die Expression unbedeutenden Stelle schneidet (Pvu I, siehe Abb. 20).

### MATERIAL

- BSA (New England Biolabs)
- Chloroform/Isoamylalkohol Gemisch (24:1)
 

Chloroform (Merck)	96 ml
Isoamylalkohol (Merck)	4 ml
- Ethanol absolut p.a. (Merck)
- Ethanol 70% (B.2.3)
- ERGs 2 ml (Eppendorf)
- Expressionsvektor pcDNA3.1(+)/*FANCA* 200 µg
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (Gibco)
- Kühlzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus Instruments)
- Natriumacetat 3 M (B.2.7)
- NEB Puffer 3 (New England Biolabs)
- PCR-Maschine GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- PCR-Reaktionsgefäße Thermo-Tube0,2 ml (Abgene)

- Phase Lock Gel Heavy 2 ml (Eppendorf)
- Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1 Gesättigt mit 10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA (Sigma)
- Pvu I 10 U/ml (New England Biolabs)
- Sterilbank (Galaire® BSB 4A, Flow Laboratories)

### DURCHFÜHRUNG

Für den Restriktionsverdau werden in ein Reaktionsgefäß gegeben: 200 µg zu linearisierendes Plasmid, 30 U Pvu I, 20 µl NEB Puffer 3, 2 µl BSA und ad 200 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>. Der Ansatz wird über Nacht bei 37°C inkubiert und durch Gelelektrophorese (B.3.1.1.5.3) kontrolliert. Nach erfolgreicher Linearisierung muss das Plasmid aufgereinigt werden. Dafür wird der Restriktionsansatz in Phase-Lock-Gefäße überführt und mit 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt. Es wird gut gemischt und 5 min bei RT bei 12.000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird mit 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt und erneut zentrifugiert. Nun wird der Überstand in ein neues ERG überführt und mit 18 µl Natriumacetat und 500 µl 100%igem Ethanol bei -20°C für 20 min gefällt. Die DNA wird für 20 min bei 16.000 x g und 4°C pelletiert und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wird das Pellet getrocknet, in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gelöst und die Konzentration bestimmt (B.3.1.1.4).

### **B.9.11.2 G418 Konzentrationstest**

Bei diesem Versuch wird die G418-Konzentration ermittelt, mit welcher die Selektion der Zellen nach der Transfektion erfolgt. Es soll sichergestellt werden, dass bei der Selektion nur stabil transfizierte Zellen überleben und die nicht stabil transfizierten Zellen absterben.

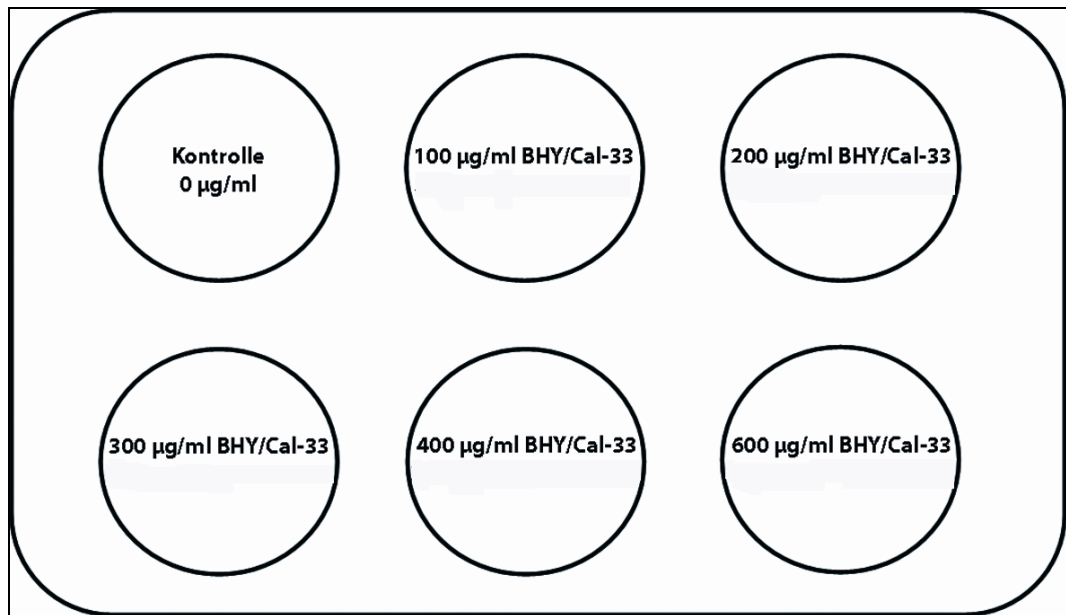
### MATERIAL

- Brutschrank (Heraeus)
- Bunsenbrenner Fireboy Plus (Vitaris)
- Coulter Counter Z1 (Beckmann Coulter)
- Geneticin (G418) 100 mg/ml  
G418 Disulfat (Sigma) 1 g  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (Gibco) 10 ml
- Kulturmedium (Gibco)

- NaCl 0,9%  
NaCl 9 g  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (Gibco) 1000 ml
- Steril filtrieren (0,2 µm)
- PBS 1x (B.2.9)
- Sterilbank Laminair® HBB 2472S (Heraeus)
- Trypsin-EDTA 0,5% (Gibco)
- Zählröhrchen (Coulter Beckmann) mit 19,8 ml 0,9%iger NaCl-Lösung
- Zellkulturplatten mit sechs Vertiefungen (Falcon)
- Zelllinien BHY (480.000 Zellen) und Cal-33 (300.000 Zellen)

### DURCHFÜHRUNG

Für jede Zelllinie wird eine Zellkulturplatte mit sechs Vertiefungen pro Zählung angesetzt. Der Effekt von G418 soll anhand einer Wachstumskurve gemessen werden (Messpunkte an Tag 1, 2, 4, 7 und 9), so dass pro Zelllinie insgesamt sechs Platten angesetzt werden. Die Zelllinie Cal-33 wird mit 50.000 Zellen/Vertiefung (in 3 ml Kulturmedium) angesetzt, die Zelllinie BHY aufgrund ihrer Wachstumseigenschaften mit 80.000 Zellen/Vertiefung (ebenfalls in 3 ml Kulturmedium). Nach ca. 4-5 h (wenn die Zellen sich angeheftet haben) wird die entsprechende Menge G418 in jede Vertiefung gegeben (siehe Abb. 21). Für eine Zählung wird jede Vertiefung der Zellkulturplatte mit 2 ml PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin befüllt. Die Platten werden bis zum Ablösen der Zellen (Kontrolle im Mikroskop) bei 37°C im Brutschrank inkubiert, dann werden in jede Vertiefung 0,5 ml Vollmedium zum Abstoppen des Trypsins gegeben. Die Zellen werden gut gemischt und 1 ml der Zellsuspension wird zu 9 ml 0,9%iger NaCl-Lösung (1:10 Verdünnung) in ein Zählröhrchen gegeben. Die Zählung erfolgt wie unter B.8.1 beschrieben mit Hilfe eines Coulter Counters. Bei den noch nicht gemessenen Platten erfolgt alle 48 h ein Mediumwechsel mit G418 Zugabe.



**Abbildung 21: G418 Konzentrationstest bei den Zelllinien BHY und Cal-33.**

In der Abbildung ist eine Kulturplatte mit sechs Vertiefungen skizziert. Pro Zelllinie werden sechs solcher Platten mit 50.000 Zellen (Cal-33) oder 80.000 Zellen (BHY) pro Vertiefung mit den angegebenen G418-Konzentrationen angesetzt.

### B.9.11.3 Transfektion der Zelllinien

Die Transfektion der Zelllinien erfolgt mit Hilfe des Transfektions-Reagenz „Polyfect<sup>®</sup>“ der Firma Qiagen. Diese Art der Transfektion ist ein biologisches Verfahren, bei dem Transportmechanismen der Zelle ausgenutzt werden, um den Expressionsvektor einzuschleusen. Polyfect<sup>®</sup> ist ein sogenanntes aktiviertes Dendrimer, eine chemische Verbindung, deren Struktur aus einem zentralen Kern mit Verästelungen aus repetitiven Einheiten eine radiale Symmetrie ergibt. Die DNA wird durch das Reagenz in kompakte Strukturen verpackt. Der Polyfect<sup>®</sup>-DNA-Komplex besitzt eine positive Gesamtladung, welche eine Bindung an negativ geladene Rezeptoren der Oberfläche eukaryotischer Zellen ermöglicht. Wird der Polyfect<sup>®</sup>-DNA-Komplex durch einen Rezeptor in die Zelle eingeschleust, inhibiert das Polyfect<sup>®</sup> lysosomale Nukleasen, wodurch die Stabilität des Polyfect<sup>®</sup>-DNA-Komplexes innerhalb der Zelle gesichert ist und die DNA in den Nucleus transportiert werden kann.

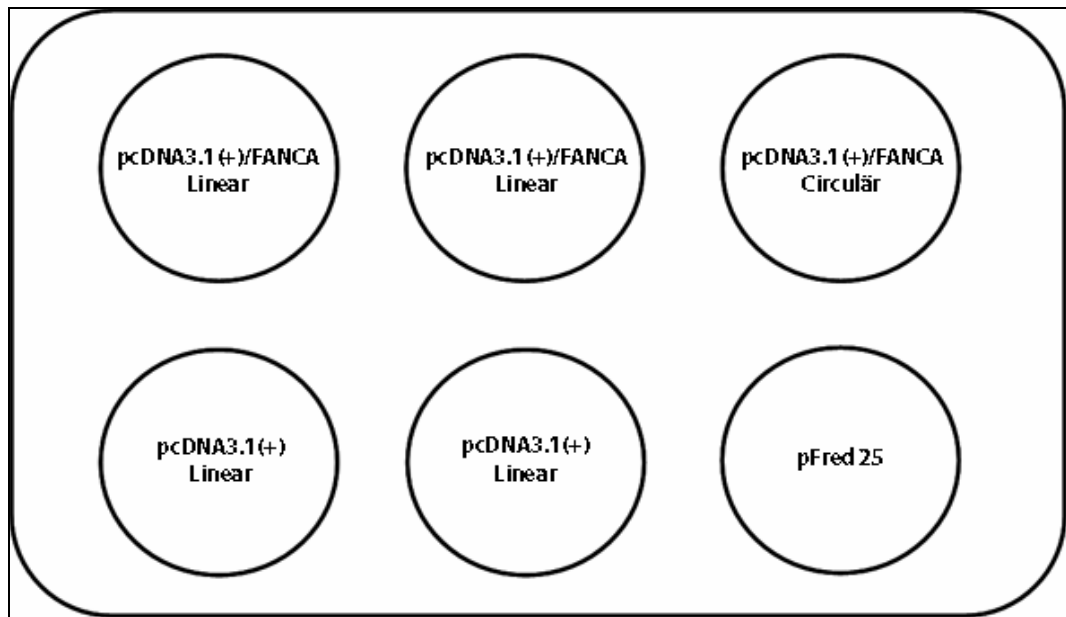
MATERIAL

- Brutschrank 37°C, 5% CO<sub>2</sub> (Heraeus)
- PBS 1x (B.2.9)
- Polyfect® Transfektionsreagenz (Qiagen)
- Tischzentrifuge (G. Kisker)
- Vektor-DNA 4 µg
- Zellkulturmedium (RPMI)
- Zellkulturplatten mit sechs Vertiefungen (Falcon)
- Zentrifuge 3-15 (Sigma Laborzentrifugen)

DURCHFÜHRUNG

24 h vor der Transfektion wird jede Zelllinie (BHY und Cal-33) in einer Zellkulturplatte mit sechs Vertiefungen kultiviert. Pro Vertiefung werden  $1 \times 10^5$  Zellen angezüchtet, so dass am nächsten Tag ein Konfluenzgrad von 40-80% erreicht ist. Für jede Vertiefung der Zellkulturplatte wird ein Transfektionsansatz vorbereitet (siehe Abb. 22). Die Vektor-DNA wird mit serumfreien Medium so verdünnt, dass ein Endvolumen von 100 µl gegeben ist. Der Ansatz wird gut gemischt und zentrifugiert, bevor 8 µl des Polyfect® Transfektionsreagenz dazugegeben werden. Die Lösung wird mit der Pipette gemischt und für 5-10 min bei RT inkubiert. Während dieser Polyfect® -DNA Komplexbildung werden die kultivierten Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und mit 1,5 ml neuem Zellkulturmedium überschichtet. Dann wird die Lösung mit dem Transfektionskomplex mit 600 µl Zellkulturmedium verdünnt und vollständig in eine Vertiefung der Zellkulturplatten mit den zu transfizierenden Zellen gegeben. Es folgt die Inkubation für 24 h im Brutschrank.



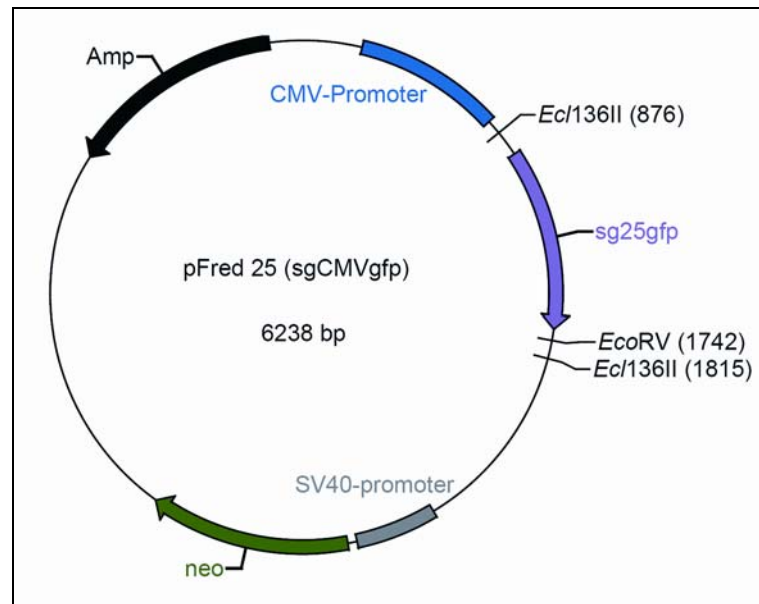


**Abbildung 22: Darstellung der verschiedenen Transfektionsansätze pro Zelllinie.**

In der Abbildung ist eine Kulturplatte mit sechs Vertiefungen skizziert. Für jede Zelllinie wird eine entsprechende Platte mit  $1 \times 10^5$  Zellen vorbereitet und nach 24 h mit den dargestellten Transfektionsansätzen transfiziert.

### B.9.11.3.1 Überprüfung der Transfektionseffizienz

Um die Transfektionseffizienz der drei Zelllinien zu überprüfen, wird jede Zelllinie einmal mit dem ebenfalls G418-resistenten Vektor pFred 25 transfiziert (siehe Abb. 22 und 23). Dieser Vektor codiert für das Protein sg25gfp unter der Kontrolle des CMV-Promotors. sg25gfp ist ein so genanntes eGFP (enhanced green fluorescent protein), eine mutierte Form von GFP, welches eine 50 bis 100-fach hellere Fluoreszenz im Vergleich zu Wildtyp-GFP aufweist (Stauber et al., 1998). Bei einer Anregung mit 530 nm kann bei eGFP-exprimierenden, also transfizierten Zellen eine grüne Fluoreszenz gemessen werden. Diese Messung erfolgt im FACS (Fluorescence activated cell sorter) durch Durchflusszytometrie, wobei eine Zellsuspension durch eine Kapillare gesaugt wird und in einem Sensormodul einen einzelnen Laserstrahl passiert. Jede Zelle emittiert dabei Streulicht und Fluoreszenzimpulse wenn eine Transfektion mit pFred stattgefunden hat. Der Vektor pFred wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe „DNA Reparatur“ von Frau Prof. Eckhardt-Schupp, Institut für Strahlenbiologie – Helmholtz Zentrum München, zur Verfügung gestellt.



**Abbildung 23: Schematische Darstellung des Vektors pFred25 (Drexler, 2002).**

Dargestellt sind die für eine Selektion wichtigen Ampicillin- und Neomycin-Resistenzen, sowie das eGFP sg25gfp unter der Kontrolle des CMV-Promotors und Restriktionsschnittstellen, welche das eGFP flankieren. Die Neomycin-Resistenz wird durch den SV40 Promotor exprimiert.

#### MATERIAL

- FACS BD LSR II (Becton Dickinson)
- FACS-Röhrchen (Becton Dickinson)
- Nicht transfizierte Zellen (Negativkontrolle)
- PBS 1x (B2.9)
- Propidiumiodid (Sigma)
- Trypsin-EDTA 0,5% (Gibco)
- Zentrifuge 3-15 (Sigma Laborzentrifugen)
- Zellen 48 h nach der Transfektion

#### DURCHFÜHRUNG

Die Zellen werden wie in B.8.1 beschrieben zunächst mit PBS gewaschen und trypsiniert. Nach dem Abstoppen wird für 5 min bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellpellets in 300 µl PBS gelöst. Pro Zelllinie wird eine Negativkontrolle mit  $1 \times 10^6$  nicht-transfizierten Zellen mitgemessen. Es folgt die Zugabe von 3 µl Propidiumiodid, die Lösungen werden in die FACS-Röhrchen überführt und gemessen.

Propidiumiodid kann die perforierte Zellmembran toter Zellen durchdringen und diese durch DNA-Interkalierung anfärben und dient somit der Ermittlung abgestorbener Zellen.

#### **B.9.11.3.2 Selektion mit G418**

Die Selektion mit G418 erfolgt 48 h nach der Transfektion. Transfizierte Zellen haben aufgrund der Neomycin-Resistenz des Expressionsvektors eine Unempfindlichkeit gegen das toxische Antibiotikum, während nicht transfizierte Zellen absterben. Die Selektion erfolgt für zwei Wochen bei einer Konzentration von 400 µg/ml G418, wobei ca. jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel mit neuer G418-Zugabe erfolgt. Nach diesen zwei Wochen wird die Konzentration auf eine „Erhaltungsdosis“ von 200 µg/ml reduziert. So wird sichergestellt, dass die Zellen stabil transfiziert sind und den Expressionsvektor in ihre genomische DNA integriert haben.

#### MATERIAL

- Geneticin (G418) 100 mg/ml  
G418 Disulfat (Sigma) 1 g  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (Gibco) 10 ml
- Transfizierte Zellen in Zellkulturplatten mit sechs Vertiefungen

#### DURCHFÜHRUNG

24-48 h nach der Transfektion werden in jede Vertiefung der Kulturplatten 12 µl G418 gegeben.

## B.10 Phänotypische Charakterisierung der mit *FANCA* transfizierten Zelllinien

### B.10.1 Erstellung von Überlebenskurven nach Bestrahlung

Genetische Veränderungen in Tumoren können Auswirkungen auf die Empfindlichkeit der Tumorzellen auf therapeutische Maßnahmen wie Cytostatika oder Bestrahlung haben. Um den Effekt einer Überexpression des Gens *FANCA* bezüglich einer Strahlenempfindlichkeit der Zellen zu untersuchen, werden die mit *FANCA* transfizierten Zellen mit  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Quelle bestrahlt und deren Auswirkung auf die Überlebensrate der Zellen nach ca. 10 Tagen erfasst. Dazu wird die Kammerbestrahlungsanlage HWM D-2000 der Firma Wälischmiller verwendet, welche durch doppelseitige Cs-137-Quellen Gammabestrahlungen ermöglicht. Die Dosisleistung innerhalb der Kammer beträgt 0,55 Gy/min.

#### MATERIAL

- Bunsenbrenner Fireboy Plus (Vitaris)
- Coulter Counter Z1 (Beckmann Coulter)
- Giemsa-Lösung, 10%ig  
   Giemsa (Merck) 10 ml  
   Leitungswasser 90 ml
- HWM D-2000 (Hans Wälischmiller GmbH)
- Kulturmedium (B.8.2.2)
- PBS 1x (B.2.9)
- Sterilbank Laminair<sup>®</sup> HBB 2472S (Heraeus)
- Transfizierte Zellen (BHY/*FANCA* Lin1, BHY/*FANCA* Lin2, BHY/*FANCA* circ., BHY/Vektor Lin1, BHY/Vektor Lin2 und Cal-33/*FANCA* Lin1, Cal-33/*FANCA* Lin2, Cal-33/*FANCA* circ., Cal-33/Vektor Lin1, Cal-33/Vektor Lin2 (vergl. B.9)) je in vier T<sub>25</sub>-Zellkulturflaschen (Greiner-bioone Cellstar<sup>®</sup>)
- Trypsin-EDTA 0,5% (Gibco)
- Zählröhrchen (Beckmann Coulter) mit 19 ml 0,9%iger NaCl-Lösung (B.8)
- Zentrifugenröhrchen 15 ml (Falcon)
- Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen (Greiner-bioone Cellstar<sup>®</sup>)

DURCHFÜHRUNG

Die transfizierten Zelllinien BHY/*FANCALin1*, BHY/*FANCALin2*, BHY/*FANCAcirc*, BHY/*VektorLin1*, BHY/*VektorLin2*, Cal-33/*FANCALin1*, Cal-33/*FANCALin2*, Cal-33/*FANCAcirc*, Cal33/*VektorLin1* und Cal-33/*VektorLin2* (vgl. B.9.11.3) sowie die Originalzelllinien BHY und Cal-33 werden mit jeweils 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy, 4 Gy und 5 Gy bestrahlt. 48 h vor der Bestrahlung werden von jeder der 12 Zelllinien jeweils  $3 \times 10^5$  Zellen in T<sub>25</sub>-Zellkulturflaschen (Kontrolle 0 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy, 4 Gy und 5 Gy) gegeben und bei 37°C inkubiert. Zwei Tage später werden die Zellen in der Bestrahlungsanlage HWM D-2000 im Institut für Strahlenschutz des Helmholtz Zentrums München bestrahlt. Um eine gleichmässige Dosisverteilung zu gewährleisten, werden die Kulturflaschen am Rand der Bestrahlungskammer positioniert. Für eine Dosis von 1 Gy wird für 1,8 min, von 2 Gy für 3,6 min, von 3 Gy für 5,4 min, von 4 Gy für 7,2 min und für 5 Gy für 9 min bestrahlt. Nach der Bestrahlung werden die Zellen weiter kultiviert. Dazu werden sie zunächst wie unter B.8 beschrieben trypsiniert und gezählt. Jede Zelllinie wird auf zwei Kulturplatten mit sechs Vertiefungen verteilt und jeder Ansatz mit einer bestimmten Strahlendosis wird in drei Vertiefungen ausplattiert. Auf Grund der ermittelten „Plating Efficiency“ der nicht transfizierten Originalzelllinien (vgl. B.8.3.1 und C.7.1) werden die unbestrahlten BHY-Zellen mit 150 Zellen pro Vertiefung und Cal-33-Zellen mit 300 Zellen pro Vertiefung in 3 ml Medium kultiviert. Die bestrahlten Zellen werden entsprechend ihrer reduzierten Überlebensrate in höherer Anzahl ausgesät, so dass ähnliche Koloniezahlen wie bei der Kontrolle entstehen können. Nach 10 Tagen werden die Zellen wie unter B.8.3.1 beschrieben fixiert, gefärbt und gezählt. Die Überlebensrate ergibt sich aus dem Quotienten der resultierenden Koloniezahl und der Anzahl der ausgesäten Zellen, welcher dann durch die Überlebensrate (=Plating Efficiency) der unbestrahlten Kontrollen dividiert wird. Es werden dann Überlebenskurven nach dem Logarithmisch-Linearen-Modell mit folgender Kurvengleichung erstellt:

$$S = e^{-aD}$$

S = Überlebensrate („Survival Rate“)

a = Linearer Dosiseffektkoeffizient [ $\text{Gy}^{-1}$ ]

D = Dosis [Gy]

Die Kurven werden linearisiert ( $-\ln S = aD$ ) und nach der Methode der kleinsten Quadrate (Sachs und Hedderich, 2006) angepasst. Signifikante Unterschiede zwischen der

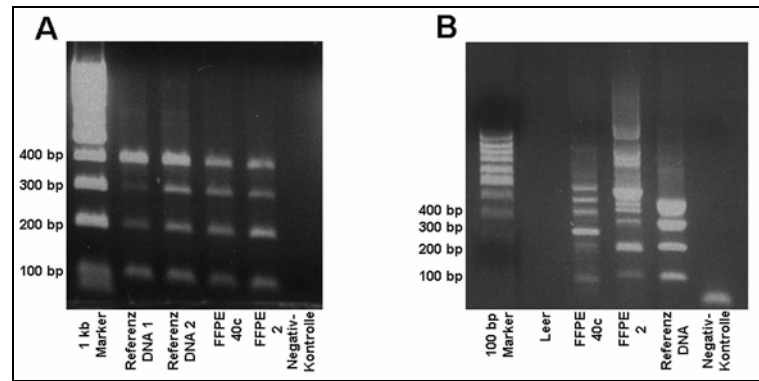
Kurve der nicht-transfizierten Kontrollzelllinie und den mit *FANCA* transfizierten Zelllinien werden mit Hilfe des t-Tests (Sachs und Hedderich, 2006) ermittelt.

## **C ERGEBNISSE**

### **C.1 Etablierung molekulargenetischer Methoden**

#### **C.1.1 Gesamtgenomische Amplifikation von DNA aus formalinfixiertem Paraffingewebe**

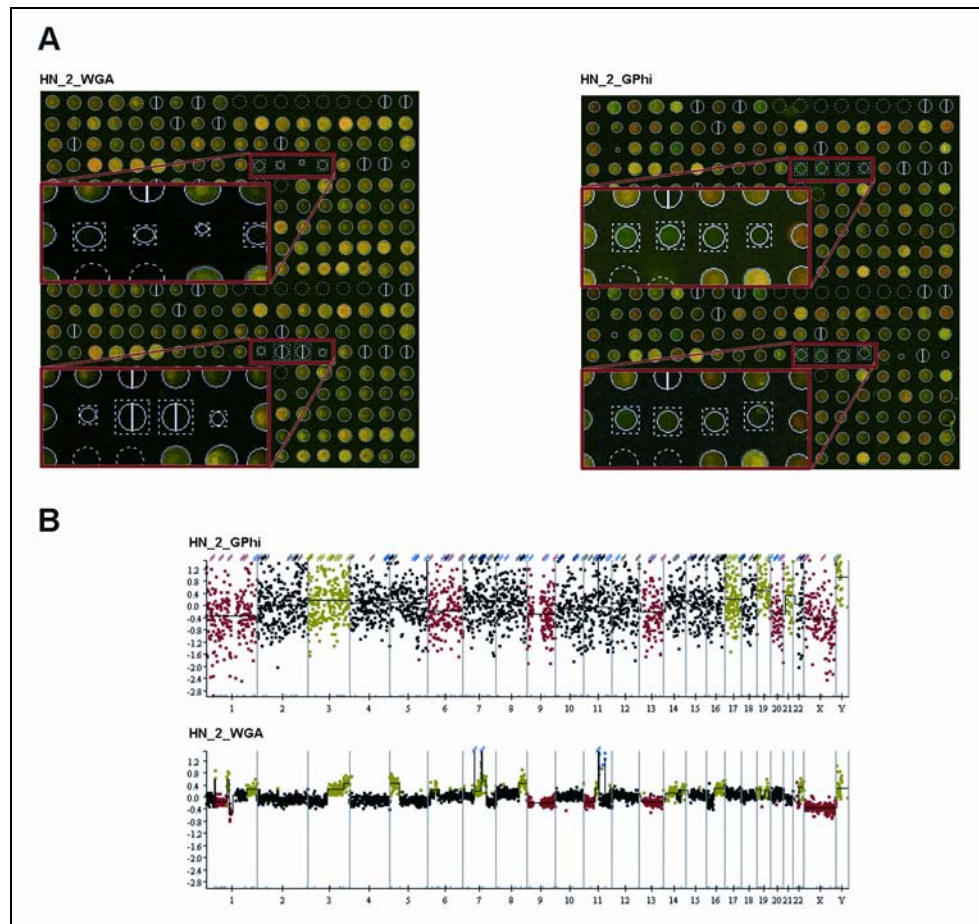
Die Menge an isolierter DNA aus Tumorgewebe ist häufig nicht ausreichend, um molekularzytogenetische Untersuchungen wie CGH und Array-CGH durchführen zu können. Aufgrunddessen ist eine Amplifizierung der genomischen Tumor-DNA notwendig. Es wurden zwei verschiedene PCR-Methoden (Genomi-Phi Amplifikations-Kit und WGA-Kit) ausgetestet, um die gesamtgenomische DNA aus formalinfixiertem Paraffingewebe (FFPE) zu amplifizieren. Beide Verfahren lieferten ausreichende Mengen an Amplifikat. Dieses wurde dann mittels der in B.4.1.2 beschriebenen Multiplex-PCR auf seine Tauglichkeit in Array-CGH-Experimenten getestet. Die Multiplex-PCR der WGA-Amplifikate zeigte deutlich, sowohl in den kommerziellen Referenz DNAs als auch in den DNAs aus formalinfixiertem Paraffingewebe, alle vier Fragmentgrößen (Abb. 24 A), was auf eine optimale DNA-Qualität für Array-CGH-Experimente hindeutete. Die Amplifikate aus der GenomiPhi-amplifizierten DNA hingegen zeigten bei den FFPE-Proben neben den erwarteten Banden noch eine Reihe unspezifischer Intermediärbanden. Die Referenz-DNA lieferte auch hier eindeutig die vier erwarteten Banden der Größe 100, 200, 300 und 400 bp (Abb. 24 B). FFPE-DNA von Fall 2 wurde mit beiden Amplifikationsvarianten auf je einen 1 Mb BAC Array hybridisiert. Es zeigte sich, dass die DNA aus der WGA-PCR ein sauberes Profil mit deutlich erkennbaren Veränderungen lieferte, während die DNA aus der GenomiPhi-PCR unspezifisch hybridisierte (erkennbar durch grüne Fluoreszenz der Drosophila-Kontrollspots) und in der Array-CGH-Analyse auf Grund starker Schwankungen des Profils nicht auswertbar war (Abb. 25).



**Abbildung 24: Multiplex-PCR der Amplifikate aus WGA- und GenomiPhi-PCR.**

(A) WGA-Amplifikation von FFPE- und kommerzieller Referenz-DNA. In der Multiplex-PCR ergeben sich spezifische Amplifikate der zu erwartenden Banden. (B) GenomiPhi-Amplifikation von FFPE- und kommerzieller Referenz-DNA. In der Multiplex-PCR ergeben sich bei der FFPE-DNA unspezifische Intermediärbanden, während die kommerzielle Referenz-DNA spezifische Amplifikate generiert.





**Abbildung 25: Vergleich der Array-CGH von amplifizierter DNA mittels GenomiPhi- und WGA-Kit.**

(A) Gescannte Bilder der hybridisierten Arrays. Die Cy3-markierte Test-DNA liefert ein grünes, die Cy5-markierte Referenz-DNA ein rotes Fluoreszenzsignal. Rot eingerahmt sind die Drosophila-Kontrollklone, welche bei einer spezifischen Hybridisierung keine DNA binden sollten (HN\_2\_WGA). Zeigen diese Spots ein Signal, so handelt es sich um eine unspezifische Hybridisierung (HN\_2\_GPhi). (B) Array-CGH Profile der beiden verschieden amplifizierten FFPE-DNAs. Das Profil der GenomiPhi-amplifizierten DNA zeigt starke Schwankungen der Signale und ist dadurch nicht auswertbar. Das Profil der WGA-amplifizierten DNA hingegen gibt chromosomale Veränderungen klar und deutlich wieder.

### C.1.2 Evaluierung verschiedener Array-Plattformen

Aus den CGH-Analysen der in dieser Arbeit untersuchten HNO-Tumoren ergaben sich chromosomale Veränderungen, welche signifikant mit einer schlechten Prognose der Patienten korrelieren (DNA Zugewinne auf den Chromosomen 16q23-24 und 1q43, sowie DNA Verluste auf Chromosom 18q22, vergl. C.2). Die DNA von Fällen, welche diese Aberrationen in der CGH zeigten, wurden zur Eingrenzung der betroffenen chromosomalen Regionen mittels höher auflösender Array-CGH untersucht. Es stan-

den zwei Array-Plattformen zur Verfügung, welche auf ihre Tauglichkeit in dieser Fragestellung überprüft werden sollten.

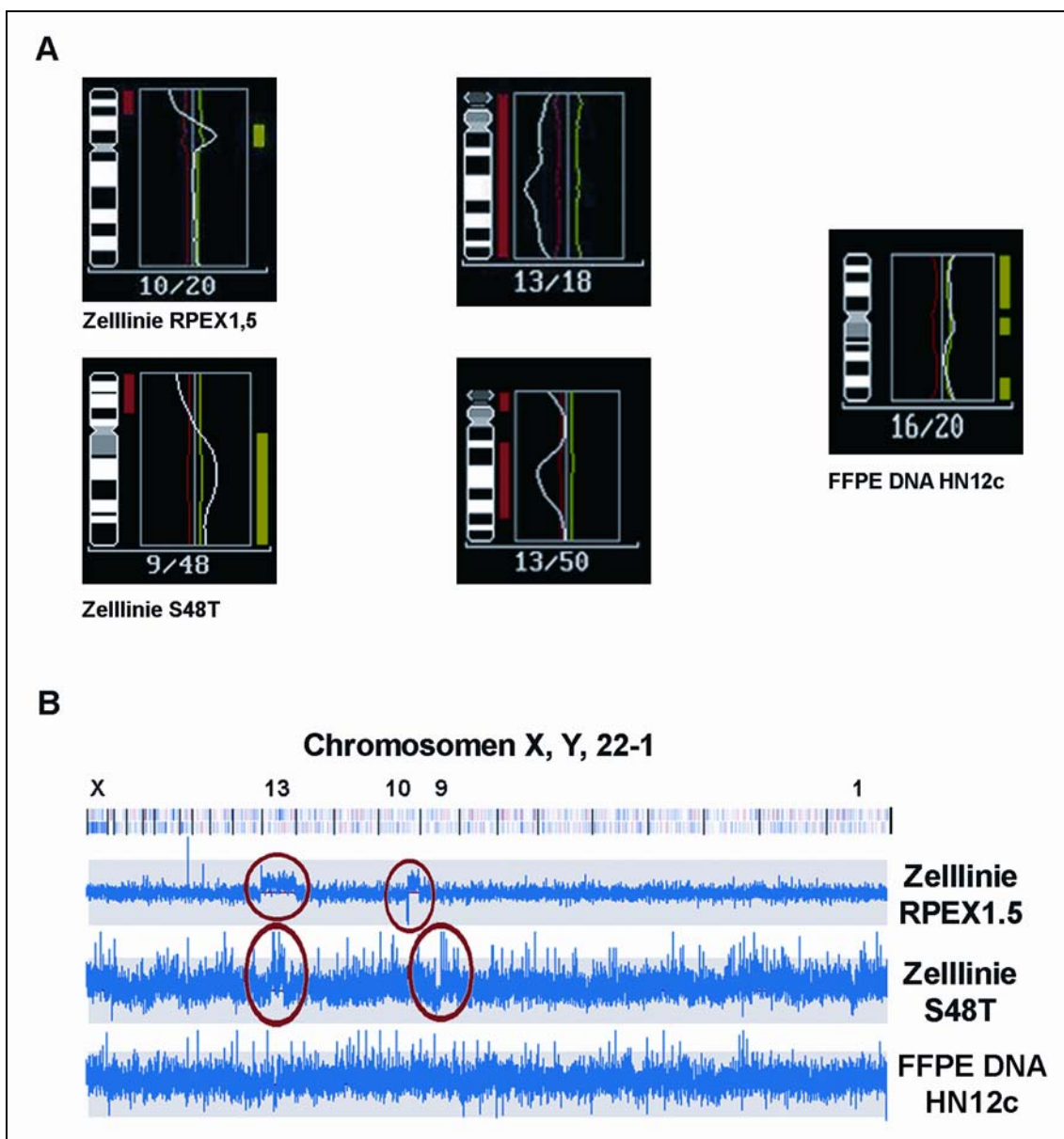
*SNP Array: Affymetrix GeneChip® Mapping 10K Array Xba 142 2.0*

Die Komplexitätsreduzierung des Genoms durch einen Restriktionsverdau zu Beginn des Protokolls stellte sich aufgrund der teilweise stark fragmentierten DNA aus FFPE-Gewebe als problematisch dar. Zunächst gelang es nicht die Proben-DNA in der Linker-Adapter PCR effizient zu amplifizieren, da in dieser fast ausschließlich Fragmentgrößen von 250-1000 bp vervielfältigt werden. Nach vorausgehender Kontrolle der Fragmentverteilung im Agarosegel und nach Adaptierung des Protokolls (Erhöhung der eingesetzten DNA-Menge, Ansetzen mehrerer PCR-Reaktionen) gelang es schließlich doch, die benötigte Menge an DNA herzustellen. Zum Vergleich der Ergebnisse wurden zusätzlich zwei zytogenetisch charakterisierte Tumor-Zelllinien, RPEX1.5 und S48T, analysiert. Die tumorogene epitheliale Retina-Zelllinie RPEX1.5 ist durch drei deutliche chromosomale Veränderungen gekennzeichnet: Deletionen auf den Chromosomen 13q und 10p, sowie einer Amplifikation auf 10p. S48T ist eine triploide epitheliale Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie, welche in der chromosomalen CGH einen DNA-Zugewinn auf Chromosom 9q sowie Deletionen auf den Chromosomen 9p und 13q zeigen (siehe Abb. 26 A). Die Auswertung der durch die Affymetrix-Software (GCOS und GDAS) generierten Daten im Hinblick auf chromosomale Imbalancen erfolgte mit Hilfe der DNA-Chip Analyzer Software (dChip; Li und Wong, 2004). Die chromosomalen Veränderungen von RPEX1.5 ließen sich aus dem Array-Profil exakt ablesen (Abb. 26 B) und konnten in einer höheren Auflösung beschrieben werden. Das amplifizierte Gen PARD3 (Zitzelsberger et al., 2004) lag genau in dem als amplifiziert angezeigten Bereich auf Chromosom 10p. Bei der Auswertung von S48T war ein deutlich höheres Hintergrundrauschen der Signale als bei RPEX1.5 zu beobachten. Dennoch ließen sich im Vergleich mit den Profilen der chromosomalen CGH Veränderungen auf den Chromosomen 9 und 13 lokalisieren und genauer eingrenzen (Abb. 26). Das Profil der FFPE-Probe hingegen machte auf Grund des starken Rauschens der Signale Aussagen über chromosomale Veränderungen und eine Schwellenwertsetzung nahezu unmöglich. Nur im direkten Vergleich mit den Bildern der chromosomalen CGH des Falles konnten Tendenzen zu DNA-Verlusten oder DNA-Zugewinnen ermittelt werden. Über bestimmte Veränderungen mit geringerer Ausprägung, wie der DNA Zugewinn auf Chromosom 16q, konnten keine Aussagen getroffen werden.

Die Stärke des Hintergrundrauschens der Affymetrix-Profile zeigte eine deutliche Abhängigkeit von Polyploidiegrad und Aberrationsanzahl der Probe. Bei gering veränder-

ter DNA konnten chromosomale Veränderungen präzise und in hoher Auflösung dargestellt werden (RPEX1.5). Bei der triploiden Zelllinie S48T und der FFPE-Tumor-Probe mit zahlreichen Aberrationen erhöhte sich das Hintergrundrauschen deutlich. Dies lag mitunter daran, dass bei den stark aberranten Proben viele der so genannten „calls“ durch die Software aus der Auswertung genommen wurden. Da diese Array-Plattform eigentlich auf Genotypisierung und Linkage-Studien ausgerichtet ist, wird für jeden SNP bestimmt, ob dieser in homo- oder heterozygoter Form vorliegt. Wenn das Verhältnis der Allele zwischen Sense- und Antisense-Strang aufgrund von Polyploidien oder DNA-Zugewinnen bzw. DNA-Verlusten der Proben-DNA zu stark aus dem Gleichgewicht gerät (z.B. bei einem DNA-Zugewinn AAAB anstatt von AB), passieren viele der betroffenen SNPs nicht die Qualitätskontrolle der GDAS-Software, da der Genotyp nicht errechnet werden kann. Dies führt zu hohen Intensitätsraten des gescannten Arrays, was zunächst auf eine erfolgreiche Hybridisierung schließen lässt. Die „Call Rate“ der letztendlich auswertbaren SNPs hingegen liegt deutlich unter dem erwünschten Wert von 99%. Ein weiteres Manco der Auswertung bestand darin, dass SNPs von einigen bekannten Proto-Onkogenen oder Supressorgenen nicht auf dem Array vertreten waren.

Aufgrund der Limitierungen in Anwendung und Auswertung von FFPE-Proben, wurden die Array-CGH Analysen der chromosomalen Veränderungen von Kopf-Hals-Tumoren in höherer Auflösung nicht mit der Array-Plattform von Affymetrix vorgenommen.



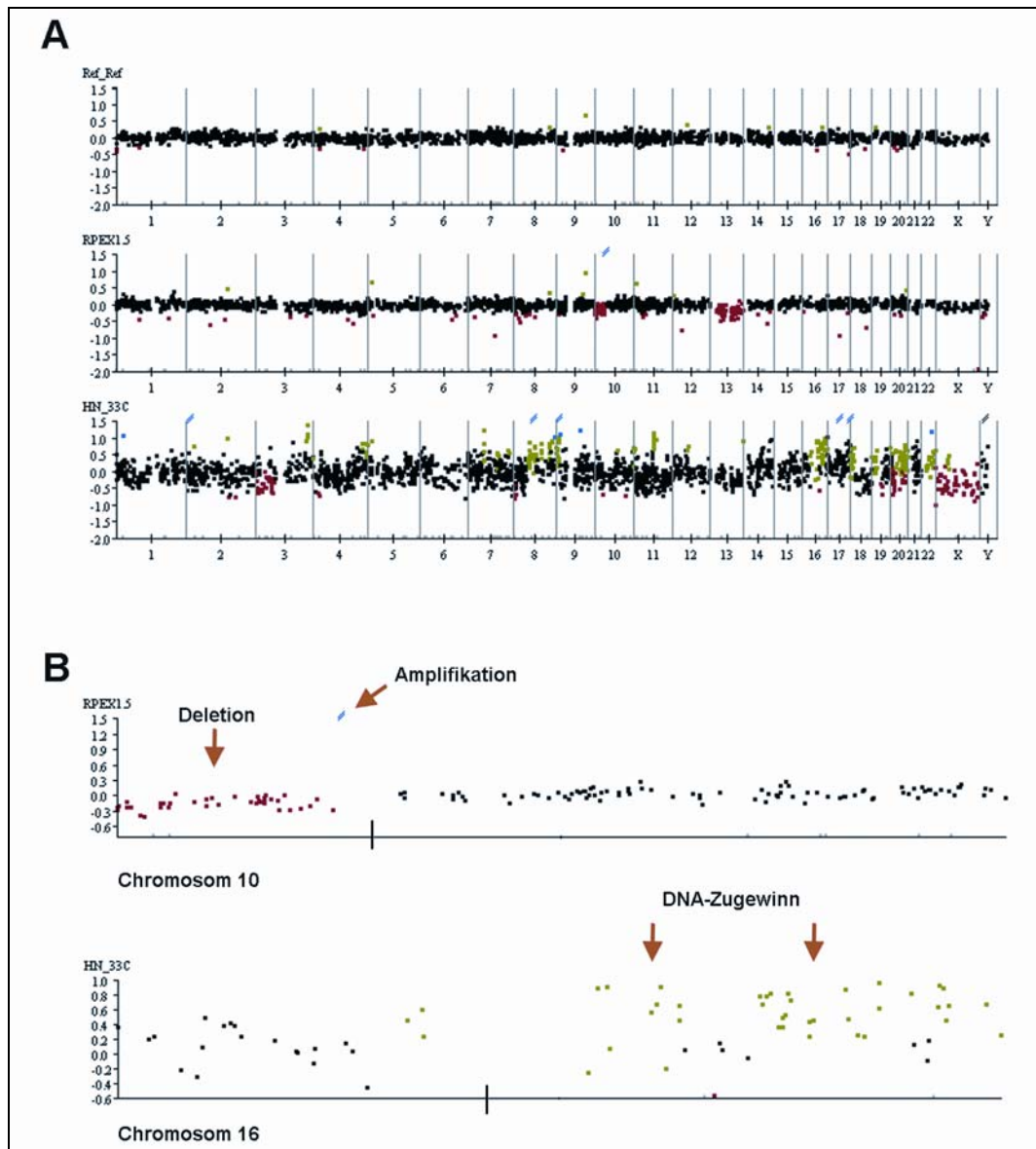
**Abbildung 26: Evaluierung von SNP-Arrays zur Array-CGH-Analyse von DNA aus formalinfixiertem Gewebe.**

(A) CGH Profile charakteristischer Aberrationen der Zelllinien RPEX1.5 und S48T, sowie einer Tumorprobe aus FFPE-Gewebe (HN12c). (B) Gesamtgenomische Array-Profile des Affymetrix GeneChip® Mapping 10K Arrays der beiden Zelllinien und der FFPE-Probe. Die Profile von RPEX1.5 und S48T zeigen erwartete Veränderungen (markiert durch rote Kreise) während bei der FFPE-Probe HN12c aufgrund starker Signalschwankungen kaum Aberrationen erkennbar sind.

### 1Mb BAC Arrays

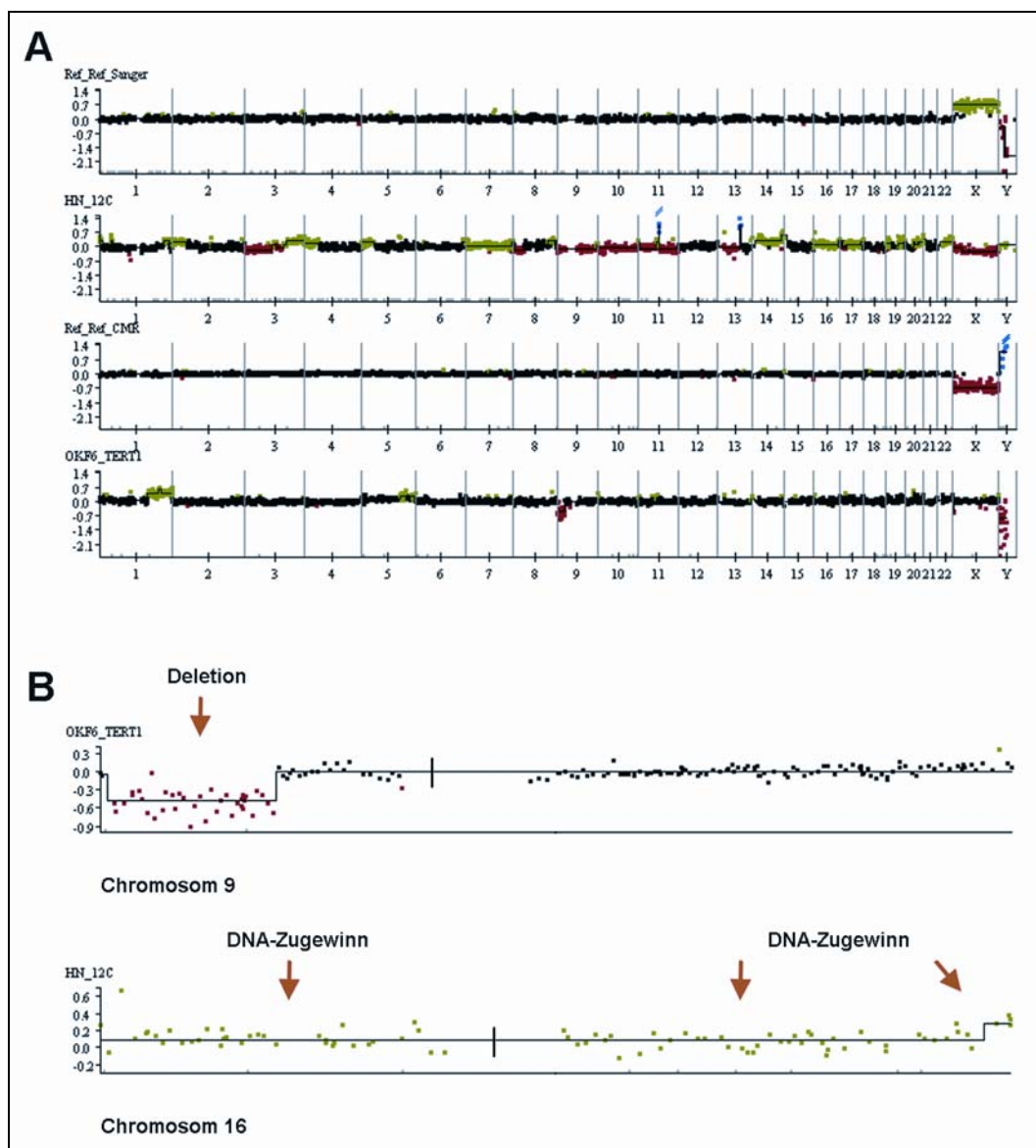
Es standen drei verschiedene BAC-Arrays zur Verfügung: der UCSF Human BAC Array 1.4 Mb, der Sanger 1 Mb Array und der CMR Hs1 Mb BAC Array, wobei sich die letzten beiden Arrays nur in der Spot-Anordnung der Klone unterscheiden. Alle Testhybridisierungen verliefen erfolgreich, alle drei BAC-Arrays zeigten spezifische Hybridisierungen mit wenig Hintergrundrauschen (Abb. 27 und 28). Kontrollhybridisierungen, bei welchen zwei normale DNA-Proben gegeneinander hybridisiert wurden, zeigten in allen Fällen unveränderte Profile. Bekannte Aberrationen in bereits charakterisierten Proben (Zelllinie RPEX1.5, siehe C.1.1) waren reproduzierbar und klar zu erkennen. Auch die Analyse von DNA-Proben aus FFPE-Gewebe lieferte die gewünschte Darstellung der Veränderungen in einer höheren chromosomalen Auflösung.

Auf Grund der Ergebnisse dieser Voruntersuchung erfolgten die Array-CGH Experimente zur Analyse von Kopf-Hals-Tumoren mit BAC-Arrays. Aus technischen Gründen wurden die UCSF 1.4 Mb BAC-Arrays allerdings nicht weiter angewendet. Bei diesen Arrays befanden sich auf einem Objektträger zwei gespottete Arrays, was eigentlich den Vorteil mit sich bringt, dass in einem Hybridisierungsvorgang zwei Proben analysiert werden können. Das für die Hybridisierung verwendete Hybridisierungsmodul der HS 400 (Tecan) besaß nur einzelne Hybridisierungskammern mit einer reaktiven Fläche, wodurch es nicht möglich war, diesen Vorteil zu nutzen. Für alle weiteren Array-CGH-Untersuchungen wurden die 1 Mb Sanger- und CMR-BAC-Arrays verwendet.



