

Aus der Abteilung für Medizinische Genetik  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. Jan Murken

**Entwicklung  
neuer molekularzytogenetischer Verfahren  
für die Tumordiagnostik**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Isabell Jentsch  
aus  
München  
2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. Michael Speicher
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. J.-U. Walther Prof. Dr. St. K. Bohlander
Dekan	Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung	12.12.2003

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Neuroblastom .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Allgemeines .....	1
1.1.2 Entstehung.....	3
1.1.3 Stadieneinteilung .....	4
1.1.4 Genetik .....	5
1.1.4.1 Genetische Prädisposition.....	5
1.1.4.2 Genetische Veränderungen .....	6
1.1.5 Stadieneinteilung nach zytogenetischen Gesichtspunkten: Modell zur Tumorentstehung.....	12
1.1.6 Symptomatik .....	14
1.1.7 Diagnostik .....	14
1.1.8 Therapie.....	16
1.1.9 Prognose .....	16
<b>1.2 Multiplex-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung .....</b>	<b>17</b>
1.2.1 Technik .....	17
1.2.2 Vor- und Nachteile von M-FISH .....	21
1.2.3 Konventionelle Techniken bei der Analyse von Maus-Chromosomen .....	23
1.2.3.1 G-Banden .....	23
1.2.3.2 Vielfarben-FISH bei der Maus .....	24
<b>1.3 Aufgabenstellung und Zielsetzung der Doktorarbeit .....</b>	<b>26</b>
1.3.1 Interphase Zytogenetik beim Neuroblastom .....	26
1.3.2 Maus 7 Fluorochrom M-FISH .....	27
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>30</b>
<b>2.1 Schematische Darstellung der verwendeten Protokolle.....</b>	<b>30</b>
2.1.1 Übersicht: Vorbereitung der DNA-Sonden .....	31
2.1.2 Übersicht: Vorbehandlung der Präparate.....	32
2.1.3 Übersicht: Hybridisierung .....	33
2.1.4 Übersicht: Nachweis.....	34

2.1.5	Übersicht: Aufnahme und Auswertung.....	35
<b>2.2</b>	<b>Neuroblastom: In-situ-Hybridisierung mit BACs