**Abbildung 27: Evaluierung der UCSF 1.4 Mb BAC-Arrays zur Array-CGH-Analyse von FFPE-DNA.**

(A) Genomweite Array-Profile des UCSF 1.4 Mb BAC-Arrays einer Kontrollhybridisierung (Ref\_Ref), der Zelllinie RPEX1.5 und einer DNA-Probe aus FFPE-Gewebe (HN33c). Die X-Achse gibt jeweils die Chromosomennummer (1-22, X und Y) wieder, während die Y-Achse die logarithmierten Werte der Intensitätsquotienten aus Cy3- und Cy-5-Fluoreszenz („log2-Ratios“) für jeden BAC-Klon zeigt. Normale Bereiche sind in schwarz, DNA-Zugewinne in grün, Amplifikationen in blau und DNA-Verluste in rot dargestellt. Die Kontrollhybridisierung zeigt wie erwartet ein unverändertes Profil. Die Darstellung der Zelllinie zeigt ebenfalls ein enges Profil mit wenig Signalschwankungen, die bekannten genomischen Veränderungen sind klar zu erkennen. Die Hybridisierung der FFPE-Probe zeichnet sich durch ein stärker schwankendes Profil aus, aus dem dennoch chromosomale Veränderungen abgelesen werden können. (B) Einzelprofile von RPEX1.5 (Chr. 10) und HN\_33c (Chr.16). Die charakteristischen Veränderungen auf den Chromosomn 10p (RPEX1.5) und 16q (HN\_33c) lassen sich mit hoher Auflösung darstellen.



**Abbildung 28: Evaluierung der 1 Mb BAC-Arrays (Sanger und CMR Hs1) zur Array-CGH-Analyse von FFPE-DNA.**

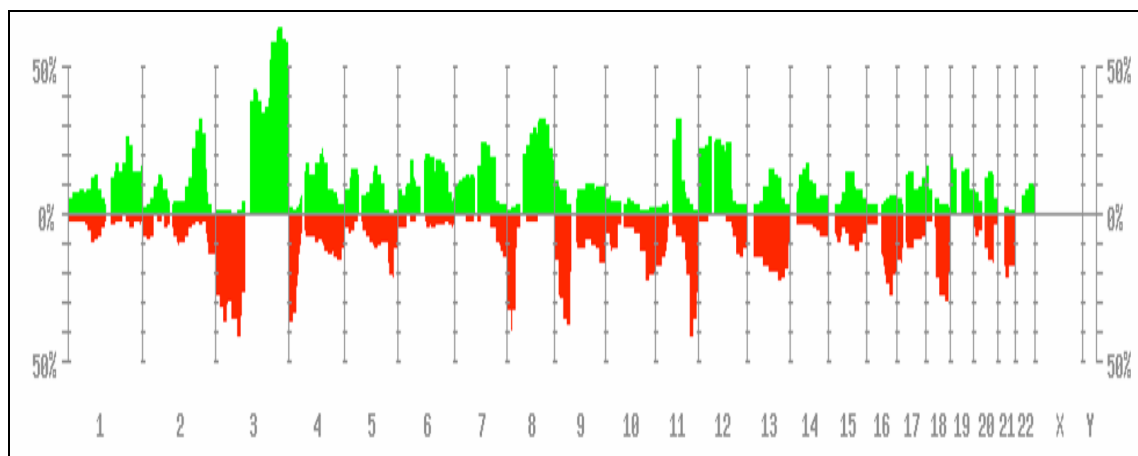
(A) Genomweite Array-CGH-Profile der 1 Mb BAC-Arrays einer Kontrollhybridisierung (Ref Ref), einer Keratinozyten-Zelllinie (OKF6/TERT-1) und einer DNA-Probe aus FFPE-Gewebe (HN12c). Die X-Achse gibt jeweils die Chromosomennummer (1-22, X und Y) wieder, während die Y-Achse die logarithmierten Werte der Intensitätsquotienten aus Cy3- und Cy-5-Fluoreszenz („log2-Ratios“) für jeden BAC-Klon zeigt. Normale Bereiche sind in schwarz, DNA-Zugewinne in grün, Amplifikationen in blau und DNA-Verluste in rot dargestellt. Bei beiden Arrays zeigen die Kontrollhybridisierungen mit normaler Referenz-DNA, bis auf den „Sex-Mismatch“, ein unverändertes Profil. Auch Proben mit komplexerem Karyotyp (HN12c) zeigen klare Profile mit präziser Darstellung der Aberrationen. (B) Exemplarische Einzelschromosom-Profile der Zelllinie OKF6/TERT1 (Chr. 9) und HN12c (Chr. 16). Aus den Profilen gehen DNA-Veränderungen auf den Chromosomen 9p und 16 deutlich hervor.

## C.2 Ergebnisse der chromosomalen CGH-Analysen von Kopf-Hals-Tumoren

### C.2.1 Häufigkeit chromosomaler Veränderungen

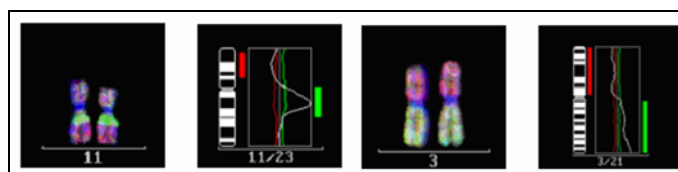
117 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches wurden mittels CGH auf genomische Imbalancen der gesamten genomischen DNA in Form von DNA-Zugewinnen und DNA-Verlusten untersucht. Die Gesamtheit der ermittelten Aberrationen ist in Anhang 1 und in Abbildung 29 zusammengefasst und dargestellt. Auf Grund der Beobachtung von abweichenden Fluoreszenzintensitäten in Kontrollhybridisierungen, welche zu falsch positiven Deletionen auf den Chromosomen 1p32-pter, 16p, 19 und 22 führen (Kallioniemi et al., 1994), wurden Deletionen in den betroffenen chromosomalen Regionen nicht in die Auswertung mit einbezogen. Insgesamt ließen sich 1566 chromosomale Veränderungen, davon 857 DNA-Zugewinne und 709 DNA-Verluste dokumentieren. Einige der DNA-Zugewinne (132) fielen als so genannte „High Level Amplifications“ (HLA; Abb. 30) auf, die einen Grün/Rot-Verhältnis von 1,5 überschreiten oder visuell durch ein starkes Fluoreszenzsignal erfasst werden können (Solinas-Toldo et al., 1996). Die häufigsten (in mehr als 20% der untersuchten Fälle) DNA-Zugewinne befanden sich auf den Chromosomen 1q, 2q, 3q, 4q, 7q, 8q, 11q, 12p, 12q und 19p, während die häufigsten DNA-Verluste auf den Chromosomen 3p, 4p, 8p, 9p, 10q, 11q, 13q, 16q, 18q und 21q lokalisiert waren. Die einzigen HLA mit einer Häufigkeit  $\geq 20\%$  wurden auf Chromosom 3q gefunden. Die einzelnen Banden dieser chromosomalen Regionen und die unterschiedlichen Häufigkeiten können aus Tabelle 8 abgelesen werden. Aus der Verteilung der Häufigkeiten lassen sich auf jedem der aufgeführten Chromosomenarme so genannte „Konsensusbanden“ erkennen, welche den am häufigsten veränderten Bereich für eine bestimmte Aberration unter den 117 untersuchten Fällen wiedergeben (Tab. 8: gelb unterlegt).





**Abbildung 29: Gesamtheit der durch die CGH ermittelten chromosomalen Veränderungen bei 117 Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches.**

Die Veränderungen werden entlang der Chromosomen 1-22 entsprechend ihrer Häufigkeit (%) im Gesamtkollektiv pro Bande dargestellt. DNA-Zugewinne sind in grün, DNA-Verluste in rot angezeigt. Veränderungen auf den Geschlechtschromosomen werden nicht gezeigt, da die Auswahl der Referenz-DNA nicht geschlechtsspezifisch erfolgte.



**Abbildung 30: Exemplarische Darstellung von „High Level Amplifikationen“ auf den Chromosomen 3 und 11.**

Die Abbildung zeigt die Rot-Grün-Fluoreszenzverhältnisse entlang der Chromosomen 11 und 3, jeweils am Metaphasechromosom (links) und im CGH-Profil (rechts). Die Amplifikation ist optisch am Metaphasechromosom durch eine deutliche grüne Färbung zu erkennen und im CGH-Profil zeigt sich eine auffällig starke Abweichung des Profils von der Nulllinie.

Tabelle 8: Die häufigsten DNA-Veränderungen in 117 HNO-Tumorfällen (mindestens 20% der Fälle).

DNA-Zugewinne		DNA-Verluste	
Chromosomale Region	Häufigkeit [%]	Chromosomale Region	Häufigkeit [%]
1q31	26,50	3p26	25,64
1q32	23,08	3p25	29,91
		3p24	35,04
		3p23	29,06
		3p22	28,21
		3p21	34,19
		3p14	40,17
		3p13	33,33
		3p12	24,79
2q24	22,22	4p16	35,04
2q31	28,21	4p15.3	31,62
2q32	31,62	4p15.2	23,08
2q33	27,35		
3q12	37,61	8p23	30,77
3q13.1	41,88	8p22	38,46
3q13.2	41,03	8p21	30,77
3q13.3	38,46		
3q21	34,19		
3q22	35,90		
3q23	39,32		
3q24	52,14		
3q25	58,12, 21,4		
3q26.1	62,39, 21,4		
3q26.2	63,25, 21,4		
3q26.3	63,25, 21,4		
3q27	58,97, 22,2		
3q28	58,12, 20,5		
3q29	58,12, 20,5		
4q26	22,22	9p23	25,64
		9p22	27,35
		9p21	34,19
		9p13	35,90
7q21	23,93	10q25	21,37
7q22	23,08		
8q12	23,08	11q23	40,17
8q13	27,35	11q24	34,19
8q21.1	29,06	11q25	24,79
8q21.2	27,35		
8q21.3	30,77		
8q22	32,48		
8q23	31,62		
8q24.1	31,62		
8q24.2	22,22		
11q12	24,79	13q31	21,37
11q13	31,62	13q32	20,51
12p13	22,22	16q22	22,22
12p12	23,08	16q23	25,64
12p11.2	27,35		
12q12	23,93	18q21	26,50
12q13	24,79	18q22	28,21
12q14	23,08		
12q15	21,37		
12q21	23,93		

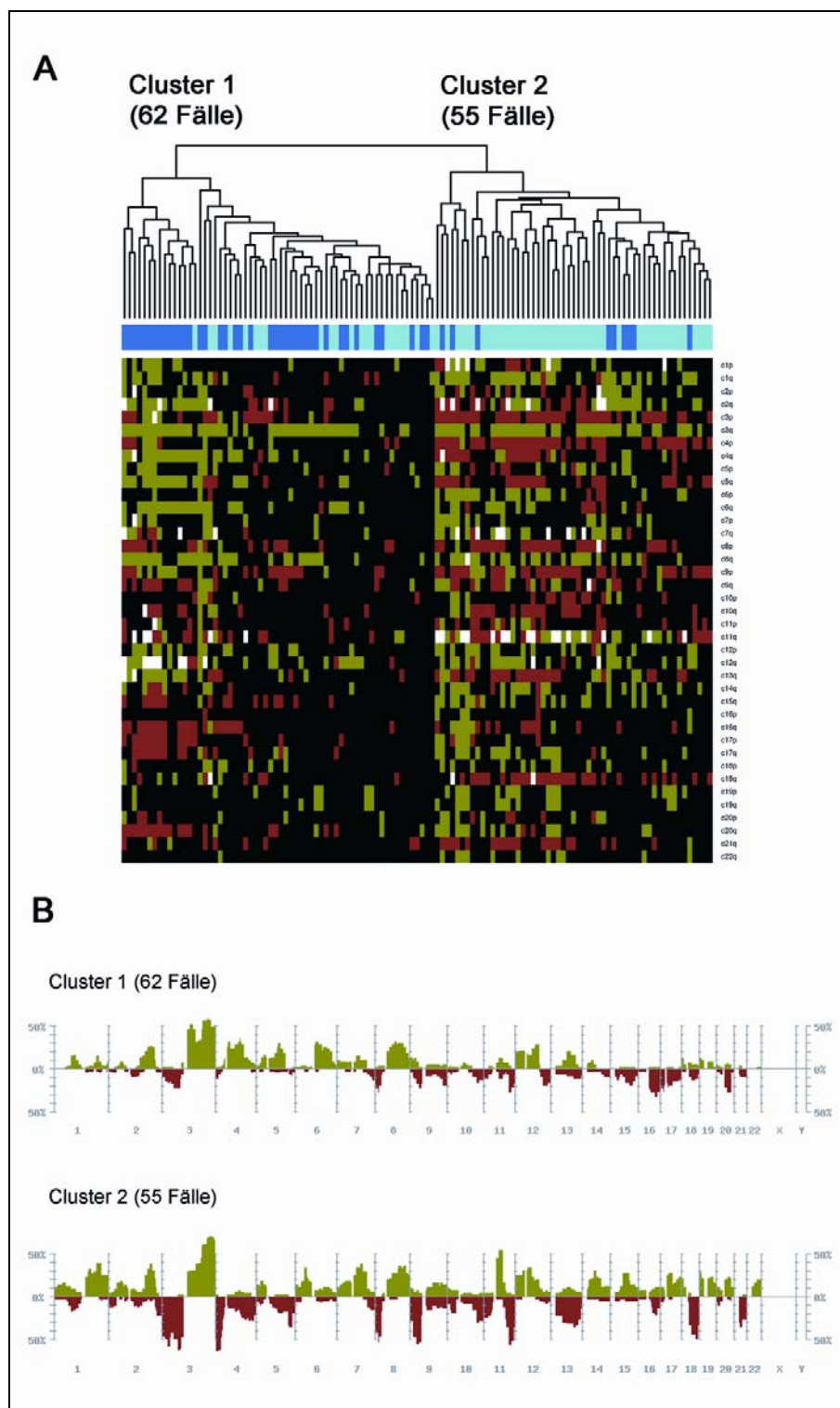
DNA-Zugewinne		DNA-Verluste	
Chromosomale Region	Häufigkeit [%]	Chromosomale Region	Häufigkeit [%]
19p13.3	20,51	21q21	20,51

**Fett** gedruckt: Häufigkeit der Veränderung als HLA

**gelb** unterlegt: Konsensusbanden

### C.2.2 Cluster Analyse

Alle chromosomalen Kopienzahlveränderungen wurden einer hierarchischen Cluster Analyse unterzogen, um Fälle mit ähnlichem Aberrationsmuster zu identifizieren. Diese Analyse legte eine deutliche Unterteilung der Fälle in zwei Hauptcluster (Cluster 1 und 2, siehe Abb. 31) nahe, welche signifikant mit dem Anämiestatus der Patienten korrelierten ( $p < 0,0001$ ). In Cluster 1 befanden sich 35% (22/62), in Cluster 2 83,6% (46/55) anämische Patienten. Innerhalb der zwei Cluster werden die chromosomalen Veränderungen auf die Konsensusbereiche eingegrenzt. Diese umfassen 27 DNA-Zugewinne, 16 HLA und 22 Deletionen in Cluster 1 und 29 DNA-Zugewinne, 28 HLA und 24 Deletionen in Cluster 2. Die betroffenen chromosomalen Regionen sind aus Tabelle 9a und 9b ersichtlich. Beide Hauptcluster werden durch ein bestimmtes Muster an chromosomalen Veränderungen charakterisiert, wobei die auffälligsten Diskrepanzen für DNA-Zugewinne auf den Chromosomen 1q32, 1q43, 4q26, 7q22, 11q13 und 16q23-24 und für Deletionen auf den Chromosomen 3p13, 3p24, 4p16, 9p22, 13q31, 18q22 und 21q21 beobachtet werden konnten.



**Abbildung 31: Hierarchische Cluster Analyse von 117 HNO-Tumoren.**

(A) Dendrogramm der Cluster Analyse von 117 HNO-Tumoren in Abhängigkeit der ermittelten chromosomalen Veränderungen. Die DNA-Zugewinne (grün) und DNA-Verluste (rot) werden nach Gruppen geordnet. Deutlich ist die Aufspaltung in zwei Hauptcluster zu erkennen. Die Farbskala unterhalb des Dendrogramms gibt den Anämiestatus der Patienten wieder (anämisch = hellblau; nicht anämisch = dunkelblau). (B) Häufigkeitsprofile der Aberrationen innerhalb der beiden Hauptcluster.

Tabelle 9a: Konsensbereiche und HLA in Cluster 1.

Cluster 1			
DNA-Zugewinne		DNA-Verluste	
Chromosomale Region	Häufigkeit (%)	Chromosomale Region	Häufigkeit (%)
1p22-31	16,4	2q12-21	8,2
1q31	14,8	3p14-21	21,3
1q44	8,2		
2p15-16	8,2	7q36	11,5
2q31-33	26,2	8p22	26,2
<b>2q32-33</b>	<b>1,6</b>		
3q13,1-13,2	52,5	9p13	21,3
<b>3q25-27</b>	<b>21,0</b>		
3q25-26,3	59,0	9q34	18,0
4q13	31,1	10p13-14	4,9
4q26	36,1		
<b>4q28-31,2</b>	<b>1,6</b>		
5p13	16,4	10q25	14,8
<b>5p13-14</b>	<b>3,2</b>		
5q21	29,5	11p15	9,8
6q13-14	31,1	11q13	9,8
6q22-23	24,6	11q23	26,2
7p14-22	9,8	12q24,1-24,2	18,0
<b>7p13-pter</b>	<b>1,6</b>		
7q21	14,8	13q31-33	9,8
<b>7q21-22</b>	<b>4,8</b>		
8q21,1-23	31,1	14q32	8,2
<b>8q12-24,3</b>	<b>1,6</b>		
9p22-24	13,1	15q13	11,5
<b>9p21-24</b>	<b>1,6</b>	15q23-24	18,0
9q21-34	4,9	16q23	31,1
<b>9q21-34</b>	<b>1,6</b>		
10q21	6,6	17p12	24,6
<b>10q22</b>	<b>3,2</b>		
11q13	11,5	17q12-21	19,7
<b>11q13</b>	<b>4,8</b>		
<b>12p</b>	<b>1,6</b>	18q21-22	11,5
12q21	27,9	20q12-13,2	27,9
13q21	19,7	21q21-22	8,2
14q21	9,8		
<b>15q14-25</b>	<b>1,6</b>		
<b>18p</b>	<b>1,6</b>		
18q11,2-12	6,6		
<b>18q11,2-21</b>	<b>3,2</b>		
19p	11,5		
19q	9,8		
<b>20p</b>	<b>1,6</b>		
20q12	6,6		

Fett gedruckt: HLA

Tabelle 9b: Konsensusbereiche und HLA in Cluster 2.

Cluster 2			
DNA-Zugewinne		DNA-Verluste	
Chromosomale Region	Häufigkeit (%)	Chromosomale Region	Häufigkeit (%)
1p34,3-36,2	16,1	1p22-31	16,1
<b>1p34,2-36,1</b>	<b>10,9</b>		
1q31-32	39,3	2p23-25	10,7
<b>1q32-44</b>	<b>10,9</b>		
2p15-22	17,9	2q13-22	10,7
<b>2p14-16</b>	<b>5,5</b>	2q36-37	21,4
2q32	37,5	3p24	57,1
<b>2q24-32</b>	<b>7,3</b>	3p13-14	60,7
3q26,1-qter	59,6	4p15,3-16	62,5
<b>3q24-29</b>	<b>23,6</b>		
4q24-26	7,1	4q32-34	26,8
<b>4q12-22</b>	<b>1,8</b>		
5p14-15,1	17,9	5p14-15,1	8,9
<b>5p</b>	<b>3,6</b>		
6p21,3	33,9	5q32-34	33,9
<b>6p12-21,1</b>	<b>7,3</b>		
6q22-24	10,7	7q33-36	14,3
<b>6q22-23</b>	<b>1,8</b>		
7p12-15	17,9	8p22	51,8
7q21-22	37,5	9p13-21	53,6
<b>7q11,2-31</b>	<b>10,9</b>		
8q21,3-24,1	35,7	9q21	14,3
<b>8q22-24,2</b>	<b>10,9</b>		
<b>9p</b>	<b>1,8</b>	10p12-13	17,9
9q22-qter	16,1	10q25-26	28,6
<b>9q22-31</b>	<b>7,3</b>		
10p	8,9	11p14-15	23,2
<b>10p</b>	<b>3,6</b>		
11q13	53,6	11q23-24	55,4
<b>11q13</b>	<b>30,9</b>		
12p11,2	30,4	12q24,2-24,3	7,1
<b>12p</b>	<b>5,5</b>		
12q13	33,9	13q31-32	33,9
<b>12q13-21</b>	<b>9,1</b>		
13q14-22	10,7	16q22-23	19,6
<b>13q12-21</b>	<b>1,8</b>		
14q22	30,4	17p12-13	5,4
<b>14q11,2-13</b>	<b>7,4</b>		
15q21-22	26,8	18q22	48,2
<b>15q</b>	<b>3,6</b>		
<b>16p</b>	<b>3,6</b>	21q21	33,9
16q22-qter	8,9		
<b>16q</b>	<b>3,6</b>		
17p12-13	10,7		
<b>17p</b>	<b>5,5</b>		
17q11,2-21	26,8		
17q25	23,2		
<b>17q23-25</b>	<b>7,3</b>		
18p11,3	21,4		
19p13,3	30,4		

Cluster 2			
DNA-Zugewinne		DNA-Verluste	
Chromosomale Region	Häufigkeit (%)	Chromosomale Region	Häufigkeit (%)
19q	23,2		
<b>19q</b>	<b>1,8</b>		
<b>20p</b>	<b>1,8</b>		
20q12-13,2	23,2		
<b>20q</b>	<b>1,8</b>		
22q13	19,6		
<b>22q12-13</b>	<b>3,6</b>		

Fett gedruckt: HLA

### C.2.3 Korrelation der rezidivfreien Überlebenszeit mit klinischen Parametern und chromosomalen Kopienzahlveränderungen

Die in der CGH Analyse erhobenen Daten und die klinischen Parameter (vergl. B.1 Tabelle 1) wurden im Hinblick auf eine signifikante Korrelation mit dem krankheitsfreien Überleben untersucht. Dazu wurden uni- und multivariate statistische Verfahren herangezogen. Die Berechnung der signifikanten Hazardverhältnisse für die klinischen Parameter durch univariate Cox Regression (proportionales Hazard Modell) zeigte eine signifikante Korrelation der Tumorgröße (pT), des Resektions- und des Anämiestatus der Patienten mit dem rezidivfreien Überleben (Tab. 10).

Auch chromosomale Veränderungen, welche in mindestens sechs Fällen vorkommen, wurden auf einen Zusammenhang mit dem krankheitsfreien Überleben geprüft. Daraus ergab sich, dass sowohl DNA-Zugewinne auf den Chromosomen 1q43 und 16q23-24, als auch DNA-Verluste auf Chromosom 18q22 einen signifikanten Einfluss auf das rezidivfreie Überleben haben. Die Kaplan-Meier-Stufengraphik (Abb. 32) verdeutlicht, dass Patienten mit einer dieser chromosomalen Veränderungen eine wesentlich schlechtere Prognose haben als Patienten, welche keine dieser Veränderungen aufweisen. Dieser Befund blieb auch nach Korrektur der p-Werte mittels FDR (Hochberg-Benjamini Adaptierung) erhalten (Tab. 11).

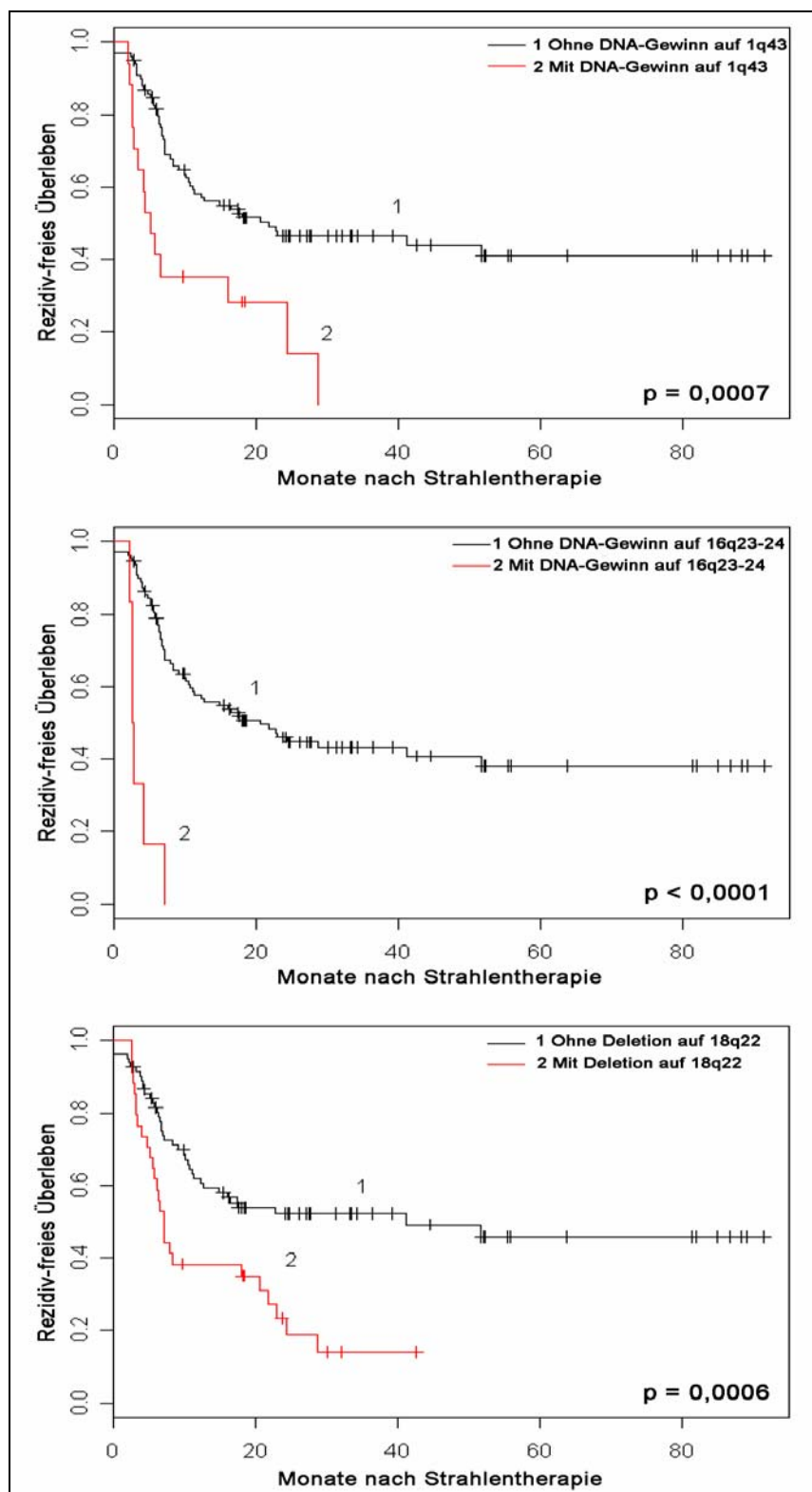
Die durch univariate statistische Methoden ermittelten signifikanten Korrelationen wurden in der multivariaten Cox-Regression auf ihre Unabhängigkeit überprüft. Es zeigte sich, dass Resektions- (Hazardverhältnis 2,3 pro Status,  $p < 0,0001$ ) und Anämiestatus (Hazardverhältnis 2,5;  $p = 0,001$ ), sowie DNA-Zugewinne auf den Chromosomen 1q43 (Hazardverhältnis 2,6;  $p = 0,0076$ ) und 16q23-24 (Hazardverhältnis 6,0;  $p = 0,0017$ ) weiterhin signifikant mit dem rezidivfreien Überleben korrelieren.

**Tabelle 10: Signifikante Hazardverhältnisse für die Korrelation klinischer Parameter mit einer rezidivfreien Überlebenszeit.**

<b>Klinische Parameter</b>	<b>Fallzahl pro Parameter</b>	<b>Hazardverhältnis</b>	<b>Log Rang Test, Freiheitsgrade</b>	<b>p-Wert</b>
Tumorgröße (pT0-pT3, pT4)	74/42	1,22	5,84; 1	0,016
Resektionsstatus (R0, R1-2, primäre Strahlentherapie)	40/17/59	1,95 pro Status	19,9; 2	<0,0001
Anemiestatus: nicht-anämisch/anämisch	49/68	2,24	9,04	0,0026

pT0-pT3, pT4, R0, R1-2: siehe Anhang 1





**Abbildung 32: Kaplan-Meier-Überlebenskurven für Patienten mit und ohne DNA-Zugewinn auf den Chromosomen 1q43 und 16q23-24 und Deletion auf Chromosom 18q22.**

Auswirkung von DNA-Zugewinnen auf den Chromosomen 1q43 (A) und 16q23-24 (B) und DNA-Verlusten auf Chromosom 18q22 (C) auf das krankheitsfreie Überleben von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren. Vertikale Markierungen innerhalb der Graphen zeigen zensierte Patienten.

**Tabelle 11: Statistische Kenngrößen für die Korrelation chromosomaler Veränderungen mit dem rezidivfreien Überleben nach Korrektur der p-Werte mit FDR.**

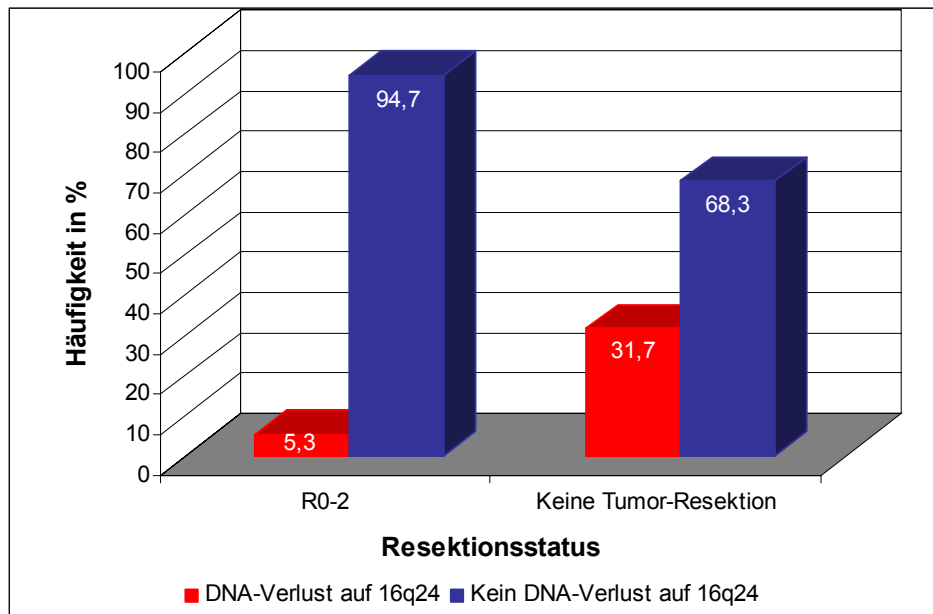
Chromosomale Region	Art der Veränderung	Hazard-rate	Log Rang Test, Freiheitsgrade	p-Wert	FDR-Korrigierter p-Wert
16q23-24	DNA-Zugewinn	8,43	31,1	<0,0001	0,0004
1q43	DNA-Zugewinn	2,71	11,59	0,0007	0,048
18q22	Deletion	2,32	11,64	0,0006	0,048

#### **C.2.4 Korrelation der chromosomalen Kopienzahlveränderungen mit klinischen Parametern**

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den chromosomalen Kopienzahlveränderungen und den bekannten klinischen Parametern Tumorgöße, Lymphknotenbefall, Tumor-Differenzierungsgrad, Lokalisation, Resektions- und Anämiestatus zu untersuchen, wurden verschiedene nicht-parametrische Tests (Jonckheere-Terpstra Trend Test, Chi-Quadrat-Test) angewendet. Es zeigte sich, dass DNA-Verluste auf Chromosom 16q24 signifikant mit dem Resektionsstatus der Tumoren korrelieren (FDR-korrigierter p-Wert = 0,042). Inoperable Tumoren (primäre Strahlentherapie der Patienten ohne chirurgischen Eingriff) zeigten eine Deletion auf 16q24 etwa sechs-mal häufiger, als resektable Tumoren (R0-2; siehe Abb. 33).

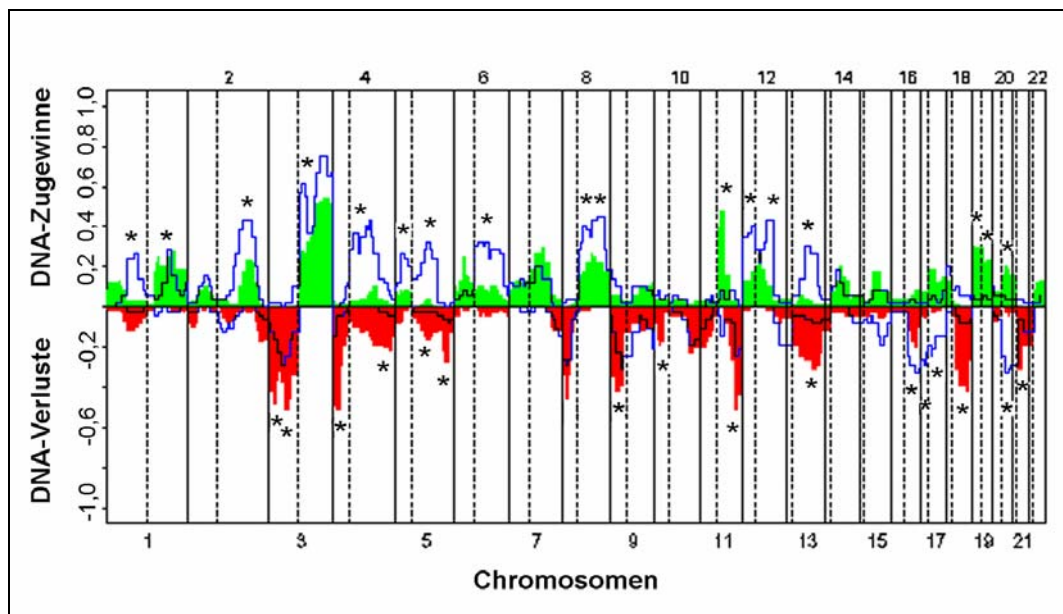
Des Weiteren wurde eine Assoziation zwischen einigen chromosomalen Veränderungen und dem Anämiestatus der Patienten festgestellt. Beim Vergleich von anämischen und nicht-anämischen Fällen ergaben sich signifikante Unterschiede (FDR korrigierter p-Wert<0,05) für die Häufigkeiten von Aberrationen auf folgenden Chromosomen: 1p22-31, 1q22-23, 2q22-31, 3p24-26, 3p12-14, 3q12-13.3, 4p14-16, 4q12-34, 5p14, 5q11.2-23, 5q33-34, 6q12-24, 8q13, 8q23-24.1, 9p22-24, 10p12-14, 11q12-13, 11q23-24, 12p11.2-13, 12q21-22, 13q14-32, 16q12.1-12.2, 16q24, 17p11.2-13, 17q11.2-25, 18q12-23, 19p13.1-13.3, 19q13.1-13.3, 20q11.2-13.3 und 21q11.2-21 (Abb. 35).

Zwischen den klinischen Parametern Tumorgöße, Lokalisation, Lymphknotenbeteiligung und Differenzierungsgrad und den ermittelten chromosomalen Aberrationen konnte keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden.



**Abbildung 33: Signifikante Korrelation zwischen Resektionsstatus und Deletion auf Chromosom 16q24.**

Inoperable Tumore (keine Tumor-Resektion) zeigen einen Verlust auf 16q24 etwa sechs mal häufiger als resektable Tumore (R0-2). Diese Korrelation zwischen Resektionsstatus und DNA-Verlust auf Chromosom 16q ist statistisch signifikant ( $p=0,042$ ).



**Abbildung 34: Signifikante Unterschiede der chromosomalen Veränderungen zwischen anämischen und nicht anämischen Patienten.**

Die Häufigkeiten der chromosomalen Veränderungen in anämischen (farbige Fläche) und nicht anämischen Patienten (blaue Linie) sind graphisch dargestellt. Gestrichelte Linien geben die Centromerpositionen wieder. Signifikante Unterschiede der beiden Gruppen sind durch Sternchen gekennzeichnet.

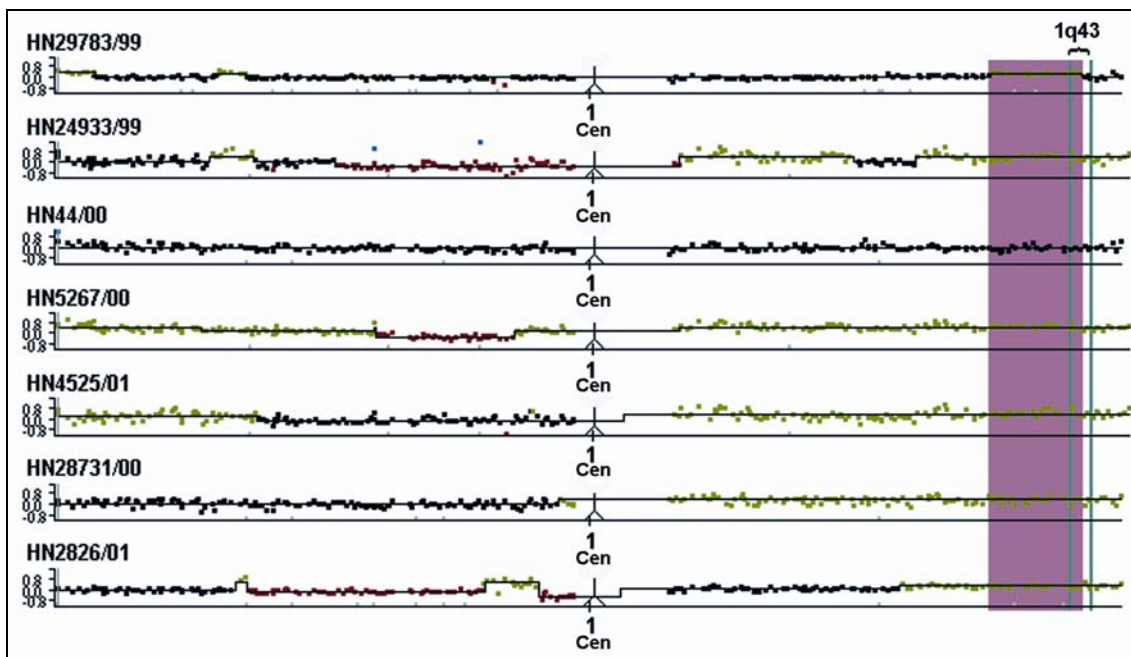
### **C.2.5 Korrelationen zwischen chromosomalen Kopienzahlveränderungen**

Mit Hilfe des exakten Fisher Tests wurde die Unabhängigkeit der signifikant mit dem rezidivfreien Überleben korrelierenden chromosomalen Veränderungen von anderen Aberrationen getestet. Es zeigte sich, dass DNA-Zugewinne auf den Chromosomen 1q43 und 16q23-24 in fünf Fällen simultan auftreten ( $p=0,0002$ ). Des Weiteren konnten Co-Aberrationen von DNA-Zugewinnen auf 16q23-24 und Deletionen auf 3p14 in allen sechs Fällen mit 16q-Zugewinn beobachtet werden ( $p= 0,0039$ ).

### C.3 Validierung von Kopienzahlveränderungen

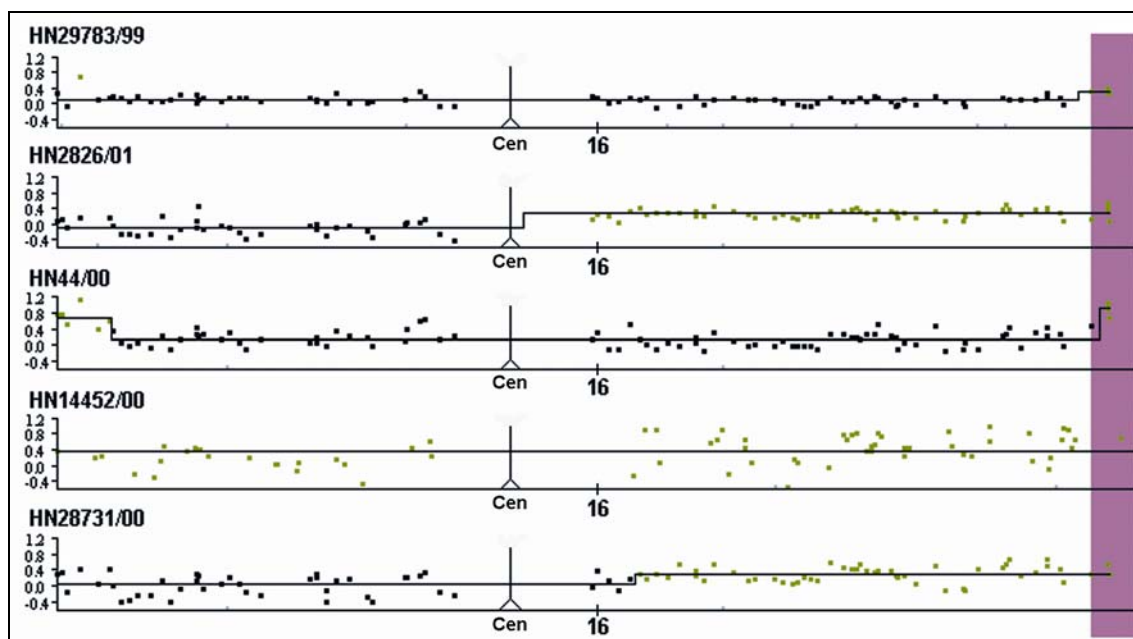
#### C.3.1 Array-CGH Analysen von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches

Aus den Daten der konventionellen CGH-Analyse (C. 2) konnten chromosomale Veränderungen ermittelt werden, die eine signifikante Korrelation zu einem verminderten Überleben der Patienten aufweisen. Diese Aberrationen (DNA-Zugewinne auf den Chromosomen 1q43 und 16q23-24, sowie DNA-Verluste auf Chromosom 18q22) wurden auf 1 Mb BAC Arrays in höherer Auflösung untersucht. Die Array-CGH-Analyse von sieben der 13 Patienten, welche in der chromosomalen CGH einen DNA-Zugewinn auf Chromosom 1q43 zeigten, verifizierte die Veränderung in sechs von sieben Fällen (Abb. 35). In einem Fall konnte die Aberration in der Array-CGH nicht nachgewiesen werden (HN44/00). Der durch die Array-CGH ermittelte Konsensusbereich auf Chromosom 1 lag auf 1q41-43. Der DNA-Zugewinn auf Chromosom 16q23-24 wurde in allen fünf untersuchten Fällen verifiziert und konnte weiter eingegrenzt werden auf eine chromosomale Subbande auf 16q24.3 (Abb. 36). Die Untersuchung von 12 der 29 Fälle mit Deletion auf 18q22 ergab eine Bestätigung der Deletion in 50% der Fälle (Tumorfälle HN25610/99, HN5267/00, HN14452/00, HN28731/00, HN26989/99 und HN12925/03). Wie aus Abbildung 37 ersichtlich, lagen die Konsensusbanden innerhalb dieser sechs Fälle auf 18q12, 18q12-22 und 18q22-23. Interessanterweise fiel ein Großteil der Bande 18q22 aus den Konsensusbereichen aufgrund eines Falles, welcher in genau dieser Region keine Veränderung in der Array-CGH aufwies (Fall HN26989/99), raus. Bei den Tumoren HN29783/99, HN24933/99, HN23263/99, HN33275/00, HN28714/00 und HN25165/00 konnten in der Array-CGH-Analyse keine Deletionen auf Chromosom 18 ermittelt werden.



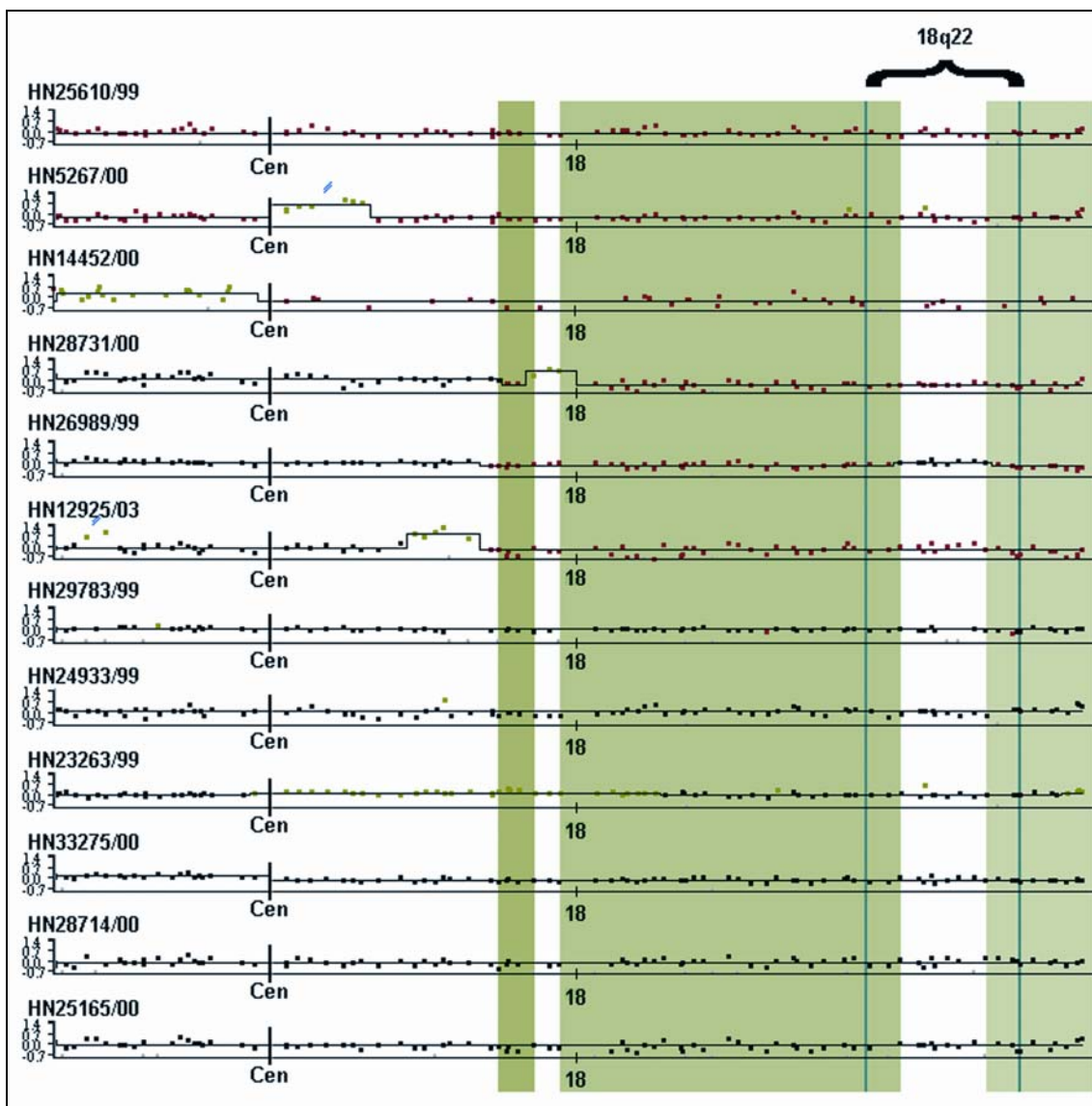
**Abbildung 35: Array-CGH Profile für Chromosom 1.**

Die Abbildung zeigt die Array-CGH-Profile für Chromosom 1 in sieben untersuchten Patienten-Proben. Entlang der X-Achse, welche Chromosom 1 darstellt (links p-Arm, rechts q-Arm) sind in Y-Richtung die logarithmierten Werte der Intensitätsquotienten aus Cy3- und Cy-5-Fluoreszenz („log2-Ratios“) für jeden BAC-Klon angezeigt. Die Lage des Centromers ist durch vertikale Linien indiziert, DNA-Zugewinne sind in grün und DNA-Verluste in rot dargestellt. Der DNA-Zugewinn auf 1q43 ist in sechs von sieben Fällen vorhanden. Die Konsensus-Region in der Array-CGH (violetter Balken) befindet sich auf 1q41-43. Die Lokalisation der Bande 1q43 ist durch türkis-farbige vertikale Linien dargestellt.



**Abbildung 36: Array-CGH Profile von Chromosom 16.**

Die Abbildung zeigt die Array-CGH-Profile für Chromosom 16 in fünf untersuchten Patienten-Proben. Entlang der X-Achse, welche Chromosom 16 darstellt (links p-Arm, rechts q-Arm) sind in Y-Richtung die logarithmierten Werte der Intensitätsquotienten aus Cy3- und Cy-5-Fluoreszenz („log<sub>2</sub>-Ratios“) für jeden BAC-Klon angezeigt. Die Lage des Centromers ist durch vertikale Linien indiziert, DNA-Zugewinne sind in grün und DNA-Verluste in rot dargestellt. Der kleinste gemeinsam veränderte Bereich (roter Balken) liegt auf 16q24.3 und bestätigt den aus der CGH-Analyse ermittelten DNA-Zugewinn.



**Abbildung 37: Array-CGH Profile von Chromosom 18.**

Die Abbildung zeigt die Array-CGH-Profile für Chromosom 18 in 12 untersuchten Patienten-Proben. Entlang der X-Achse, welche Chromosom 18 darstellt (links p-Arm, rechts q-Arm) sind in Y-Richtung die logarithmierten Werte der Intensitätsquotienten aus Cy3- und Cy-5-Fluoreszenz („log2-Ratios“) für jeden BAC-Klon angezeigt. Die Lage des Centromers ist durch vertikale Linien indiziert, DNA-Zugewinne sind in grün und DNA-Verluste in rot dargestellt. Die Chromosomenbande 18q22 wird durch türkis-farbige vertikale Linien dargestellt. Konsensusbanden von DNA-Verlusten auf 18q in sechs Fällen sind grün unterlegt und befinden sich auf 18q12, 18q12-22 und 18q22-23.



### C.3.2 FISH-Experimente zur Verifizierung von chromosomalen Aberrationen

Durch die statistische Analyse der CGH-Daten konnten chromosomale Zugewinne auf den Chromosomen 16q23-24 und 1q43, sowie Deletionen auf Chromosom 18q22 signifikant mit einem verkürzten rezidivfreiem Überleben der Patienten korreliert werden. Die chromosomalen Veränderungen auf 1q43 und 18q22 konnten in der Array-CGH weitgehend bestätigt werden (C.3.1). DNA-Zugewinne auf Chromosom 16q23-24 wurden hingegen in allen betroffenen Fällen bestätigt und die veränderte Region konnte weiter auf 16q24.3 eingegrenzt werden. Diese Veränderungen sollten auch durch FISH-Experimente auf DNA-Ebene an den Originalgeweben der Patienten verifiziert werden. Dazu wurden aus den betroffenen chromosomalen Regionen BAC-Klone herausgesucht ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)), welche ein oder mehrere interessante Kandidatengene repräsentieren (Tab. 12). Zusätzlich wurden Referenzklone in Form von centromernahen BACs verwendet. Da die Verfügbarkeit von Tumorgewebe in einigen Fällen extrem limitiert war, konnten leider nicht immer alle BACs hybridisiert werden. Die Ergebnisse der Hybridisierungen für die BAC-Klone auf Chromosom 16q sind in Tabelle 13 und in den Abbildungen 38-41 zusammengefasst. Die FISH-Signale der BAC-Klone (Centromersonde: grüne Signale, BAC-Klone: rote Signale) wurden ausgezählt und die Häufigkeit (2 Signale, 3 Signale, >3 Signale) anhand der ausgewerteten Zellzahl errechnet. Leider war es nicht möglich, zu jeder BAC-Sonde spezifisch eine Centromersonde auszuwerten, wodurch ein direkter intrazellulärer Vergleich der Kopienzahl von Centromer und Kandidatengen möglich gewesen wäre. In der Häufigkeitsverteilung der Signale der Centromersonden, zeigten 40-60% der ausgewerteten Zellen (Fälle HN24419/98, HN14452/00, HN28731/00 und HN8826/01) eine normale Genkopienzahl (zwei Signale), während es bei Fall HN29783/99 sogar 85% waren. In den Tumoren HN24419/98, HN14452/00 und HN8826/01 konnten in etwa 30% der Zellen drei Centromersignale beobachtet werden, in Tumor HN28731/00 waren es 42% und in Tumor HN29783/99 32% der Zellen. Seltener, mit einer Häufigkeit von 1% (Fall HN24419/98) bis 14% (Fall HN28731/00), wurden mehr als drei Centromersignale gezählt. Das Auftreten von drei Centromersignalen konnte in einigen Fällen klar einer Trisomie des Chromosoms 16 oder einem triploiden Chromosomensatz der Tumorzellen zugeordnet werden. In diesen Fällen zeigte z.B. auch der BAC-Klon RP11-79A1 drei Signale (Fall HN28731/00; Abb. 39). Das Beispiel einer Tumorzelle des Falles HN14452/00 in Abbildung 39, bei welcher drei Centromersignale auf Chromosom 16 und vier Signale des BACs RP11-79A1 auf Chromosom 16 gezählt werden konnten, zeigt, dass erhöhte FISH-Signale der BACs auch zusätzlich zu einer möglichen Polyploidie auftreten können.

In allen untersuchten Tumorgeweben konnte eine Amplifikation auf 16q24.3 nachgewiesen werden. Die BAC-Klone RP11-79A1, RP11-781H20, RP11-476G08 und RP11-354M24 zeigten in allen Fällen deutlich mehr als drei Signale im Vergleich zu den Centromersignalen. Auffällig war, dass die Sonde RP11-354M24, welche den Genlokus des *FANCA*-Gens repräsentiert, in vier von sechs Tumorfällen im Vergleich zu den anderen BAC-Klonen sehr viel häufiger mehr als drei Signale lieferte (Fall HN24419/98: 54%; Fall HN8826/01: 66%; Fall HN29783/99: 24%; Fall HN44/00: 49%). In den restlichen zwei Fällen waren mehr als drei Signale für alle untersuchten BAC-Klonen ähnlich häufig (Fall HN14452/00: ~ 35%; Fall HN28731/00: ~ 23%).

Während der gesamten FISH-Auswertung fielen die extrem unterschiedliche Anzahl von Signalen pro Zelle auf. Innerhalb der Tumorgewebe wurden immer wieder auch Zellen mit normaler Genkopienzahl (zwei Signale) registriert, wobei darauf geachtet wurde, diese nicht mit infiltrierenden Lymphozyten einer Entzündungsreaktion oder normalen Epithelzellen am Rand des Tumorareals zu verwechseln. Zellen mit veränderter Kopienzahl zeigten eine sehr uneinheitliche Anzahl von FISH-Signalen; diese reichten von drei Signalen bis teilweise sieben Signalen pro Zelle. Diese Tatsache, welche auch gut in den Abbildungen 38-41 zu erkennen ist, weist auf eine Heterogenität der Tumoren hin, bei der sich die Zellen innerhalb eines Tumorgewebes hinsichtlich ihrer zytogenetischen Veränderungen unterscheiden.

**Tabelle 12: BAC-Klone für FISH Analysen.**

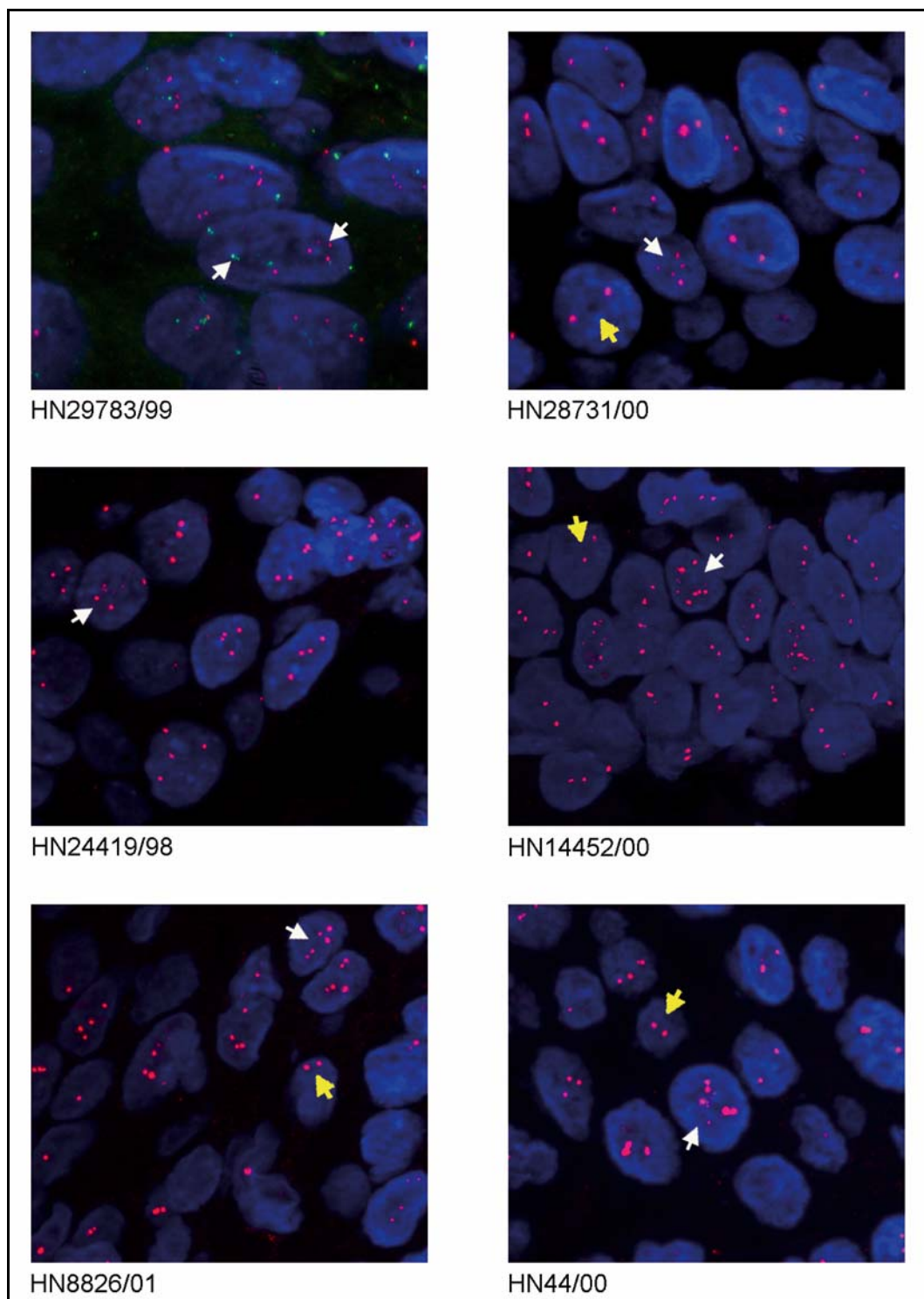
<b>Name BAC</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Kandidatengene</b>
RP11-781H20	16q24.3 bp 87865823-88014087	<i>ANKRD11</i>
RP11-79A1	16q24.3 bp 88147043-88297476	<i>DPEP1; RPL13; CPNE7; CHMP1A; CDK10; SPATA2L</i>
RP11-476G08	16q24.3 bp 87351531-87538812	<i>CDT1; APRT; GALNS; TRAPPC2;CBFA2T3</i>
RP11-354M24	16q24.3 bp 88290249-88417589	<i>FANCA</i>
RP11-258P17	Centromernahe Sonde 16p11.2 bp 34135033-34285558	-

Tabelle 13: Ergebnisse der FISH-Analysen für Chromosom 16q.

HNO-Tumorfälle

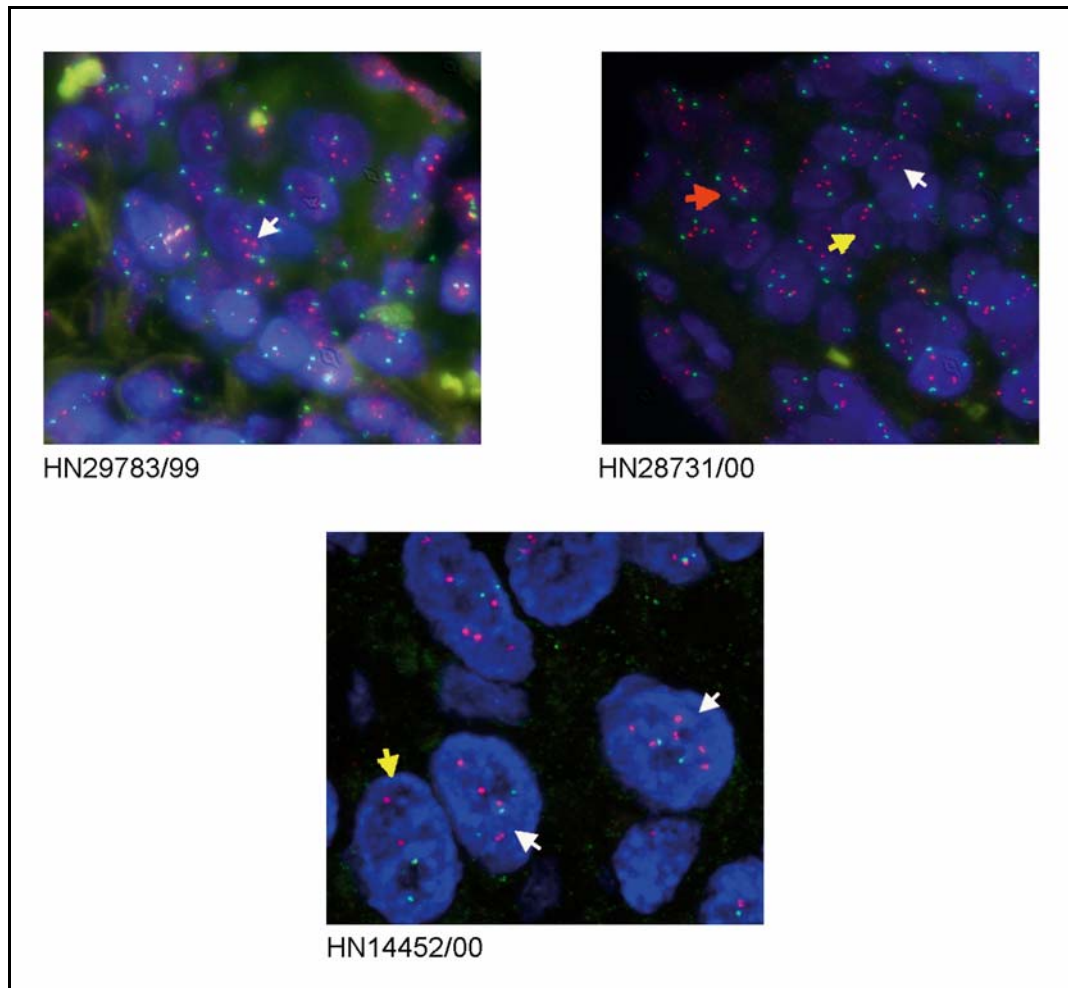
BAC-Klone	HN24419/98			HN14452/00			HN28731/00			HN8826/01			HN29783/99			HN44/00								
	Σ	Häufigkeit der FISH-Signale [%]			Σ	Häufigkeit der FISH-Signale [%]			Σ	Häufigkeit der FISH-Signale [%]			Σ	Häufigkeit der FISH-Signale [%]			Σ	Häufigkeit der FISH-Signale [%]						
		●●	●●●	>●●●		●●	●●●	>●●●		●●	●●●	>●●●		●●	●●●	>●●●		●●	●●●	>●●●				
BAC-Cen	110	58,20	31,80	1,00	74	54,10	32,40	13,50	107	43,90	42,10	14,00	22	59,10	31,80	9,10	71	84,50	14,10	1,40	-	-	-	-
RP11-79A1	-	-	-	-	83	34,90	30,10	35,00	61	27,90	45,90	26,20	-	-	-	-	71	64,80	26,80	8,50	-	-	-	-
RP11-781H20	110	23,60	39,00	37,20	107	35,50	30,80	33,70	107	23,40	54,20	22,40	22	45,50	45,50	9,10	-	-	-	-	75	48,00	21,30	32,00
RP11-476G08	114	38,60	44,70	16,60	85	28,20	34,10	37,70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RP11-354M24	159	18,20	28,30	53,50	174	50,60	16,10	33,30	135	43,00	36,30	20,70	93	15,05	19,35	65,60	187	29,40	47,10	23,50	162	24,70	25,90	49,40

Σ = Anzahl Zellen; ●● = 2 Signale; ●●● = 3 Signale; >●●● = >3Signale



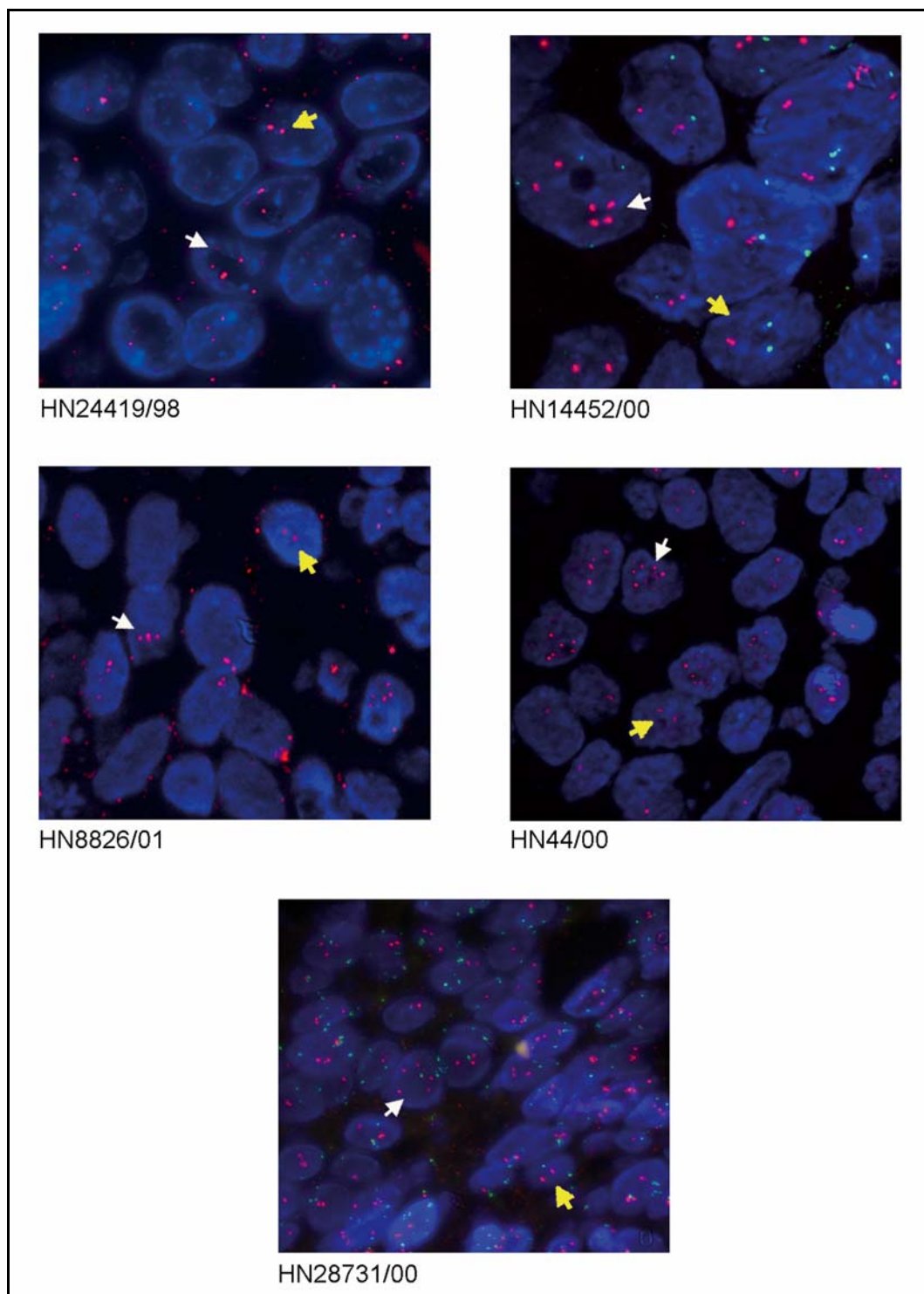
**Abbildung 38: Tumorgewebe-FISH von BAC RP11-354M24.**

BAC RP11-354M24 (rote Signale) auf Tumorgewebe der HNO-Tumorfälle mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 16q23-24 und BAC RP11-258P17 (Centromersonde; grüne Signale) auf HN29783/99. Weiße Pfeile zeigen auf die amplifizierten Signale der Sonden, gelbe Pfeile markieren normale Zellen mit nur zwei Signalen.



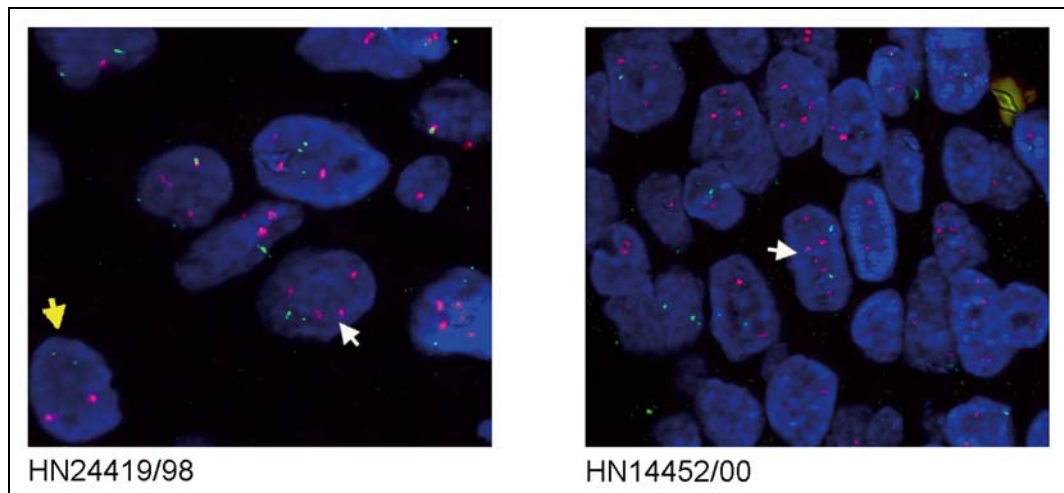
**Abbildung 39: Tumorgewebe-FISH von BAC RP11-79A1.**

FISH-Analyse mit BAC RP11-79A1 (rote Signale) und BAC RP11-258P17 (Centromer-sonde; grüne Signale) auf drei HNO-Tumorgeweben mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 16q23-24. Weiße Pfeile zeigen auf die amplifizierte Signale der Sonden, gelbe Pfeile markieren normale Zellen mit nur zwei Signalen. Der orangene Pfeil markiert eine triploide Zelle.



**Abbildung 40: Tumorgewebe-FISH von BAC RP11-781H20.**

FISH-Analyse mit BAC RP11-781H20 (rote Signale) von fünf HNO-Tumorgeweben mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 16q23-24 und BAC RP11-258P17 (Centromersonde; grüne Signale) auf HN14452/00 und HN28731/00. Weiße Pfeile zeigen auf die amplifizierten Signale der Sonden, gelbe Pfeile markieren normale Zellen mit nur zwei Signalen.



**Abbildung 41: Tumorgewebe-FISH von BAC RP11-476G08.**

FISH-Analyse mit BAC RP11-476G08 (rote Signale) und BAC RP11-258P17 (Centromersonde; grüne Signale) von zwei HNO-Tumorgeweben mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 16q23-24. Weiße Pfeile zeigen auf die amplifizierten Signale der Sonden, gelbe Pfeile markieren normale Zellen mit nur zwei Signalen.

### C.3.3 QRT-PCR-Analyse der *FANCA* Expression

Mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-PCR (QRT-PCR) wurde die Expression des Kandidatengens *FANCA* in Kopf-Hals-Tumoren mit chromosomalem Zugewinn auf 16q untersucht. Dieser Zugewinn an genetischem Material wurde durch die CGH-, Array-CGH- und FISH-Experimente in allen analysierten Fällen auf DNA-Ebene bestätigt (vgl. C.2, C.3.1/2). In vier Fällen mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 16q, von denen noch ausreichend Gewebe vorhanden war, wurde die Expression des *FANCA*-mRNA-Transkriptes relativ zur Expression in einer Zelllinie (RPEX1.5) ohne chromosomale Veränderung auf 16q untersucht. Dazu wurde aus den entsprechenden FFPE-Geweben und der Zelllinie RNA isoliert und diese in cDNA umgeschrieben. Daraufhin erfolgte mit Hilfe von Exon-übergreifenden Primern und einer Double-Dye-Sonde (Taqman<sup>®</sup>) die Quantifizierung des cDNA-Ausgangsproduktes in der QRT-PCR. Es zeigte sich, dass die *FANCA*-Expression in den HNO-Tumoren mit chromosomalem Zugewinn auf 16q im Vergleich zu der Referenz-Zelllinie RPEX1.5 deutlich erhöht war (siehe Tab. 14 und Abb. 42). Bei Tumor HN24419/98 konnte eine 56,7-fache, bei Tumor HN28731/00 eine 45,6-fache, bei Tumor HN44/00 eine 30,4-fache und bei Tumor HN14452/00 eine 19-fache Erhöhung der Expression beobachtet werden. Auch im Vergleich zu zwei weiteren Zelllinien, den HNO-Tumorzelllinien BHY und Cal-33, war die Expression von *FANCA* in den HNO-Tumoren mit 16q-Veränderung deutlich erhöht. Als Negativkontrollen wurden zwei FFPE-Tumorgewebe ohne DNA-Zugewinn (Tumor HN30153/05) und Deletion (Tumor HN31366/05) auf Chromosom 16q auf die Expression des *FANCA*-Gens hin untersucht. Bei diesen Fällen konnte eine leichte Erhöhung der *FANCA*-Expression (6,6-fach und 3,5-fach) im Vergleich zur Referenzzelllinie RPEX1.5 nachgewiesen werden. Bei der Gegenüberstellung mit den Tumoren mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 16 wurde eine deutlich geringere Expression von *FANCA* in den Tumoren ohne chromosomalen Zugewinn auf 16q beobachtet. Der Unterschied in der Expression von *FANCA* zwischen den vier Tumorfällen mit DNA-Zugewinn auf 16q und den vier Fällen ohne DNA-Zugewinn auf 16q war mit einem p-Wert von 0,029 statistisch signifikant (Wilcoxon-Rangtest).



Tabelle 14: Ergebnisse der QRT-PCR-Analyse.

Bezeichnung	Ct-Werte (MW)		Relative Expression
	FANCA	ACTB	
Zelllinie BHY	24,06	16,65	2,5
Zelllinie Cal-33	23,54	16,74	7,3
HN14452/00	30,96	26,41	19,0
HN24419/98	29,43	26,58	56,7
HN28731/00	30,4	27,23	45,6
HN44/00	31,29	27,49	30,4
HN30153/05	29,66	23,38	6,6
HN31366/05	30,21	22,92	3,5

MW: Mittelwert

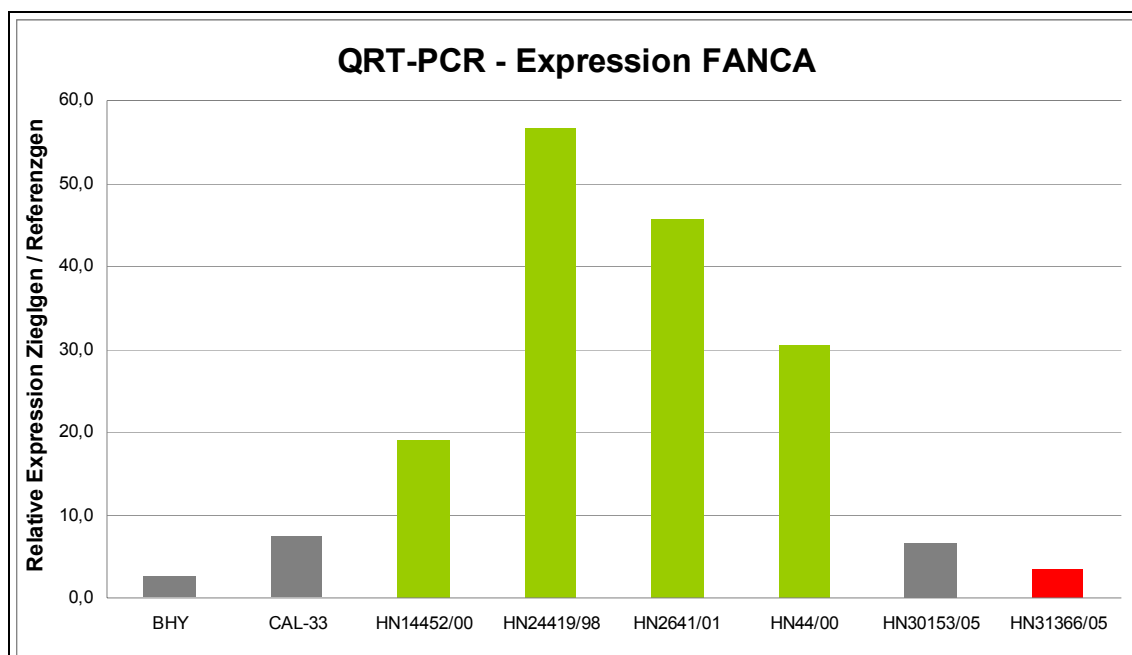


Abbildung 42: Relative Expression von FANCA.

Die Balken stellen die relative Expression des FANCA-Gens im Vergleich zu einer Referenzzelllinie dar. Proben ohne chromosomale Veränderung auf 16q werden durch graue Balken, Proben mit DNA-Zugewinn auf 16q durch grüne und Proben mit einer Deletion auf Chromosom 16q durch rote Balken repräsentiert. Es wird deutlich, dass in HNO-Tumoren mit DNA-Zugewinn auf 16q die Expression von FANCA sowohl im Vergleich zur Referenzzelllinie, als auch im Vergleich mit den Tumorzelllinien BHY und Cal-33 und den HNO-Tumoren ohne Veränderung und mit Deletion auf 16q deutlich erhöht ist.

### **C.3.4 Immunhistochemische Untersuchung von HNO-Tumoren**

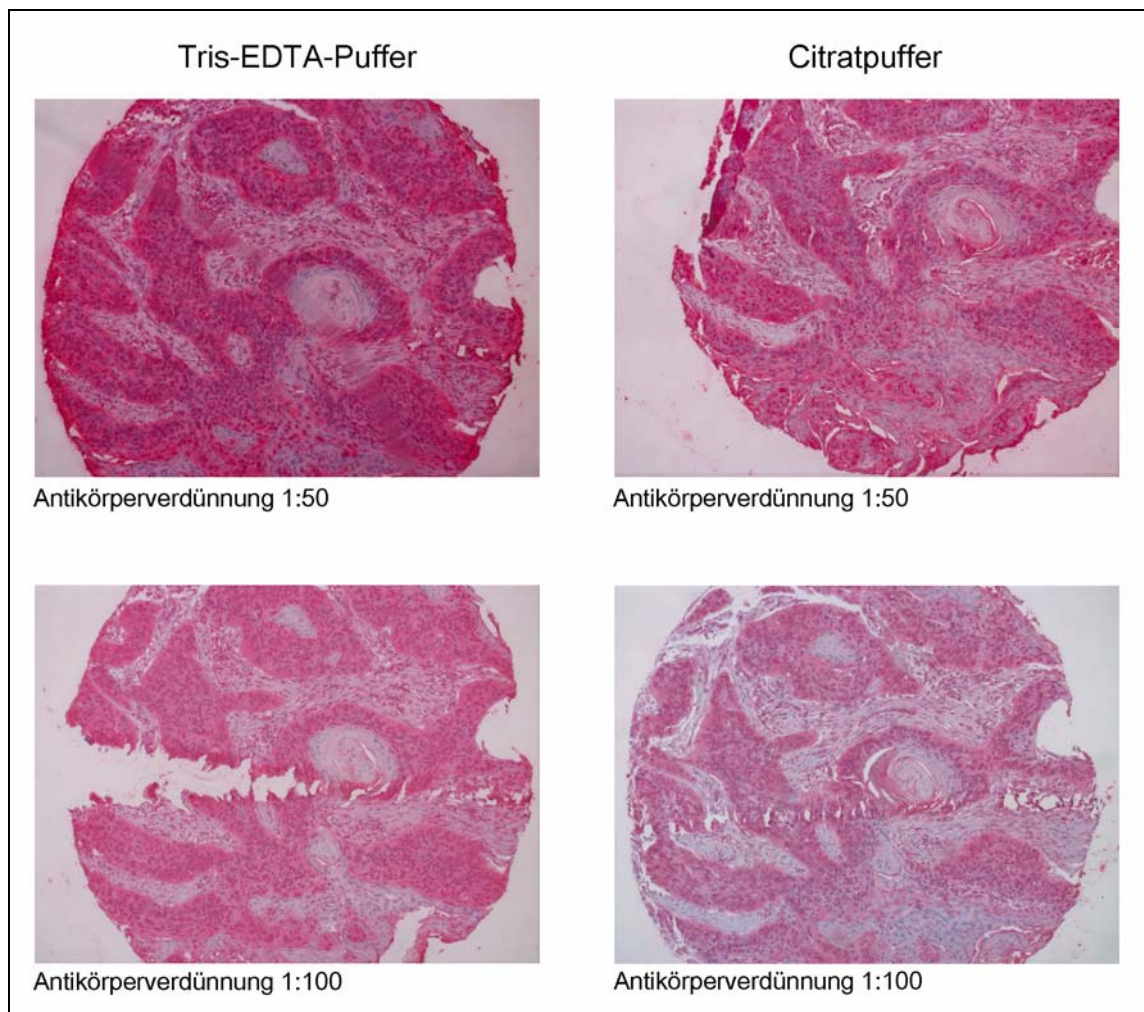
Die Kopienzahlveränderung bzw. eine Überexpression des Kandidatengens *FANCA* konnte auf DNA-Ebene durch CGH, Array-CGH und FISH-Experimente und auf mRNA-Ebene durch QRT-PCR nachgewiesen werden. Um die Expression von *FANCA* auf Proteinebene zu untersuchen, wurden immunhistochemische Färbungen mit einem Antikörper, welcher gegen den C-Terminus des *FANCA*-Proteins gerichtet ist, durchgeführt. Das *FANCA*-Protein ist laut Kupfer et al. (1997) in seiner ungebundenen Form vorwiegend im Cytoplasma, in seiner gebundenen Form als nukleärer Fanconi-Anämie-Komplex hauptsächlich im Zellkern lokalisiert. Bei den immunhistochemischen Untersuchungen können demnach Färbeprodukte sowohl im cytoplasmatischen Bereich, als auch in den Zellkernen erwartet werden.

#### **C.3.4.1 Methodische Etablierung der Immunhistochemie (IHC)**

Im Vorfeld mussten experimentelle Parameter wie Hitzebehandlung der Gewebe, Antikörperverdünnung und Inkubationszeit des Primärantikörpers spezifisch für den verwendeten *FANCA*-Antikörper ausgetestet werden (Werner et al., 2000). Dazu wurden Gewebe-Arrays mit FFPE-Gewebe von HNO-Tumoren verwendet. Bei der hitzeinduzierten Epitopdemaskierung von FFPE-Gewebe zeigte die Verwendung von Citratpuffer im Vergleich zu Tris-EDTA-Puffer das bessere Ergebnis. Wie aus Abbildung 43 zu erkennen ist, gab es bei der Hitzebehandlung mit Tris-EDTA-Puffer einen höheren Grad an unspezifischer Antikörperbindung mit ausgeprägterem Hintergrund als bei der Hitzebehandlung mit Citratpuffer. Bei einer Antikörperverdünnung von 1:100 konnten die mit Citratpuffer behandelten Gewebeschnitte klar in Bereiche mit höherer und geringerer bzw. keiner Proteinexpression eingeteilt werden. Eine Antikörperverdünnung von 1:50 zeigte mit beiden Methoden eine unspezifische Färbung. Beim Vergleich verschiedener Antikörperinkubationszeiten konnte bei einer einstündigen Inkubation eine sehr schwache Färbereaktion beobachtet werden. Die Inkubation über Nacht hingegen zeigte erneut Expressions-positive und -negative Bereiche auf. Eine Antikörperverdünnung von 1:200 bei einer Inkubation über Nacht lieferte ein optimales Färbeergebnis. Wie Abbildung 44 zeigt, konnte in normalen Plattenepithelgeweben eine mäßige Expression von *FANCA* in den Zellkernen der basalen Abschnitte des Plattenepithels beobachtet werden.

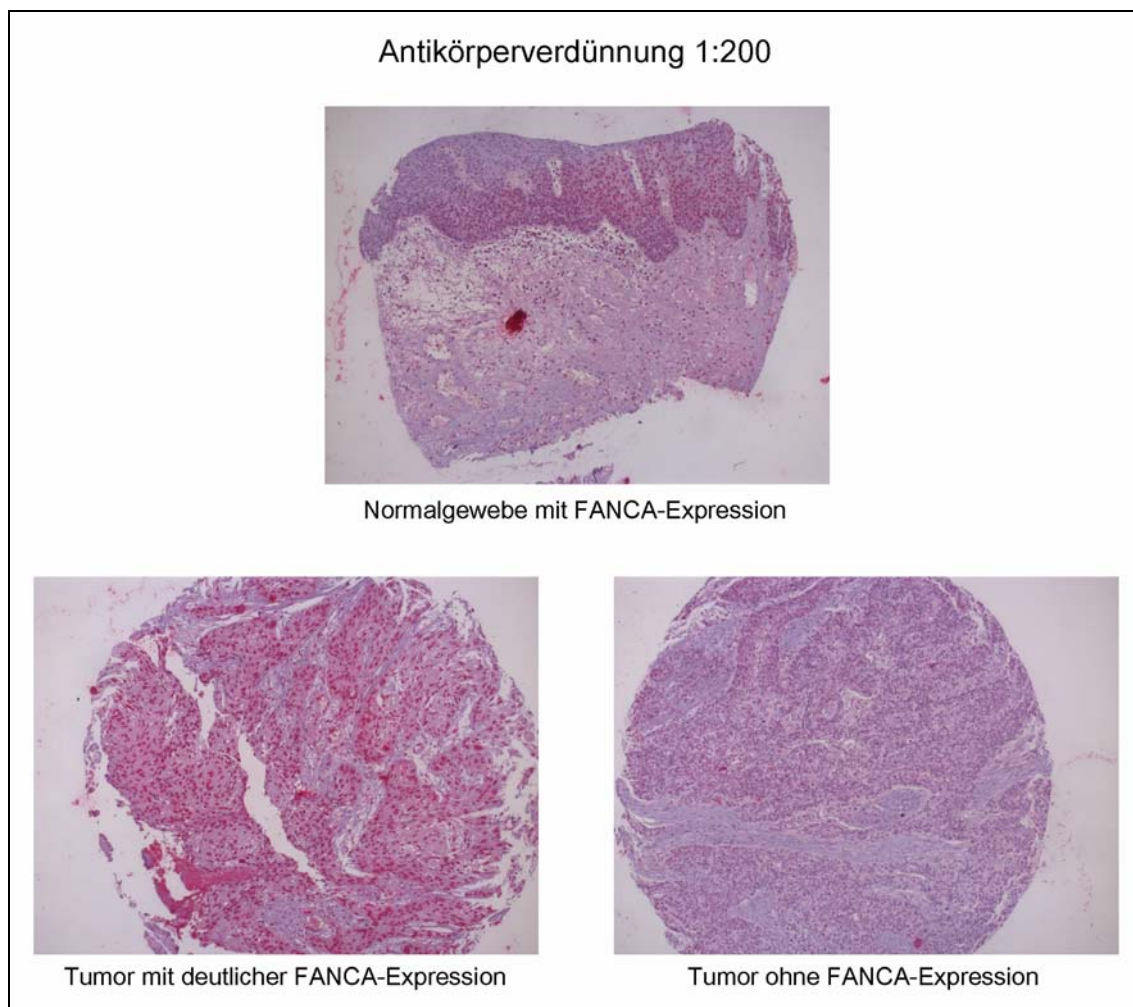
Um Veränderungen auf genomischer Ebene in den Tumorfällen des Gewebe-Arrays, der für die Etablierung der immunhistochemischen Untersuchungen verwendet wurde, zu untersuchen, wurde ein FISH-Experiment mit einem BAC-Klon, welcher den

FANCA-Genlocus repräsentiert (RP11-354M24, vergl. C.2), ausgeführt. Es zeigte sich, dass sich die Ergebnisse der IHC und der FISH gut korrelieren ließen. Abbildung 45 zeigt jeweils die IHC- und FISH-Bilder eines Falls mit erhöhter Expression, keiner Expression und eines normalen Plattenepithels. Beim normalen Plattenepithel waren in der IHC sowohl expressionsnegative, als auch Areale mit schwacher Antikörperfärbung ersichtlich. Die FISH-Analyse zeigte Zellen mit normaler Kopienzahl (zwei Signale). Im Tumorfall mit positiver cytoplasmatischer und nukleärer Antikörperfärbung ließen sich Zellen mit deutlich erhöhter Kopienzahl nachweisen. Dies war bei dem Tumor mit fehlender Expression nicht möglich, dort konnten nur Zellen mit zwei oder einem Signal erfasst werden. Zellen mit nur einem Signal könnten möglicherweise Zellen mit einer Deletion des *FANCA*-Gens darstellen.



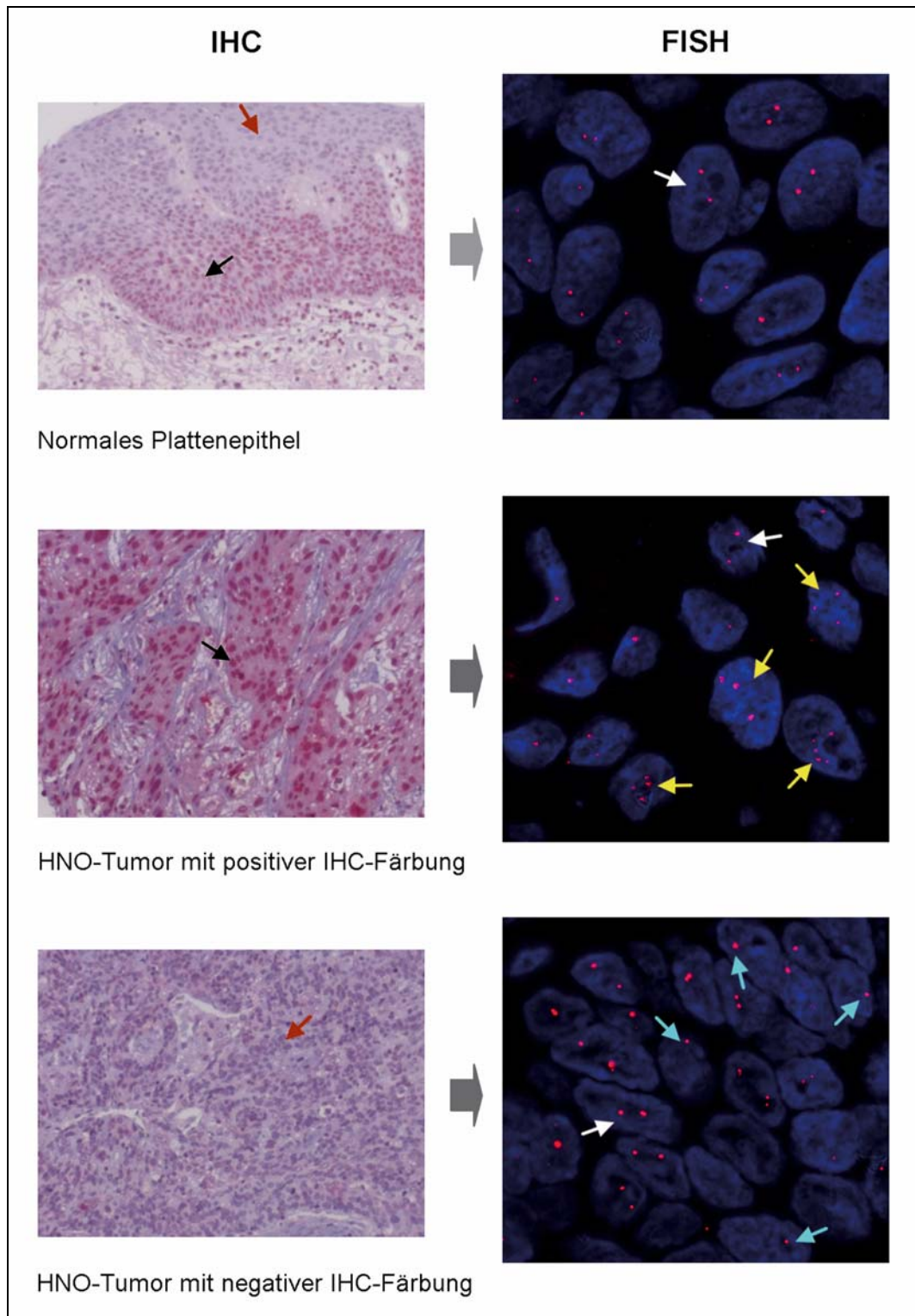
**Abbildung 43: Hitzebehandlung der Gewebe mit Tris-EDTA- und Citratpuffer.**

Durch die Epitopdemaskierung mit Citratpuffer konnte eine bessere Antikörperfärbung erzielt werden. Exprimierende Gewebeareale weisen eine rote Antikörperfärbung auf, nicht exprimierendes Gewebe wird durch die blaue Gegenfärbung dargestellt. Während bei einer Antikörperverdünnung von 1:50 kaum ein Vorteil ersichtlich ist, zeigt bei einer Antikörperverdünnung von 1:100 das mit Citratpuffer behandelte Präparat eine spezifischere Antikörperfärbung mit weniger Hintergrundfärbung.



**Abbildung 44: Immunhistochemischer Nachweis von FANCA auf einem Gewebe-Array von HNO-Tumoren.**

Eine Antikörperverdünnung von 1:200 lässt eine eindeutige Einteilung in exprimierende und nicht-exprimierende Gewebeareale bei geringer Hintergrundfärbung zu. In Normalgewebe zeigt sich eine mäßige Antikörperfärbung, die auf eine „normale“ Expression des FANCA-Proteins schließen lässt. Im Gegensatz dazu ist in einer Tumorprobe ein deutliches rotes Färbeprodukt in einzelnen Zellkernen zu beobachten. Ein anderer Tumor hingegen zeigt keine FANCA-Expression.



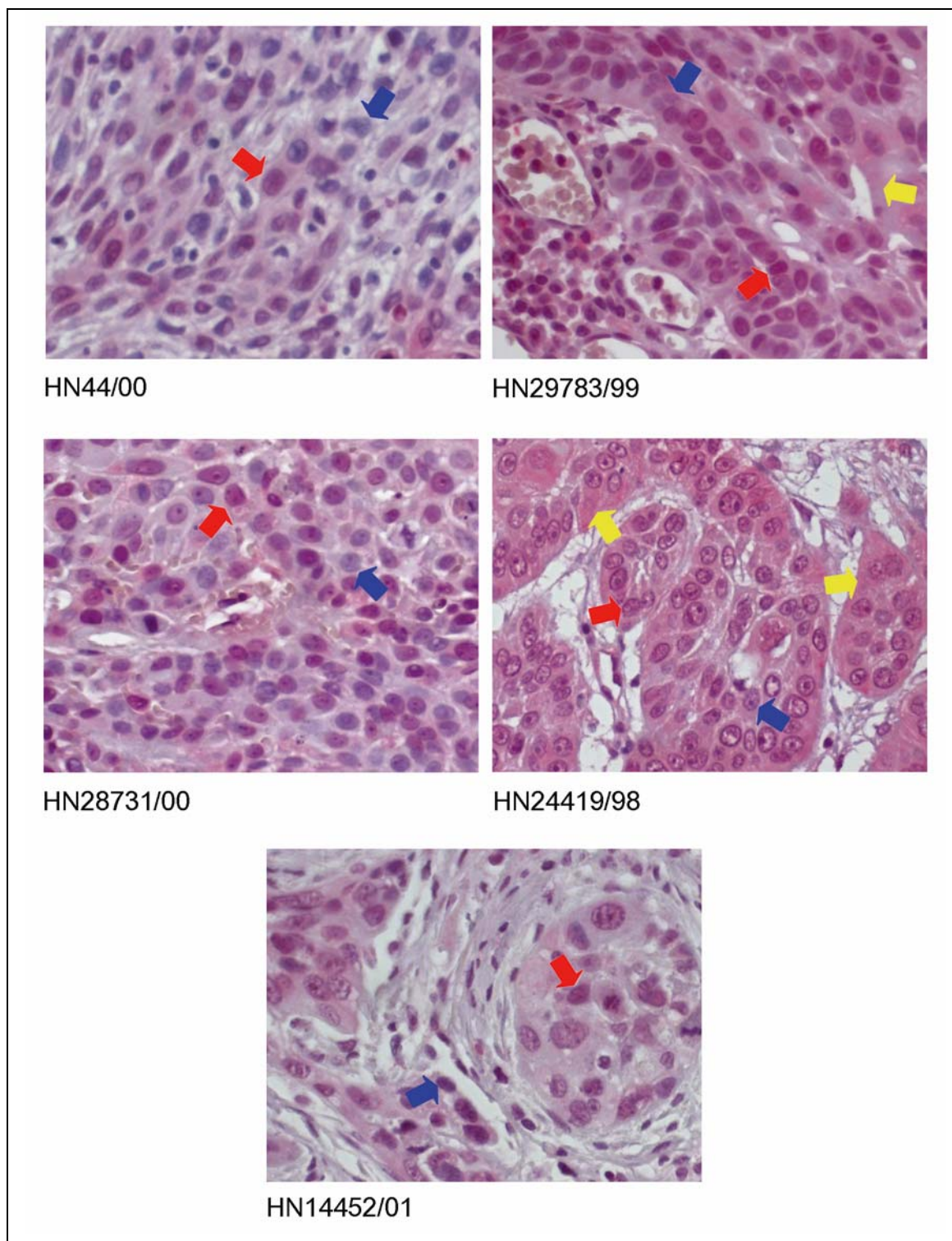
**Abbildung 45: Vergleich von IHC und FISH an Geweben eines HNO-Gewebe-Arrays.**

Normales Plattenepithel zeigt sowohl Areale ohne FANCA-Expression (roter Pfeil) als auch Areale mit Expression von FANCA (schwarzer Pfeil). In der FISH-Analyse zeigen die Zellkerne des normalen Plattenepithels eine normale Kopienzahl mit zwei Signalen (weiße Pfeile). Bei einem Tumor mit starker Antikörperfärbung (schwarzer Pfeil) können Zellkerne mit erhöhter FANCA-Kopienzahl (gelbe Pfeile) beobachtet werden. Bei negativer FANCA-Expression in einem HNO-Tumorgewebe zeigen die Zellkerne in der FISH eine normale Kopienzahl mit zwei Signalen (weiße Pfeile) sowie eine verminderte Kopienzahl mit nur einem Signal (hellblaue Pfeile).

### **C.3.4.2 Untersuchung der FANCA-Expression in HNO-Tumoren mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 16q**

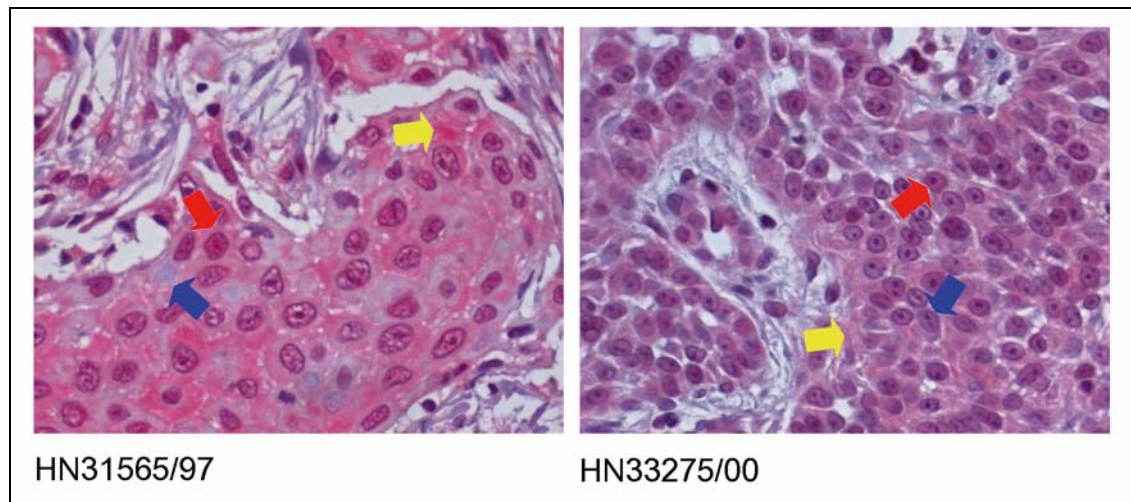
Für die Untersuchung der FANCA-Expression in Kopf-Hals-Tumoren wurden fünf Fälle mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 16q24.3 (verifiziert durch FISH), zwei Fälle ohne chromosomale Veränderung auf 16q und drei Fälle mit Deletionen auf 16q24.3 mittels IHC untersucht. In Abbildung 46 sind die Ergebnisse der HNO-Tumorfälle mit chromosomalem Zugewinn auf 16q dargestellt. In den Tumorgeweben HN44/00, HN28731/00 und HN14452/00 konnten sowohl FANCA-positive als auch FANCA-negative Zellkerne beobachtet werden. In den FANCA-positiven Zellen von HN28731/00 ist die Antikörperfärbung stärker als in den FANCA-positiven Zellen des Falles HN44/00. Bei Fall HN14452/00 war eine mäßige Heterogenität bezüglich der Expressionsstärke von FANCA zu beobachten. Positive und negative Zellkerne wurden auch in den Fällen HN29783/99 und HN24419/98 erfasst, wobei zusätzlich auch eine zytoplasmatische Komponente der Antikörperfärbung beobachtet werden konnte. Diese war bei Fall HN24419/00 bei geringerer nukleärer Antikörperfärbung deutlich ausgeprägt. Ein ähnliches Bild bot sich bei den Tumoren, welche in der CGH keine chromosomale Veränderung auf 16q aufwiesen (Abb. 47). Tumor HN31565/97 zeigte Kerne mit unterschiedlich ausgeprägter Antikörperfärbung, jedoch mit zusätzlicher zytoplasmatischer Antikörperfärbung. Bei Fall HN33275/00 war die FANCA-Expression insgesamt schwächer, dennoch ließen sich auch hier positive und negative Kerne bei schwacher Färbung des Zytoplasmas beobachten. In zwei von drei Fällen der HNO-Tumoren mit Deletion auf Chromosom 16q24.3 (Tumorfälle HN14654/00 und HN31366/00; Abb. 48) konnte keine FANCA-Expression nachgewiesen werden. Weder die Zellkerne noch das Zytoplasma zeigten eine rote Antikörperfärbung. Bei Tumor HN25805/97 hingegen konnten wiederum sowohl eine zytoplasmatische Komponente, als auch positive und negative Zellkerne erfasst werden.

In einigen Fällen konnte eine Tumorerheterogenität aufgrund verschiedener Färbemuster beobachtet werden. In Abbildung 49 sind zwei IHC-Bilder des gleichen Gewebepreparates von Tumor HN31565/97 dargestellt. Bei diesem Tumor existieren sowohl Areale mit relativ hoher, als auch Areale mit sehr geringer zytoplasmatischer FANCA-Expression.



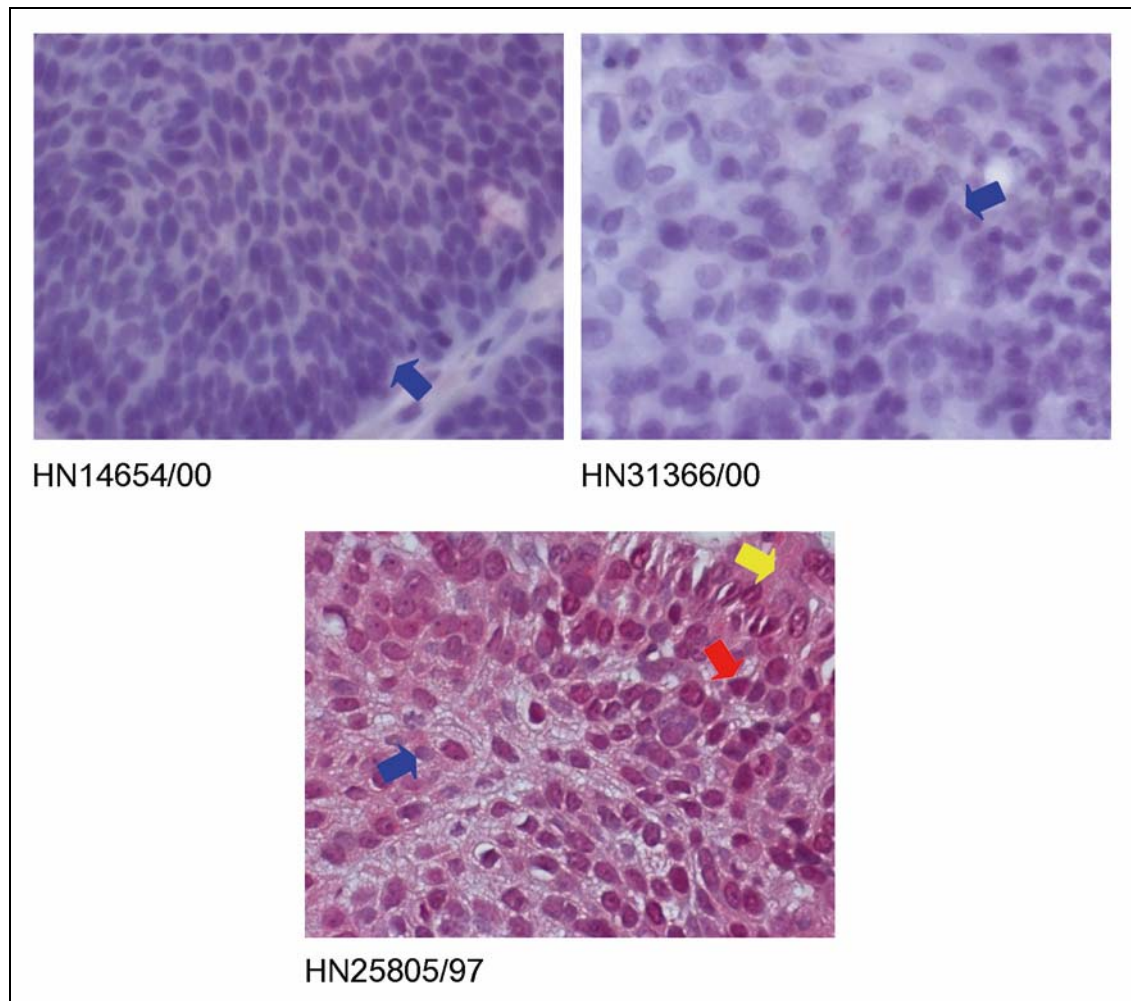
**Abbildung 46: Immunhistochemischer Nachweis der FANCA-Expression an Tumorgewebe von HNO-Tumoren mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 16q.**  
 Eine positive Antikörperfärbung ist durch eine Rotfärbung zu erkennen. Strukturen ohne Antikörperfärbung erscheinen blau. Rote Pfeile kennzeichnen einen positiven Zellkern, gelbe Pfeile eine Antikörperfärbung des Cytoplasmas und blaue Pfeile Zellkerne ohne Antikörperfärbung.





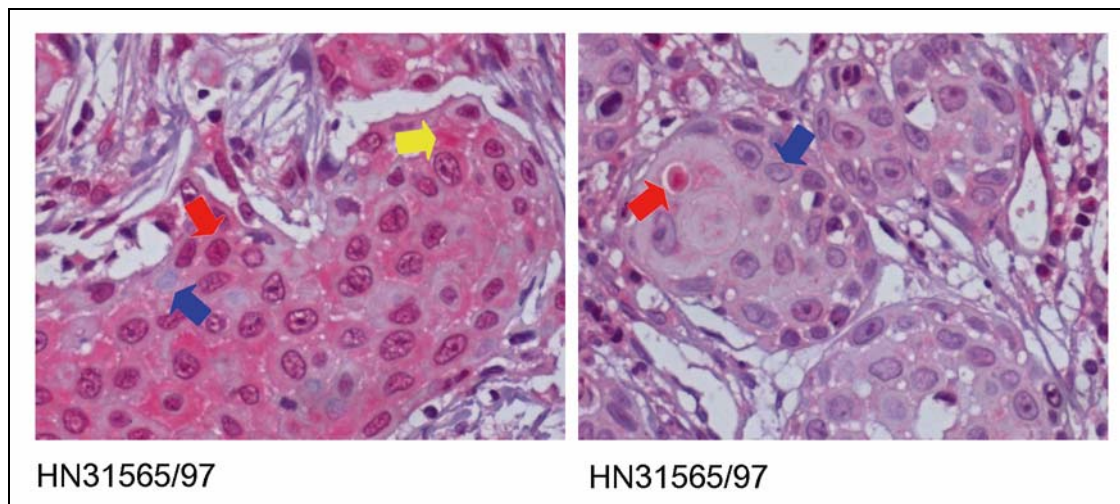
**Abbildung 47: Immunhistochemischer Nachweis der FANCA-Expression an Tumorge-  
webe von HNO-Tumoren ohne chromosomale Imbalancen auf 16q.**

Eine positive Antikörperfärbung ist durch eine Rotfärbung zu erkennen. Strukturen ohne Antikörperfärbung erscheinen blau. Rote Pfeile kennzeichnen einen positiven Zellkern, gelbe Pfeile eine Antikörperfärbung des Cytoplasmas und blaue Pfeile Zellkerne ohne Antikörperfärbung.



**Abbildung 48: Immunhistochemischer Nachweis der FANCA-Expression an Tumorge-  
webe von HNO-Tumoren mit Deletionen auf 16q.**

Eine positive Antikörperfärbung ist durch eine Rotfärbung zu erkennen. Strukturen ohne Antikörperfärbung erscheinen blau. Rote Pfeile kennzeichnen einen positiven Zellkern, gelbe Pfeile eine Antikörperfärbung des Cytoplasmas und blaue Pfeile Zellkerne ohne Antikörperfärbung.



**Abbildung 49: Tumorheterogenität bei Tumor HN31565/97 in der IHC-Färbung.**

Eine positive Antikörperfärbung ist durch eine Rotfärbung zu erkennen. Strukturen ohne Antikörperfärbung erscheinen blau. Rote Pfeile kennzeichnen einen positiven Zellkern, gelbe Pfeile eine Antikörperfärbung des Cytoplasmas und blaue Pfeile Zellkerne ohne Antikörperfärbung. Beide Gewebeausschnitte stammen aus demselben Präparat. Innerhalb des Tumors sind sowohl Areale mit starker, als auch Areale mit sehr geringer cytoplasmatischer Antikörperfärbung zu finden.

## C.4 Funktionelle Untersuchungen zur FANCA-Expression

### C.4.1 Charakterisierung der Zelllinien

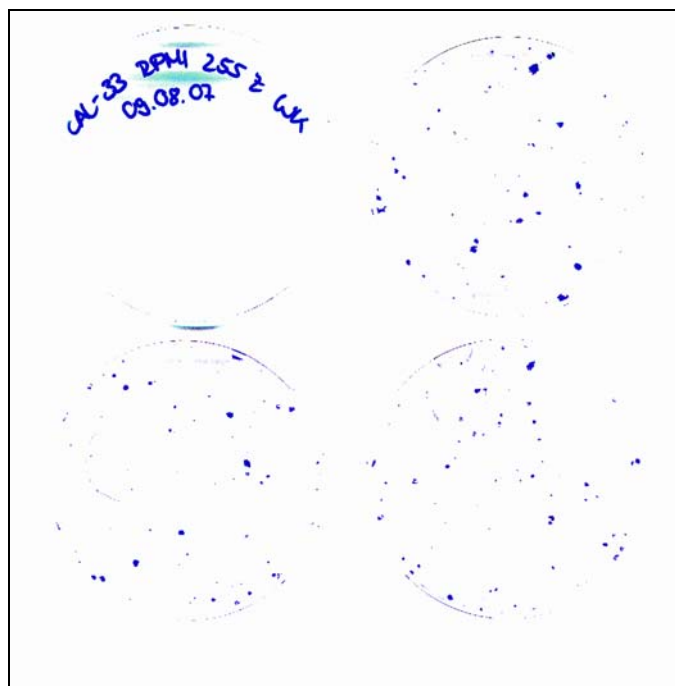
Zur phänotypischen und molekularen Charakterisierung der zwei Tumorzelllinien Cal-33 und BHY wurden verschiedene Verfahren herangezogen.

#### C.4.1.1 Koloniebildungstest

Für den Koloniebildungstest, bei dem der Prozentsatz an koloniebildenden Zellen im Verhältnis zur Anzahl an ausgesäten Zellen bestimmt wird („Plating Efficiency“), der Zelllinie Cal-33 wurden 255, für den der Zelllinie BHY 320 Zellen in jeweils drei Petrischalen mit Kulturmedium ausgesät. Nach elf Tagen wurden die entstandenen Kolonien ausgezählt, wobei nur Kolonien mit mehr als 50 Zellen gewertet wurden (Abb. 50 und 51). Die errechneten „Plating Efficiencies“ können Tabelle 15 entnommen werden.

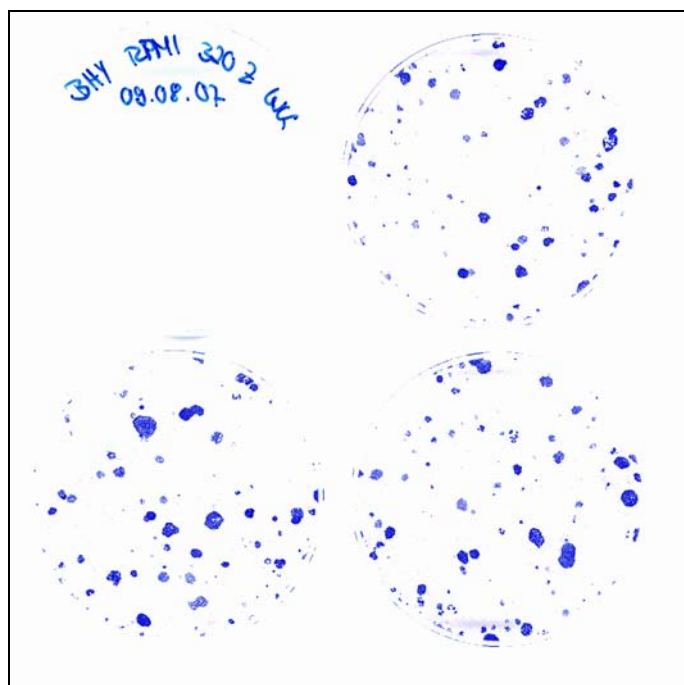
**Tabelle 15: Plating Efficiencies der Zelllinien Cal-33 und BHY.**

Zelllinie	Plating Efficiency [%]
CAL-33	9,7
BHY	21



**Abbildung 50: Koloniebildungstest der Zelllinie Cal-33.**

Die entstandenen Kolonien sind durch ihre blaue Anfärbung (Giemsa) gut zu erkennen. Es werden nur Kolonien  $\geq 50$  Zellen gezählt.



**Abbildung 51: Koloniebildungstest der Zelllinie BHY.**

Die entstandenen Kolonien sind durch ihre blaue Anfärbung (Giemsa) gut zu erkennen. Es werden nur Kolonien  $\geq 50$  Zellen gezählt.

#### **C.4.1.2 Array-CGH**

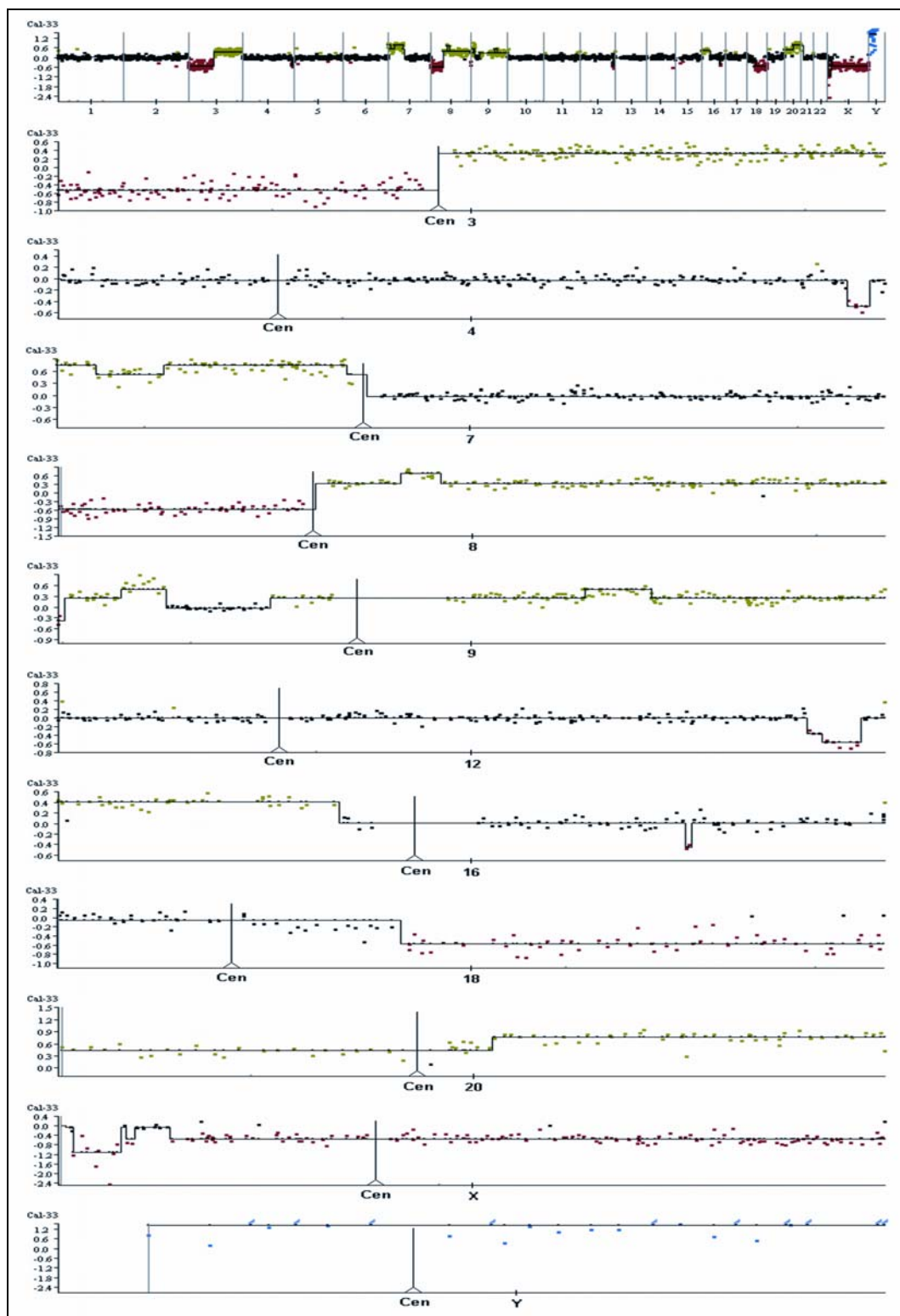
Die zwei Zelllinien wurden unter Verwendung eines 1 Mb BAC Arrays auf chromosomale Veränderungen in Form von DNA-Zugewinnen und DNA-Verlusten untersucht. In beiden Fällen wurde gegen eine weibliche Referenz-DNA hybridisiert. Die ermittelten chromosomalen Veränderungen können Tabelle 16 entnommen werden und sind in den Abbildungen 52 und 53 dargestellt. Aus dem Verhältnis der Geschlechts-Chromosomen konnte das bekannte männliche Geschlecht der Tumorzelllinien Cal-33 und BHY bestätigt werden. Die Zelllinie Cal-33 zeigte in der Array-CGH sieben DNA-Zugewinne (Chromosomen 3, 7, 8, 9, 16 und 20) und sieben DNA-Verluste (Chromosomen 3, 4, 8, 9, 12, 16 und 18), insgesamt also 14 Veränderungen. Die Zelllinie BHY wies viele chromosomalen Veränderungen auf (26 Kopienzahlveränderungen). Davon waren 20 DNA-Zugewinne (Chromosomen 1, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 19, 20 und 22), vier Amplifikationen (Chromosomen 1, 11 und 20) und zwei Deletionen (Chromosomen 3 und 18).

Die beiden Tumorzelllinien BHY und Cal-33 wiesen in sieben chromosomalen Regionen übereinstimmende Veränderungen auf, welche in Abbildung 54 dargestellt sind. Dabei handelt es sich um DNA-Zugewinne auf den Chromosomen 7p22-14, 8p11.1-q12, 9p13-q21, 9q22-34 und 20, sowie um eine Deletion auf Chromosom 18q12-23.

Tabelle 16: Chromosomale Veränderungen der Zelllinie Cal-33 und BHY.

Cal-33	
Chromosomale Region DNA-Zugewinne	Chromosomale Region DNA-Verluste
3q11.2-29	3p26-q11.2
7p22-q11.2	4q34-35
8p11.1-q24.3	8p23-q11.1
9p22-24 9p13-q34	9p24
16p11.2-13.3	12q24.3
20p13-q13.3	16q22
	18q12-23
BHY	
Chromosomale Region DNA-Zugewinne	Chromosomale Region DNA-Verluste
1p36.3 <b>1p21-22</b> 1p13-21	3p12-q11.2
4q13	18q11.2-23
5p15.3-q11.1	
7p14-22	
8p11.1-q12	
9p21-q21 9q22-34	
10p11.2-q22	
11p15-q13 <b>11q13</b> 11q13 <b>11q13-14</b>	
12p13-q12 12q21-24.3	
13q21-34	
14q21-32	
17q11.1-12	
19p12-13.2	
20p13-q11.2 <b>20q11.1-11.2</b> 20q11.2-13.3	
22q11.1-13	

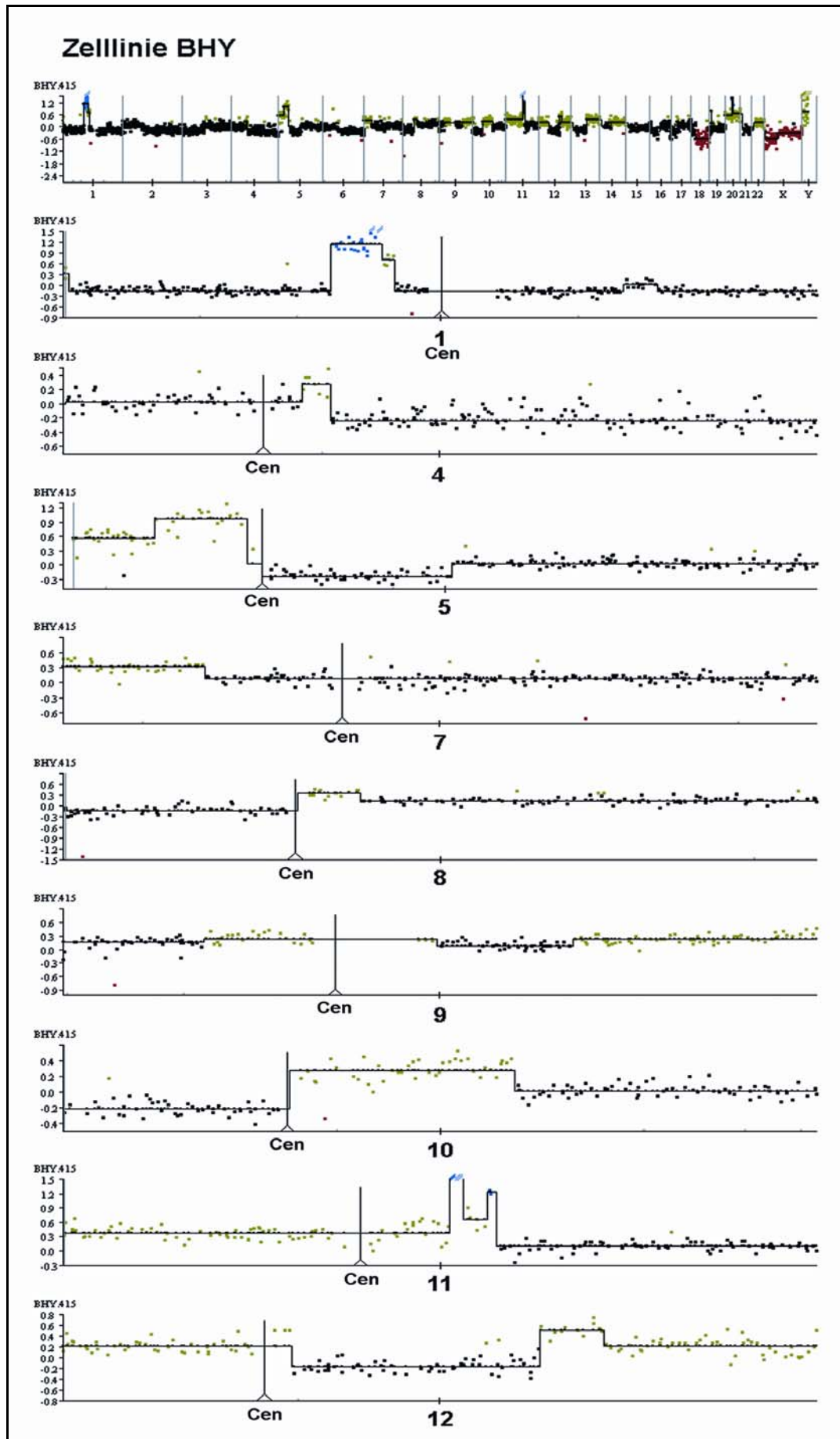
Amplifikationen sind **fett** gedruckt.

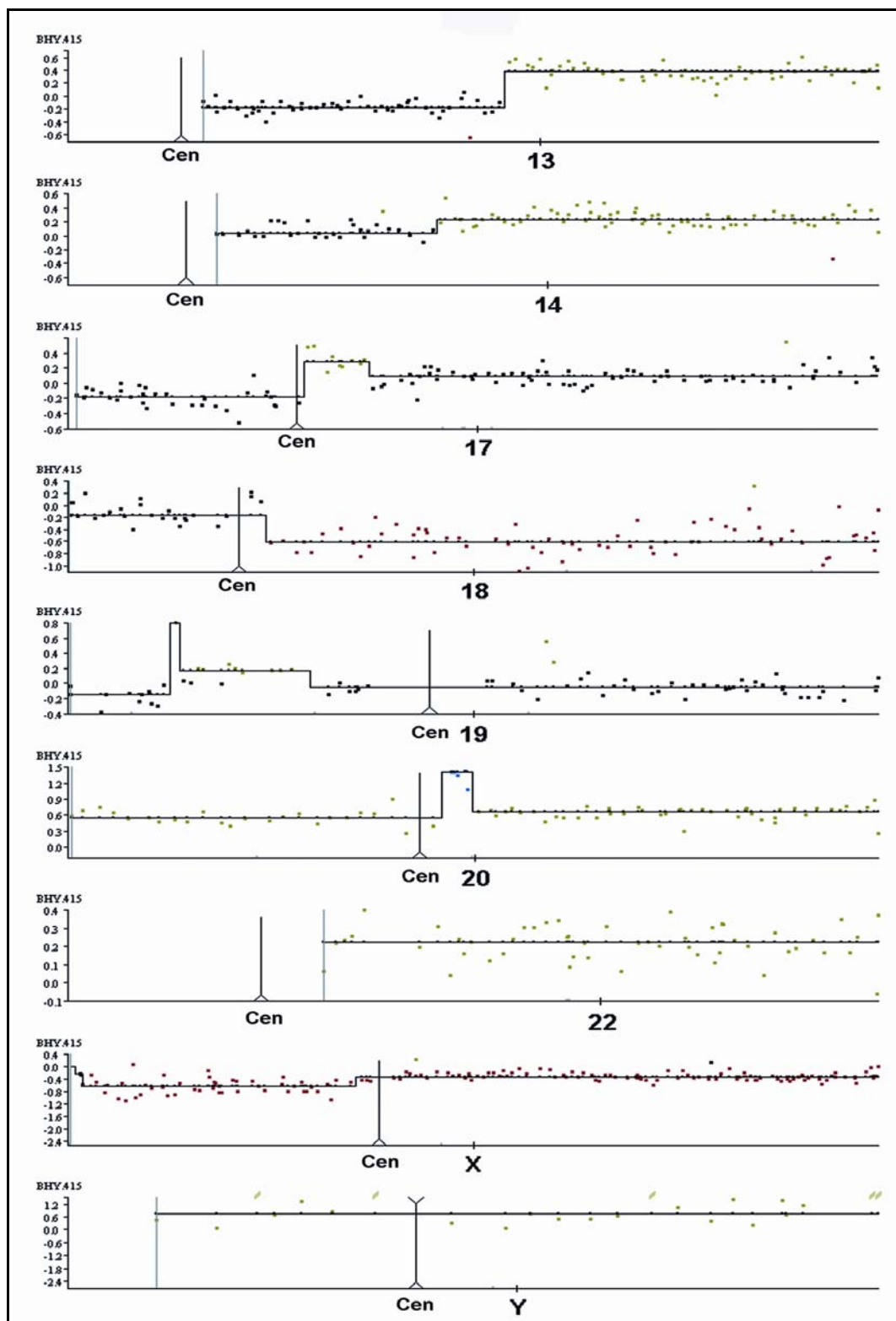


**Abbildung 52: Array-CGH-Analyse der Zelllinie Cal-33.**

Die Abbildung zeigt das gesamtgenomische Array-CGH-Profil (oben) und elf Einzelprofile der veränderten Chromosomen. Entlang der X-Achse, welche die Chromosomenzahl oder das jeweils angezeigte Chromosom darstellt (links p-Arm, rechts q-Arm) sind in Y-Richtung die logarithmierten Werte der Intensitätsquotienten aus Cy3- und Cy5-Fluoreszenz („log2-Ratios“) für jeden BAC-Klon angezeigt. Normale Bereiche sind in schwarz, DNA-Zugewinne in grün, Amplifikationen in blau und DNA-Verluste in rot dargestellt. Die Centromere werden durch vertikale Linien angezeigt.

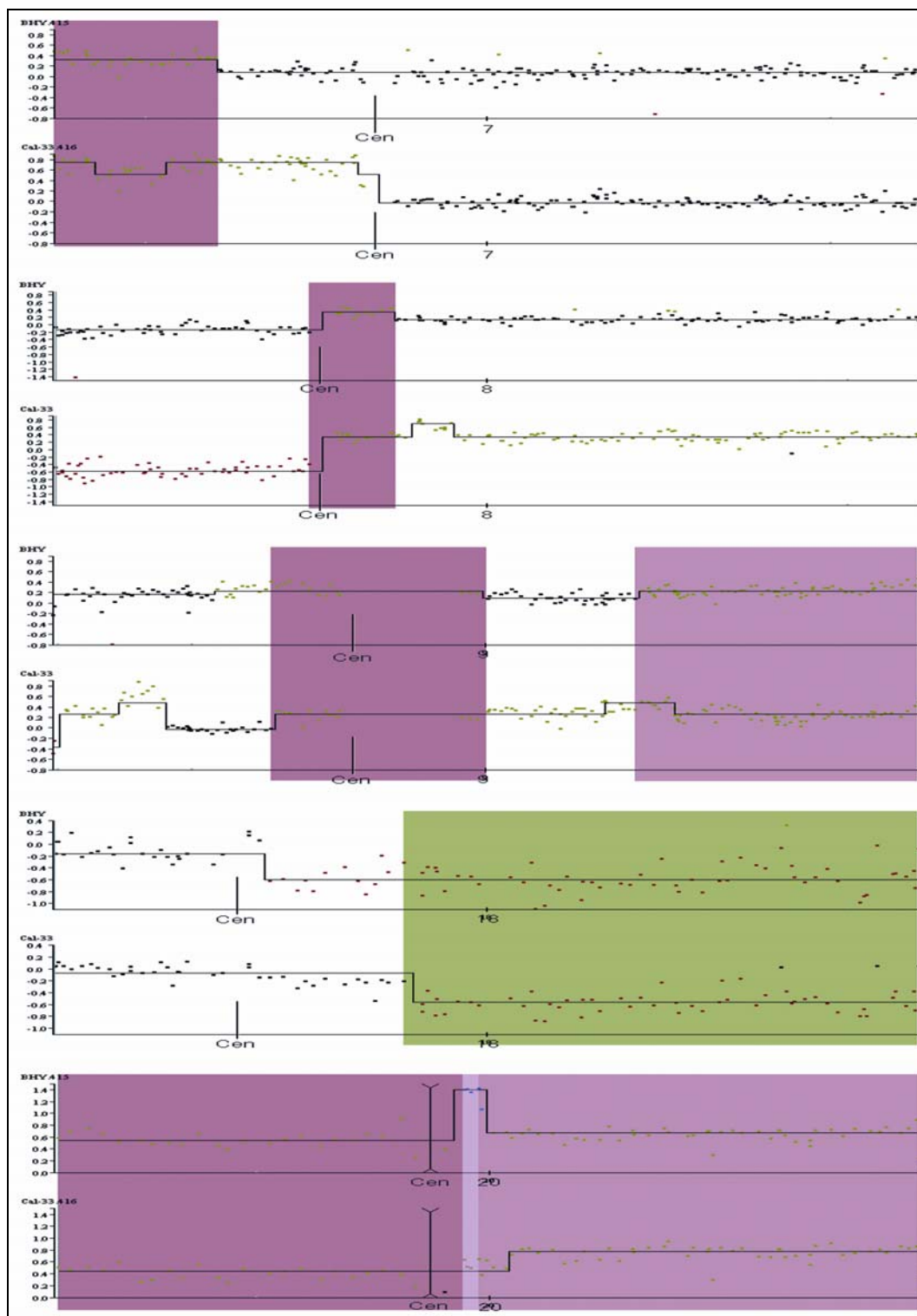






**Abbildung 53: Array-CGH-Analyse der Zelllinie BHY.**

Die Abbildung zeigt das gesamtgenomische Array-CGH-Profil (oben) und 18 Einzelprofile der veränderten Chromosomen. Entlang der X-Achse, welche die Chromosomenzahl oder das jeweils angezeigte Chromosom darstellt (links p-Arm, rechts q-Arm) sind in Y-Richtung die logarithmierten Werte der Intensitätsquotienten aus Cy3- und Cy5-Fluoreszenz („log2-Ratios“) für jeden BAC-Klon angezeigt. Normale Bereiche sind in schwarz, DNA-Zugewinne in grün, Amplifikationen in blau und DNA-Verluste in rot dargestellt. Die Centromere werden durch vertikale Linien angezeigt.



**Abbildung 54: Gemeinsame Veränderungen der Tumorzelllinien BHY und Cal-33.**

Die Abbildung zeigt die Einzelprofile der in den Zelllinien gemeinsam veränderten Chromosomen. Entlang der X-Achse, welche das jeweils angezeigte Chromosom darstellt (links p-Arm, rechts q-Arm) sind in Y-Richtung die logarithmierten Werte der Intensitätsquotienten aus Cy3- und Cy-5-Fluoreszenz („log2-Ratios“) für jeden BAC-Klon angezeigt. Normale Bereiche sind in schwarz, DNA-Zugewinne in grün, Amplifikationen in blau und Deletionen in rot dargestellt. Gemeinsame Veränderungen werden durch farbige Unterlegungen dargestellt (violett: DNA-Zugewinne, grün: DNA-Verluste).

### C.4.1.3 SKY- und FISH-Analyse

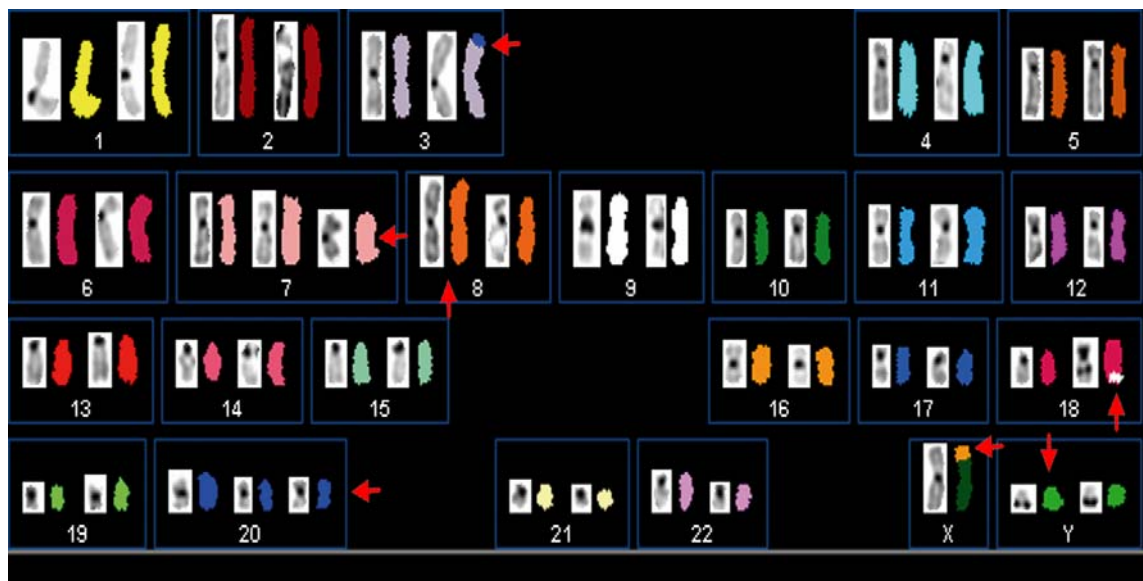
Der Karyotyp der zwei Zelllinien BHY und Cal-33 wurde auch auf interchromosomale Rearrangierungen mit Hilfe einer SKY-Analyse untersucht. Der Karyotyp der Zelllinie BHY konnte auf Grund der komplexen strukturellen Umlagerungen und des polyploiden Charakters der Zellen (>4N) nicht bestimmt werden, der der Zelllinie Cal-33 wurde hingegen näher charakterisiert. Bei 49 Chromosomen ließen sich drei interchromosomale Umlagerungen (der(3)t(3p;20), der(18)t(18q;9) und der(X)t(Xp;16)), zwei Isochromosomen (i(7p) und i(8q)), eine Trisomie (Chromosom 20) und ein zusätzliches Y-Chromosom nachweisen (Abb. 55). In einer FISH-Analyse wurden BACs aus der 32 k-BAC-Bibliothek ausgewählt ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)), um die Rearrangierungen zu verifizieren und gegebenenfalls genauer zu bestimmen (Tab. 17). Die Ergebnisse der FISH werden in Abbildung 60 dargestellt. Die Isochromosomen i(7p) und i(8q) konnten zweifelsfrei auch in der FISH-Analyse nachgewiesen werden, ebenso die Trisomie von Chromosom 20. Auch bestätigte sich, dass Chromosom 18q genetisches Material von Chromosom 9 enthielt. Die derivativen Chromosomen 3 und X konnten näher bestimmt werden; so zeigte sich, dass das zusätzliche genetische Material auf Chromosom 3p von Chromosom 20q stammte. Die zusätzliche chromosomale Region auf Chromosom Xp ließ sich Chromosom 16p zuordnen. Nach Auswertung der SKY und FISH-Analyse ergab sich für die Zelllinie Cal-33 folgender Karyotyp: 49, XYY, +7, +20, der(X)t(X;16)(p;p), der(3)t(3;20)(p;q), der(18)t(18q;9)(q;?), i(7p), i(8q).

#### C.4.1.3.1 Vergleich der Ergebnisse der Array-CGH-, SKY- und FISH-Analyse der Zelllinie Cal-33

Das Ergebnis der SKY-Analyse ließ sich sehr gut mit dem Ergebnis der Array-CGH in Einklang bringen (C.4.3, Abb. 52). So wurden die Isochromosomen i(7p) und i(8q) dort durch einen Zugewinn des jeweiligen Chromosomenarms angezeigt. Das Array-CGH-Profil von Chromosom 8 bestätigte, dass das Isochromosom i(8q) ein normales Chromosom ersetzte und nicht zusätzlich neben zwei normalen Chromosomen existierte. Auf Grund eines DNA-Zugewinns auf Chromosom 16p in der Array-CGH ging, bestätigt durch die FISH-Analyse, hervor, dass der auf das Chromosom X translozierte Bereich von Chromosom 16 zusätzlich zu den zwei normalen Chromosomen 16 vorhanden war und nicht durch einem DNA-Verlust der entsprechenden Region auf Chromosom 16 entstand. Eine Deletion auf Chromosom 18q zeigte einen wahrscheinlichen Verlust eines Teils des Chromosomenarms in Folge der Translokation von genetischem Material von Chromosom 9 auf 18q an. Klar zu erkennen war auch die Trisomie 20, welche

durch einen kompletten DNA-Zugewinn des Chromosoms angezeigt wurde. Ebenfalls wurde deutlich, dass der auf Chromosom 3 translozierte Bereich zusätzlich zu den normalen Chromosomen 20 vorhanden war (erkennbar auch in der FISH, Abb. 56). In der Array-CGH wurde die männliche Zelllinie Cal-33 gegen eine weiblich Referenz-DNA hybridisiert. In Folge dessen sollte bei keiner Veränderung der Geschlechtschromosomen das X-Chromosom als deletiert angezeigt werden, während für das Y-Chromosom ein DNA-Zugewinn zu erwarten wäre. Eine Amplifikation des gesamten Chromosoms in der Array-CGH bestätigte das zweite Y-Chromosom.

Ungeklärt hingegen blieben große chromosomale Imbalancen auf den Chromosomen 3 und 9 in der Array-CGH, welche nicht mit dem Ergebnis der SKY-Analyse in Einklang gebracht werden konnten. Deletionen auf den Chromosomen 4q und 12q waren durch die SKY-Analyse nicht nachweisbar. Zur Klärung dieser Veränderungen bedarf es weiterer FISH-Analysen.

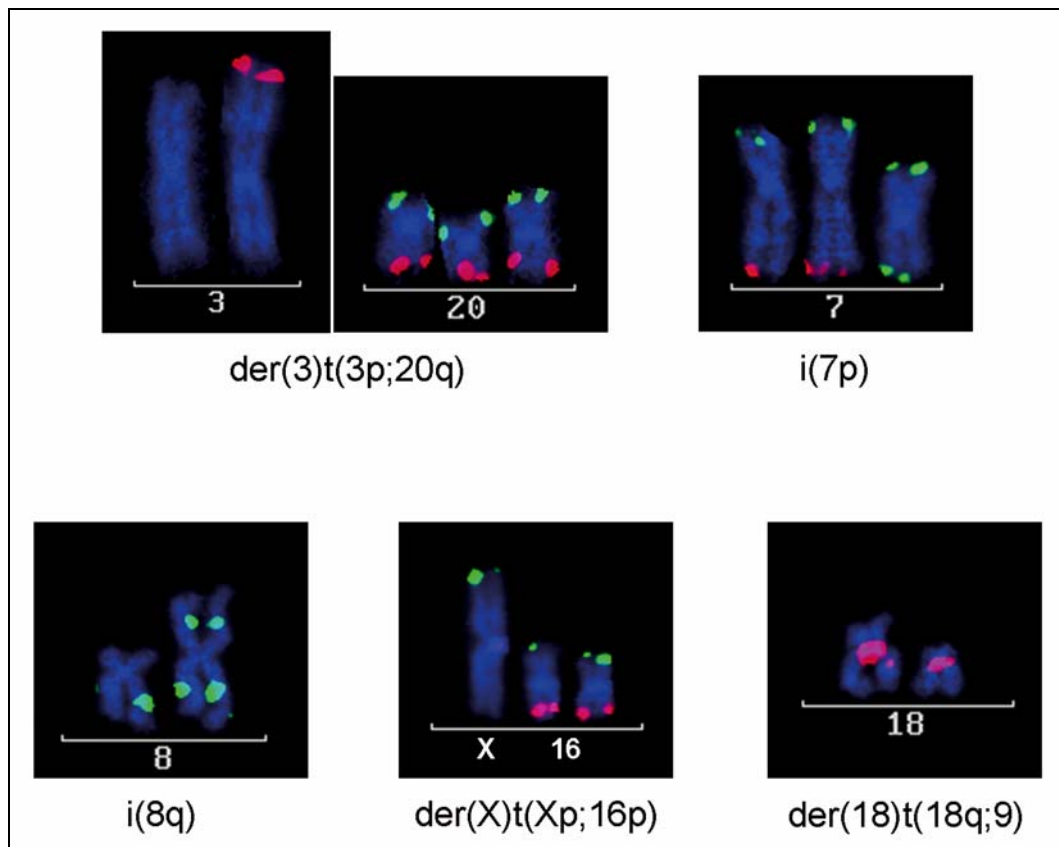


**Abbildung 55: SKY-Analyse der Zelllinie Cal-33.**

Die Chromosomen sind in der jeweiligen Falschfarbe und der DAPI-Bänderung dargestellt. Chromosomale Veränderungen sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Es ergibt sich folgender Karyotyp: 49, XYY, der(3)t(3p;20), i(7p), i(8q), der(18)t(18q;9), der(X)t(Xp;16), +7, +20.

**Tabelle 17: BAC-Klone für die FISH-Analyse von Cal-33.**

<b>Name BAC</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>FISH-Markierung</b>
RP11-640A09	20p13; bp 60369-216637	Biotin
RP11-631L08	20q13.33; bp 61879997-62060928	Digoxigenin
RP11-20N02	7p22.3; bp 724423-876413	Biotin
RP11-664B05	7q36.3; bp 158404469-158595970	Digoxigenin
RP11-22E02	16p13.13; bp 12248522-12413733	Biotin
RP11-466E19	16q23.1; bp 75876182-76038779	Digoxigenin
RP11-627A06	8q21.3; bp 90790023-90970605	Biotin
RP11-1076F02	18q11.2; bp 17795823-17988690	Digoxigenin



**Abbildung 56: FISH-Analyse der Zelllinie Cal-33.**

BACs (siehe Tab. 19) wurden entweder mit Biotin (grüne Signale) oder Digoxigenin (rote Signale) markiert und auf Metaphasenpräparate der Zelllinie hybridisiert. Eine Trisomie von Chromosom 20 war in der FISH-Analyse durch die Hybridisierung von BAC RP11-640A09 (20p) und RP11-631L08 (20q) deutlich zu erkennen. Die zusätzliche Hybridisierung von BAC RP11-631L08 (20q) auf Chromosom 3p zeigte, dass der auf 3p translozierte Bereich vom Chromosomenarm 18q stammte. Die Isochromosomen i(7p) und i(8q) wurden durch die Hybridisierung der BACs RP11-20N02 (7p) und RP11-627A09 (8q) verifiziert. Ebenso bestätigt wurde durch BAC RP11-22E02 (16p) die Translokation von Chromosom 16p auf Chromosom Xp und der interchromosomale Austausch zwischen den Chromosomen 18 und 9 durch die Hybridisierung von BAC RP11-1076F02. Diese zeigte, dass eines der homologen Chromosomen 18 auf Grund des zusätzlichen genetischen Materials von Chromosom 9 (vgl. SKY, Abb. 55) deutlich größer als das normale Chromosom ist.

#### C.4.1.4 Bestimmung der FANCA-Expression mittels Quantitativer Real Time-PCR

Die relative Quantifizierung der FANCA-Expression der Zelllinien Cal-33 und BHY wird unter C.3.3 dargestellt.

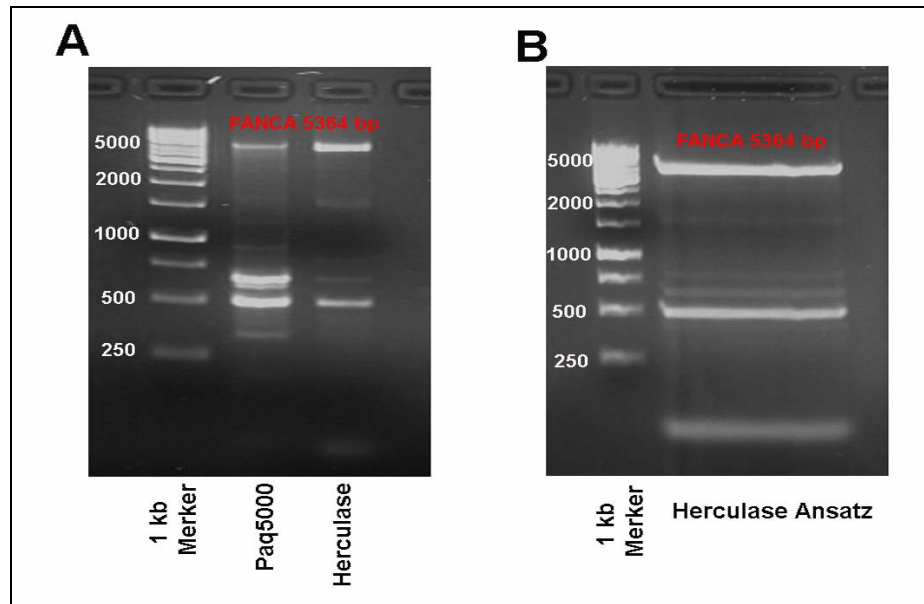
#### C.4.2 Transfektion der Zelllinien BHY und Cal-33

Durch statistische Analysen der CGH-Daten konnten DNA-Zugewinne auf Chromosom 16q23-24 mit einem verringerten rezidivfreien Überleben der Patienten korreliert werden (C.2.3). Durch Array-CGH wurde der veränderte chromosomale Bereich auf 16q24.3 eingegrenzt (C.3.1). Dies wurde durch FISH-Experimente an Paraffinschnitten der von der Veränderung betroffenen Patienten bestätigt (C.3.2). Innerhalb der veränderten Region konnten einige Kandidatengene lokalisiert werden, von denen *FANCA* als Bestandteil des DNA-Reparatur-assoziierten Fanconi Anämie (FA)/BRCA-Signalweges näher untersucht wurde. Eine erhöhte Expression dieses Gens in Tumorgewebe von Patienten mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 16q24.3 konnte in QRT-PCR-Analysen nachgewiesen werden (C.3.3). Um phänotypische Folgen einer gezielten Überexpression des *FANCA*-Gens untersuchen zu können, sollten zwei Zelllinien aus Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches (Cal-33 und BHY) mit dem Gen stabil transfiziert werden.

##### Selektive Amplifikation von *FANCA* aus cDNA

Das zu untersuchende Gen *FANCA* wurde mit Hilfe von spezifischen Primern selektiv aus der cDNA einer exprimierenden Zelllinie (RPEX1.5) amplifiziert und das erwartete 5.000 bp Fragment im Agarosegel identifiziert. Es wurden zwei Parallelansätze mit verschiedenen Polymerasen (Paq 5000- und Herculase® II Fusion-Polymerase) angesetzt, wobei die Amplifikation mit Hilfe der Herculase® II Fusion-Polymerase effizienter erschien (Abb. 57 A). Das PCR-Produkt dieses Ansatzes wurde durch die Taq-Polymerase an den 5'-Enden polyadenyliert und zur Auftrennung und Isolierung auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen (Abb. 57 B). Der Schritt der Polyadenylierung war für die nachfolgende Klonierung des Amplifikats in den Klonierungsvektor pSC-A notwendig, da die Ligation in den Vektor auf Basenpaarung der Uracil-Überhänge der MCS des Vektors basiert (vergl. Abb 17, B.9.2).





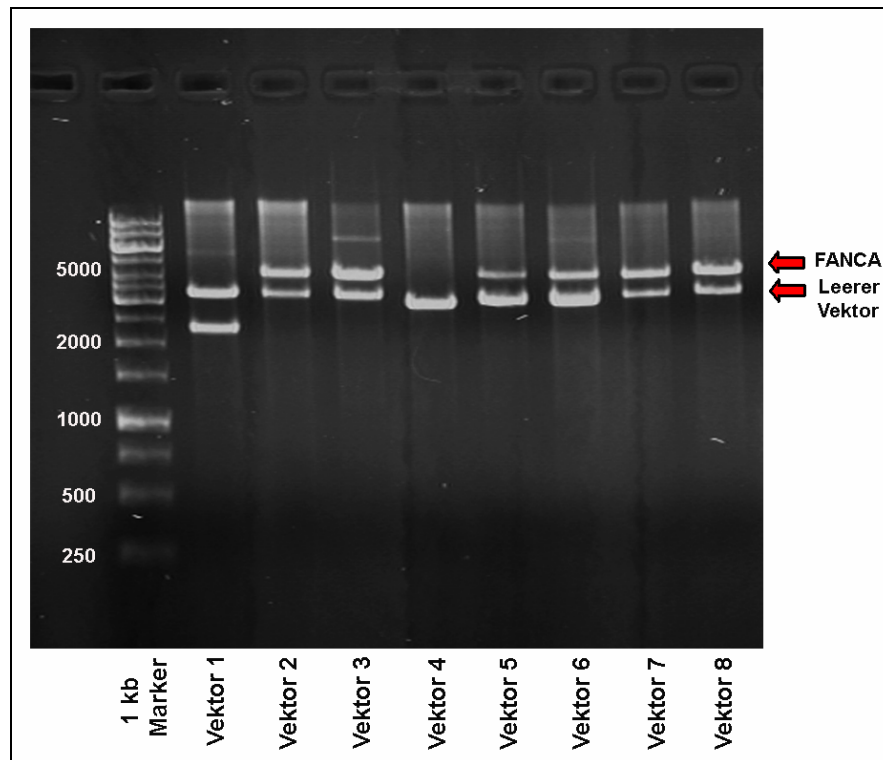
**Abbildung 57: Selektive Amplifikation des *FANCA*-Gens aus cDNA.**

(A) Vergleich der Amplifikation durch Paq5000- und Herculase® II Fusion-Polymerase. Der Herculase-Ansatz zeigt eine spezifische Amplifikation des *FANCA*-Gens mit weniger unspezifischen Banden im Vergleich zur Paq5000-Polymerase. (B) Gesamtansatz des Herculase-PCR-Produktes nach der Polyadenylierung. Die *FANCA*-Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA daraus isoliert.

#### Klonierung von *FANCA* in einen Vektor und Sequenzierung des Inserts

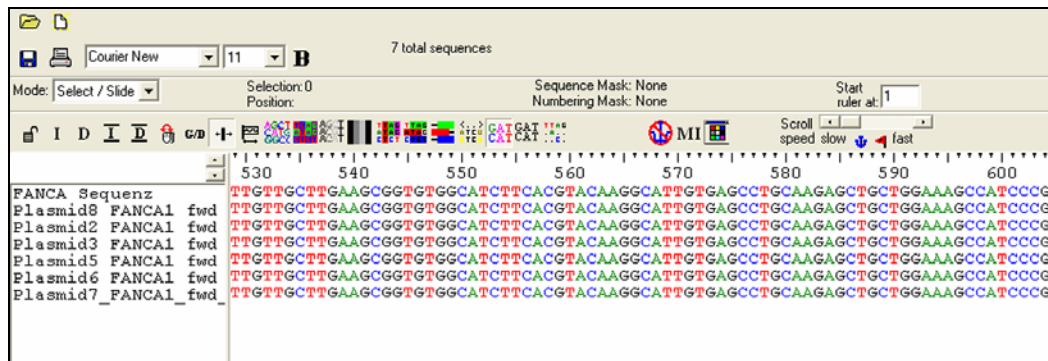
Nach der Isolation der *FANCA*-DNA aus der spezifischen Gelbande wurde das Gen mit Hilfe des PCR-Cloning-Kits (Stratagene) in den Klonierungsvektor pSC-A ligiert. Nach der Vermehrung des *FANCA*-Klonierungsvektors in kompetenten *E.coli*-Zellen und wurde dieser aus acht zufällig ausgewählten Klonen isoliert und in eine Restriktionsanalyse mit dem Enzym EcoRI eingesetzt. Dadurch konnten Vektoren ermittelt werden, welche das Insert korrekt eingebaut hatten. Da die MCS des pSC-A Vektors von zwei EcoRI-Schnittstellen flankiert wurde, ergaben sich nach einem Restriktionsverdau zwei Fragmente, die auf Grund ihrer unterschiedlichen Größe voneinander getrennt werden konnten. Dabei repräsentierte ein ca. 5 kb großes Fragment das ausgeschnittene *FANCA*-Gen und ein 3,3 kb großes Fragment den leeren Vektor. Wie aus Abbildung 58 ersichtlich ist, war in sechs von acht Vektoren eine korrekte Insertion des Gens erfolgt, während es in zwei Fällen offenbar zu einer unvollständigen bzw. zu keiner Ligation des *FANCA*-Gens in den Vektor gekommen war. Dieses stellte sich durch die im Restriktionsverdau entstandenen Fragmente dar. Vektoren mit korrektem Insert (Vektoren 2,3 und 5-8) wurden nach dem Didesoxy-Verfahren in 5'- und 3'-Richtung sequenziert (Abb. 59), um sicher zu stellen, dass die spätere Transfektion der Zellen mit dem

Wildtyp-*FANCA*-Gen erfolgte. In keinem der isolierten Klone konnten Einzelbasenpaar-substitutionen oder Mutationen nachgewiesen werden. Plasmid 3 zeigte die beste Sequenzierungsqualität und das integrierte Gen zeigte keine Abweichung zur Originalsequenz. Aus diesem Grund wurde es für die spätere Transfektion verwendet.



**Abbildung 58: EcoRI Restriktionsverdau der isolierten pSC-A-Klonierungsvektoren.**

Bei korrekter Insertion des *FANCA*-Gens ergeben sich zwei konkrete Banden (Vektoren 2,3, 5-8) bei ca. 5000 bp (*FANCA*) und ca. 3000 bp (leerer Vektor).

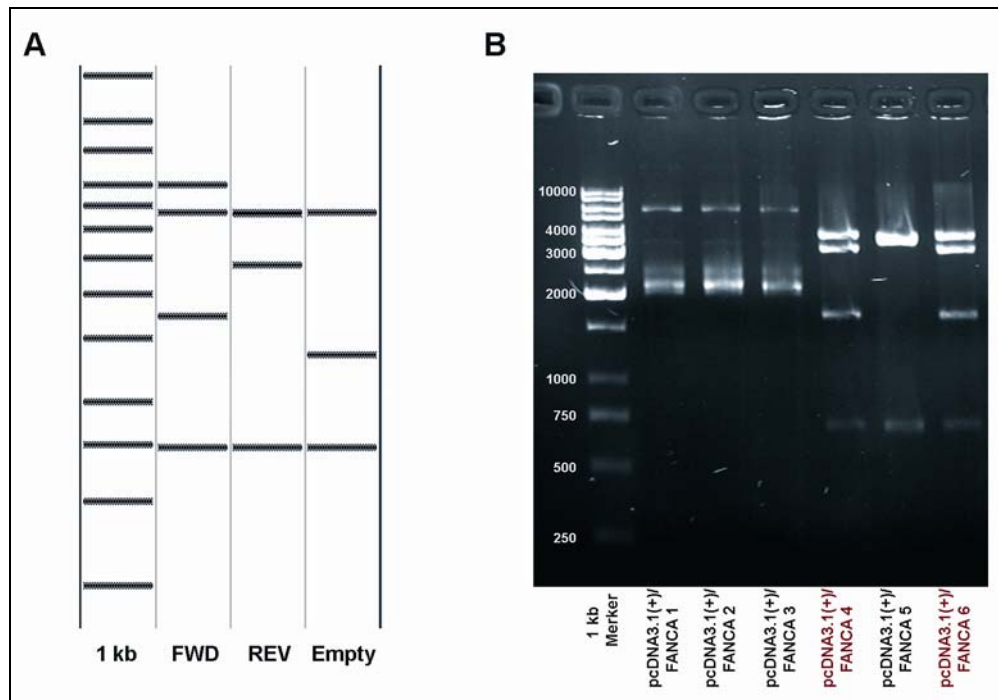


**Abbildung 59: Exemplarische Darstellung der Sequenzierungsdaten des klonierten FANCA-Gens.**

Sequenzierung des in die Plasmide eingebauten FANCA-Gens (der durch den Primer „FANCA1“ sequenzierte Abschnitt). In diesem Abschnitt stimmen alle Sequenzen mit der originalen FANCA-Sequenz überein.

Klonierung von FANCA in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+)

Plasmid 3 wurde erneut mit EcoRI in zwei größeren Ansätzen verdaut, die Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt und FANCA aus dem Gel isoliert. Daraufhin erfolgte die Ligation in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+), welcher dann durch Transformation in kompetenten Zellen vervielfältigt wurde. Nach der Isolation des Vektors aus den Bakterienzellen wurde eine Restriktionsanalyse mit dem Enzym NcoI durchgeführt. Diese diente zur Ermittlung von Vektoren, die das Insert in korrekter Orientierung eingebaut hatten. Durch den Restriktionsverdau mit NcoI konnten zwei Vektoren mit richtigem Insert aufgrund des spezifischen Fragmentmusters identifiziert werden (Abb. 60). Einer dieser Klone wurde im großen Maßstab angezüchtet und das Plasmid erneut isoliert.



**Abbildung 60: NcoI Restriktionsverdau der pcDNA3.1(+)/FANCA Expressionsvektoren.**

(A) Zu erwartendes Bandenmuster nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der mit NcoI verdauten Vektoren. FWD: FANCA richtig inseriert; REV: FANCA rückwärts inseriert; Empty: FANCA nicht inseriert. (B) Die Expressionsvektoren 4 und 6 (rot) zeigen das für ein in der korrekten Richtung inseriertes FANCA-Gen spezifische Fragmentmuster.

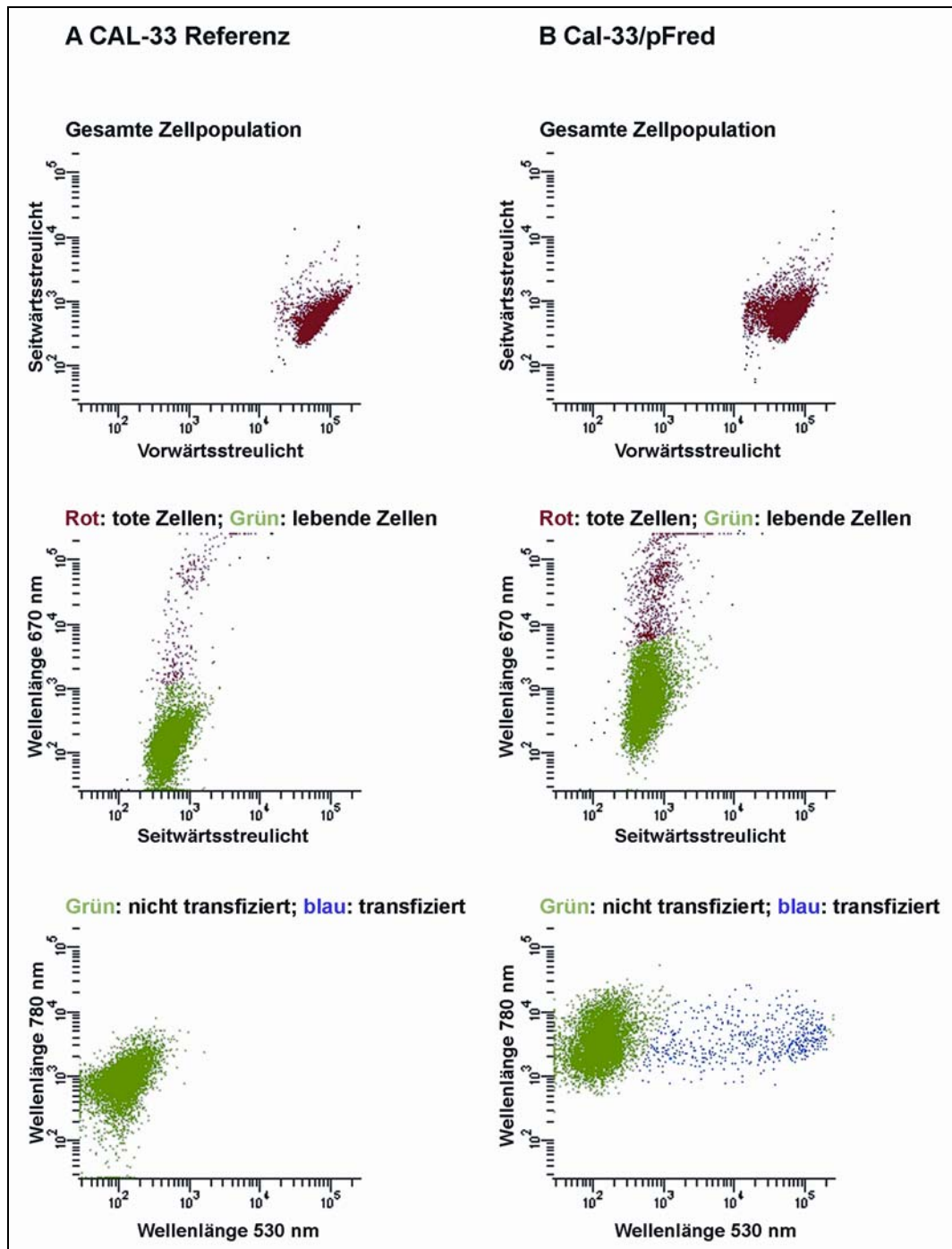
### Transfektion der Zelllinien Cal-33 und BHY

Vor der Transfektion wurde ein Teil des pcDNA3.1(+)/FANCA Vektors mit Hilfe des Restriktionsenzym PvuI linearisiert, da zirkuläre und lineare Fragmente von Zellen unterschiedlich gut aufgenommen werden können. Daraufhin erfolgte mit Hilfe des Transfektionsreagenzes „Polyfect“ die Transfektion der Zelllinien Cal-33 und BHY, jeweils mit zwei linearisierten pcDNA3.1(+)/FANCA Vektoren, einem zirkulären pcDNA3.1(+)/FANCA Vektor, zwei linearisierten pcDNA3.1(+) Vektoren ohne FANCA und dem Vektor pFred (vgl. B.9.11.3). Nach 48 h wurden die mit pFred transfizierten Zellen mit nicht transfizierten Referenz-Zellen im FACS-Gerät analysiert. Aufgrund der Zugabe des Nukleinsäureinterkalators Propidiumiodid konnte neben der Transfektionseffizienz auch die Anzahl an toten Zellen bestimmt werden. Aus dem Verhältnis der Lebendzellzahl zur Gesamtzellzahl konnte die Überlebensrate der Zellen ermittelt werden (siehe Abb. 61 und 62 sowie Tab. 18). Die nicht transfizierten Referenz-Zellen zeigten wie erwartet keine oder sehr niedrige Fluoreszenz-Signale, welche als Hintergrundrauschen interpretiert werden konnten. Die Transfektionseffizienzen der Zelllinien Cal-33 und BHY lagen bei 6,5% und 13% (Tab. 18).

48 h nach der Transfektion wurde mit der Selektion von stabil transfizierten Zellen mit 400 µg/ml Geneticin (G418) begonnen. Wie ein im Vorfeld erfolgter G418-Konzentrationstest der nicht transfizierten Stammzelllinien ergab, waren beide Zelllinien sensitiv auf G418 (Abb. 63). Lediglich transfizierte Zellen konnten nach 10 Tagen Selektion aufgrund der G418-Resistenz des Transfektionsvektors überleben. Die Transfektion und Selektion der einzelnen Zelllinien wird über einen Zeitraum von 8-10 Tagen photographisch dargestellt (Abb. 69-70). Zwei Tage nach der Transfektion waren bei allen Zelllinien phänotypische Veränderungen festzustellen. Beim Blick durch ein Lichtmikroskop erschienen die Zellmembranen der Zellen porös, was auf den Mechanismus der Aufnahme von Fremd-DNA zurückzuführen ist. Vier Tage nach Beginn der Selektion mit G418 konnte wie erwartet ein deutlicher Rückgang der lebenden Zellen verzeichnet werden. Tote Zellen wurden bei regelmäßigen Medienwechseln entfernt. Acht Tage nach der Transfektion war die Zahl der lebenden Zellen bei Cal-33 und BHY zwar weiter zurückgegangen, jedoch erschienen die verbliebenen Zellen gesund und es konnten zunehmend sich teilende Zellen beobachtet werden. Dabei handelte es sich offensichtlich um stabil transfizierte Zellen mit G418-Resistenz.

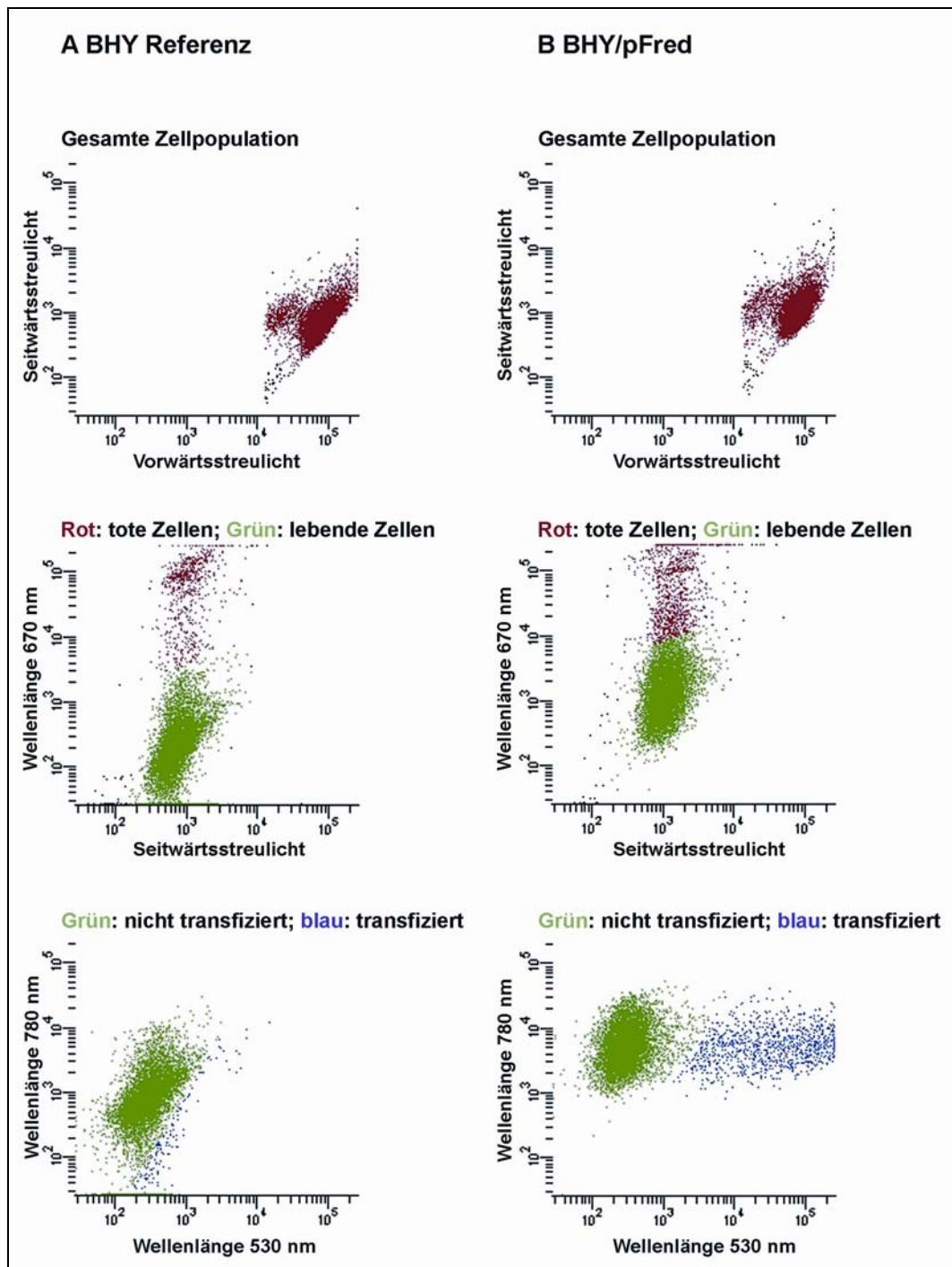
**Tabelle 18: Transfektionseffizienzen der Zelllinien Cal-33 und BHY.**

Zelllinie	Transfektions-effizienz [%]	Überlebens-rate [%]	Zelllinie	Transfektions-effizienz [%]	Überlebens-rate [%]
Cal-33	0,7	97,1	Cal-33/pFred	6,5	92,8
BHY	7,6	94,7	BHY/pFred	13,0	91,4



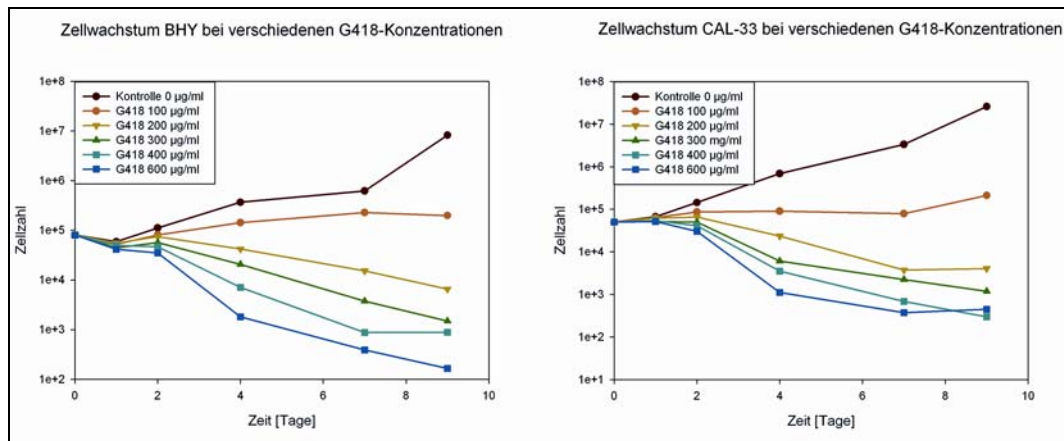
**Abbildung 61: Transfektionseffizienz der Zelllinie Cal-33.**

In der Abbildung sind die Daten der FACS-Analyse der nicht transfizierten Stammzelllinie Cal-33 (A) und der mit pFred transfizierten Zellen Cal-33/pFred (B) graphisch dargestellt. Die gesamte Zellpopulation wird durch das Seitwärtsstreulicht nach der Granularität und durch das Vorwärtsstreulicht nach der Größe der Zellen aufgetrennt. Tote Zellen können bei einer Wellenlänge von 670 nm von lebenden Zellen durch die Propidiumiodidfluoreszenz unterschieden werden. Bei einer Wellenlänge von 530 nm fluoresziert das nur in den transfizierten Zellen exprimierte GFP des pFred-Vektors.



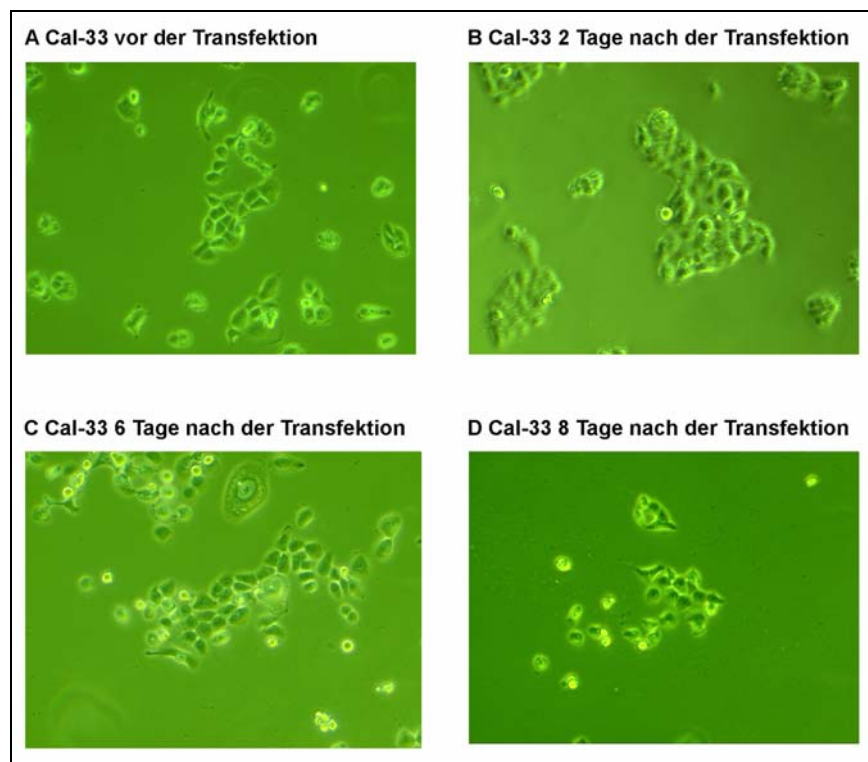
**Abbildung 62: Transfektionseffizienz der Zelllinie BHY.**

In der Abbildung sind die Daten der FACS-Analyse der nicht transfizierten Stammzelllinie BHY (A) und der mit pFred transfizierten Zellen BHY/pFred (B) graphisch dargestellt. Die gesamte Zellpopulation wird durch das Seitwärtsstreulicht nach der Granularität und durch das Vorwärtsstreulicht nach der Größe der Zellen aufgetrennt. Tote Zellen können bei einer Wellenlänge von 670 nm von lebenden Zellen durch die Propidiumiodidfluoreszenz unterschieden werden. Bei einer Wellenlänge von 530 nm fluoresziert das nur in den transfizierten Zellen exprimierte GFP des pFred-Vektors.



**Abbildung 63: Einfluss von G418 auf das Wachstum der Zelllinien BHY und Cal-33.**

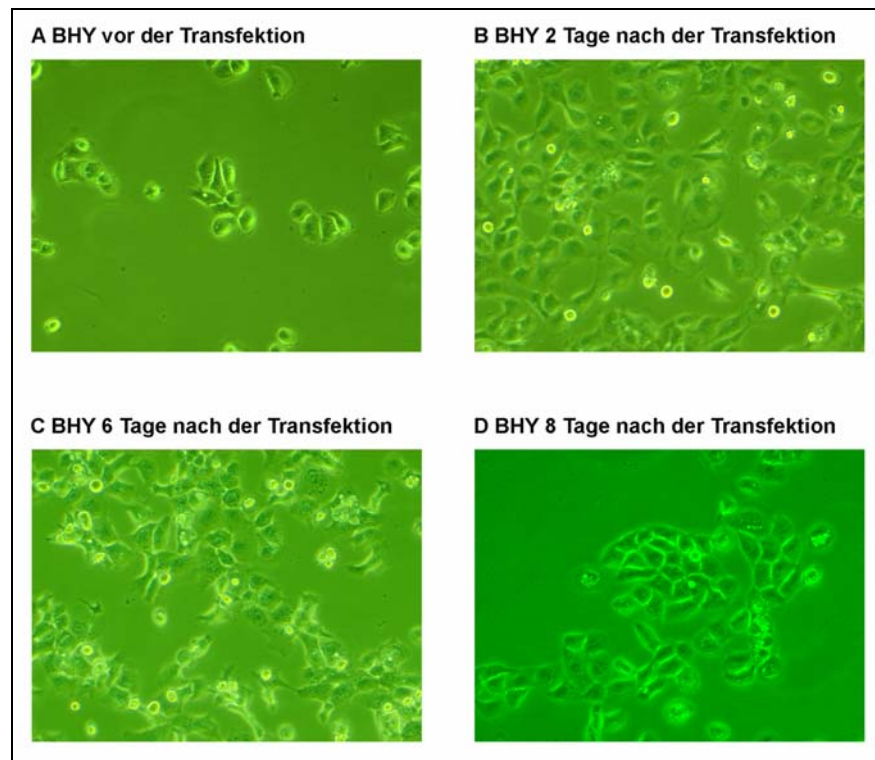
Logarithmische Darstellung der Zellzahl gegen die Inkubationszeit mit verschiedenen G418-Konzentrationen. Bei beiden Zelllinien zeigt die Negativkontrolle ohne G418 eine stetige Zunahme der Zellzahl, wohingegen die Zellzahl bei den mit G418 behandelten Zellen proportional zur eingesetzten Konzentration abnimmt. Nach 9 Tagen bewegen sich die Zellzahlen bei den Konzentrationen 400 und 600 µg/ml bei einem Wert von  $\sim 10^3$ , was im Coulter Counter etwa dem Leerwert entspricht, so dass sich diese Konzentrationen für eine Selektion von transfizierten Zellen eignen.



**Abbildung 64: Transfektion der Zelllinie Cal-33.**

Vor der Transfektion (A) zeigen die Zellen einen gesunden Phänotyp mit klar ausgeprägten Zellmembrangrenzungen. Zwei Tage nach der Transfektion (B) erscheinen die Zellmembranen unscharf und das Cytoplasma wirkt granuliert. Zu späteren Zeitpunkten (C) und (D) erscheinen die Zellen morphologisch wieder gesund. Aufgrund der Selektion mit G418 (ab Tag 4 nach der Transfektion) reduziert sich die Zellzahl aufgrund des Absterbens der nicht-transfizierten Zellen. Nur stabil transfizierte Zellen mit G418-Resistenz können weiter proliferieren.





**Abbildung 65: Transfektion der Zelllinie BHY.**

Vor der Transfektion (A) zeigen die Zellen einen gesunden Phänotyp mit klar ausgeprägten Zellmembrangrenzungen. Zwei Tage nach der Transfektion (B) erscheinen die Zellmembranen unscharf und das Cytoplasma wirkt granuliert. Auch sechs Tage nach der Transfektion sind die Zellen noch angegriffen, nach acht Tagen (D) haben sich die Zellen erholt und erscheinen morphologisch wieder gesund. Aufgrund der Selektion mit G418 (ab Tag 4 nach der Transfektion) reduziert sich die Zellzahl aufgrund des Absterbens der nicht-transfizierten Zellen. Nur stabil transfizierten Zellen mit G418-Resistenz können weiter proliferieren.

### C.4.3 Untersuchung der Strahlensensitivität der mit *FANCA* transfizierten Zellen

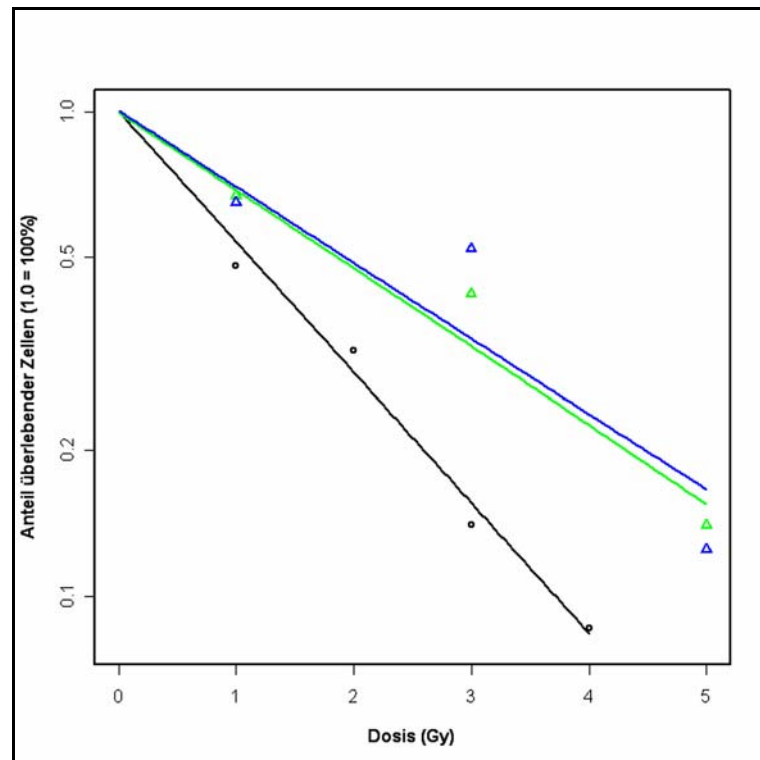
Um die Strahlenempfindlichkeit der mit *FANCA* transfizierten Zelllinien (BHY/*FANCA* Lin1, BHY/*FANCA* Lin2, BHY/*FANCA* circ., BHY/Vektor Lin1, BHY/Vektor Lin2 und Cal-33/*FANCA* Lin1, Cal-33/*FANCA* Lin2, Cal-33/*FANCA* circ., Cal-33/Vektor Lin1, Cal-33/Vektor Lin2 (vergl. B.9) im Vergleich zur jeweiligen nicht-transfizierten Kontrollzelllinie (Cal-33 oder BHY) zu untersuchen, wurden die Zellen mit einer  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Quelle bestrahlt. Alle Zellen wurden anhand der im Vorfeld ermittelten „Plating Efficiency“ der jeweiligen nicht-transfizierten Kontrollzelllinie (vgl. C.4.1.1) und je nach Dosis entsprechend ihrer zu erwartenden Überlebensrate ausgesät. Nach zehn Tagen ließen sich nur drei der zwölf untersuchten Zelllinien auswerten, da bei den meisten transfizierten Zelllinien die „Plating Efficiency“ zu gering war, so dass keine oder nur sehr wenige Kolonien gebildet wurden. Die Überlebensraten der Kontrollzelllinie Cal-33 und der transfizierten Zelllinien Cal-33/*FANCA* Lin1 und Cal-33/*FANCA* circ. sind aus Tabelle

19 ersichtlich. Aus den sich daraus ergebenden Überlebenskurven (Cal-33:  $a = 0,62 \pm 0,04$ ; Cal-33/FANCA Lin1:  $a = 0,067 \pm 0,04$ ; Cal-33/FANCA circ.:  $a = 0,065 \pm 0,04$ ;  $a =$  linearer Dosiseffektkoeffizient = Steigung der Kurven), welche in Abbildung 66 dargestellt ist, ergibt sich eine signifikant verringerte Strahlenempfindlichkeit der beiden mit FANCA transfizierten Zelllinien im Vergleich zur nicht-transfizierten Stammzelllinie ( $p=0,0006$ ).

**Tabelle 19: Überlebensraten der Zellen nach der Gamma-Bestrahlung.**

Dosis (Gy)	Überlebensraten [%]		
	Cal-33	Cal-33/FANCA Lin1	Cal-33/FANCA circ.
0	100	100	100
1	48	65	67
2	32	-	-
3	14	52	42
4	8,6	-	-
5	-	12,5	15

- nicht auswertbar



**Abbildung 66: Überlebenskurve von Cal-33-Zellen nach Gamma-Bestrahlung.**

Die Überlebenskurven der transgenierten Zelllinien Cal-33/FANCA Lin1 und Cal-33/FANCA circ. (grün und blau) geben im Vergleich zur Stammzelllinie Cal-33 (schwarz) eine verringerte Strahlenempfindlichkeit wieder.

## D DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein aus 117 Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches bestehendes Tumorkollektiv mit Hilfe der Vergleichenden Genomischen Hybridisierung (Comparative Genomic Hybridisation; CGH) zytogenetisch zu charakterisieren. Dieses Tumorkollektiv besteht ausschließlich aus strahlentherapeutisch behandelten Patienten mit klinischen Verlaufsdaten über einen Zeitraum von mehr als fünf Jahren. Somit stellt die vorliegende Arbeit die erste CGH Studie dar, die eine Korrelation der zytogenetischen Marker mit der Strahlenempfindlichkeit der untersuchten Tumoren erlaubt. Anhand der ermittelten chromosomalen Kopienzahlveränderungen sollten zudem zytogenetische Marker mit prognostischer Bedeutung identifiziert werden. Dafür wurden die Daten der CGH-Analyse durch statistische Berechnungen mit den klinischen Parametern und dem rezidivfreien Überleben der Patienten korreliert. Veränderte chromosomale Regionen mit prognostischer Bedeutung wurden auf potenzielle Kandidatengene hin untersucht. Ebenso wurden sie mit weiteren molekularen Methoden wie Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH), Immunhistochemie (IHC) und Expressionsanalysen analysiert und verifiziert. Darüber hinaus sollten funktionelle Studien an einem Zellkultursystem Aufschluss über phänotypische Auswirkungen der ermittelten Genveränderungen geben. Genetische Marker mit prognostischer Bedeutung sind besonders in der Diagnostik von großem Interesse, da durch sie das individuelle Tumorverhalten besser eingeschätzt werden kann. Diese Erkenntnisse wiederum ermöglichen individuelle Behandlungsschemata und eine Verbesserung des Therapieerfolges bei HNO-Tumoren.

Um die angeführten Ziele erreichen zu können, waren zunächst verschiedene methodische Etablierungen im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit erforderlich.

### D.1 Methodische Etablierungen

Da ausschließlich formalinfixiertes Paraffingewebe (FFPE-Gewebe) von HNO-Tumoren für die Experimente dieser Dissertation zur Verfügung stand, musste insbesondere die Array-CGH an FFPE-Gewebe sowie die gesamtgenomische Amplifizierung von DNA aus FFPE-Gewebe (FFPE-DNA) etabliert werden.

Etablierung einer Methode der gesamtgenomischen Amplifikation von DNA aus formalinfixiertem Paraffingewebe

Das zu untersuchende Tumormaterial lag in Form von FFPE-Gewebe-Schnitten auf Objektträgern vor. Die DNA-Isolation führte nicht in allen Fällen zu einer ausreichenden Menge an DNA. Aus diesem Grund sollte eine geeignete Methode zur gesamtgenomischen Amplifikation von DNA aus FFPE-Gewebe etabliert werden, die zu reproduzierbaren Ergebnissen in CGH und Array-CGH-Experimenten führt. Eine PCR-Amplifikation von DNA aus FFPE-Gewebe ist wegen der durch die Fixierung hervorgerufene Degradierung der DNA oftmals problematisch. Die am Häufigsten angewandte Methode zur gesamtgenomischen Amplifikation von FFPE-DNA war in der Vergangenheit die Degenerierte Oligonukleotid (DOP)-PCR, mit welcher eine universelle Vervielfältigung der DNA durch degenerierte Universalprimer in Kombination mit niedriger Annealingtemperatur erreicht wird (Telenius et al., 1992). Allerdings konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden, dass das PCR-Amplifikat in einigen Fällen nicht alle Regionen der Ausgangs-DNA zuverlässig repräsentiert, was besonders bei hoch auflösenden molekularen Techniken, wie beispielsweise Array-CGH, von Bedeutung ist (Cardoso et al., 2004; Pinard et al., 2006; Little et al., 2006). Es wurde somit eine robustere Methode der gesamtgenomischen DNA-Amplifikation benötigt, welche auch mit schlechter DNA-Qualität und/oder degradiertem DNA zufrieden stellende Ergebnisse liefert.

Sowohl die Amplifikation durch isothermische Strangverdrängung mit Hilfe der DNA-Polymerase des Bakteriophagen Phi29 (GenomiPhi-PCR), als auch die GenomePlex-PCR (WGA; Whole Genome Amplification) erzeugten ausreichende Mengen an amplifizierter FFPE-DNA. Nach der Qualitätskontrolle der Amplifikate in einer Multiplex-PCR auf ihre Tauglichkeit für Array-CGH-Experimente (van Beers et al., 2006), konnten in den GenomiPhi-Amplifikaten aus FFPE-DNA unspezifische Intermediärbanden bei der elektrophoretischen Auftrennung der entstandenen Fragmente beobachtet werden (Abb. 24). Die mit GenomiPhi amplifizierte kommerzielle Referenz-DNA hingegen zeigte, wie auch die mit WGA-amplifizierte FFPE- und Referenz-DNA, nur die erwarteten spezifischen Banden in der Multiplex-PCR. Auf Grund dessen kann angenommen werden, dass es sich bei der Generierung der unspezifischen Intermediärbanden um einen Effekt handelt, der spezifisch bei GenomiPhi-amplifizierter FFPE-DNA auftritt. Durch die degradierte FFPE-DNA kann möglicherweise auch eine unspezifische Amplifikation durch die GenomiPhi-Polymerase erfolgen. Eine Array-CGH-Analyse der amplifizierten FFPE-DNAs bestätigte diese Theorie. Während das Array-CGH-Profil der mit WGA amplifizierten DNA die erwarteten genomischen Veränderungen eines bereits mit CGH

untersuchten HNO-Tumors klar und deutlich wiedergab, zeichnete sich das Array-CGH-Profil der GenomiPhi-DNA durch ein starkes Rauschen der Signale aus (Abb. 25). Zusätzlich konnte anhand von Drosophila-Kontroll-Klonen auf dem verwendeten Array, an welche keine humane DNA binden sollte, eine unspezifische Hybridisierung der GenomiPhi-DNA nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Resultaten von Lage et al. (2003), die bei Array-CGH-Analysen mit Phi29-Polymerase-amplifizierter DNA auf cDNA-Arrays ebenfalls starke Schwankungen der gemessenen Fluoreszenzsignale beobachteten. Im Gegensatz dazu berichten Cardoso et al. (2004) über eine erfolgreiche Amplifikation von DNA aus Zelllinien und Gefriergewebe mit Hilfe des GenomiPhi-Kits mit anschließender Array-CGH-Analyse. Allerdings wurde auch in dieser Studie die Bildung unspezifischer PCR-Produkte, bemerkenswerterweise sogar in Reaktionsansätzen ohne DNA-Template, geschildert. Dieses Phänomen wurde bereits von Lage et al. (2003) beschrieben und wird auf die Fähigkeit der Phi29-Polymerase zurückgeführt, eine nur von Primer-Dimeren initiierte DNA-Synthese betreiben zu können. Obwohl auch Dean et al. (2002) über positive Erfahrungen mit der Amplifikation von DNA durch Strangverdrängung mit der Phi29-Polymerase berichten, wurde diese Methode auf Grund der weiter oben beschriebenen Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit nicht weiter verwendet, um genomische DNA aus FFPE-Gewebe von HNO-Tumoren zu amplifizieren. Zu diesem Zweck wurde die GenomePlex-WGA-Amplifikation beibehalten, mit deren Amplifikaten gute Ergebnisse in weiterführenden Array-CGH-Analysen erzielt werden konnten. Die Eignung der GenomePlex-WGA-Amplifikation für eine zuverlässige Vervielfältigung von DNA aus FFPE-Gewebe mit anschließender Analyse der Amplifikate in Array-CGH-Experimenten, wurde bereits von Little et al. (2006) demonstriert.

Eine weitere Methode zur gesamtgenomischen Amplifikation, die Linker-Adapted-PCR (Klein et al., 1999), wurde im Rahmen des Affymetrix-Protokolls ebenfalls getestet und wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

#### *Etablierung einer Array-CGH-Plattform zur Analyse von Kopienzahlveränderungen in DNA aus formalinfixiertem Paraffingewebe*

Die Weiterentwicklung der CGH zur Matrix-basierten CGH (Array-CGH) erlaubt die molekularzytogenetische Analyse von chromosomalen Kopienzahlveränderungen in einer höhern molekularen Auflösung. Diese ist ausschließlich abhängig von der Größe und dem genomischen Abstand der gewählten Zielsequenzen, welche auf den Array aufgebracht werden (Fiegler et al., 2003). Als Zielsequenzen können beispielsweise cDNAs (Pollak et al., 1999) oder BACs (Snijders et al., 2001) dienen. Bei der Analyse

von Kopienzahlveränderungen wurden auch bereits Oligonukleotid-Arrays, welche ursprünglich für die Genotypisierung von Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (Single Nucleotide Polymorphisms; SNPs) entwickelt wurden, erfolgreich eingesetzt (Bignell et al., 2004; LaFramboise et al., 2005; Rauch et al., 2004). Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Array-CGH-Plattform etabliert werden, die es erlaubt, DNA aus FFPE-Gewebe zuverlässig auf chromosomale Zugewinne und Verluste zu untersuchen. Dazu wurden Testexperimente mit drei BAC-Arrays (Sanger 1Mb BAC-Array, CMR Hs1 Mb BAC-Array und UCSF 1.4 Mb BAC-Array) sowie mit einem Oligonukleotid-Array (SNP-Array; Affymetrix GeneChip® Mapping 10K Array Xba 142 2.0) durchgeführt und miteinander verglichen. Auf jeden Array wurde DNA einer bereits zytogenetisch charakterisierten Zelllinie hybridisiert, um die Reproduzierbarkeit des Nachweises von genetischen Veränderungen zu überprüfen. Um zu untersuchen, ob auch chromosomale Veränderungen bei DNA aus FFPE-Gewebe zuverlässig wiedergegeben werden, wurde mit jedem Array HNO-Tumor-DNA aus FFPE-Gewebe mit bereits bekannten Kopienzahlveränderungen analysiert.

Die Analyse von FFPE-DNA mit dem SNP-Array stellte sich als problematisch dar. Die Komplexitätsreduzierung der bereits degradierten FFPE-DNA durch einen Restriktionsverdau mit dem Enzym XbaI zu Beginn des Protokolls führte zu einer geringen DNA-Ausbeute nach der Linker-Adapted-PCR; nach Optimierung des Protokolls durch den Einsatz einer größeren DNA-Menge gelang immerhin eine erfolgreiche Hybridisierung mit sehr guten Signalintensitäten. Das Problem der geringen Ausbeute bei der Amplifikation von FFPE-DNA im Affymetrix-Protokoll wurde ebenfalls durch Thompson et al. (2005) beschrieben, die neben der Anzahl an PCR-Reaktionen auch die einzusetzende DNA-Menge und die Zyklenzahl der PCR erhöhten, um ausreichende Mengen an Amplifikat zu generieren. Leider zeichnete sich das SNP-Array Profil der FFPE-DNA sowohl in den eigenen Versuchen als auch in publizierten Experimenten durch ein starkes Rauschen der Signale aus, wodurch eine Schwellenwertsetzung für die Untersuchung von Kopienzahlveränderungen nahezu unmöglich war (Abb. 26). Ein Nachweis der bekannten Genomveränderungen in den untersuchten HNO-Tumoren war nicht möglich. Im Gegensatz zu diesen Experimenten mit DNA aus FFPE-Gewebe ließen sich die bekannten chromosomalen Kopienzahlveränderungen einer diploiden Zelllinie exakt reproduzieren, und durch die höhere Auflösung des Arrays wurde eine detailliertere Beschreibung dieser Veränderungen ermöglicht. Auffällig war, dass die Stärke des Hintergrundrauschens in den Profilen der SNP-Arrays eine deutliche Abhängigkeit von Polyploidiegrad und Aberrationsanzahl der Probe zeigte. Die Hybridisierung einer weiteren Zelllinie, welche einen triploiden Karyotyp und zahlreiche chromosomale Kopienzahlveränderungen aufwies, resultierte in einem Array-Profil mit deutlich

erhöhtem Signalrauschen im Gegensatz zu dem Profil der wenig veränderten diploiden Zelllinie (Abb. 26). Dennoch konnten aus dem Profil der triploiden Zelllinie charakteristische Veränderungen lokalisiert und genauer eingegrenzt werden. Zellen aus HNO-Tumoren weisen ebenso oft einen hohen Polyploidiegrad auf. Auf Grund dieser Vorversuche ist daher zu erwarten, dass sich dies zusätzlich zu einer schlechten DNA-Qualität und einer hohen Anzahl an Veränderungen, in einem SNP-Array-Profil als extrem starkes Schwankungen der Signale bemerkbar macht. Stärkere Schwankungen in den SNP-Array-Profilen aus FFPE-DNA wurden auch von Thompson et al. (2005) im Vergleich zu DNA aus Gefriergewebe beobachtet. Die Schwankungen der Signalintensitäten waren allerdings nicht so stark ausgeprägt, wie in den hier diskutierten Profilen, so dass eine erfolgreiche Analyse der Genkopienzahlveränderungen von DNA aus FFPE-Gewebe unter Verwendung des Affymetrix GeneChip® Mapping 10K Arrays in dieser Studie gezeigt werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass der Grad der Degradierung durch die Formalinfixierung ausschlaggebend sein könnte. Ein weiterer interessanter Aspekt bei der Analyse von chromosomalen Kopienzahlveränderungen in Tumor-DNA aus FFPE-Gewebe zeigte sich bei der Auswertung mit der Affymetrix-Software. Nach dem Scannen zeigten alle Proben Signalintensitäten von ca. 95-99%, was auf eine erfolgreiche Hybridisierung schließen ließ. Die so genannte „call rate“, welche den Anteil der letztendlich in die Auswertung einfließenden SNPs wiedergibt, lag bei der FFPE-Probe und bei der triploiden Zelllinie mit ca. 80% deutlich darunter. Da diese Art von Arrays ursprünglich für Genotypisierungsstudien entwickelt worden waren, geben die Hybridisierungsdaten für jeden SNP auch dessen Genotyp (AA, AB oder BB) wieder. Treten in einem Tumorgenom DNA-Zugewinne mit mehreren verschiedenen Allelen auf (z.B. AAABB) kann der Genotyp in der Software nicht eindeutig zugeordnet werden, so dass der betroffene SNP nicht in die Auswertung mit einbezogen wird. Derartige Auswerteprobleme sind folglich bei den polyploiden Tumoren – unabhängig von der Formalinfixierung – zu erwarten. Allerdings stellt die schlechte Qualität der degradierten Ausgangs-DNA einen weiteren Grund für eine reduzierte „call rate“ bei Analysen mit FFPE-DNA dar. In den meisten Fällen weist FFPE-DNA einen geringen Anteil an hochmolekularer DNA auf und die Fragmentgrößen sind selten größer als 800 bp. Aus diesem Grund sind größere Fragmente in den Amplifikaten der PCR und somit auch auf dem Array unterrepräsentiert, was zu einem Absinken der „call rate“ führt (Jacobs et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnte keine zufrieden stellende Analyse von Genkopienzahlveränderungen von DNA aus FFPE-Gewebe unter Verwendung des Affymetrix GeneChip® Mapping 10K Arrays erzielt werden. Wie bereits in vielen Studien bewiesen (Zhou et al., 2004; Zhao et al., 2005; Hu et al., 2006), eignet sich diese Art der SNP-



basierten Array-CGH sehr gut für die Analyse von chromosomalen Kopienzahlveränderungen von DNA aus Zelllinien oder Gefriergewebe. Die schlechte Qualität von degradierter DNA aus FFPE-Gewebe ist der limitierende Faktor bei der Untersuchung von archiviertem Tumormaterial. Trotzdem stellt diese Methode in Zukunft eine leistungsfähige Plattform für die Analyse von Tumorgenomen dar (Davies et al., 2005). Einen großen Vorteil stellt die Möglichkeit zur Erfassung von Verlusten der Heterogenität (Loss of Heterozygosity, LOH) und Genkopienzahlveränderungen in einem Experiment dar. Auch kann die kombinierte Auswertung von Kopienzahlveränderungen und LOH-Status, welcher den parentalen Ursprung der veränderten chromosomalen Region wiedergibt, zur Identifikation von Genen führen, die in erblich bedingten Tumoren eine Rolle spielen (Tomlinson et al., 1999; Oosting et al., 2007). Durch die Weiterentwicklung des Affymetrix GeneChip® Mapping 10K Arrays zu noch höher auflösenden Arrays (z.B. 100 und 500 K) wurde die SNP-Dichte auf den einzelnen Chromosomen verbessert, so dass das Genom gleichmäßiger repräsentiert wird. Auch bei der Anwendung von FFPE-DNA auf SNP-Arrays wurden Fortschritte erzielt, so empfiehlt der Hersteller Affymetrix vor Beginn des Experimentes inzwischen eine PCR-basierte Qualitätskontrolle der FFPE-DNA. Interessanterweise war die Qualität der in dieser Arbeit hybridisierten FFPE-DNA durch eine Multiplex-PCR als gut befunden worden, eine Auswertung von Genkopienzahlveränderungen konnte aufgrund des starken Signalrauschens trotzdem nicht vorgenommen werden. Auch die Affymetrix-Softwares wurden mittlerweile an die Bedürfnisse der Analyse von Genkopienzahlveränderungen angepasst und weiterentwickelt. In einer aktuellen Veröffentlichung stellen Lyons-Weiler et al. (2008) ein speziell an FFPE-DNA adaptiertes Protokoll für die Analyse von Genkopienzahlveränderungen mit dem Affymetrix GeneChip® Mapping 10K 2.0 Array vor. Diese Weiterentwicklungen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr angewendet werden konnten, machen diese Art von Arrays für die Untersuchung von Tumorgenomen in Zukunft attraktiver.

Die Verwendung von BAC-Arrays für die Analyse von chromosomalen Aberrationen in Tumorgenomen wird in einer Vielzahl von Studien beschrieben (Fiegler et al., 2003, Greshock et al., 2004; Davies et al., 2005; Douglas et al., 2004; Pinkel et al., 2005). Auch über erfolgreiche Analysen von DNA aus FFPE-Geweben mit Hilfe der hier getesteten BAC-Arrays wird berichtet (Little et al., 2005; Johnson et al., 2006; Lee et al., 2006; DeVries et al., 2005). Im Einklang mit diesen Studien konnte in der vorliegenden Dissertation eine reproduzierbare Analyse von Genkopienzahlveränderungen in Tumor-DNA aus FFPE-Gewebe mit Hilfe von BAC Arrays erreicht werden. Alle Array-CGH-Profile der getesteten BAC-Arrays (Sanger 1Mb BAC-Array, CMR Hs1 Mb BAC-Array und UCSF 1.4 Mb BAC-Array; Abb. 27 und 28) gaben die in der chromosomalen

CGH ermittelten DNA-Zugewinne und DNA-Verluste zuverlässig bei gleichzeitig höherer molekularer Auflösung wieder. Der UCSF 1.4 Mb BAC-Array zeichnet sich durch zwei Arrays auf einem Objektträger aus, wodurch in einem Hybridisierungsexperiment zwei Proben analysiert werden können. Aufgrund der Hybridisierungskammern der in dieser Arbeit verwendeten Hybridisierungsstation (HS 400, Tecan) konnte dieser Vorteil nicht genutzt werden, weshalb für weitere Array-CGH-Untersuchung von HNO-Tumoren die Sanger 1Mb- und der CMR Hs1 Mb-BAC-Arrays verwendet wurden.

Den höher auflösenden SNP-Arrays wird von Haus aus eine höhere Signalvariabilität als den BAC-Arrays zugeschrieben (Pinkel und Albertson, 2005; Ylstra et al., 2006). Dies ist möglicherweise auf eine höhere Variabilität der Hybridisierungskinetik aufgrund der im Vergleich zu BAC-Arrays sehr kurzen Target-Sequenzen (Oligonukleotide aus 25 bp) zurückzuführen (Tan et al., 2007). Trotz der geringeren molekularen Auflösung erwiesen sich die BAC-Arrays als geeignetes molekulares Werkzeug zum Nachweis von Genkopienzahlveränderungen, das robust genug ist, um auch DNA aus FFPE-Gewebe reproduzierbar auf chromosomale Kopienzahlveränderungen hin zu untersuchen.

## **D.2 Zytogenetische Marker in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches**

Die Entwicklung der chromosomalen CGH 1992 durch Kallioniemi et al. lieferte die erste effiziente Screening-Methode, mit der das gesamte Genom in einem Experiment auf chromosomale Kopienzahlveränderungen untersucht werden konnte (Pinkel und Albertson, 2005). Viele Studien befassten sich seitdem mit der Analyse von chromosomalen Aberrationen in soliden Tumoren (Zitzelsberger et al., 1997), wobei in den letzten Jahren die Identifikation von chromosomalen Markern als potenzielle Prognosefaktoren im Vordergrund stand. In dieser Arbeit wurden 117 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches mit Hilfe der CGH auf chromosomale Aberrationen untersucht. Dies ist die erste CGH-Untersuchung an ausschließlich strahlentherapeutisch behandelten HNO-Tumoren, aus der Rückschlüsse auf die Strahlenempfindlichkeit der Tumoren gezogen werden können und Korrelationen mit den klinischen Parametern der Patienten hergestellt werden können.

### Zytogenetische Aberrationsmuster

Wie bereits in vorangegangenen Studien beschrieben (Patmore et al., 2005), zeichnete sich das genetische Profil der untersuchten HNO-Tumoren durch eine komplexe Zusammensetzung aus einer großen Anzahl von DNA-Zugewinnen und DNA-Verlusten aus. Am Häufigsten waren DNA-Zugewinne auf den Chromosomen 1q, 2q, 3q, 4q, 7q, 8q, 11q, 12p, 12q und 19p und Deletionen auf den Chromosomen 3p, 4p, 8p, 9p, 10q, 11q, 13q, 16q, 18q und 21q zu beobachten (Abb. 29 und Tab. 8). Dieses Muster an chromosomalen Veränderungen stimmt sehr gut mit bereits publizierten Daten (frei zugänglich über die Datenbank [www.progenetix.de](http://www.progenetix.de); Baudis und Cleary, 2001) von chromosomalen Kopienzahlveränderungen in Kopf-Hals-Tumoren überein. Patmore et al. (2005) fassten die aufgrund ihres häufigen Auftretens offensichtlich wichtigsten chromosomalen Veränderungen bei HNO-Tumoren zusammen. Die beschriebenen Veränderungen auf den Chromosomen 3p, 3q, 7q, 8p, 8q, 9p und 11q wurden auch in dem hier untersuchten Tumorkollektiv beobachtet. Chromosomale Aberrationen auf den Chromosomen 5 und 7p zählten dabei hingegen nicht zu den häufigsten Veränderungen. Die in dem hier untersuchten Kollektiv ermittelten häufigen Kopienzahlveränderungen auf den Chromosomen 2q, 10q, 12, 13q, 16q, 18q, 19p und 21q werden von Patmore et al. (2005) zwar nicht erwähnt, wurden aber in anderen Studien ebenfalls mit unterschiedlichen Häufigkeiten nachgewiesen (Bockmühl et al., 2000; Ashman et al., 2003).

Eine hierarchische Cluster-Analyse aller in dieser Arbeit ermittelten chromosomalen Veränderungen legte eine deutliche Unterteilung der Tumor-Fälle in zwei Hauptcluster (Cluster 1 und Cluster 2; Abb. 31) nahe, was mindestens zwei verschiedene Hauptwege der molekularen Tumorentstehung vermuten lässt. Die auffälligsten Unterschiede zwischen beiden Clustern waren auf den chromosomalen Regionen 1q32, 1q43, 4q26, 7q22, 11q13, 16q23-24 (DNA-Zugewinne) und 3p13, 3p24, 4p16, 9p22, 13q31, 18q22 sowie 21q21 (DNA-Verluste) zu beobachten (Tab. 9a+b).

### Korrelation genetischer Veränderungen mit Anämiestatus und Strahlenempfindlichkeit

Ein interessanter Aspekt der Cluster-Analyse war, dass die beiden Cluster signifikant mit dem Anämiestatus der Patienten korrelierten ( $p < 0,0001$ ). In Cluster 1 befanden sich 35%, in Cluster 2 84% anämische Patienten. Möglicherweise unterscheiden sich Tumoren von anämischen und nicht-anämischen Patienten auf molekularer Ebene, was auf einen genetischen Hintergrund der begleitenden Anämie-Erkrankung von Tumorpatienten hindeuten könnte. Diese These wurde durch den direkten Vergleich der

chromosomalen Veränderungen von anämischen und nicht-anämischen Patienten untermauert, da sich bei einer Reihe von Aberrationen eine signifikante Korrelation (FDR korrigierter  $p$ -Wert  $< 0,05$ ) zwischen den Häufigkeiten der Veränderungen und dem Anämiestatus der Patienten feststellen ließ. Dies galt für chromosomale Kopienzahlveränderungen auf den Chromosomen 1, 2q, 3, 4, 5, 6q, 8q, 9p, 10p, 11q, 12, 13, 16q, 17, 18q, 19, 20q und 21q (Abb. 34). Es ist bekannt, dass eine Anämie bei Tumorpatienten den Krankheitsverlauf unabhängig von anderen Prognosefaktoren negativ beeinflusst (Frommhold et al., 1998). Dies wird durch die vorliegende Arbeit bestätigt, da eine hoch signifikante Korrelation zwischen dem Anämiestatus und dem krankheitsfreien Überleben der Patienten beobachtet werden konnte ( $p=0,0026$ ). Das Ergebnis der Cluster-Analyse lässt einen genetischen Hintergrund der tumorbegleitenden Anämie vermuten, welcher für die schlechtere Prognose anämischer Patienten verantwortlich sein könnte. Ein weiterer Grund für den ermittelten negativen Effekt auf das rezidivfreie Überleben könnte eine durch die Anämie entstehende verminderte Sauerstoffversorgung des Tumorgewebes (Hypoxie) sein, welche zu einer geringeren Strahlenempfindlichkeit der Tumoren führt (Becker et al., 2000). Um diesem negativen Effekt der Anämie entgegenzuwirken, wird vor einer Strahlentherapie versucht, den Hämoglobinspiegel bei anämischen Tumorpatienten mit Hilfe von gentechnisch hergestelltem Erythropoetin zu korrigieren (Henke et al., 1999; Seidenfeld et al. 2001). Obwohl in diversen Studien ein positiver Effekt der Erythropoetin-Gabe auf anämische Tumorpatienten nachgewiesen werden konnte (Demetri et al., 1998; Gabrilove et al., 2001; Littlewood et al., 2001), wurde sowohl bei HNO-Tumor-Patienten als auch bei Brustkrebs-Patienten ein verringertes Überleben nach der Behandlung der Anämie mit Erythropoetin beobachtet (Leyland-Jones et al., 2005; Henke et al., 2003). Dieser Befund wird durch eine kürzlich veröffentlichte Studie mit über 10 000 Patienten untermauert, in der Bennet et al. (2008) eine erhöhte Mortalität mit einer Erythropoetin-Behandlung von anämischen Tumorpatienten assoziieren konnten. Obwohl der Mechanismus, wie Erythropoetin das Überleben der Tumorpatienten nachteilig beeinflusst, bislang nicht bekannt ist, kann ein direkter Effekt auf Tumorzellen nicht ausgeschlossen werden (Henke et al., 2006). So exprimieren eine ganze Reihe von Tumorzellen den Erythropoetin-Rezeptor (EpoR) auf ihrer Oberfläche (Hardee et al., 2006), dessen Aktivierung durch seinen Liganden Erythropoetin zu Signal-Transduktions-Kaskaden führen. Diese können das invasive Wachstum von Tumorzellen des Kopf-Hals-Bereiches fördern (Lai et al., 2005; Mohyeldin et al., 2005) und eine anti-apoptotische Wirkung erzielen (Koury et al., 1990), was erhebliche Folgen für die mit Erythropoetin therapierten anämischen Tumorpatienten haben könnte. Arcasoy et al. (2005) konnten die Expression des EpoR in 97% der von ihnen untersuchten Kopf-Hals-Tumoren nachweisen. Interessanterwei-

se wird die Expression von Erythropoetin unter anderem durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor 1) reguliert (Ebert et al., 1999), welcher wiederum vermehrt in unzureichend mit Sauerstoff versorgten Tumorgeweben gebildet wird (Wincewicz et al., 2007). Wie bereits weiter oben erwähnt, könnte die schlechte Prognose von anämischen Tumorpatienten auf einer Therapieresistenz aufgrund der durch die Anämie hervorgerufene Hypoxie des Tumors zurückzuführen sein. In mehreren Studien konnte eine direkte Korrelation zwischen Tumor-Hypoxie bei HNO-Tumoren mit dem Überleben der Patienten nach der Strahlentherapie nachgewiesen werden (Acs et al., 2007), wodurch ein enger Zusammenhang zwischen Strahlenresistenz der Tumore und Tumor-Hypoxie deutlich wird. Auch HIF-1, dessen Expression z.B. durch Tumor-Hypoxie aktiviert wird, scheint eine Rolle bei der Strahlenresistenz von Tumorzellen zu spielen (Möller et al., 2007). Sasabe et al. (2006) konnten einen Zusammenhang zwischen erhöhter HIF-1-Expression und einer zunehmenden Strahlen- und Chemo-Resistenz von epithelialen Tumorzellen im Mundbereich nachweisen. Nach Aktivierung der Expression von Erythropoetin durch HIF-1 und die Bindung an EpoR könnten in hypoxischen Tumoren möglicherweise Signal-Transduktionskaskaden ausgelöst werden, durch welche sich ein aggressiveres Tumorwachstum und/oder eine Therapieresistenz entwickeln könnte. Die Thematik um Erythropoetin und den EpoR wird allerdings kontrovers diskutiert. So finden beispielsweise Lönnroth et al. (2008) keine Assoziation zwischen der Expression von EpoR, dem Überleben von Patienten mit gastrointestinalen Tumoren und der Behandlung durch Erythropoetin. In diesem Zusammenhang wurden auch experimentelle Methoden zur Erfassung des EpoR angezweifelt (Elliott et al., 2006) und natürlich können auch andere molekulare Eigenschaften von Tumorzellen an der schlechten Prognose von anämischen Patienten beteiligt sein. Auch existieren neben der HIF-1-vermittelten Erythropoetin-Expression vermutlich parallele Mechanismen für das Überleben von Zellen in hypoxischen Geweben (Acs et al., 2007). Um die komplexen Zusammenhänge zwischen Anämie, Tumor-Hypoxie und HIF-1- und Erythropoetin-abhängigen Signalkaskaden, die einen Einfluss auf die Therapiesensitivität der Tumore und damit auf das Überleben der Patienten haben, aufzudecken, bedarf es in Zukunft weiterer Studien an größeren Tumorkollektiven.

### Korrelation der chromosomalen Aberrationen mit klinischen Parametern

Zur Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen den ermittelten Kopienzahlveränderungen und den bekannten klinischen Parametern der Patienten, wurden verschiedene statistische Tests angewandt.

DNA-Verluste auf Chromosom 16q24 korrelierten signifikant mit dem Resektionsstatus der Tumoren ( $p=0,042$ ; FDR korrigiert; Abb. 33). Patienten mit inoperablen Tumoren zeigten diese Deletion häufiger als Patienten mit resektablen Tumoren, was auf einen aggressiveren Verlauf von Tumoren mit einem chromosomalen Verlust auf 16q24 hindeutet. Das vermehrte Auftreten in weit fortgeschrittenen Tumoren könnte allerdings auch darauf hindeuten, dass es sich bei Verlusten auf dem Chromosomenarm 16q um eine in der Tumorprogression relativ spät auftretende Veränderung handelt. Bestätigend dazu stellten Wang et al. (1999) eine Korrelation zwischen fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches mit Zervix-Metastasen und LOH auf Chromosom 16q fest. Im Gegensatz dazu ist der Verlust von 16q die am häufigsten beobachtete chromosomale Veränderungen bei Brustkrebs im Stadium I, welche als Tumoren der Größe T1 ohne Lymphknotenbefall und ohne Metastasen definiert sind (Simpson et al., 2005). Auf Chromosom 16q befinden sich einige putative Tumorsuppressorgene (Rakha et al., 2006; van Wezel et al., 2005), deren Funktionsverlust durch Deletion eine Rolle bei der Entstehung von HNO-Tumoren spielen könnte.

### Korrelation von Kopienzahlveränderungen mit dem Überleben

In einer Überlebenszeitanalyse wurden die ermittelten chromosomalen Kopienzahlveränderungen mit dem krankheitsfreien Überleben der Patienten in Beziehung gesetzt. Es stellte sich heraus, dass sowohl DNA-Zugewinne auf den Chromosomen 1q43 ( $p=0,048$ ; FDR korrigiert) und 16q23-24 ( $p=0,0004$ ; FDR korrigiert), als auch DNA-Verluste auf Chromosom 18q22 ( $p=0,048$ ; FDR korrigiert) einen signifikanten Einfluss auf das rezidivfreie Überleben der Patienten haben (Abb. 32). DNA-Zugewinne auf Chromosom 1q konnten bereits in diversen Studien mit verschiedenen Tumoren, wie z.B. Ösophaguskarzinomen, Hirntumoren und Lungenkarzinomen, mit einer schlechteren Prognose der Patienten in Verbindung gebracht werden (van Decken et al., 2006; Lo et al., 2007; Mendrzyk et al., 2006; Tai et al., 2004). Die Konsensusregionen für DNA-Zugewinne auf Chromosom 1q wurden in den meisten Fällen bei 1q21-32 angegeben (Stange et al., 2006; van Decken et al., 2006). Dies deutet darauf hin, dass sich in dieser chromosomalen Region Proto-Oncogene oder andere potenzielle Kandidatengene wie z.B. *KIF14* befinden (Corson et al., 2005). Überraschenderweise wurde

der in dieser Arbeit ermittelte chromosomale Marker auf Chromosom 1 in der Bande 1q43 lokalisiert. Lediglich Bièche et al. (1995) beobachteten in diesem Bereich (1q41-44) häufige DNA-Zugewinne bei Brustkrebs. Allerdings sind auch auf 1q43 einige interessante Kandidatengene lokalisiert, deren veränderte Expression durch einen DNA-Zugewinn einen negativen Einfluß auf das rezidivfreie Überleben der Patienten haben könnte. *Gal-8* ist in zelluläre Prozesse wie Zelladhäsion und Wachstum eingebunden. Eine erhöhte Expression dieses Gens konnte in Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen werden (Henno et al., 2002). Das Gen *EXO1* zeigt ebenfalls eine erhöhte Expression in verschiedenen Tumorarten im Vergleich zu Normalgewebe (Rasmussen et al., 2000). Ein weiteres Gen, *MTR-5*, wurde bereits mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich in Verbindung gebracht (Zhang et al., 2005).

Bereits im Jahr 2000 konnten Bockmühl et al. einen Zusammenhang zwischen DNA-Zugewinnen auf Chromosom 16q und einer schlechteren Prognose von HNO-Patienten beobachten. Im Gegensatz dazu berichtet eine Vielzahl von Studien von DNA-Verlusten auf Chromosom 16q, die besonders häufig bei Brustkrebs vorkommen. Diese chromosomalen Verluste werden mit dem Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen wie z.B. Gene der *CDH*-Familie, *WWOX* oder *GAS11* in Verbindung gebracht (Übersicht in Rakha et al., 2006; siehe auch Teilüberschrift „Korrelation der chromosomalen Aberrationen mit klinischen Parametern“). Die Ermittlung eines prognostischen Markers auf 16q aufgrund eines DNA-Zugewinns bei Kopf-Hals-Tumoren erscheint daher zunächst widersprüchlich. Andererseits wurden DNA-Zugewinne auf Chromosom 16q auch in einigen anderen Tumorgruppen wie beispielsweise Nierenkarzinomen (Kuroda et al., 2003) oder Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus (Yen et al., 2003) beobachtet. Schlade-Bartsiak et al. (2005) konnten durch CGH-Analysen ebenfalls diese Veränderung bei HNO-Tumoren nachweisen. Auch über veränderte Kandidatengene und Proto-Oncogene in dieser chromosomalen Region wird berichtet. In Colonkarzinomen wird beispielsweise *DPEP1* überexprimiert (McIver et al., 2004), ebenso wie *RPL13* in Magen-Darm-Karzinomen (Kobayashi et al., 2006). Eine veränderte Expression des Proto-Oncogens *MAF* wurde bei multiplen Myelomen beobachtet (Largo et al., 2006) und eine Überexpression des CDT1-Proteins durch Gen-Amplifikation wurde bei Lungenkarzinomen nachgewiesen (Liontos et al., 2007). Mit einer erhöhten Resistenz gegen Chemotherapeutika wird die Überexpression des Gens *TUBB3* assoziiert, die z.B. in Pankreas-Karzinomen beobachtet wurde (Lee et al., 2007; Wilson et al., 2005). Interessanterweise konnte in einer kürzlich veröffentlichten Studie gezeigt werden, dass eine Tumor-Hypoxie die Expression von *TUBB3* über den Faktor HIF-1 induziert (Raspaglio et al., 2008). So könnte eine durch die Anämie der Patienten ausgelöste Tumor-Hypoxie neben dem Epo-Signalweg (siehe

Teilüberschrift „Korrelation genetischer Veränderungen mit Anämie und Strahlenempfindlichkeit“) noch weitere zelluläre Prozesse beeinflussen, die einen negativen Effekt auf das Überleben der Patienten haben. Ein weiteres interessantes Kandidatengen, *FANCA*, ist auf Chromosom 16q lokalisiert. *FANCA* spielt eine Rolle in einem Signalweg der homologen Rekombinationsreparatur (Fanconi Anämie (FA)/BRCA-Signalweg), der bei Patienten der autosomal rezessiven Erbkrankheit „Fanconi Anämie“ durch Genmutationen gestört ist (D’Andrea und Gompe, 2003; Patel et al., 2007). Bemerkenswerterweise haben Fanconi-Anämie-Patienten ein erhöhtes Risiko Tumoren, insbesondere Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches, zu entwickeln (D’Andrea et al., 2003). Diese Tatsache deutet auf eine mögliche Rolle veränderter FA-Gene in einigen HNO-Tumoren hin. Tatsächlich konnte eine verminderte Expression einiger FA-Gene bei HNO-Tumorzelllinien nachgewiesen werden (Wreesmann et al., 2006). Van Wetzel et al. (2005) berichten hingegen von einer erhöhten *FANCA*-Expression in Brust-Tumoren im Vergleich zu Normalgewebe, was im Einklang zu dem in dieser Arbeit ermittelten DNA-Zugewinn auf 16q23-24 steht. Auffällig war, dass ein DNA-Zugewinn auf Chromosom 16q23-24 in der vorliegenden Arbeit ausschließlich bei anämischen Patienten beobachtet werden konnte, was auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der chromosomalen Veränderung und der besonders schlechten Prognose einiger anämischer Patienten hindeutet. Zusätzlich konnten auch Co-Alterationen dieses hochsignifikanten Markers auf 16q23-24 mit dem DNA-Zugewinn auf Chromosom 1q43 ( $p=0,0002$ ) und einer Deletion auf 3p14 ( $p=0,0039$ ) nachgewiesen werden. Interessanterweise sind Deletionen des kurzen Arms von Chromosom 3 eine der am häufigsten beobachteten Kopienzahlveränderungen bei verschiedenen Tumoren (Patmore et al., 2005). Auch bei Kopf-Hals-Tumoren wird mehrfach über häufige DNA-Verluste auf Chromosom 3p berichtet (Bockmühl et al., 1997; Ashman et al., 2003; Wreesmann et al., 2004; Wreesmann et al., 2005) und mit einer Häufigkeit von 40% war diese Veränderung die zweit-häufigste chromosomale Aberration in dem hier untersuchten Tumorkollektiv. Dieser Befund passt gut in das von Califano et al. (1996) entwickelte Modell der Kanzerogenese von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich, nach welchem Deletionen auf Chromosom 3p ein frühes Ereignis beim Übergang einer präkanzerösen Läsion zur Dysplasie darstellen. Einen weiteren interessanten Aspekt liefert die Tatsache, dass in der chromosomalen Bande 3p14.2 einer der am häufigsten beobachteten Bruchpunkte des menschlichen Genoms lokalisiert ist (*FRA3B*; Smith et al., 2007). Das Gen *FHIT*, ein Mitglied der „histidin triad“ Genfamilie, liegt in dieser chromosomalen Region. Die Expression dieses Gens fehlt in einer Vielzahl von Tumoren, was auf eine mögliche Funktion als Tumorsuppressor hindeutet (Huebner et al., 2001). Auch bei Tumoren der Kopf-Hals-Region konnten Deletionen



des *FHIT*-Genlocus und aberrante Transkripte des Gens beobachtet werden (Virgilio et al., 1996), Tai et al. (2004) konnten den Verlust der Genexpression in HNO-Tumoren mit einer geringeren Überlebensrate der Patienten in Zusammenhang bringen. Die Korrelation des chromosomalen Markers auf 16q23-24 mit einem weiteren signifikanten Faktor (1q43) und einer der häufigsten Genveränderungen (Deletion von 3p14) deutet auf einen starken Einfluss der drei Aberrationen bei der Tumorentwicklung hin. Chromosomale Verluste auf 18q wurden bereits in der Vergangenheit häufig bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches beobachtet (Ashman et al., 2003; Wreesmann et al., 2004; Takebayashi et al., 2000; Blons et al., 2002). Takebayashi et al. (2004) assoziierten diese DNA-Verluste mit der Tumorentwicklung bei HNO-Tumoren. Sowohl Bockmühl et al. (2000) als auch Pearlstein et al. (1998) konnten Deletionen auf 18q ebenfalls mit einem verminderten Überleben von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren korrelieren. In der Literatur variiert allerdings die Angabe der genauen Lokalisation des DNA-Verlustes, was zum Teil durch unterschiedliche experimentelle Ansätze mit verschiedenem molekularem Auflösungsvermögen erklärt werden kann. Der in dieser Arbeit identifizierte Konsensusbereich 18q22 wurde bereits in vorangegangenen Studien sowohl bei HNO-Tumoren (Blons et al., 2002), als auch bei Plattenepithelkarzinomen der Vulva (Worsham et al. 1991), bei Magenkarzinomen (Inou et al., 1998), bei Darmkarzinomen (Kytölä et al., 2001) und bei Eierstock-Karzinomen (Lassus et al., 2001) als deletiert nachgewiesen. Der Verlust von Tumorsuppressorgen auf Chromosom 18q22 könnte zu einem aggressiveren Krankheitsverlauf bei HNO-Tumoren beitragen. In dieser chromosomalen Region sind einige interessante Kandidatengene lokalisiert. *CDH-7*, *CDH-19* und *DNAM-1* sind in die Zell-Zell-Adhäsion involviert und könnten somit die Invasivität und das Metastasierungspotential eines Tumors beeinflussen (Blons et al., 2002; Hajra et al., 2002). Der Verlust des Cytokin-Suppressors *SOCS6* beeinflusst unter anderem die JAK-STAT-Kaskade und damit regulatorische Prozesse der Signaltransduktion und des Zellwachstums (Storojeva et al., 2004).

Die Weiterentwicklung der chromosomalen CGH zur Array-CGH erlaubt durch die erhöhte molekulare Auflösung eine detailliertere Analyse von genomweiten chromosomalen Kopienzahlveränderungen, was in zahlreichen Studien mit verschiedenen Tumorerkrankungen einer näheren Charakterisierung von potenziellen Kandidatengenen geführt hat (Bejjani und Schaffer, 2006). Die durch die CGH-Analyse identifizierten chromosomalen Marker (DNA-Zugewinne auf 1q43 und 16q23-24 und Deletionen auf 18q22) wurden durch Array-CGH-Experimente mit einem 1 MB BAC-Array in höherer Auflösung untersucht. DNA-Zugewinne auf Chromosom 16q23-24 wurden in allen untersuchten Fällen auch in der Array-CGH-Analyse bestätigt, und der veränderte Be-

reich konnte auf die subchromosomale Bande 16q24.3 näher eingegrenzt werden (Abb. 36). Der DNA-Zugewinn auf 1q43 wurde in sechs von sieben untersuchten Fällen in der Array-CGH nachgewiesen (Abb. 35). Die Deletion auf 18q hingegen konnte in der Array-CGH nur in 50% der untersuchten Fälle beobachtet werden (Abb. 37). Die Diskrepanz der Ergebnisse aus chromosomaler CGH und Array-CGH für die Chromosomen 1q43 und 18q22 verdeutlichen die Notwendigkeit, die Befunde aus solchen „Screening-Ansätzen“ an Tumorgeweben oder Tumorzellen durch andere Methoden, beispielsweise FISH- oder PCR-basierten-Analysen, zu verifizieren. Mögliche Gründe für diese inter-experimentellen Unstimmigkeiten zwischen CGH und Array-CGH sind zum einen die Verwendung unterschiedlicher Referenz-DNAs, zum anderen das Vorliegen einer Tumorerheterogenität. Letztere hat in sensibleren Verfahren wie der Array-CGH einen größeren Einfluss auf das Ergebnis, als in der chromosomalen CGH mit geringerer Auflösung.

Neben den ermittelten Kopienzahlveränderungen wurden auch die bekannten klinischen Parameter der Patienten mit dem rezidivfreien Überleben korreliert. Daraus ergab sich eine signifikante Korrelation der Tumorgröße (pT;  $p=0,016$ ), des Resektionsstatus (R;  $p<0,0001$ ) und, wie bereits diskutiert, mit dem Anämiestatus der Patienten ( $p=0,0026$ ). Dies deckt sich mit der Tatsache, dass die Tumorgröße und die Residualtumorklassifikation als Stagingparameter der UICC (siehe Anhang 1) zu den klinisch-pathologischen Variablen gehören, deren prognostische Bedeutung bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches als gesichert gilt (Wittekind et al., 2001).

Nach einer multivariaten Überlebenszeitanalyse, in welcher der unabhängige Beitrag eines Parameters auf die Überlebenszeit der Patienten geprüft wird, blieben der Resektions- ( $p<0,0001$ ) und der Anämiestatus ( $p<0,001$ ), sowie DNA-Zugewinne auf den Chromosomen 1q43 ( $p=0,0076$ ) und 16q23-24 ( $p=0,0017$ ) hochsignifikant. Dies verdeutlicht das Potential der in dieser Arbeit identifizierten genetischen Marker als prognostische Faktoren für das rezidivfreie Überleben von Kopf-Hals-Tumorpatienten.

### **D.3 Validierung von Kandidatengen**

Durch die CGH-Analyse konnten in dieser Arbeit drei chromosomale Marker identifiziert werden, die einen negativen Effekt auf das rezidivfreie Überleben von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches haben. Dabei zeigten DNA-Zugewinne auf Chromosom 16q23-24 die stärksten Auswirkungen auf das rezidivfreie Überleben der Patienten, was in einer multivariaten statistischen Analyse bestätigt wurde. Der ermittelte prognostische Marker auf 16q wurde bei allen untersuchten Fäl-

len in Array-CGH-Experimenten bestätigt. Die Konsensusbande konnte hierbei auf Grund der höheren molekularen Auflösung auf die chromosomale Region 16q24.3 eingegrenzt werden. Auf Grund dieser Befunde konzentrierte sich in dieser Arbeit die weiterführende Untersuchung von Kandidatengenen auf diesen chromosomalen Bereich. Dazu wurden FISH-, QRT-PCR und IHC-Analysen durchgeführt.

Durch FISH-Analysen mit fluoreszenzmarkierten Sonden ist es möglich, sowohl strukturelle als auch numerische chromosomale Aberrationen direkt an formalinfixierten Gewebepräparaten von Tumoren zu untersuchen (Tibiletti, 2007). Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die untersuchte Tumor-DNA keiner molekularen Manipulation, wie z.B. Extraktion oder PCR-Amplifikation, unterzogen werden muss, so dass das Ergebnis den tatsächlichen genetischen Zustand in den Tumorzellen wiedergibt. Handelt es sich bei den zu untersuchenden genetischen Veränderungen um DNA-Zugewinne liegt die Vermutung nahe, dass in der aberranten chromosomalen Region potenzielle Proto-Onkogene lokalisiert sind, welche durch eine erhöhte Expression das Tumorwachstum fördern (Albertson, 2006). Die chromosomale Bande 16q24.3 wurde mit Hilfe einer öffentlich zugänglichen Datenbank ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) auf potenzielle Kandidatengene hin untersucht. Für die FISH-Analyse wurden fluoreszenzmarkierte BAC-Sonden hergestellt, welche dann auf die FFPE-Gewebeschnitte der Tumoren mit DNA-Zugewinn auf 16q24.3 hybridisiert wurden. Die ausgewählten Kandidatengene (*DPEP1*, *RPL13*, *CDT1* und *FANCA*), welche auf den verwendeten BAC-Sonden lokalisiert sind, wurden bereits unter D.2 beschrieben. Amplifizierte FISH-Signale dieser Gene konnten in allen untersuchten Tumorfällen mit unterschiedlichen Häufigkeiten nachgewiesen werden, wodurch der DNA-Zugewinn auf Chromosom 16q24.3 erneut in allen untersuchten Fällen bestätigt wurde (Abb. 38-41, Tab. 13). Bemerkenswerterweise war der *FANCA*-Genlocus in vier von sechs untersuchten Tumoren im Vergleich zu den anderen untersuchten Genloci auf 16q in einer höheren Kopienzahl vorhanden, so dass auf eine herausragende Rolle von *FANCA* in Tumorpatienten mit verringertem rezidivfreiem Überleben geschlossen werden kann.

Um festzustellen, ob die chromosomale Kopienzahlveränderung des *FANCA*-Genlocus mit einer erhöhten Expression des Gens auf m-RNA-Ebene korreliert, wurde eine QRT-PCR-Analyse durchgeführt. Dabei wurde die Expression des *FANCA*-mRNA-Transkriptes in HNO-Tumorgeweben mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 16q24.3 relativ zur Expression in einer Referenz-Zelllinie ohne chromosomale Veränderung auf Chromosom 16q untersucht. Im Vergleich zu HNO-Tumoren ohne Kopienzahlveränderungen auf Chromosom 16q wiesen die Tumoren mit DNA-Zugewinn in der chromosomalen Region 16q24.3 eine signifikant ( $p=0,029$ ) erhöhte (drei- bis neun-fach) Expression von *FANCA* auf (Abb. 42). Dieses Ergebnis bestätigte, dass sich die erhöhte

Kopienzahl auf DNA-Ebene des *FANCA*-Genlocus bei den untersuchten HNO-Tumoren auch auf Transkriptionsebene manifestiert. Bereits bei Brustkrebs konnte eine erhöhte Expression von *FANCA* beobachtet werden, bei der das Ausmaß der Überexpression mit dem Tumor-Differenzierungsgrad korrelierte (van Wezel et al., 2005). Da weniger stark differenzierte Tumore eine schlechtere Prognose als gut differenzierte haben (Wittekind et al., 2001), deutete dieser Befund ebenfalls auf eine Beteiligung von *FANCA* in der Entwicklung eines aggressiveren Tumorphänotyps hin. Tremblay et al. wiesen 2006 erstmals eine signifikant erhöhte Expression von *FANCA* und einigen assoziierten Genen (*FANCC*, *FANCD2* und *FANCG*) in Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle im Vergleich zu Normalgewebe nach.

Darüber hinaus wurde mit Hilfe von IHC-Experimenten die Überexpression von *FANCA* auf Proteinebene in HNO-Tumoren mit Zugewinn auf 16q24.3 immunhistochemisch untersucht. Bei der methodischen Etablierung des experimentellen Ansatzes mit Hilfe eines Gewebe-Arrays mit 28 verschiedenen Kopf-Hals-Tumorproben konnte die Proteinexpression mit der Kopienzahl von *FANCA* in FISH-Experimenten korreliert werden (Abb. 45). Dies war bei den HNO-Tumoren mit Zugewinn auf 16q24.3 des in dieser Arbeit untersuchten Kollektivs in nur zwei von zehn analysierten Fällen möglich (Abb. 46-48). Die auf DNA- und mRNA-Ebene nachgewiesene Überexpression des Kandidatengens *FANCA* war auf Proteinebene nicht zweifelsfrei quantifizierbar. Ein möglicher Grund für die mangelnde Korrelation der Ergebnisse aus QRT-PCR- und IHC-Analyse könnte das Vorliegen einer Tumorerogenität sein, welche in einigen Fällen auf Grund verschiedener Färbemuster innerhalb eines Präparates beobachtet werden konnte (Abb. 49). Auch aus den Ergebnissen der FISH-Analysen war diese intratumorale Heterogenität durch auffallend unterschiedliche Signalzahlen pro Zelle innerhalb eines Gewebeschnittes erkennbar (Abb. 38-41, Tab.13). Dieses Phänomen, bei dem sich die Zellen eines Tumors auf molekularer Ebene unterscheiden, wurde in der Vergangenheit bereits bei Brustkrebs und papillären Schilddrüsenkarzinomen beobachtet (Aubele et al., 1999; Unger et al., 2004 und 2008). Die Tumorerogenität gibt die genomische Instabilität in den Tumorzellen wieder, die aufgrund von genetischen Veränderungen während der Tumorentwicklung aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle entsteht (Bayani et al., 2007). Da für die verschiedenen experimentellen Ansätze nicht dieselben Gewebeschnitte verwendet wurden, kann eine Tumorerogenität zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Aufgrund der sehr geringen Fallzahl muss zunächst offen bleiben, in wie weit Kopienzahlveränderungen, mRNA-Expression und Proteinexpression des Gens *FANCA* korrelieren.

Zwei Tumorfälle mit Deletion auf Chromosom 16q wiesen eine fehlende *FANCA*-Expression in der IHC auf, während ein Tumor aus dem anämischen Kollektiv mit Dele-

tion auf Chromosom 16q eine FANCA-Expression zeigte. Interessanterweise waren die beiden Tumorgewebe ohne Proteinexpression aus nicht-anämischen Patienten, während alle anderen immunhistochemisch untersuchten Gewebe von anämischen Patienten stammten und eine Antikörperfärbung aufwiesen. Dies könnte darauf hindeuten, dass Tumorgewebe aus nicht-anämischen Patienten generell eine geringere Expression von FANCA aufweisen, was wiederum auf einen genetischen Hintergrund einer tumorbegleitenden Anämie hinweisen würde. Auch histologisch ließen sich die nicht-anämischen von den anämischen Geweben abgrenzen. So zeigten Erstere einen geringeren Differenzierungsgrad mit einhergehendem Verlust vieler Eigenschaften eines Plattenepithels wie z.B. Verhornung. Um diese beobachteten immunhistochemischen Unterschiede zwischen anämischen und nicht-anämischen Tumorgeweben näher zu untersuchen, hätte es weiterer Experimente, welche den Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätten, bedurft.

FISH-Experimente und QRT-PCR-Analysen verifizierten die Amplifikation und Überexpression des Gens *FANCA* in den in dieser Arbeit untersuchten Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 16q24.3. Wie bereits unter D.2 beschrieben, ist FANCA Teil eines Enzymkomplexes aus mindestens 12 FA-Proteinen, welcher eine wichtige Rolle im „FA/BRCA-DNA-Reparatur-Signalweg“ spielt und bei dessen Unterbrechung es zur klinischen Manifestation der Erkrankung „Fanconi Anämie“ (FA) kommt (Übersicht in Kennedy und D’Andrea, 2005). FA ist eine autosomal rezessive Erkrankung, welche durch eine hohe chromosomale Instabilität und eine starke Überempfindlichkeit gegenüber DNA-Strang-vernetzenden Agenzien wie Mitomycin C charakterisiert ist. Zusätzlich weisen FA-Patienten eine hohe Prädisposition für die Entwicklung von Tumorerkrankungen, besonders für Leukämien und Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich, auf (Alter et al., 2003). Letzterer Aspekt lässt die Befunde dieser Arbeit besonders interessant erscheinen, da Aberrationen der FA-Gene in sporadisch auftretenden Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches durch eine Veränderung der Empfindlichkeit der Zellen, beispielsweise gegenüber DNA-Strang-vernetzenden Agenzien, von therapeutischer Bedeutung sein können. Auch können veränderte FA-Genprodukte die genomische Instabilität fördern, was eine maligne Transformation der betroffenen Zellen begünstigt (Jacquemont und Taniguchi, 2006). Tatsächlich wird eine Störung des FA/BRCA-DNA-Reparatur-Signalweges in einer ganzen Reihe von Tumoren beobachtet (Lyakhovich und Surrealles, 2006), darunter Blasen- und Pankreaskarzinome (Van der Heijden et al., 2004 und Neveling et al., 2007). Wreesman et al. (2007) berichteten über eine reduzierte Expression von *FANCA* und einigen anderen FA-Genen bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. Im Gegensatz dazu, allerdings im Einklang mit den Befunden

aus der vorliegenden Arbeit, stehen die bereits erwähnten Studien von van Wezel et al. (2005) und Tremblay et al. (2006), in welchen eine erhöhte FANCA-Expression in Brust- und HNO-Tumoren nachgewiesen werden konnte. Zusammengefasst führen diese Erkenntnisse zu der Annahme, dass eine Deregulation der im FA/BRCA-DNA-Reparatur-Signalweg involvierten Gene auch in Zellen von nicht-FA-Patienten zu einer erhöhten chromosomalen Instabilität und somit zur malignen Transformation führen kann.

#### **D.4 Untersuchung des Kandidatengens *FANCA* in funktionellen Studien mit Zelllinien**

Die Überexpression des Kandidatengens *FANCA* wurde in HNO-Tumoren von Patienten mit verringertem rezidivfreiem Überleben auf DNA- und mRNA-Ebene nachgewiesen. Um die Strahlenempfindlichkeit von *FANCA*-überexprimierenden Zellen zu untersuchen, wurden funktionelle Studien mit zwei transfizierten HNO-Tumorzelllinien vorgenommen.

*FANCA* bildet mit weiteren FA-Proteinen (*FANCB*, *FANCC*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCI*, *FANCL* und *FANCM*) einen Enzymkomplex („FA-Core-Komplex“ oder „Monoubiquitin-E3-Ligasekomplex“), welcher für die Monoubiquitinierung des Proteins *FANCD2* benötigt wird (Patel und Joenje, 2007). Das durch die Monoubiquitinierung aktivierte *FANCD2* interagiert mit *FANCD1/BRCA2* und bildet den chromatin-assoziierten *FANCD2/BRCA2*-DNA-Reparaturkomplex, welcher wiederum mit weiteren DNA-Reparaturproteinen (*RAD51*, *MRE11*, *RAD50*, *PCNA*, *NBS1* und *BRCA1*) interagiert und eine wichtige Rolle bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen spielt. Durch die Assoziation von *FANCD2* mit einer Vielzahl von Reparaturenzymen wird eine intensive Interaktion des FA-DNA-Reparatur-Signalweges mit anderen Reparaturmechanismen vermutet. Zellen von FA-Patienten, welche auf Grund von Genveränderungen keinen funktionsfähigen FA-Core-Komplex oder *FANCD2/BRCA2*-DNA-Reparaturkomplex bilden können, zeigen die charakteristische Überempfindlichkeit gegenüber DNA-Strang-vernetzenden Agenzien und ein erhöhtes Maß an genomischer Instabilität (zusammengefasst von Kennedy und D'Andrea, 2005). Der FA-Core-Komplex scheint konstitutiv im Nucleus zusammengesetzt zu sein, wobei es nur nach einem Auftreten von DNA-Schäden zu einer Monoubiquitinierung von *FANCD2* kommt. Das aktive *FANCD2*-Protein wandert infolgedessen zu den Reparaturfoci des schadhafte Chromatins, wo es mit weiteren nucleären Reparaturenzymen interagiert. Nach

erfolgter DNA-Reparatur wird FANCD2 de-ubiquitiniert und dissoziiert vom Reparaturkomplex (Gregory et al., 2003). Die Aktivität des FA/BRCA-DNA-Reparatur-Signalweges ist ausschließlich auf die S-Phase des Zellzykluses begrenzt, wobei die Regulation durch das Protein USP1 vermutlich eine wichtige Rolle spielt. USP1 scheint dabei das monoubiquitinierte FANCD2 in der G2-Phase des Zellzykluses zu de-ubiquitininieren, wodurch die weitere Aktivierung der Reparaturmechanismen inhibiert wird. Bestätigt wird dieses Modell durch die Tatsache, dass durch DNA-Schäden eine autogene Spaltung von USP1 induziert wird (Patel und Joene, 2007).

Wie bereits unter D.3 erwähnt, untersuchten bereits verschiedene Studien mögliche Veränderungen des FA-DNA-Reparatur-Signalweges in sporadisch auftretenden Tumoren (Lyakhovich und Surralles, 2006). Eine verringerte Expression von FA-Proteinen wurden unter anderem bei akuten myeloischen Leukämien (AML), bei Zelllinien aus Eierstock-, Zervix- und Pankreastumoren beobachtet (zusammengefasst vom Mathew, 2006). Die Mutationen der Gene BRCA1 und BRCA2, welche auch im FA/BRCA-DNA-Reparatur-Signalweg involviert sind, spielen eine bedeutende Rolle bei erblich bedingtem Mammakarzinom (Teng et al., 2008). Ein besonders interessanter Aspekt bei Tumoren mit aberrantem FA/BRCA-DNA-Reparatur-Signalweg ist die Assoziation der Inaktivierung dieses Signalweges mit der Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber DNA-Strang-vernetzenden Agenzien. Eine wichtige Gruppe der in der Tumorthherapie eingesetzten Chemotherapeutika besteht aus solchen DNA-Strang-vernetzenden Agenzien wie Mitomycin C oder Cisplatin. Durch die selektive Inhibierung des FA/BRCA-DNA-Reparatur-Signalweges in Tumorzellen könnte ein besseres Ansprechen der Patienten auf die Chemotherapie erreicht werden (Chirnomas et al., 2006). Bestätigend dazu ist der FA/BRCA-DNA-Reparatur-Signalweg in Cisplatin-empfindlichen Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches und Eierstocktumoren gestört (Burkitt und Ljungman, 2007; Taniguchi et al., 2003). Auch könnte durch ein Screening von Tumoren bezüglich der am FA/BRCA-DNA-Reparatur-Signalweg beteiligten Gene vor der Therapie Aufschluß über die bestmögliche medizinische Behandlung geben. Von besonderem Interesse ist auf Grund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass nicht nur eine Überempfindlichkeit von Tumorzellen, sondern möglicherweise auch eine Resistenz gegen DNA-schädigende Reagenzien durch den FA/BRCA-DNA-Reparatur-Signalweg erklärt werden kann. Taniguchi et al. (2003) entwickelten ein mögliches Modell der Tumorprogression bei Eierstocktumoren, bei dem in frühen Entwicklungsstadien eine epigenetische Inaktivierung eines FA-Gens (FANCF) zu vermehrter genetischer Instabilität und damit zur malignen Transformation führt. In einigen Tumorzellen erfolgt dann im Laufe der Tumorevolution eine zufällige Demethylierung, was zu einer Reaktivierung des FA/BRCA-DNA-Reparatur-Signalweges führt. Durch den aktiven

FA/BRCA-DNA-Reparatur-Signalweg weisen die Zellen dann eine erhöhte Resistenz gegen DNA-Strang-vernetzende Agenzien wie Cisplatin auf. Marsit et al. (2004) berichteten bei HNO-Tumoren ebenfalls von einer Inaktivierung des FA/BRCA-DNA-Reparatur-Signalweges durch Methylierung des Proteins FANCF. Eine Resistenz der FA-Zellen kann nicht nur gegen DNA-Strang-vernetzende, sondern auch andere DNA-schädigende Agenzien wie z.B. ionisierende Strahlung wirken, was wiederum einen starken Einfluß auf die Strahlentherapierbarkeit der betroffenen Tumore hätte. Tatsächlich scheinen FA-Zellen mit gestörtem FA-DNA-Reparatur-Signalweg eine Strahlensensitivität mit unterschiedlicher Ausprägung aufzuweisen (Bremer et al., 2003; Alter, 2002). Das in dieser Arbeit untersuchte Tumorkollektiv wurde ausschließlich strahlentherapeutisch behandelt. Eine Strahlenresistenz von Tumoren mit besonders aggressivem Verlauf, die zu einem verringertem rezidivfreien Überleben der betroffenen Patienten führt, muss daher in Betracht gezogen werden. DNA-Zugewinne auf Chromosom 16q24.3 wurden als genetischer Marker für eine schlechte Prognose der Patienten identifiziert und eine Überexpression von *FANCA* konnte nachgewiesen werden. Um die funktionellen Auswirkungen einer *FANCA*-Überexpression in Hinblick auf die Strahlensensitivität der Zellen zu untersuchen, wurden zwei HNO-Tumorzelllinien, Cal-33 und BHY, stabil mit dem Gen transfiziert. Vor der Transfektion wurden die zwei Zelllinien zytogenetisch charakterisiert. Sie zeigten in der Array-CGH die für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches typischen Veränderungen auf den Chromosomen 3q, 8q, 11q, 12, 13q und 14q (DNA-Zugewinne) und 3p, 8p, 12q, 16q und 18q (Deletionen; Abb. 52 und 53). Die Resultate einer SKY-Analyse der Zelllinie Cal-33 (Abb. 55), welche sehr gut mit den Array-Profilen zusammenpassten, ergaben diverse intrachromosomale Umbauten, welche teilweise durch FISH mit BAC-Sonden bestätigt werden konnten (Abb. 56). Die Ergebnisse der Array-CGH-, SKY- und FISH-Analysen der Cal-33-Zellen verdeutlichen das Potential einer kombinierten Anwendung der Methoden in der zytogenetischen Charakterisierung eines Genoms, bei welcher strukturelle sowie numerische Aberrationen erfasst werden können. Ein DNA-Zugewinn auf Chromosom 16q24.3 konnte in keiner der beiden HNO-Tumorzelllinien nachgewiesen werden und die mRNA-Expression von *FANCA* war in den Zelllinien Cal-33 und BHY deutlich geringer als in den HNO-Tumoren mit DNA-Zugewinn auf 16q. Für die Transfektion der Zellen mit *FANCA* wurde das Gen zunächst aus einer *FANCA*-exprimierenden retinalen Zelllinie (RPEX1.5) durch selektive Amplifikation isoliert (Abb. 57). Dazu wurde das *Pfu*-basierte Enzym Herculase® II Fusion-Polymerase verwendet. Die *Pfu*-Polymerase weist durch ihre 3'-5'-Exonuclease-Proofreading-Aktivität einer sehr geringe Fehlerrate auf (Lundberg et al., 1991), was die Wahrscheinlichkeit auf ein fehlerfreies PCR-Produkt erhöht. Wie auch von Zhang et al. (2006) beschrieben wurde die Sequenz des



Kandidatengens überprüft und die korrekte Orientierung des *FANCA*-Inserts im Expressionsvektor pcDNA3.1(+) durch einen Restriktionsverdau mit einer geeigneten Endonuklease bestätigt (Abb. 60). Für die Transfektion eukaryotischer Zellen stehen mehrere Verfahren, wie beispielsweise die Calciumphosphat-Methode, die DEAE-Dextran-Methode, die Liposomentechnik oder die Elektroporation der Zellen, zur Verfügung (Lottspeich und Zorbas, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde die Transfektion der Zelllinien Cal-33 und BHY mit Hilfe des Transfektions-Reagenzes Polyfect<sup>®</sup> durchgeführt, da sich in vorangegangenen Experimenten eine höhere Überlebensrate von mit Polyfect<sup>®</sup> transfizierten Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit anderen Methoden wie der Calciumchlorid-Methode oder Elektroporation transfiziert wurden, ergab. Mit dem biologischen Polyfect<sup>®</sup>-Transfektionsverfahren werden die zelleigenen Transportmechanismen ausgenutzt, um die Fremd-DNA in die Zellen einzuschleusen. Polyfect<sup>®</sup> ist ein Polymer, welches aus verästelten Monomeren, die radial aus einem zentralen Kern ausstrahlen, besteht (Dendrimer; Lee et al., 2005). Dieses Dendrimer verpackt die Fremd-DNA (pcDNA3.1+)/*FANCA* in kompakte Strukturen und bindet auf Grund der positiven Gesamtladung an negativ geladene Rezeptoren der Zelloberfläche und wird durch diese in die Zellen aufgenommen. Die Vorteile der Polyfect<sup>®</sup>-Transfektion wie geringe Zytotoxizität und hohe Stabilität des Polyfect<sup>®</sup>-DNA-Komplexes nach der Aufnahme in die Zellen haben bereits in verschiedenen Studien zu einer erfolgreichen Transfektion geführt (Zhang et al., 2006; Chiba et al., 2004; Devitt et al., 2007). Die Transfektionseffizienz jeder Zelllinie wurde mit Hilfe des Vektors pFred, welcher Fluoreszenz über eine eGFP-Expression emittiert, im FACs gemessen. Die Transfektion war bei 6,5% der Cal-33- und bei 13% der BHY-Zellen erfolgreich (siehe Abb. 61 und 62). Stabil transfizierte Zellen konnten durch die durch den Expressionsvektor erzeugte Resistenz gegen Neomycin (G418) selektiert werden. Um eine Veränderung der Strahlensensitivität aufgrund einer *FANCA*-Überexpression zu analysieren, wurden mit den beiden transfizierten Zellen Bestrahlungsexperimente mit einer <sup>137</sup>Cs- $\gamma$ -Quelle durchgeführt. Die Ergebnisse deuten auf eine signifikant verringerte Strahlensensitivität der *FANCA*-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den nicht-transfizierten Ausgangszelllinien hin ( $p=0,0006$ ; Abb. 66). Dieser Befund passt zu der Tatsache, dass *FANCA* eine wesentliche Rolle bei der homologen Reparatur von Doppelstrangbrüchen in Säugerzellen spielt (Yang et al., 2005). Das *FANCA*-Protein stabilisiert dabei den FA-Core-Komplex und damit das Protein *FANCL*, welches für die Monoubiquitinierung von *FANCD2* benötigt wird. Das monoubiquitinierte *FANCD2* wiederum ist für die Interaktion mit den DNA-Reparaturkomplexen essentiell (Garcia-Higuera et al., 2001; Taniguchi et al., 2002). In *FANCA*-Null-Mutanten kann eine abgeschwächte Focus-Bildung der Reparaturenzyme *RAD51* und *BRCA1*, sowie von  $\gamma$ -

H2AX an DNA-Bruchstellen beobachtet werden (Yang et al., 2005). Die Bildung von  $\gamma$ -H2AX durch Phosphorylierung des Histone H2AX ist eine der ersten messbaren Reaktionen einer Säugerzelle auf eine DNA-Schädigung in Form eines Doppelstrangbruchs (Rogakou et al., 1999). Die Erfassung der  $\gamma$ -H2Ax-Foci nach Bestrahlung ist eine etablierte radiobiologische Methode, um die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen kurz nach Exposition mit ionisierender Strahlung in Zellen nachzuweisen (Rothkamm und Löbrich, 2003). Der Umkehrschluß der von Yang et al. (2005) beobachteten Befunde könnte bedeuten, dass in FANCA-überexprimierenden Zellen durch eine erhöhte Stabilität des FA-Core-Komplexes eine vermehrte FANCD2-Aktivierung und Reparaturaktivität erfolgt. Dies wiederum könnte in einer verringerten Strahlensensitivität von Tumoren mit DNA-Zugewinnen und erhöhter FANCA-Expression resultieren, was das Rezidivrisiko der betroffenen Patienten steigern würde.

Obwohl der FA-DNA-Reparatur-Signalweg in den letzten Jahren immer mehr in den Mittelpunkt der Erforschung von Reparaturmechanismen in Tumorzellen gerückt ist, bleiben die direkten Zusammenhänge vieler beteiligten Gene weitgehend ungeklärt. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Funktion der FA-Proteine bei der DNA-Reparatur und um die Bedeutung des FA/BRCA-DNA-Reparatur-Signalweges in Tumorzellen zu klären (Patel, 2007; Taniguchi und D'Andrea, 2006).

In der vorliegenden Arbeit konnten zytogenetische Marker für ein verringertes rezidivfreies Überleben in einem ausschließlich strahlentherapeutisch behandeltem Tumorkollektiv aus 117 Plattenkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches ermittelt werden. Die Veränderungen von Genen, die auf dem chromosomalen Marker mit der stärksten klinischen Signifikanz lokalisiert sind (16q24.3), wurden durch FISH-Analysen weiter charakterisiert. Die Überexpression des Kandidatengens *FANCA* konnte auch auf mRNA-Ebene verifiziert werden und die phänotypischen Auswirkungen einer *FANCA*-Überexpression wurden in einem Zellkulturmodell hinsichtlich der Strahlenempfindlichkeit untersucht. Die vorläufigen Ergebnisse bestätigen eine erhöhte Strahlenresistenz von *FANCA*-überexprimierenden Zellen, die zu einem erhöhten Rezidivrisiko bei strahlentherapierten Patienten mit Tumoren mit *FANCA*-Überexpression führen könnten. Weitere Experimente sind erforderlich, um die Prävalenz einer *FANCA*-Veränderung bei Kopf-Hals-Tumoren an größeren Fallzahlen, z.B. mit Hilfe von Gewebe-Arrays, zu untersuchen und um die diagnostische und therapeutische Bedeutung dieses neuen potenziellen prognostischen Markers zu verifizieren.

## E ZUSAMMENFASSUNG

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches sind auf Grund ihrer Häufigkeit von zentraler Bedeutung in der medizinischen und molekulargenetischen Forschung. Anhand der etablierten klinisch-pathologischen Parameter, wie beispielsweise der Stagingparameter der UICC, lässt sich die Prognose der Patienten nur ungenügend abschätzen. Aus diesem Grund liegt ein besonderes Augenmerk auf der Erforschung der molekularbiologischen Mechanismen der Tumorentstehung und der genetischen Prognosefaktoren, welche im Idealfall das spezifische Tumorverhalten vorhersagen könnten. Durch eine verbesserte Abschätzung von Tumoreigenschaften, wie z.B. der Therapieempfindlichkeit, wäre es möglich die Prognose von betroffenen Patienten durch eine individualisierte Tumorthherapie positiv zu beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein rein strahlentherapeutisch behandeltes Kollektiv aus Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches mit Hilfe der CGH auf chromosomale Kopienzahlveränderungen hin untersucht. Aus diesem Kollektiv, welches hinsichtlich des klinischen Krankheitsverlaufes der Patienten über einen Zeitraum von fünf Jahren bestens charakterisiert ist und eine Korrelation mit dem Anämiestatus der Patienten erlaubt, standen 117 HNO-Tumorproben der Radiologischen Universitätsklinik Freiburg zur Verfügung. Die identifizierten Kopienzahlveränderungen wurden mit den bekannten klinisch-pathologischen Parametern und mit dem rezidivfreien Überleben der Patienten korreliert, um prognostische Marker, welche möglicherweise mit der Strahlenempfindlichkeit der Tumoren in Verbindung stehen, zu ermitteln. Durch die CGH-Analyse ergaben sich häufige Veränderungen auf den Chromosomen 1q, 2q, 3q, 4q, 7q, 8q, 11q, 12p, 12q und 19p (DNA-Zugewinne) und 3p, 4p, 8p, 9p, 10q, 11q, 13q, 16q, 18q und 21q (DNA-Verluste), welche sehr gut mit bereits publizierten Daten über chromosomale Aberrationen bei HNO-Tumoren übereinstimmten. Eine hierarchische Cluster-Analyse aller Veränderungen ergab eine deutliche Unterteilung der HNO-Tumoren in zwei Hauptcluster entsprechend ihrer genetischen Unterschiede. Die auffallendsten Unterschiede dabei waren DNA-Zugewinne auf den Chromosomen 1q, 4q, 7q, 11q und 16q, sowie DNA-Verluste auf den Chromosomen 3p, 4p, 9p, 13q, 18q und 21q. Interessanterweise korrelierten die beiden Cluster signifikant mit dem Anämiestatus der Patienten, was einen genetischen Hintergrund der tumorbegleitenden Anämie-Erkrankung vermuten lässt. Dies wurde durch einen statistischen Vergleich der Aberrationen von anämischen und nicht-anämischen Patienten untermauert, der signifikante Unterschiede für die Chromosomen 1, 2q, 3, 4, 5, 6q, 8q, 9p, 10p, 11q, 12, 13, 16q, 17, 18q, 19, 20q und 21q ergab. Der bekannte negative Effekt einer Anämie sowie der Tumorgröße und des Resektionsstatus auf das rezidivfreie Überleben von Tumor-

patienten wurde in dem untersuchten HNO-Tumorkollektiv bestätigt. Zusätzlich zeigte die Korrelation der durch die CGH ermittelten Kopienzahlveränderungen mit dem rezidivfreien Überleben, dass DNA-Zugewinne auf den Chromosomen 1q43 und 16q23-24 sowie DNA-Verluste auf Chromosom 18q22 ebenfalls einen signifikanten negativen Einfluss auf das rezidivfreie Überleben haben. Diese potenziellen prognostischen Faktoren wurden in Array-CGH-Experimenten in höherer molekularer Auflösung untersucht, wobei die Kopienzahlveränderung auf Chromosom 16q23-24 in allen analysierten Fällen bestätigt, und auf die subchromosomale Bande 16q24.3 eingegrenzt werden konnte. Anhand von FISH und QRT-PCR wurde eine Überexpression des in dieser Region lokalisierten Kandidatengens *FANCA* auf DNA- und mRNA-Ebene verifiziert. *FANCA* ist Teil des „FA-Core-Enzymkomplexes“, welcher eine wichtige Rolle im „FANCA/BRCA-DNA-Reparatur-Signalweg“ spielt, und bei dessen Funktionsverlust in FA-Patienten und in Tumoren es zu einer Überempfindlichkeit der Zellen gegenüber DNA-Strang-vernetzenden Agenzien kommt. Die verschiedenen Komplementationsgruppen der FA-Erkrankung weisen zudem eine unterschiedlich ausgeprägte Strahlenempfindlichkeit auf. Das rezidivfreie Überleben der Patienten kann als Maß für die Therapieempfindlichkeit der Tumorzellen auf die Strahlentherapie angesehen werden. Dadurch können die identifizierten genetischen Faktoren in Patienten mit verringerter Überlebenszeit auch als Marker für eine erhöhte Strahlenresistenz der Tumore interpretiert werden. Die *FANCA*-Überexpression eines Tumors ist somit mit einer erhöhten Strahlenresistenz des Tumors korrelierbar und kommt somit als prognostischer Faktor in Betracht. Um phänotypische Auswirkungen einer *FANCA*-Überexpression hinsichtlich der Strahlenempfindlichkeit zu untersuchen, wurde das Kandidatengen aus einer Zelllinie isoliert, sequenziert und in einen Expressionsvektor kloniert. Zwei HNO-Tumorzelllinien ohne *FANCA*-Überexpression (Cal-33 und BHY) konnten stabil mit dem Konstrukt transfiziert werden. Vorläufige Ergebnisse von Experimenten zur Strahlenempfindlichkeit der Zelllinien deuten auf eine signifikant reduzierte Strahlenempfindlichkeit der *FANCA*-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu nicht-transfizierten Kontrollzellen hin.

Die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse können als Basis für die weitere Erforschung von Therapieresistenzen von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich, die das rezidivfreie Überleben der betroffenen Patienten negativ beeinflussen, dienen. Dazu müssen weitere Kandidatengene auf Chromosom 16q24.3, sowie auf den Chromosomen 1q43 und 18q22 analysiert werden. Auch weitere Komponenten des FA/BRCA-DNA-Reparatur-Signalweges in häufig veränderten chromosomalen Bereichen der Kopf-Hals-Tumore müssen näher charakterisiert werden. Es ist in dieser Arbeit auch gelungen ein Zellkultursystem mit erhöhter *FANCA*-Expression zu etablieren,

das für weiterführende Experimente zur Strahlenempfindlichkeit *FANCA*-über-exprimierender Zellen verwendet werden kann.

**F LITERATURVERZEICHNIS**

- Abremski K, Hoess R, Sternberg N. Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell* 32: 1301-11; 1983.
- Acs G, Acs P, Beckwith SM, Pitts RL, Clements E, Wong K, Verma A. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. *Cancer Res* 61: 3561-5; 2001.
- Albertson DG. Gene amplification in cancer. *Trends Genet* 22: 447-55; 2006.
- Alter BP. Radiosensitivity in Fanconi's anemia patients. *Radiother Oncol* 62: 345-7; 2002.
- Alter BP, Greene MH, Velazquez I, Rosenberg PS. Cancer in Fanconi anemia. *Blood* 101: 2072; 2003.
- Applebaum KM, Furniss CS, Zeka A, Posner MR, Smith JF, Bryan J, Eisen EA, Peters ES, McClean MD, Kelsey KT. Lack of association of alcohol and tobacco with HPV16-associated head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 99: 1801-10; 2007.
- Arcasoy MO, Amin K, Chou SC, Haroon ZA, Varia M, Raleigh JA. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in head and neck cancer: relationship to tumor hypoxia. *Clin Cancer Res* 11: 20-7; 2005.
- Ashman JN, Patmore HS, Condon LT, Cawkwell L, Stafford ND, Greenman J. Prognostic value of genomic alterations in head and neck squamous cell carcinoma detected by comparative genomic hybridisation. *Br J Cancer* 89: 864-9; 2003.
- Aubele M, Mattis A, Zitzelsberger H, Walch A, Kremer M, Hutzler P, Hofler H, Werner M. Intratumoral heterogeneity in breast carcinoma revealed by laser-microdissection and comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 110: 94-102; 1999.
- Baudis M, Cleary ML. Progenetix.net: an online repository for molecular cytogenetic aberration data. *Bioinformatics* 17: 1228-9; 2001.
- Bayani J, Selvarajah S, Maire G, Vukovic B, Al-Romaih K, Zielenska M, Squire JA. Genomic mechanisms and measurement of structural and numerical instability in cancer cells. *Semin Cancer Biol* 17: 5-18; 2007.
- Bayani JM, Squire JA. Applications of SKY in cancer cytogenetics. *Cancer Invest* 20: 373-86; 2002.
- Becker A, Stadler P, Lavey RS, Hansgen G, Kuhnt T, Lautenschlager C, Feldmann HJ, Molls M, Dunst J. Severe anemia is associated with poor tumor oxygenation in head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 46: 459-66; 2000.
- Bejjani BA, Shaffer LG. Application of array-based comparative genomic hybridization to clinical diagnostics. *J Mol Diagn* 8: 528-33; 2006.
- Benjamini Y, Hochberg, Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc B* 57: 289-300; 1995.
- Bennett CL, Silver SM, Djulbegovic B, Samaras AT, Blau CA, Gleason KJ, Barnato SE, Elverman KM, Courtney DM, McKoy JM, Edwards BJ, Tigue CC, Raisch DW, Yarnold PR, Dorr DA, Kuzel TM, Tallman MS, Trifilio SM, West DP, Lai SY, Henke M. Venous thromboembolism and mortality associated with recombinant erythropoietin and darbepoetin administration for the treatment of cancer-associated anemia. *JAMA* 299: 914-24; 2008.
- Bidon-Wagner N, Le Pennec JP. Human galectin-8 isoforms and cancer. *Glycoconj J* 19: 557-63; 2004.
- Bieche I, Champeme MH, Lidereau R. Loss and gain of distinct regions of chromosome 1q in primary breast cancer. *Clin Cancer Res* 1: 123-7; 1995.
- Bignell GR, Huang J, Greshock J, Watt S, Butler A, West S, Grigorova M, Jones KW, Wei W, Stratton MR, Futreal PA, Weber B, Shapero MH, Wooster R. High-resolution analysis of DNA copy number using oligonucleotide microarrays. *Genome Res* 14: 287-95; 2004.
- Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-23; 1979.
- Blons H, Laccourreye O, Houllier AM, Carnot F, Brasnu D, Beaune P, Zucman-Rossi J, Laurent-Puig P. Delineation and candidate gene mutation screening of the 18q22 minimal region of deletion in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 21: 5016-23; 2002.
- Bockmuhl U, Kuchler I, Petersen I. [Improved prognostic assessment of head-neck carcinomas by new genetic markers]. *HNO* 48: 451-6; 2000.

- Bockmuhl U, Petersen S, Schmidt S, Wolf G, Jahnke V, Dietel M, Petersen I. Patterns of chromosomal alterations in metastasizing and nonmetastasizing primary head and neck carcinomas. *Cancer Res* 57: 5213-6; 1997.
- Bockmuhl U, Schluns K, Kuchler I, Petersen S, Petersen I. Genetic imbalances with impact on survival in head and neck cancer patients. *Am J Pathol* 157: 369-75; 2000.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279: 349-52; 1998.
- Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res* 63: 1727-30; 2003.
- Bremer M, Schindler D, Gross M, Dork T, Morlot S, Karstens JH. Fanconi's anemia and clinical radiosensitivity report on two adult patients with locally advanced solid tumors treated by radiotherapy. *Strahlenther Onkol* 179: 748-53; 2003.
- Burian M, Selzer, E., Kornek, G.V. Fortschritte in der Behandlung von HNO-Tumoren. *Onkologie* 25: 26-30; 2002.
- Burkitt K, Ljungman M. Compromised Fanconi anemia response due to BRCA1 deficiency in cisplatin-sensitive head and neck cancer cell lines. *Cancer Lett* 253: 131-7; 2007.
- Byrne BC, Li JJ, Sninsky J, Poiesz BJ. Detection of HIV-1 RNA sequences by in vitro DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 16: 4165; 1988.
- Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 56: 2488-92; 1996.
- Cardoso J, Molenaar L, de Menezes RX, Rosenberg C, Morreau H, Moslein G, Fodde R, Boer JM. Genomic profiling by DNA amplification of laser capture microdissected tissues and array CGH. *Nucleic Acids Res* 32: e146; 2004.
- Chiba C, Nakamura K, Unno S, Saito T. Intraocular implantation of DNA-transfected retinal pigment epithelium cells: a new approach for analyzing molecular functions in the newt retinal regeneration. *Neurosci Lett* 368: 171-5; 2004.
- Chirnomas D, Taniguchi T, de la Vega M, Vaidya AP, Vasserman M, Hartman AR, Kennedy R, Foster R, Mahoney J, Seiden MV, D'Andrea AD. Chemosensitization to cisplatin by inhibitors of the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol Cancer Ther* 5: 952-61; 2006.
- Choi P, Chen C. Genetic expression profiles and biologic pathway alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 104: 1113-28; 2005.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-9; 1987.
- Chung JY, Braunschweig T, Hewitt SM. Optimization of recovery of RNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Diagn Mol Pathol* 15: 229-36; 2006.
- Clegg RM. Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. *Methods Enzymol* 211: 353-88; 1992.
- Coe BP, Ylstra B, Carvalho B, Meijer GA, Macaulay C, Lam WL. Resolving the resolution of array CGH. *Genomics* 89: 647-53; 2007.
- Corson TW, Huang A, Tsao MS, Gallie BL. KIF14 is a candidate oncogene in the 1q minimal region of genomic gain in multiple cancers. *Oncogene* 24: 4741-53; 2005.
- Cox D. Regression Models and life tables (with discussion). *J R Stat Soc B* 34: 187-220; 1972.
- D'Andrea AD. The Fanconi road to cancer. *Genes Dev* 17: 1933-6; 2003.
- D'Andrea AD, Grompe M. The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer* 3: 23-34; 2003.
- Davies JJ, Wilson IM, Lam WL. Array CGH technologies and their applications to cancer genomes. *Chromosome Res* 13: 237-48; 2005.
- Dean FB, Hosono S, Fang L, Wu X, Faruqi AF, Bray-Ward P, Sun Z, Zong Q, Du Y, Du J, Driscoll M, Song W, Kingsmore SF, Egholm M, Lasken RS. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 5261-6; 2002.
- Deichsel G, Trampisch HJ. Clusteranalyse und Diskriminanzanalyse. Stuttgart <etc.>: Fischer; 1985.
- Demetri GD, Kris M, Wade J, Degos L, Cella D. Quality-of-life benefit in chemotherapy patients treated with epoetin alfa is independent of disease response or tumor type: results from a prospective community oncology study. Procrit Study Group. *J Clin Oncol* 16: 3412-25; 1998.

- Devitt G, Thomas M, Klibanov AM, Pfeiffer T, Bosch V. Optimized protocol for the large scale production of HIV pseudovirions by transient transfection of HEK293T cells with linear fully deacylated polyethylenimine. *J Virol Methods* 146: 298-304; 2007.
- Devries S, Nyante S, Korkola J, Segraves R, Nakao K, Moore D, Bae H, Wilhelm M, Hwang S, Waldman F. Array-based comparative genomic hybridization from formalin-fixed, paraffin-embedded breast tumors. *J Mol Diagn* 7: 65-71; 2005.
- Dimery IW, Hong WK. Overview of combined modality therapies for head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 85: 95-111; 1993.
- Douglas EJ, Fiegler H, Rowan A, Halford S, Bicknell DC, Bodmer W, Tomlinson IP, Carter NP. Array comparative genomic hybridization analysis of colorectal cancer cell lines and primary carcinomas. *Cancer Res* 64: 4817-25; 2004.
- Drexler G. Etablierung eines neuen Rekombinations-Meßsystems in Nachweis der Störung homologer Rekombination in Atm- und Rad51C-defizienten Säugerzell-Mutanten. In: Institut für Molekulare Strahlenbiologie, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit. München: Ludwig-Maximilians-Universität; 2002.
- Ebert BL, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene. *Blood* 94: 1864-77; 1999.
- Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 21: 5400-13; 2002.
- Eich HT, Loschcke M, Scheer M, Kocher M, Bongartz R, Wacker S, Zoller JE, Muller RP. Neoadjuvant radiochemotherapy and radical resection for advanced squamous cell carcinoma of the oral cavity. Outcome of 134 patients. *Strahlenther Onkol* 184: 23-9; 2008.
- El-Husseiny G, Kandil A, Jamshed A, Khafaga Y, Saleem M, Allam A, Al-Rajhi N, Al-Amro A, Rostom AY, Abuzeid M, Otieschan A, Flores AD. Squamous cell carcinoma of the oral tongue: an analysis of prognostic factors. *Br J Oral Maxillofac Surg* 38: 193-9; 2000.
- Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 100: 261-9; 2008.
- Ferrer I, Armstrong J, Capellari S, Parchi P, Arzberger T, Bell J, Budka H, Strobel T, Giaccone G, Rossi G, Bogdanovic N, Fakai P, Schmitt A, Riederers P, Al-Sarraj S, Ravid R, Kretzschmar H. Effects of formalin fixation, paraffin embedding, and time of storage on DNA preservation in brain tissue: a BrainNet Europe study. *Brain Pathol* 17: 297-303; 2007.
- Fiegler H, Carr P, Douglas EJ, Burford DC, Hunt S, Scott CE, Smith J, Vetrie D, Gorman P, Tomlinson IP, Carter NP. DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. *Genes Chromosomes Cancer* 36: 361-74; 2003.
- Fiegler H, Redon R, Carter NP. Construction and use of spotted large-insert clone DNA microarrays for the detection of genomic copy number changes. *Nat Protoc* 2: 577-87; 2007.
- Förster T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann Phys*: 55-75; 1948.
- Frommhold H, Guttenberger R, Henke M. The impact of blood hemoglobin content on the outcome of radiotherapy. The Freiburg experience. *Strahlenther Onkol* 174 Suppl 4: 31-4; 1998.
- Gabrilove JL, Cleeland CS, Livingston RB, Sarokhan B, Winer E, Einhorn LH. Clinical evaluation of once-weekly dosing of epoetin alfa in chemotherapy patients: improvements in hemoglobin and quality of life are similar to three-times-weekly dosing. *J Clin Oncol* 19: 2875-82; 2001.
- Gall JG. The genes for ribosomal RNA during oogenesis. *Genetics* 61: Suppl:121-32; 1969.
- Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn MS, Timmers C, Hejna J, Grompe M, D'Andrea AD. Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell* 7: 249-62; 2001.
- Gioanni J, Fischel JL, Lambert JC, Demard F, Mazeau C, Zanghellini E, Ettore F, Formento P, Chauvel P, Lalanne CM, et al. Two new human tumor cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: establishment, characterization and response to cytotoxic treatment. *Eur J Cancer Clin Oncol* 24: 1445-55; 1988.
- Greshock J, Naylor TL, Margolin A, Diskin S, Cleaver SH, Futreal PA, deJong PJ, Zhao S, Liebman M, Weber BL. 1-Mb resolution array-based comparative genomic hybridization using a BAC clone set optimized for cancer gene analysis. *Genome Res* 14: 179-87; 2004.



- Gronbaek K, Hother C, Jones PA. Epigenetic changes in cancer. *APMIS* 115: 1039-59; 2007.
- Ha PK, Califano JA. The molecular biology of mucosal field cancerization of the head and neck. *Crit Rev Oral Biol Med* 14: 363-9; 2003.
- Hajra KM, Fearon ER. Cadherin and catenin alterations in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 34: 255-68; 2002.
- Hardee ME, Arcasoy MO, Blackwell KL, Kirkpatrick JP, Dewhirst MW. Erythropoietin biology in cancer. *Clin Cancer Res* 12: 332-9; 2006.
- Harms V. Biomathematik, Statistik und Dokumentation eine leichtverständliche Einführung nach dem Gegenstandskatalog für den 1. und 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung. 7., überarb. Aufl. ed. Kiel: Harms; 1998.
- Henke M, Guttenberger R, Barke A, Pajonk F, Potter R, Frommhold H. Erythropoietin for patients undergoing radiotherapy: a pilot study. *Radiother Oncol* 50: 185-90; 1999.
- Henke M, Laszig R, Rube C, Schafer U, Haase KD, Schilcher B, Mose S, Beer KT, Burger U, Dougherty C, Frommhold H. Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 362: 1255-60; 2003.
- Henke M, Mattern D, Pepe M, Bezay C, Weissenberger C, Werner M, Pajonk F. Do erythropoietin receptors on cancer cells explain unexpected clinical findings? *J Clin Oncol* 24: 4708-13; 2006.
- Henno S, Brichory F, Langanay T, Desrues B, Bidon N, Delaval P, Ramee MP, Dazord L, Caullet-Maugendre S. Expression of Po66-CBP, a galectin-8, in different types of primary and secondary broncho-pulmonary tumors. *Oncol Rep* 9: 177-80; 2002.
- Hsiung DT, Marsit CJ, Houseman EA, Eddy K, Furniss CS, McClean MD, Kelsey KT. Global DNA methylation level in whole blood as a biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16: 108-14; 2007.
- Hu N, Wang C, Hu Y, Yang HH, Kong LH, Lu N, Su H, Wang QH, Goldstein AM, Buetow KH, Emmert-Buck MR, Taylor PR, Lee MP. Genome-wide loss of heterozygosity and copy number alteration in esophageal squamous cell carcinoma using the Affymetrix GeneChip Mapping 10 K array. *BMC Genomics* 7: 299; 2006.
- Huebner K, Croce CM. FRA3B and other common fragile sites: the weakest links. *Nat Rev Cancer* 1: 214-21; 2001.
- Hupe P, Stransky N, Thiery JP, Radvanyi F, Barillot E. Analysis of array CGH data: from signal ratio to gain and loss of DNA regions. *Bioinformatics* 20: 3413-22; 2004.
- Inoue T, Uchino S, Shiraishi N, Adachi Y, Kitano S. Loss of heterozygosity on chromosome 18q in cohesive-type gastric cancer is associated with tumor progression and poor prognosis. *Clin Cancer Res* 4: 973-7; 1998.
- Institut GdGdeKeVudRK. Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends [online]. Available Accessed 6. Auflage.
- Jacobs S, Thompson ER, Nannya Y, Yamamoto G, Pillai R, Ogawa S, Bailey DK, Campbell IG. Genome-wide, high-resolution detection of copy number, loss of heterozygosity, and genotypes from formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue using microarrays. *Cancer Res* 67: 2544-51; 2007.
- Jacquemont C, Taniguchi T. Disruption of the Fanconi anemia pathway in human cancer in the general population. *Cancer Biol Ther* 5: 1637-9; 2006.
- Janmaat ML, Giaccone G. The epidermal growth factor receptor pathway and its inhibition as anticancer therapy. *Drugs Today (Barc)* 39 Suppl C: 61-80; 2003.
- Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J Clin* 53: 5-26; 2003.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 58: 71-96; 2008.
- John HA, Birnstiel ML, Jones KW. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223: 582-7; 1969.
- Johnson NA, Hamoudi RA, Ichimura K, Liu L, Pearson DM, Collins VP, Du MQ. Application of array CGH on archival formalin-fixed paraffin-embedded tissues including small numbers of microdissected cells. *Lab Invest* 86: 968-78; 2006.
- Kalbfleisch JD, Prentice RL. The statistical analysis of failure time data. New York, NY <etc.>: Wiley; 1980.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258: 818-21; 1992.

- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 10: 231-43; 1994.
- Kaplan EM, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53: 457-81; 1958.
- Katoh M, Katoh M. Identification and characterization of human TIPARP gene within the CCNL amplicon at human chromosome 3q25.31. *Int J Oncol* 23: 541-7; 2003.
- Kawamata H, Nakashiro K, Uchida D, Harada K, Yoshida H, Sato M. Possible contribution of active MMP2 to lymph-node metastasis and secreted cathepsin L to bone invasion of newly established human oral-squamous-cancer cell lines. *Int J Cancer* 70: 120-7; 1997.
- Kennedy RD, D'Andrea AD. The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd. *Genes Dev* 19: 2925-40; 2005.
- Kessler P, Grabenbauer G, Leher A, Bloch-Birkholz A, Vairaktaris E, Neukam FW, Sauer R. [Five year survival of patients with primary oral squamous cell carcinoma. Comparison of two treatment protocols in a prospective study]. *Strahlenther Onkol* 183: 184-9; 2007.
- Klein CA, Schmidt-Kittler O, Scharadt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmuller G. Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 4494-9; 1999.
- Kobayashi T, Sasaki Y, Oshima Y, Yamamoto H, Mita H, Suzuki H, Toyota M, Tokino T, Itoh F, Imai K, Shinomura Y. Activation of the ribosomal protein L13 gene in human gastrointestinal cancer. *Int J Mol Med* 18: 161-70; 2006.
- Koury MJ, Bondurant MC. Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science* 248: 378-81; 1990.
- Kupfer GM, Naf D, Suliman A, Pulsipher M, D'Andrea AD. The Fanconi anaemia proteins, FAA and FAC, interact to form a nuclear complex. *Nat Genet* 17: 487-90; 1997.
- Kuroda N, Toi M, Hiroi M, Enzan H. Review of papillary renal cell carcinoma with focus on clinical and pathobiological aspects. *Histol Histopathol* 18: 487-94; 2003.
- Kytola S, Hoog A, Nord B, Cedermarck B, Frisk T, Larsson C, Kjellman M. Comparative genomic hybridization identifies loss of 18q22-qter as an early and specific event in tumorigenesis of midgut carcinoids. *Am J Pathol* 158: 1803-8; 2001.
- La Rosa P, Viara E, Hupe P, Pierron G, Liva S, Neuvial P, Brito I, Lair S, Servant N, Robine N, Manie E, Brennetot C, Janoueix-Lerosey I, Raynal V, Gruel N, Rouveirol C, Stransky N, Stern MH, Delattre O, Aurias A, Radvanyi F, Barillot E. VAMP: visualization and analysis of array-CGH, transcriptome and other molecular profiles. *Bioinformatics* 22: 2066-73; 2006.
- LaFramboise T, Weir BA, Zhao X, Beroukhim R, Li C, Harrington D, Sellers WR, Meyerson M. Allele-specific amplification in cancer revealed by SNP array analysis. *PLoS Comput Biol* 1: e65; 2005.
- Lage JM, Leamon JH, Pejovic T, Hamann S, Lacey M, Dillon D, Segreaves R, Vossbrinck B, Gonzalez A, Pinkel D, Albertson DG, Costa J, Lizardi PM. Whole genome analysis of genetic alterations in small DNA samples using hyperbranched strand displacement amplification and array-CGH. *Genome Res* 13: 294-307; 2003.
- Lai SY, Childs EE, Xi S, Coppelli FM, Gooding WE, Wells A, Ferris RL, Grandis JR. Erythropoietin-mediated activation of JAK-STAT signaling contributes to cellular invasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 24: 4442-9; 2005.
- Largo C, Alvarez S, Saez B, Blesa D, Martin-Subero JI, Gonzalez-Garcia I, Brieva JA, Dopazo J, Siebert R, Calasanz MJ, Cigudosa JC. Identification of overexpressed genes in frequently gained/amplified chromosome regions in multiple myeloma. *Haematologica* 91: 184-91; 2006.
- Lassus H, Salovaara R, Aaltonen LA, Butzow R. Allelic analysis of serous ovarian carcinoma reveals two putative tumor suppressor loci at 18q22-q23 distal to SMAD4, SMAD2, and DCC. *Am J Pathol* 159: 35-42; 2001.
- Lee CC, MacKay JA, Frechet JM, Szoka FC. Designing dendrimers for biological applications. *Nat Biotechnol* 23: 1517-26; 2005.
- Lee CI, Leong SH, Png AE, Choo KW, Syn C, Lim DT, Law HY, Kon OL. An isothermal method for whole genome amplification of fresh and degraded DNA for comparative genomic hybridization, genotyping and mutation detection. *DNA Res* 13: 77-88; 2006.

- Lee KM, Cao D, Itami A, Pour PM, Hruban RH, Maitra A, Ouellette MM. Class III beta-tubulin, a marker of resistance to paclitaxel, is overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma and intraepithelial neoplasia. *Histopathology* 51: 539-46; 2007.
- Lehmann EL, D'Abbrera HJM. *Nonparametrics statistical methods based on ranks*. San Francisco: Holden-Day; 1975.
- Lehninger AL. *Biochemistry: The Molecular Basis of Cell Structure and Function*. 2nd ed. New York: Worth Publishers; 1975.
- Leyland-Jones B, Semiglazov V, Pawlicki M, Pienkowski T, Tjulandin S, Manikhas G, Makhson A, Roth A, Dodwell D, Baselga J, Biakhov M, Valuckas K, Voznyi E, Liu X, Vercammen E. Maintaining normal hemoglobin levels with epoetin alfa in mainly nonanemic patients with metastatic breast cancer receiving first-line chemotherapy: a survival study. *J Clin Oncol* 23: 5960-72; 2005.
- Li C, Hung Wong W. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biol* 2: RESEARCH0032; 2001.
- Lin M, Wei LJ, Sellers WR, Lieberfarb M, Wong WH, Li C. dChipSNP: significance curve and clustering of SNP-array-based loss-of-heterozygosity data. *Bioinformatics* 20: 1233-40; 2004.
- Lindberg K, Rheinwald JG. Three distinct keratinocyte subtypes identified in human oral epithelium by their patterns of keratin expression in culture and in xenografts. *Differentiation* 45: 230-41; 1990.
- Liontos M, Koutsami M, Sideridou M, Evangelou K, Kletsas D, Levy B, Kotsinas A, Nahum O, Zoumpourlis V, Kouloukoussa M, Lygerou Z, Taraviras S, Kittas C, Bartkova J, Papavassiliou AG, Bartek J, Halazonetis TD, Gorgoulis VG. Deregulated overexpression of hCdt1 and hCdc6 promotes malignant behavior. *Cancer Res* 67: 10899-909; 2007.
- Little SE, Vuononvirta R, Reis-Filho JS, Natrajan R, Irvani M, Fenwick K, Mackay A, Ashworth A, Pritchard-Jones K, Jones C. Array CGH using whole genome amplification of fresh-frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tumor DNA. *Genomics* 87: 298-306; 2006.
- Littlewood TJ, Bajetta E, Nortier JW, Vercammen E, Rapoport B. Effects of epoetin alfa on hematologic parameters and quality of life in cancer patients receiving nonplatinum chemotherapy: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol* 19: 2865-74; 2001.
- Liu CJ, Lin SC, Chen YJ, Chang KM, Chang KW. Array-comparative genomic hybridization to detect genomewide changes in microdissected primary and metastatic oral squamous cell carcinomas. *Mol Carcinog* 45: 721-31; 2006.
- Liu CJ, Liu TY, Kuo LT, Cheng HW, Chu TH, Chang KW, Lin SC. Differential gene expression signature between primary and metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol* 214: 489-97; 2008.
- Liva S, Hupe P, Neuvial P, Brito I, Viara E, La Rosa P, Barillot E. CAPweb: a bioinformatics CGH array Analysis Platform. *Nucleic Acids Res* 34: W477-81; 2006.
- Lo KC, Ma C, Bundy BN, Pomeroy SL, Eberhart CG, Cowell JK. Gain of 1q is a potential univariate negative prognostic marker for survival in medulloblastoma. *Clin Cancer Res* 13: 7022-8; 2007.
- Lonnröth C, Svensson M, Wang W, Korner U, Daneryd P, Nilsson O, Lundholm K. Survival and erythropoietin receptor protein in tumours from patients randomly treated with rhEPO for palliative care. *Med Oncol* 25: 22-9; 2008.
- Lottspeich F, Zorbas H. *Bioanalytik*. Heidelberg <etc.>: Spektrum Akademischer Verlag; 1998.
- Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW, Short JM, Sorge JA, Mathur EJ. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* 108: 1-6; 1991.
- Lyakhovich A, Surrallés J. Disruption of the Fanconi anemia/BRCA pathway in sporadic cancer. *Cancer Lett* 232: 99-106; 2006.
- Lyons-Weiler M, Hagenkord J, Sciulli C, Dhir R, Monzon FA. Optimization of the Affymetrix GeneChip Mapping 10K 2.0 Assay for routine clinical use on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Diagn Mol Pathol* 17: 3-13; 2008.
- Marsit CJ, Liu M, Nelson HH, Posner M, Suzuki M, Kelsey KT. Inactivation of the Fanconi anemia/BRCA pathway in lung and oral cancers: implications for treatment and survival. *Oncogene* 23: 1000-4; 2004.

- Masuda N, Ohnishi T, Kawamoto S, Monden M, Okubo K. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Res* 27: 4436-43; 1999.
- Mathew CG. Fanconi anaemia genes and susceptibility to cancer. *Oncogene* 25: 5875-84; 2006.
- McIver CM, Lloyd JM, Hewett PJ, Hardingham JE. Dipeptidase 1: a candidate tumor-specific molecular marker in colorectal carcinoma. *Cancer Lett* 209: 67-74; 2004.
- Mendrzyk F, Korshunov A, Benner A, Toedt G, Pfister S, Radlwimmer B, Lichter P. Identification of gains on 1q and epidermal growth factor receptor overexpression as independent prognostic markers in intracranial ependymoma. *Clin Cancer Res* 12: 2070-9; 2006.
- Meredith SD, Levine PA, Burns JA, Gaffey MJ, Boyd JC, Weiss LM, Erickson NL, Williams ME. Chromosome 11q13 amplification in head and neck squamous cell carcinoma. Association with poor prognosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 121: 790-4; 1995.
- Millesi W, Steiner E., Dobrowsky W., Glaser C., Öckher M. Regionale Diagnostik und Therapie bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx. *Acta Chir. Austriaca*: 299-304; 1998.
- Mizuno T, Nagamura H, Iwamoto KS, Ito T, Fukuhara T, Tokunaga M, Tokuoka S, Mabuchi K, Seyama T. RNA from decades-old archival tissue blocks for retrospective studies. *Diagn Mol Pathol* 7: 202-8; 1998.
- Moeller BJ, Richardson RA, Dewhirst MW. Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev* 26: 241-8; 2007.
- Mohr C, Bohndorf W, Carstens J, Harle F, Hausamen JE, Hirche H, Kimmig H, Kutzner J, Muhling J, Reuther J, et al. Preoperative radiochemotherapy and radical surgery in comparison with radical surgery alone. A prospective, multicentric, randomized DOSAK study of advanced squamous cell carcinoma of the oral cavity and the oropharynx (a 3-year follow-up). *Int J Oral Maxillofac Surg* 23: 140-8; 1994.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-73; 1986.
- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-50; 1987.
- Nakaya K, Yamagata HD, Arita N, Nakashiro KI, Nose M, Miki T, Hamakawa H. Identification of homozygous deletions of tumor suppressor gene FAT in oral cancer using CGH-array. *Oncogene* 26: 5300-8; 2007.
- Neuville P, Hupe P, Brito I, Liva S, Manie E, Brennetot C, Radvanyi F, Aurias A, Barillot E. Spatial normalization of array-CGH data. *BMC Bioinformatics* 7: 264; 2006.
- Neveling K, Kalb R, Florl AR, Herterich S, Friedl R, Hoehn H, Hader C, Hartmann FH, Nanda I, Steinlein C, Schmid M, Tonnies H, Hurst CD, Knowles MA, Hanenberg H, Schulz WA, Schindler D. Disruption of the FA/BRCA pathway in bladder cancer. *Cytogenet Genome Res* 118: 166-76; 2007.
- Nowell PC. Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective. *J Clin Invest* 117: 2033-5; 2007.
- Olsen J, Sabroe S, Ipsen J. Effect of combined alcohol and tobacco exposure on risk of cancer of the hypopharynx. *J Epidemiol Community Health* 39: 304-7; 1985.
- Oosting J, Lips EH, van Eijk R, Eilers PH, Szuhai K, Wijmenga C, Morreau H, van Wezel T. High-resolution copy number analysis of paraffin-embedded archival tissue using SNP BeadArrays. *Genome Res* 17: 368-76; 2007.
- Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123: 291-8; 1984.
- Parikh RA, White JS, Huang X, Schoppy DW, Baysal BE, Baskaran R, Bakkenist CJ, Saunders WS, Hsu LC, Romkes M, Gollin SM. Loss of distal 11q is associated with DNA repair deficiency and reduced sensitivity to ionizing radiation in head and neck squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 46: 761-75; 2007.
- Patel KJ. Fanconi anemia and breast cancer susceptibility. *Nat Genet* 39: 142-3; 2007.
- Patel KJ, Joenje H. Fanconi anemia and DNA replication repair. *DNA Repair (Amst)* 6: 885-90; 2007.
- Patel V, Hood BL, Molinolo AA, Lee NH, Conrads TP, Braisted JC, Krizman DB, Veenstra TD, Gutkind JS. Proteomic analysis of laser-captured paraffin-embedded tissues: a molecular portrait of head and neck cancer progression. *Clin Cancer Res* 14: 1002-14; 2008.

- Patmore HS, Cawkwell L, Stafford ND, Greenman J. Unraveling the chromosomal aberrations of head and neck squamous cell carcinoma: a review. *Ann Surg Oncol* 12: 831-42; 2005.
- Pearlstein RP, Benninger MS, Carey TE, Zarbo RJ, Torres FX, Rybicki BA, Dyke DL. Loss of 18q predicts poor survival of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Genes Chromosomes Cancer* 21: 333-9; 1998.
- Pinard R, de Winter A, Sarkis GJ, Gerstein MB, Tartaro KR, Plant RN, Egholm M, Rothberg JM, Leamon JH. Assessment of whole genome amplification-induced bias through high-throughput, massively parallel whole genome sequencing. *BMC Genomics* 7: 216; 2006.
- Pinkel D, Albertson DG. Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer. *Nat Genet* 37 Suppl: S11-7; 2005.
- Pinkel D, Albertson DG. Comparative genomic hybridization. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6: 331-54; 2005.
- Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20: 207-11; 1998.
- Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 83: 18-29; 1999.
- Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, Jeffrey SS, Botstein D, Brown PO. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* 23: 41-6; 1999.
- Premoli-De-Percoco G, Ramirez JL, Galindo I. Correlation between HPV types associated with oral squamous cell carcinoma and cervicovaginal cytology: An in situ hybridization study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 86: 77-81; 1998.
- Pschyrembel W. *Klinisches Wörterbuch Pschyrembel*. deGruyter, Walter GmbH.
- Ragin CC, Modugno F, Gollin SM. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *J Dent Res* 86: 104-14; 2007.
- Rakha EA, Green AR, Powe DG, Roylance R, Ellis IO. Chromosome 16 tumor-suppressor genes in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 45: 527-35; 2006.
- Rasmussen LJ, Rasmussen M, Lee B, Rasmussen AK, Wilson DM, 3rd, Nielsen FC, Bisgaard HC. Identification of factors interacting with hMSH2 in the fetal liver utilizing the yeast two-hybrid system. In vivo interaction through the C-terminal domains of hEXO1 and hMSH2 and comparative expression analysis. *Mutat Res* 460: 41-52; 2000.
- Raspaglio G, Filippetti F, Prislei S, Penci R, De Maria I, Cicchillitti L, Mozzetti S, Scambia G, Ferlini C. Hypoxia induces class III beta-tubulin gene expression by HIF-1alpha binding to its 3' flanking region. *Gene* 409: 100-8; 2008.
- Rauch A, Ruschendorf F, Huang J, Trautmann U, Becker C, Thiel C, Jones KW, Reis A, Nurnberg P. Molecular karyotyping using an SNP array for genomewide genotyping. *J Med Genet* 41: 916-22; 2004.
- Reiche D. *Roche Lexikon Medizin*. 5. Auflage ed. Urban & Fischer Verlag; 2003.
- Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 113: 237-51; 1977.
- Roepman P, de Jager A, Groot Koerkamp MJ, Kummer JA, Slootweg PJ, Holstege FC. Maintenance of head and neck tumor gene expression profiles upon lymph node metastasis. *Cancer Res* 66: 11110-4; 2006.
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 146: 905-16; 1999.
- Rothkamm K, Lobrich M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 5057-62; 2003.
- Rupp GM, Locker J. Purification and analysis of RNA from paraffin-embedded tissues. *Biotechniques* 6: 56-60; 1988.
- Sachs LH, J. *Angewandte Statistik; Methodensammlung mit R*. 12 ed. Springer, Berlin; 2006.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-4; 1985.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-7; 1977.

- Sasabe E, Zhou X, Li D, Oku N, Yamamoto T, Osaki T. The involvement of hypoxia-inducible factor-1alpha in the susceptibility to gamma-rays and chemotherapeutic drugs of oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Cancer* 120: 268-77; 2007.
- Schlade-Bartusiak K, Stembalska A, Ramsey D. Significant involvement of chromosome 13q deletions in progression of larynx cancer, detected by comparative genomic hybridization. *J Appl Genet* 46: 407-13; 2005.
- Schock GF, N.; Lubenow, H.; Löffert, D., Korfhage, C. Unbegrenzte DNA-Analysen durch Multiple Displacement Amplification. *Biospektrum* 6: 781-782; 2005.
- Scholes AG, Woolgar JA, Boyle MA, Brown JS, Vaughan ED, Hart CA, Jones AS, Field JK. Synchronous oral carcinomas: independent or common clonal origin? *Cancer Res* 58: 2003-6; 1998.
- Schrock E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273: 494-7; 1996.
- Schrock E, Padilla-Nash H. Spectral karyotyping and multicolor fluorescence in situ hybridization reveal new tumor-specific chromosomal aberrations. *Semin Hematol* 37: 334-47; 2000.
- Sherbenou DW, Druker BJ. Applying the discovery of the Philadelphia chromosome. *J Clin Invest* 117: 2067-74; 2007.
- Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Simon M. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8794-7; 1992.
- Shuman S. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* 269: 32678-84; 1994.
- Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, Lakhani SR. Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol* 205: 248-54; 2005.
- Singh B, Gogineni S, Goberdhan A, Sacks P, Shaha A, Shah J, Rao P. Spectral karyotyping analysis of head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 111: 1545-50; 2001.
- Singh B, Gogineni SK, Sacks PG, Shaha AR, Shah JP, Stoffel A, Rao PH. Molecular cytogenetic characterization of head and neck squamous cell carcinoma and refinement of 3q amplification. *Cancer Res* 61: 4506-13; 2001.
- Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 6: 963-8; 1953.
- Smith DI, McAvoy S, Zhu Y, Perez DS. Large common fragile site genes and cancer. *Semin Cancer Biol* 17: 31-41; 2007.
- Snijders AM, Nowak N, Segreaves R, Blackwood S, Brown N, Conroy J, Hamilton G, Hindle AK, Huey B, Kimura K, Law S, Myambo K, Palmer J, Ylstra B, Yue JP, Gray JW, Jain AN, Pinkel D, Albertson DG. Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet* 29: 263-4; 2001.
- Snijders AM, Pinkel D, Albertson DG. Current status and future prospects of array-based comparative genomic hybridisation. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2: 37-45; 2003.
- Sobin LH, Wittekind, C., IUCC. IUCC TNM Classification of Malignant Tumors. 6th ed. John Wiley & Sons; 2002.
- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, Cremer T, Lichter P. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 20: 399-407; 1997.
- Solinas-Toldo S, Wallrapp C, Muller-Pillasch F, Bentz M, Gress T, Lichter P. Mapping of chromosomal imbalances in pancreatic carcinoma by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 56: 3803-7; 1996.
- Southern PJ, Berg P. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J Mol Appl Genet* 1: 327-41; 1982.
- Specht K, Richter T, Muller U, Walch A, Werner M, Hofler H. Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue. *Am J Pathol* 158: 419-29; 2001.
- Squire JA, Bayani J, Luk C, Unwin L, Tokunaga J, MacMillan C, Irish J, Brown D, Gullane P, Kamel-Reid S. Molecular cytogenetic analysis of head and neck squamous cell carcinoma: By comparative genomic hybridization, spectral karyotyping, and expression array analysis. *Head Neck* 24: 874-87; 2002.

- Stange DE, Radlwimmer B, Schubert F, Traub F, Pich A, Toedt G, Mendrzyk F, Lehmann U, Eils R, Kreipe H, Lichter P. High-resolution genomic profiling reveals association of chromosomal aberrations on 1q and 16p with histologic and genetic subgroups of invasive breast cancer. *Clin Cancer Res* 12: 345-52; 2006.
- Stauber RH, Horie K, Carney P, Hudson EA, Tarasova NI, Gaitanaris GA, Pavlakakis GN. Development and applications of enhanced green fluorescent protein mutants. *Biotechniques* 24: 462-6, 468-71; 1998.
- Stewart BW, World Health Organization, Kleihues P. World cancer report. Lyon: IARC; 2003.
- Storojeva I, Boulay JL, Ballabeni P, Buess M, Terracciano L, Laffer U, Mild G, Herrmann R, Rochlitz C. Prognostic and predictive relevance of DNAM-1, SOCS6 and CADH-7 genes on chromosome 18q in colorectal cancer. *Oncology* 68: 246-55; 2005.
- Strachan T, Read AP. Molekulare Humangenetik. 3., vollst. neu überarb. Aufl ed. München: Elsevier; 2005.
- Tabor MP, Brakenhoff RH, Ruijter-Schippers HJ, Van Der Wal JE, Snow GB, Leemans CR, Braakhuis BJ. Multiple head and neck tumors frequently originate from a single preneoplastic lesion. *Am J Pathol* 161: 1051-60; 2002.
- Tai AL, Yan WS, Fang Y, Xie D, Sham JS, Guan XY. Recurrent chromosomal imbalances in nonsmall cell lung carcinoma: the association between 1q amplification and tumor recurrence. *Cancer* 100: 1918-27; 2004.
- Tai SK, Lee JI, Ang KK, El-Naggar AK, Hassan KA, Liu D, Lee JJ, Ren H, Hong WK, Mao L. Loss of Fhit expression in head and neck squamous cell carcinoma and its potential clinical implication. *Clin Cancer Res* 10: 5554-7; 2004.
- Takebayashi S, Hickson A, Ogawa T, Jung KY, Mineta H, Ueda Y, Grenman R, Fisher SG, Carey TE. Loss of chromosome arm 18q with tumor progression in head and neck squamous cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 41: 145-54; 2004.
- Takebayashi S, Ogawa T, Jung KY, Muallem A, Mineta H, Fisher SG, Grenman R, Carey TE. Identification of new minimally lost regions on 18q in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 60: 3397-403; 2000.
- Tan DS, Lambros MB, Natrajan R, Reis-Filho JS. Getting it right: designing microarray (and not 'microawry') comparative genomic hybridization studies for cancer research. *Lab Invest* 87: 737-54; 2007.
- Taniguchi T, D'Andrea AD. Molecular pathogenesis of Fanconi anemia: recent progress. *Blood* 107: 4223-33; 2006.
- Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Andreassen PR, Gregory RC, Grompe M, D'Andrea AD. S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51. *Blood* 100: 2414-20; 2002.
- Taniguchi T, Tischkowitz M, Ameziane N, Hodgson SV, Mathew CG, Joenje H, Mok SC, D'Andrea AD. Disruption of the Fanconi anemia-BRCA pathway in cisplatin-sensitive ovarian tumors. *Nat Med* 9: 568-74; 2003.
- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, Tunnacliffe A. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13: 718-25; 1992.
- Thomas GR, Nadiminti H, Regalado J. Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Exp Pathol* 86: 347-63; 2005.
- Thompson ER, Herbert SC, Forrest SM, Campbell IG. Whole genome SNP arrays using DNA derived from formalin-fixed, paraffin-embedded ovarian tumor tissue. *Hum Mutat* 26: 384-9; 2005.
- Tibiletti MG. Interphase FISH as a new tool in tumor pathology. *Cytogenet Genome Res* 118: 229-36; 2007.
- Tomlinson I, Rahman N, Frayling I, Mangion J, Barfoot R, Hamoudi R, Seal S, Northover J, Thomas HJ, Neale K, Hodgson S, Talbot I, Houlston R, Stratton MR. Inherited susceptibility to colorectal adenomas and carcinomas: evidence for a new predisposition gene on 15q14-q22. *Gastroenterology* 116: 789-95; 1999.
- Tremblay S, Pintor Dos Reis P, Bradley G, Galloni NN, Perez-Ordóñez B, Freeman J, Brown D, Gilbert R, Gullane P, Irish J, Kamel-Reid S. Young patients with oral squamous cell carcinoma: study of the involvement of GSTP1 and deregulation of the Fanconi anemia genes. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 132: 958-66; 2006.
- Unger K, Malisch E, Thomas G, Braselmann H, Walch A, Jackl G, Lewis P, Lengfelder E, Bogdanova T, Wienberg J, Zitzelsberger H. Array CGH demonstrates characteristic aberrations

- tion signatures in human papillary thyroid carcinomas governed by RET/PTC. *Oncogene*; 2008.
- Unger K, Zitzelsberger H, Salvatore G, Santoro M, Bogdanova T, Braselmann H, Kastner P, Zurnadzhy L, Tronko N, Hutzler P, Thomas G. Heterogeneity in the distribution of RET/PTC rearrangements within individual post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 4272-9; 2004.
- van Beers EH, Joosse SA, Ligtenberg MJ, Fles R, Hogervorst FB, Verhoef S, Nederlof PM. A multiplex PCR predictor for aCGH success of FFPE samples. *Br J Cancer* 94: 333-7; 2006.
- van Dekken H, Wink JC, Vissers KJ, van Marion R, Koppert LB, Tilanus HW, Siersema PD, Tanke HJ, Szuhai K, Hop WC. Genomic analysis of early adenocarcinoma of the esophagus or gastroesophageal junction: tumor progression is associated with alteration of 1q and 8p sequences. *Genes Chromosomes Cancer* 45: 516-25; 2006.
- van der Heijden MS, Brody JR, Gallmeier E, Cunningham SC, Dezentje DA, Shen D, Hruban RH, Kern SE. Functional defects in the fanconi anemia pathway in pancreatic cancer cells. *Am J Pathol* 165: 651-7; 2004.
- van Wezel T, Lombaerts M, van Roon EH, Philippo K, Baelde HJ, Szuhai K, Cornelisse CJ, Cleton-Jansen AM. Expression analysis of candidate breast tumour suppressor genes on chromosome 16q. *Breast Cancer Res* 7: R998-1004; 2005.
- Virgilio L, Shuster M, Gollin SM, Veronese ML, Ohta M, Huebner K, Croce CM. FHIT gene alterations in head and neck squamous cell carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9770-5; 1996.
- Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 615-9; 1979.
- Wang X, Gleich L, Pavelic ZP, Li YQ, Gale N, Hunt S, Gluckman JL, Stambrook PJ. Cervical metastases of head and neck squamous cell carcinoma correlate with loss of heterozygosity on chromosome 16q. *Int J Oncol* 14: 557-61; 1999.
- Weber A, Dietz A, Tischoff I, Tannapfel A. [Role of epigenetics in the carcinogenesis of head and neck carcinomas - possible new targeted therapy?]. *Laryngorhinootologie* 86: 9-13; 2007.
- Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 24: 1016-9; 2000.
- Wilson C, Yang J, Strefford JC, Summersgill B, Young BD, Shipley J, Oliver T, Lu YJ. Overexpression of genes on 16q associated with cisplatin resistance of testicular germ cell tumor cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 43: 211-6; 2005.
- Wincewicz A, Sulkowska M, Koda M, Lesniewicz T, Kanczuga-Koda L, Sulkowski S. STAT3, HIF-1alpha, EPO and EPOR - signaling proteins in human primary ductal breast cancers. *Folia Histochem Cytobiol* 45: 81-6; 2007.
- Wittekind C, Weber A., Weidenbach, H. Pathologie und Prognosefaktoren von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. *Der Onkologe*: 498-504; 2001.
- Worsham MJ, Chen KM, Meduri V, Nygren AO, Errami A, Schouten JP, Benninger MS. Epigenetic events of disease progression in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 132: 668-77; 2006.
- Worsham MJ, Van Dyke DL, Grenman SE, Grenman R, Hopkins MP, Roberts JA, Gasser KM, Schwartz DR, Carey TE. Consistent chromosome abnormalities in squamous cell carcinoma of the vulva. *Genes Chromosomes Cancer* 3: 420-32; 1991.
- Wreesmann VB, Estilo C, Eisele DW, Singh B, Wang SJ. Downregulation of Fanconi anemia genes in sporadic head and neck squamous cell carcinoma. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 69: 218-25; 2007.
- Wreesmann VB, Shi W, Thaler HT, Poluri A, Kraus DH, Pfister D, Shaha AR, Shah JP, Rao PH, Singh B. Identification of novel prognosticators of outcome in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 22: 3965-72; 2004.
- Yang YG, Herceg Z, Nakanishi K, Demuth I, Piccoli C, Michelon J, Hildebrand G, Jasin M, Digweed M, Wang ZQ. The Fanconi anemia group A protein modulates homologous repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Carcinogenesis* 26: 1731-40; 2005.
- Yap YY, Hassan S, Chan M, Choo PK, Ravichandran M. Epstein-Barr virus DNA detection in the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 136: 986-91; 2007.
- Yen CC, Chen YJ, Lu KH, Hsia JY, Chen JT, Hu CP, Chen PM, Liu JH, Chiou TJ, Wang WS, Yang MH, Chao TC, Lin CH. Genotypic analysis of esophageal squamous cell carci-



- noma by molecular cytogenetics and real-time quantitative polymerase chain reaction. *Int J Oncol* 23: 871-81; 2003.
- Ylstra B, van den Ijssel P, Carvalho B, Brakenhoff RH, Meijer GA. BAC to the future! or oligonucleotides: a perspective for micro array comparative genomic hybridization (array CGH). *Nucleic Acids Res* 34: 445-50; 2006.
- Zhang W, Li M, Cao K, Yang J, Shi Q, Wang B, Jiang Z, Li H. Construction of eukaryotic expressing plasmids encoding HA and HA1 of influenza A virus and their transient expression in HEK293 cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 26: 225-7, 230; 2006.
- Zhang Z, Shi Q, Liu Z, Sturgis EM, Spitz MR, Wei Q. Polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 1188-93; 2005.
- Zhao X, Weir BA, LaFramboise T, Lin M, Beroukheim R, Garraway L, Beheshti J, Lee JC, Naoki K, Richards WG, Sugarbaker D, Chen F, Rubin MA, Janne PA, Girard L, Minna J, Christiani D, Li C, Sellers WR, Meyerson M. Homozygous deletions and chromosome amplifications in human lung carcinomas revealed by single nucleotide polymorphism array analysis. *Cancer Res* 65: 5561-70; 2005.
- Zhou X, Mok SC, Chen Z, Li Y, Wong DT. Concurrent analysis of loss of heterozygosity (LOH) and copy number abnormality (CNA) for oral premalignancy progression using the Affymetrix 10K SNP mapping array. *Hum Genet* 115: 327-30; 2004.
- Zitzelsberger H, Hieber L, Richter H, Unger K, Briscoe CV, Peddie C, Riches A. Gene amplification of atypical PKC-binding PARD3 in radiation-transformed neoplastic retinal pigment epithelial cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 40: 55-9; 2004.
- Zitzelsberger H, Lehmann L, Werner M, Bauchinger M. Comparative genomic hybridisation for the analysis of chromosomal imbalances in solid tumours and haematological malignancies. *Histochem Cell Biol* 108: 403-17; 1997.

---

**ANHANG**
**Anhang 1: Allgemeine TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung von HNO-Tumoren.**


---

**Klinische TNM-Klassifikation**


---

<b>Klassifikation</b>	<b>Bedeutung</b>
<u>T-Klassifikation</u>	
	<u>Ausdehnung und Größe des Primärtumors</u>
TX	- Keine Beurteilung des Primärtumors möglich
T0	- Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	- Carcinoma in situ
T1-4	- Zunehmende Größe und/oder lokale Ausdehnung des Primärtumors
<u>N-Klassifikation</u>	
	<u>Lymphknotenbefall in der Region</u>
NX	- Keine Beurteilung der regionären Lymphknoten möglich
N0	- keine regionären Lymphknoten befallen
N1-3	- Zunehmende Lymphknotenmetastasierung
<u>M-Klassifizierung</u>	
	<u>Fehlen bzw. Vorhandensein von Fernmetastasen</u>
MX	- Keine Beurteilung von Fernmetastasen möglich
M0	- Keine Fernmetastasen
M1	- Fernmetastase(n)

**Pathologische Klassifikation (p)**


---

<b>Klassifikation</b>	<b>Bedeutung</b>
<u>G-Klassifikation</u>	
	<u>Festlegung des Tumordifferenzierungsgrades</u>
GX	- Differenzierung kann nicht bestimmt werden
G1	- Gut differenziert
G2	- Mäßig differenziert
G3	- Schlecht differenziert
G4	- Undifferenziert

---

<u>R-Klassifikation</u>	<u>Fehlen oder Vorhandensein von Residualtumor nach erfolgter chirurgischer Behandlung</u>
RX	- Vorhandensein des Residualtumors kann nicht beurteilt werden
R0	- Kein Residualtumor
R1	- Mikroskopischer Residualtumor
R2	- Makroskopischer Residualtumor

### Stadiengruppierung

<b>Stadium</b>	<b>Einteilung</b>
Stadium I	T1, N0, M0
Stadium II	T2, N0, M0
Stadium III	T2, N0, M0 T1-3, N1, M0
Stadium VI	T4, N0-1, M0 T1-4, N2-3, M0 T1-4, N0-3, M1

**Anhang 2: Ergebnisse der chromosomalen CGH-Analyse von 117 Kopf-Hals-Tumoren.**

High Level Amplifikationen (HLA) sind unterstrichen.

Probe	DNA-Zugewinne	Deletionen
3680/97	1p22-31; 1q31-32; 2p11.2-35; 2q11.2-36; 3q13.3-qter; 9q21-33; 10p12-pter; 12p; 12q12-23; 13q12-31; 14q13-qter; 15q21-25; 18p	3p12-21
13989/97	3q; 5p; 8q12-qter; 13q12-31; <u>HLA 3q24-qter</u> ; 5p13-pter; 8q12-qter	-
4340/97	1q25-qter; 2q23-32; 3q26.1-qter; 4q23-26; 4q31.1-33; 5p; 8q22-qter; 12q21-22; <u>HLA 6p11.2-21.2</u>	7q36
2625/97	2p13; 2q31-34; 3q; 4q22-27; 5p; 7p11.2-14; 7q11.2-31; 9q; 11p12; 11q12-13; 12p; 12q12-13; 13q21-qter; 14q; 15q21-22; 17p; 17q11.2-21; 17q24-qter; 18p; 20p; 20q11.2; 22; <u>HLA 2q31-34</u>	1p21-31; 2q22-24; 2q36-37; 3p12-25; 4p16; 4q31.1-34; 5q12-qter; 8p21-22; 9p13-23; 11q21-24; 21q
5590/97	1p22-31; 2q22-34; 3q13.1-13.3; 4q22-27; 5q15-23; 6q13-qter; 9p24; 13q21-qter; 18q12-qter	-
12158/97	1q31; 3q26.1-qter; 12p; 12q12; 16; 21q22; 22q13; <u>HLA 12p</u>	5q32-34, 9p12-23
110/97	2q24-32; 3q13.1-13.3; 8q13-24.1; 12q14-21	-
3778/97	4q26-28; 5q14-23; 6q12-16	10q23-25; 16q22-24
5489/04	3q25-26.3; 4q12-26; 5q11.2-12; 6q12-16; 12q12-13	11p15
18171/97	1p22-31; 3q26.2-26.3; 5q14-23; 6q14-16; 12q12-2	17p12
24057/96	1q23-41; 2p15; 2q14.2-36; 3q; 4q13-31.3; 5p12-15.2; 5q13-21; 6p11.2-23; 6q21-25; 8p11.2-22; 8q11.2-24.2; 9p21-22; 9q13-32; 10p12-14; 10q11.2-23; 11p11.2-14; 11q13-23; 12p; 12q12-22; 13q13-22; 15q14-25; 17q11.2-22; 18q11.2-21; <u>HLA 3q; 10q21-24; 15q14-25; 18q11.2-21</u>	-
3688/97	1q31-32; 2q24; 4q24-28; 5p14; 6q16-24; 8q13-qter; 14q21-22; <u>HLA 8q13-24.2</u>	-
17685/98	2p16-22; 2q24-34; 3p12-14; 3q; 5q14-32; 12p11.2-13; 13q21-33; 14q13-22; 15q23-25	
26122/99	3q12-13.1; 20	9p12-13
28226/02	2q31-33; 3q12-13.3; 3q24-qter; 4q12-13; 4q22-28; 6q12-24; 8q21.3-24.1; <u>HLA 3q25-qter</u>	8p12-pter; 9q34; 11p12-pter; 11q13-14; 11q23-qter; 12q23-qter; 16q12.2-qter; 17p12-13; 20q12-qter
14938/01	1q; 2; 3q23-qter; 5p; 7q11.2-22; 8q13-24.2; 11q13; 12; <u>HLA 3q24-qter</u>	9p; 9q13-33; 21q22
22223/01	2q22-33; 3q23-qter; 4q21; 4q24-28; 5q21-22; 6q; 9p21-pter; 11q21-23; 13q21-31; 14q12-21; <u>HLA 3q25-qter</u>	15q23-24; 16q23-qter; 17p; 17q11.2-22; 20q
12844/96	-	1q21-22; 9p12-21; 9q13-21
15663/97	3q12-13.3; 3q24-qter; 4q; 5q12-23; 6q12-24; 9p22-pter; 12p; 12q12-21; 21q11.2-21	16q12.1-13 20q11.2-13.3
11316/00	3q; 8q23-qter; 12q15; 19q13.1-13.3	9p12-21
1029/04	1p12-31; 1q21-31; 2p13-23; 2q31-34; 3q; 4p15.1-16; 5p12-14; 5q11.2-23; 6q12-24; 7p11.2-14; 7q11.2-22; 8q; 12q12; 13q12-21; 14q11.2-21; 18p; 18q11.2-12; 20p; <u>HLA 2q32-33; 3q12-27; 7q21-22; 12p; 20p</u>	2q21-23; 3p; 4q26-32; 8p21-23; 9p12-22; 9q; 11p13-15; 11q14-qter; 12q22-qter; 13q22-qter; 15q21-qter; 16q23-qter; 17p; 20q12-qter; 21q21-qter
17212/05	3q; 13q21-32; <u>HLA 3q</u>	8p; 9p12-21; 9q; 15; 17p; 17q11.2-23
214/05	2q24-31; 3q; 4q12-26; 5q14-22; 7q21; 8q; 12q21; 13q31	3p13-22; 4p16; 8p12-pter; 9p12-13; 16; 20q
20739/02	1q31-qter; 3q; 8q22-qter; 9p21-pter; 12p11.2; 18p	15q11.2-14; 16q12.1-23
1169/01	1p12-33; 2q24-32; 3q12-13.3; 3q24-qter; 6p11.2-21.3; 7p; 8q11.2-24.1; 9p23-pter; 9q; 12p11.2-12; 12q21-22; 17q21-qter; <u>HLA 7q11.2-22; 9q13-33</u>	2q34-qter; 3p; 4p13-pter; 7q34-qter; 8p21-pter; 10q21-qter; 11p12-pter; 11q23-qter; 15q11.2-14; 15q22-qter; 16q21-qter; 18q12-qter
8080/99	3q26.1-qter; 8q24.1-qter; 17q25; 18p11.3; 19p13.3; 20p13	3p12-24; 8p21-pter; 9p12-23; 9q13-21
25139/01	1p13-31; 1q25-31; 1q44; 2q22-33; 3p12; 3q12-13.3; 3q22-qter; 4p12-13; 4q; 5p12-14; 5q11.2-13; 5q15-23; 6q12-24; 7p11.2-12; 8q11.2-24.2; 11p11.2-14; 12p; 13q14-31; <u>HLA 3q23-qter</u>	3p14-21; 7q31-qter; 8p21-22; 9q34; 10q23-26; 11p13-pter; 11q13; 11q23-qter; 12q23-qter; 14q31-qter; 15q22-25; 16q; 17; 20q; 21q22
4389/03 30450/03	2p14-16; 3q25-qter; 7p15-pter; 8q12-24.1; 10p11.2; 12p; 12q14-22; 14q21-23; 18p; <u>HLA 3q25-qter; 4q28-31.2</u>	3p21; 3p24-25; 8p21-pter; 11q13; 11q23; 16q24; 18q21-22; 20q11.2
17892/05	2q32-33; 3q12-13.1; 3q25-qter; 4q; 4p12-13; 6q12-21; 8q; 12p; 12q12-21; 18p	2q11.2-22; 3p14-23; 9p12-13; 20q11.2-31.1
537/05	3q26.1-qter; 9p22-pter; 12q12-22	1q21-24; 2q11.2-21; 3p21-25; 10q24-qter; 20q12-pter
30153/05	3q; 3p24; 8q22-24.2	-
12925/03	1p22-34.3; 1q31; 2q22-34; 3q; 5p13-15.1; 6; 7p15-pter; 7q11.2-31; 8q11.2-23; 10q21; 12p; 12q12-22; 14; 18p; <u>HLA 1p22-34.3; 12p; 12q13-21; 14q11.2-24</u>	3p; 4p16; 9p21-pter; 11; 13; 17p12-13; 18q21-qter; 21
27091/01	-	-
3872/05	1q31; 2q24-34; 3q12-13.3; 3q25-26.1; 4q; 5q11.2-31; 6q22-25; 8q23; 12q21; 13q14-31	9q34; 10q24-pter; 11q13; 12q24.1-qter; 14q32; 16; 17p; 17q11.2-21; 17q24-qter; 20q12-qter
36022/00	1p21-31; 2p15-16; 2q22-34; 3p12; 3q12-13.3; 3q25-qter; 4p12; 4q12-28; 5p12-14; 5q11.2-23; 6q12-24; 8q13-24.1; 10q21; 11q21-22; 12p11.2-12; 12q12; 12q15-21; 13q21-31; 14q11.2-21	8p21-pter; 9q32-qter; 10q25-qter; 11q12-13; 11q23; 12q24.1-qter; 15q23-25; 16; 17; 20
14654/00	3p25-pter; 3q; 4q12-27; 8; 18; 20p13; 22q13; <u>HLA 18</u>	11q22-qter; 13q12-33; 16q
10086/97	3p12; 3q29; 4q12-27; 5q35; 6q12-13; 8q11.2-13; 10p	16q12.1-21

Probe	DNA-Zugewinne	Deletionen
29770/03	1p12-22; 1q25-32; 3q; 5q15-22; 7p15; 7q11.2-31; 11q12-13; 12p; 12q12-21; 13q12; <u>HLA 3q24-27; 7q21-31</u>	2p23-pter; 8p21-pter; 9p; 9q31-qter; 13q32-qter; 17p; 17q24-qter; 20q11.2-13.2
7034/01	8q11.2-13; 20q12-qter	-
11568/97	1p22-33; 3q; 6p21.3-pter; 8q24.1; 12p13; <u>HLA 3q21-qter</u>	9p12-23; 13q12-31
22258/02	1q43-qter; 3q12-13.3; 3q24-qter; 5p; 6q22-24; 7p14-pter; 8q11.2-24.1; 9p21-pter; 12p; 12q12-22; <u>HLA 5p12-14; 9p21-pter</u>	7q11.2, 7q32-qter; 8p21-pter; 16; 17; 18q12-qter; 20p11.2-12; 20q13.1-qter
12890/02	1p21-31; 1q31; 2q22-33; 3p12; 3q12-13.3; 3q24-26.3; 4p12-14; 4q12-32; 5p13-14; 5q11.2-23; 6q12-23; 7p11.2-21; 8q12-23; 9p24; 11q14-22; 12q14-21; 13q14-31; 21q11.2-21	7q34-36; 9q33-qter; 10q25-qter; 11q23-24; 12q24.1-qter; 14q32; 15q22-26; 16; 17; 20q
20090/97	5p12-13; 9q22-qter	21q11.2
27674/05	1p21-22; 2p14-21; 2q22-33; 3q13.2; 3q24-qter; 4q22-28; 5q11.2-23; 6q12-24; 7q21-31; 8q21.1; 8q22-23; 12p11.2; 12q21; 13q21	3p14-21; 7q36; 9q34; 10q25-qter; 12q23-qter; 16; 17p; 17q11.2-12; 20q
31366/05	1p22-31; 1q31; 2q21-35; 3p22-23; 3q12-21; 3q24-26.3; 4q13-31.1; 5q11.2-23; 6q12-22; 7q31; 8q12-24.1; 9p; 11p14; 12p; 12q15-21; 14q24-32; 18q22	2q37; 4p16; 9q34; 10q24-qter; 11q13; 11q23-qter; 12q24.1-qter; 14q31-qter; 15q23-26; 16; 17; 20p11.2; 20q
2872/01	3q; 7p22; 7q11.2-21; 8q11.2-13; 8q24.1-qter; 19; 20q11.2-12	-
10633/95	4p12-13; 18	2p11.2-13; 2q11.2-21; 3p14-24; 8p21-pter; 17q12-23
26355/01	3q25-qter; 4q12-13; 12p	9p13; 15q13-21
18525/01	3q; 4q12-21; 12p; 12q12-21; 17q25	1q31-42; 2q11.2-21; 8p22-23; 9p13-21; 15q14-25; 20q11.2-13.2
21860/97	7q21-31; 11q12-13; <u>HLA 7q21-31; 11q12-13</u>	2p13; 2p23-25; 2q12-14.2; 4p15.3-16; 7q32-35; 9p21; 10p12-13; 10q25; 11q22-25; 18q22; 21q11.2-22
15681/97	3q; 6q12-14	2q36-37; 15q12-14; 11p15; 11q23
24419/98	1q41-qter; 2q33; 3q22-qter; 6q; 7p; 7q11.2-31; 8q12-qter; 9q21-qter; 10q21-22; 11q13; 14q11.2-22; 16q; 18p; <u>HLA 7q11.2-31; 9q21-qter; 10q22; 11q13</u>	2q35-36; 3p; 5q12-31; 6p21.1-21.3; 10p; 11q14-qter; 13; 15q22-25; 18q12-qter
23632/98	3q; 11q12-14; 19p13.3; <u>HLA3q; 11q12-14</u>	3p; 8p22; 13; 18q; 21q21-22
30170/98	-	4p15.3-16; 5p15.2; 8p21-pter
895/99	2q24-34; 3q; 6p; 6q22-24; 7q; 11p14-15; 11p11.2-q13; 14q22-23	1p; 2q36-37; 3p13-21; 3p23-pter; 4; 5q13-34; 8p21-pter; 9p12-21; 9q21-22; 10q; 11q22-24; 13q21-qter; 16q22-24; 18q12-22
26123/99	1q31; 2q24-34; 3q; 7q; 8q11.2-22; 11p14-pter; 12p13; 12q12-21; 14q13-24; 18p; <u>HLA 2q23-34; 7q</u>	4p15.3-pter; 4q31.3-32; 5q32-33; 8p21-pter; 9p13; 10q; 11q23-24; 13q31; 16q13-qter; 18q12; 20q12-13.2
33917/00	-	2q14.3; 3p24-25; 3p13-14; 5q33-34; 8p22; 11q23; 5q13; 18q12-22; 21q2
8826/01	1p13-22; 1q22-qter; 3q; 5p; 6q11.2-23; 6q12-24; 7p11.2-15; 7q11.2-31; 8p11.2; 8q; 10; 11q12-21; 12q12-14; 12q24.1-qter; 14; 15; 16q; 17; 19; 20; 22; <u>HLA 1q32-qter; 3q; 5p; 6p11.2-24; 7q11.2-31; 8q22-qter; 11q12-14; 14; 15; 16q</u>	1p31-32; 2p16-21; 2p23-pter; 2q22; 2q34-qter; 3p; 4; 5q13-qter; 7q33-qter; 9; 11p12-pter; 13; 21
2826/01	4q25-28; 7q21-31; 19	1q43; 10q25
26965/01	1p13-22; 1q22-qter; 2p22; 2q12-14.1; 3q; 6p11.2-21.1; 6q22-23; 12q13-15; 14q13-23; 17q; 19; 20q; 22; <u>HLA 3q; 6p11.2-21.1; 6q22-23</u>	1p31-32; 3p; 4; 5q32-33; 13; 18q12-qter; 21
5306/01	1p32-34.3; 11q12-13	4p15.3-16; 18q12-21,
13102/98	3q27-qter; 11q13; <u>HLA 3q27-qter</u>	13q31-33
26733/97	3q25-27; 7p11.2-21; 8q; 9q33-qter; 11q12-13; 14q21-24; 15q22-23; 18p; <u>HLA 8q</u>	3p12-14; 3p22-26; 6p23-pter; 6q16-26; 8p12-pter; 9q13-21; 10p12-14; 18q21-23
3126/97	1q23-31; 2q31-33; 12p; 12q12	4p15.3-16; 9p13; 10q25-26; 11p13-15; 11q23-qter; 18q22-23
31565/97	14q21-24; 15q22-23; 18p; <u>HLA 8q</u>	4p15.3-16; 9p13; 10q25-26; 11p13-15; 11q23-qter; 18q22-23
14936/97	1q23-31; 2q31-33; 12p; 12q12	4p15.3-16; 9p13; 10q25-26; 11p13-15; 11q23-qter; 18q22-23
14215/97	3q24-26.3; 12p11.2-pter; 12q13-21; 14q21-22	-
35496/99	1q32; 3q; 4q27-33; 6q15; 7p; 7q11.2-q31; 8q11.2-24.1; 11q12-13; 12q12-14; 14q32; 15q25-qter; 17q11.2-21; 18p; 19q; 20q13.1-qter; <u>HLA 7q11.2-31; 8q22-23</u>	3p12-14; 3p23-pter; 4p14-pter; 5p14-pter; 7q32-qter; 8p12-pter; 9p; 9q22-qter; 11p; 11q22-qter; 13q14-q33; 18q12-qter; 21
8209/98	2p11.2-15; 2q24-32; 3q24-qter; 7q21-22; 10p; 11q12-14; 12q12-13; <u>HLA 10p; 11q13-14</u>	3p14; 9q34; 16q22-qter; 18q21-22,
7215/98	1q21-32; 2q24-33; 7p11.2-13; 7q22-31; 11q13-22; 20q11.2-12	3p13-21; 4p15.3-pter; 8p22; 11q23-qter; 13q32,
4762/99	-	3p23-24; 4p15.2; 5q32-34; 9p13-21; 11q23-qter; 18q21
26271/98	3q24-qter; 9p23-pter; 11q13; 14q22	3p24-pter; 3p13-14; 4p16; 8p22-pter,
88/99	1q41-qter; 3q23-qter; 5p12-15.1; 8q; 11q12-14; 12q12-21	2q13-21; 2q36-qter; 3p14-21; 3p24; 4p16; 5q32-34; 8p22-pter; 9p13-22; 9q21-31; 10q25-qter; 16q23-qter;
19135/98	19p	2q12-14.3; 3p14-21; 5p14-15.2; 9p21-23; 15q11.2-13; 15q22-24
25805/97	1q31-32; 2q31-32; 3q; 6q27; 8q22-24.1; 9q13-31; 11q13; 12p; 12q13-21; 18p; 18q11-2-12; <u>HLA 2q31-32; 3q; 12q13-21</u>	3p12-21; 4p15.3-16; 4q28-31.2; 4q31.3-34; 5q33-qter; 8p21-pter; 10p12-14; 10q25-qter; 11p13-pter; 11q14-qter; 12q22-qter; 13q12-14; 13q32-qter; 16q21-qter; 18q22-qter; 20q13.2-qter
25288/99	6q12-16	2p23; 8p21-22; 10q24-25; 11q23-24; 16q22-23; 18q2
25610/99	7q21-31; 8q21.3; 11q12-13; 12p; 20p11.2-12; <u>HLA 11q12-13</u>	5p14-15.1; 9p21-pter; 10p12-13; 10q26; 11q23-25; 18q21-22; 21q21-22
24933/99	1q21-qter; 2p11.2-21; 2q31-33; 3q; 7p; 7q11.2; 11q12-13; 17q11.2-12; 20p; <u>HLA 2q31-33; 11q13; 20p</u>	2q35; 3p; 4p15.1-16; 4q26-34; 5q12-35; 6p23-25; 6q21; 8p12-pter; 9p13-pter; 10p12-14; 11p15; 11q23-25; 13q12-33; 18q12-22; 21q21

Probe	DNA-Zugewinne	Deletionen
24106/99	1q21-32 ; 2q11.2-14.3 ; 3q24-qter ; 6p11.2-21.3 ; 7q11.2-31 ; 8q21.3-22 ; 9p ; 9q33-qter ; 11q12-13 ; 12q12-14 ; 17p12-pter ; 17q11.2-23 ; 19 ; <u>HLA 3q24-qter ; 9p ; 11q12-13</u>	1p13-34.1 ; 2p24-pter ; 2q32-37 ; 3p12-14 ; 3p22-26 ; 4 ; 5q12-34 ; 5p15.1-15.2 ; 11q21-23 ; 13q12-33 ; 20p11.2-13 ; 21
19497/99	9q34	3p14 ; 3p22-25 ; 4q33-34 ; 11q23-qter ; 18q21-23
28079/99	19	11q23-24
35007/99	1p33-pter ; 1q41-42 ; 3q26.3-qter ; 6p21.3-pter ; 11q12-13 ; 14q22 ; 15q21-qter ; 17q21 ; 17q24-qter	2p23-pter ; 3p12-14 ; 4p15.1-pter ; 5q32-34 ; 8p21-pter ; 9p ; 9q21-33 ; 10q26 ; 11p12-15 ; 13q31-qter ; 18q12-22 ; 20p12 ; 21q11.2-21
29783/99	1p32-pter ; 1q32-qter ; 2p15-pter ; 3q22-qter ; 4p16 ; 6p21.2-21.3 ; 8q24.1-qter ; 11q12-13 ; 14 ; 16p ; 16q23-qter ; 17 ; 19 ; 20q ; 22 ; <u>HLA 1p32-pter ; 1q32-qter ; 2p14-pter ; 11q12-13 ; 14 ; 17 ; 20q ; 22q</u>	3p12-14 ; 3p22-pter ; 4q13-33 ; 9p13-pter ; 11q14-23 ; 18q22-23
24806/99	1q21-23 ; 2p15-16 ; 3q ; 4q28 ; 7q21-22 ; 11q12-13 ; 12p ; 12q12-13 ; 17q11.2-21 ; 19 ; <u>HLA 2p14-16 ; 11q12-13</u>	3p13-21 ; 3p24 ; 4p15.2-16 ; 6q25-qter ; 7q32-36 ; 8p21-pter ; 9p21-23 ; 9q31-33 ; 11q21-25 ; 13q14-33 ; 16q13-23 ; 21q11.2-21
26538/99	1q ; 2q31-34 ; 3q27-qter ; 6p11.2-22 ; 9p21 ; 11p11.2-13 ; 11q12 ; 12q13 ; 14q13-24 ; 15q15-22 ; 19p	1p31 ; 3p ; 4p14-16 ; 4q26-35 ; 5q32-35 ; 10q25-qter ; 18q ; 20p11.2-12 ; 21q11.2-21
26380/99	3q24-26.3 ; 5p ; 7q21-22 ; 8q12-qter ; 9q ; 11q12-14 ; 15q15-qter ; <u>HLA 5p ; 11q12-14</u>	2q34-37 ; 3p13-pter ; 4p15.1-pter ; 6q14-16 ; 7q31-qter ; 8p ; 10p12-15 ; 11q21-24 ; 18q12-23
30562/99	2q32-34 ; 3q12-13.2 ; 3q24-qter ; 14q12-13	4p15.3-pter ; 9p21-23 ; 11q23-25
34602/99	-	5q32-34 ; 9p13-21 ; 11p14-15 ; 11q22-24
34230/99	4q28	8p22 ; 12q23-24.1 ; 16q23
23263/99	1p32-pter ; 1q23 ; 6p21.3 ; 7q11.2-31 ; 8q22-qter ; 11q12-23 ; 12q24.2-qter ; 14q21-24 ; 17q11.2-21 ; 19 ; 20q12-qter ; 22q12-qter ; <u>HLA 1p32-pter ; 7q11.2-31 ; 11q12-23</u>	1p22-31 ; 2q22-32 ; 3p24-pter ; 4p15.1-16 ; 4q22-34 ; 7q32-36 ; 8p21-pter ; 9p12-23 ; 10p ; 13q21-31 ; 18q12-23 ; 21q11.2-21
44/00	1p31-pter ; 1q21-qter ; 6p21.1-pter ; 7p11.2-15 ; 7q11.2-31 ; 8q23-qter ; 10p ; 10q26 ; 11q12-13 ; 12p13 ; 12p11.2 ; 12q12-13 ; 12q23-qter ; 14q11.2-13 ; 14q24-qter ; 15 ; 16p ; 16q22-qter ; 17p12-13 ; 17q ; 19 ; 20q ; 22q ; <u>HLA 1p31-pter ; 1q ; 8q23-qter ; 10p ; 11q12-13 ; 14q11.2-13 ; 15 ; 16p ; 17</u>	1p21-22 ; 3p12-13 ; 3p24 ; 4q13-22 ; 4q27-28 ; 5q15-23 ; 6q14-23 ; 8q13-21.2 ; 9p ; 11q14-24 ; 13q12-32 ; 21q11.2-21
36020/99	3q	-
35890/99	19	4p15.1-15.3 ; 4q34 ; 5p13-15.2 ; 5q34 ; 8p21-22 ; 9p13-23 ; 16q22-23 ; 18q22
5150/00	1q32-qter ; 1q21-23 ; 3q24-qter ; 6p21.3-22 ; 11q12-13 ; 17q11.2-21 ; 17q25 ; 19p ; <u>HLA 3q23-qter</u>	3p12-14 ; 3p24-25 ; 4p15.3-pter ; 4q32-34 ; 9p13-23 ; 11q23-24 ; 13q22-31
5267/00	1q ; 2q32-36 ; 3q ; 5p12-15.1 ; 6p12-21.3 ; 8q ; <u>HLA 1q ; 3q ; 8q</u>	3p13-pter ; 4p13-pter ; 4q34-qter ; 5q21-qter ; 8p12-pter ; 9p13-pter ; 10q ; 11q21-qter ; 13q12-21 ; 14 ; 15 ; 16 ; 17p12-pter ; 18q12-qter
33927/00	11q12-13 ; 19	4p15.3 ; 5q34 ; 9p13-24
35624/00	1q21-32 ; 2p12-24 ; 3q21-qter ; 5p15.3 ; 6p11.2-21.3 ; 6q12-22 ; 7p22 ; 7q11.2 ; 7q22-31 ; 8q22-qter ; 9q22-qter ; 11q12-13 ; 12p11.2 ; 15q21-24 ; 16p ; 17 ; 19q ; 20q ; <u>HLA 1p34.2-pter ; 2p12-24 ; 3q21-qter ; 6p11.2-21.3 ; 16p ; 17 ; 19q</u>	1p13-32 ; 2q34-37 ; 3p ; 4 ; 5q15-32 ; 8p21-pter ; 9p13-pter ; 11p11.2-15 ; 11q21-25 ; 13q12-33 ; 16q21-23
33275/00	1p34.1-pter ; 3q21-qter ; 9q22-14 ; 11q12-13 ; 17q23-qter ; 18p ; 19 ; 20q ; 22q12-qter ; <u>HLA 3q13.3-qter ; 9q21-qter ; 11q12-14 ; 17q23-qter ; 22q12-qter</u>	3p21-26 ; 4p13-pter ; 8p12-23 ; 9p13-24 ; 11q21-25 ; 13q12-21 ; 18q12-22 ; 21q11.2-22
30630/00	3q ; 4q26-31.3 ; 5p13 ; 7q11.2-22 ; 10q11.2-23 ; 11q12-14 ; 12q12-13 ; 19p ; 20q ; <u>HLA 11q12-14</u>	1q32 ; 3p ; 5q14-21 ; 5q33-34 ; 7q31-36 ; 9 ; 11p12-pter ; 13 ; 16q13-24 ; 17q22-24 ; 21q11.2-21
14455/00	1p32 ; 2p16-23 ; 3q24-qter ; 6p11.2-21.3 ; 8q22-qter ; 12q12-21 ; 14q22-24 ; <u>HLA 12q12-21</u>	3p13-21 ; 4p15.2-16 ; 11q23 ; 13q22-32
28714/00	3q13.1-qter ; 5q21-22 ; 7p15-pter ; 11q12-14 ; 12q14-15 ; <u>HLA 3q13.1-qter ; 7p13-pter ; 11q12-14</u>	2p23-24 ; 3p14-21 ; 3p24-pter ; 7q36 ; 9p13-23 ; 11q23-qter ; 17p12-pter ; 18q12-22 ; 21q
14452/00	3q21-qter ; 6p21.3-pter ; 8q ; 9p21-pter ; 12p11.2 ; 15q21-22 ; 16q23-qter ; 18p	2p11.2-13 ; 2q14.1-21 ; 2q36-37 ; 3p ; 4p15.1-16 ; 5p15.3 ; 7q32-qter ; 8p12-pter ; 9q31-34 ; 10q24-26 ; 11p12-pter ; 11q14-qter ; 12q24.1-qter ; 13q12-33 ; 17p12-13 ; 18q12-qter ; 20p12-pter
15303/00	3q ; 8q21.1-21.3 ; 19	5q33-35 ; 6q13-14 ; 8p22-pter ;
13111/00	5q15-21	10p13-pter ; 21q21-qter
13799/00	1p36.2-pter ; 9p ; 15q21 ; 20p ; 20q11.2-13.2	2q14.3-22 ; 4p15.2-16 ; 8p12-pter ; 10q25-26 ; 11q23-25 ; 18q
25165/00	1p34.2-pter ; 1q ; 2q31-33 ; 4q22-26 ; 12q12-13 ; 15q15-22 ; 18p ; 19p	1p13-22 ; 3p ; 4p14-pter ; 5q32-35 ; 8p21-22 ; 9p13-pter ; 10p12-pter ; 11p14-15 ; 18q12-qter
28731/00	1p34.3-pter ; 1q ; 3q ; 4q12-22 ; 9q22-31 ; 11q12-14 ; 15q21-22 ; 16q ; 17q11.2-12 ; 18p ; 19 ; 19q13.2-13.4 ; 20q ; <u>HLA 1q ; 3q ; 4q12-22 ; 9q22-31 ; 11q12-14 ; 16q ; 20q</u>	3p ; 4p ; 8p21-pter ; 9p ; 10p12-pter ; 11q21-qter ; 13q14-32 ; 18q21-qter ; 21
11795/00	1p34.3-36.1 ; 1q22-25 ; 3q21-qter ; 6p21.2-23 ; 7p ; 9q21-qter ; 11q12-13 ; 13q12-14 ; 19p ; 20 ; <u>HLA 1p34.3-36.1 ; 3q21-qter ; 9q21-qter ; 11q12-13 ; 13q12-21</u>	1p31 ; 2q34-qter ; 3p ; 4p13-pter ; 4q28-35 ; 5q ; 21q11.2-22
1339/01	2p11.2-22 ; 2q11.2-35 ; 3q23-qter ; 7q21-qter ; 8p11.2-12 ; 8q11.2-24.1 ; 12p11.2-12 ; 12q12-23 ; 13q14-21 ; 20p13 ; <u>HLA 3q23-qter ; 8p11.2-12 ; 12q12-23</u>	1q32-41 ; 1q43-qter ; 2p23-pter ; 2q36-qter ; 3p ; 4p13-pter ; 4q22-qter ; 5q14-22 ; 6p23-pter ; 8p21-pter ; 9p13-pter ; 10q25 ; 11p ; 11q22-24 ; 12q24.2-qter ;
4525/01	1q22-qter ; 2q32-33 ; 3q13.1-qter ; 6p21.1-pter ; 6q23-25 ; 7q11.2-33 ; 8q11.2-21.3 ; 8q23 ; 11q12-13 ; 12p ; 12q13-21 ; 17q11.2-21 ; 17q24-qter ; 20q12-13.1 ; 22q ; <u>HLA 1q22-qter ; 11q12-13 ; 12p ; 12q13-21</u>	4p15.1-pter ; 5p14-pter ; 8p21-pter ; 9p12-23 ; 9q31-34 ; 10q24-qter ; 11p12-15 ; 11q14-qter ; 13q14-qter ; 14q24-qter ; 21
2547/01	6p21.3 ; 11q13 ; 14q22-24 ; 15q21-22 ; 17q21-qter ; 20q13.1-13.2 ; 22q13	3p12-13 ; 4p15.2-15.3 ; 8q12 ; 9p13 ; 18q12-22

<b>Probe</b>	<b>DNA-Zugewinne</b>	<b>Deletionen</b>
5617/01 5161/01	5p ; 6p21.3 ; 8q21.3 ; 11q13-21 ; 12p ; 15q14-23 ; 19q ; 22; <u>HLA 11q12-21</u>	2q21-23 ; 3p ; 4q35 ; 9p13-23 ; 10p12-14 ; 10q24-qter ; 12q21-qter ; 18q12-22
33611/99	1q31-32 ; 2p13-22 ; 2q24 ; 3q21-qter ; 7p12-21 ; 8q13- 22 ; 13q14-22	6q26-qter ; 9q34 ; 10q25-qter,
8862/00	3q13.1-13.3 ; 3q26.2 ; 6q16	12q24.2 ; 17q21 ; 20q12-qter
12547/00	2q31-33 ; 6q12-15 ; 12q12-14	-
10394/00	4 ; 6q21-22 ; 8q21.1-21.3 ; 12p11.2-12	11q23-qter ; 14 ; 15 ; 16q12.1-23
3531/01	1q32 ; 2q32-34 ; 4q24-28 ; 5q14-21 ; 6q13-23 ; 8q21.1- 22	3p13-21 ; 8p22-pter ; 10p12-14 ; 12q24.1-24.2 ; 16q13- 23 ; 17p11.2-12
26989/99	1p12-34.1 ; 2q24-35 ; 3q26.1-28 ; 5p15.1-pter ; 7p21 ; 7q11.2-22 ; 13q13-qter	3p14-qter ; 4p15.3-pter ; 5q33-qter ; 6q25-qter ; 8p11.2- 22 ; 9q34 ; 11q23-24 ; 12p12-pter ; 17q21 ; 18q21-23 ; 20p
32180/99	1q31-32	-

**DANKSAGUNG**

Die vorliegende Dissertation der Ludwig-Maximilians-Universität München wurde am Institut für molekulare Strahlenbiologie in der Arbeitsgruppe Zytogenetik des Helmholtz Zentrums München unter der Leitung von Herrn PD Dr. H. Zitzelsberger durchgeführt.

Mein erster und besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. H. Zitzelsberger für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die vorbildliche Betreuung meiner Arbeit, für die großartige Unterstützung und die geduldige Bereitschaft alle auftretenden Fragen und Probleme schnellstmöglich zu beantworten und zu lösen.

Herrn Prof. Dr. J. Wienberg, Department Biologie II: Humanbiologie der LMU München danke ich sehr für seine Bereitschaft das Erstgutachten zu erstellen.

Bei Herrn Prof. Dr. med. T. Cremer, Department Biologie II: Humanbiologie der LMU München, bedanke ich mich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Ein großes Dankeschön gilt auch Herrn PD Dr. med. A. Walch und U. Buchholz für ihre großartige Unterstützung bei der Ausführung und Auswertung der IHC-Experimente.

Ganz besonders möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Zytogenetik für das angenehme Arbeitsklima und die immerwährende Hilfsbereitschaft bei kleineren und größeren Problemen bedanken. Ein außerordentlicher Dank geht an dieser Stelle an Herrn H. Braselmann für seine unverzichtbare Hilfe und Unterstützung bei den statistischen Fragestellungen meiner Arbeit sowie an Herrn Dr. L. Hieber und Frau E. Konhäuser für ihre tatkräftige Unterstützung bei zahlreichen Experimenten und in der Zellkultur. Ein Riesendankeschön geht natürlich auch an meine „Doktor-Kollegen“ K. Unger und K. Heiliger für ihre außerordentliche Hilfsbereitschaft und für die gute Zusammenarbeit.

Von ganzem Herzen möchte ich mich schließlich bei meinen Eltern und meinem Freund Jörg bedanken, die mich während der gesamten Promotion unterstützt haben und immer für mich da waren.



## **CURRICULUM VITAE**

**VERENA L. BAUER**

\*15.05.1978 in Sorengo (CH)

### **SCHULBILDUNG**

---

1984 – 1989 Grundschule der Europäischen Schule Varese (Italien)

1989 – 1996 Gymnasium der Europäischen Schule Varese (Italien)

1996 Allgemeine Hochschulreife, Abitur

### **HOCHSCHULAUSSCHULUNG**

---

1997 – 2000 Grundstudium Diplombiologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München

2000 Vordiplom

2000 – 2003 Hauptstudium Diplombiologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München im Hauptfach Humangenetik. Nebenfächer: Molekulare Zellbiologie, Genetik und Pharmakologie/Toxikologie

2004 Diplom der Biologie

2005 – 2008 Promotion in der Arbeitsgruppe Zytogenetik des Instituts der Molekularen Strahlenbiologie, Helmholtz Zentrum München

### **PRAKTIKA**

---

1996 – 1997 Praktikum am European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) des Joint Research Centres (JRC) in Ispra, Italien

### Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den .....

(Unterschrift)

### Erklärung

Hiermit erkläre ich, \*

- dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist.
- dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg **nicht** unterzogen habe.
- dass ich mich mit Erfolg der Doktorprüfung im Hauptfach .....  
und in den Nebenfächern .....  
bei der Fakultät für ..... der .....  
(Hochschule/Universität)  
unterzogen habe.
- dass ich ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

\*) Nichtzutreffendes streichen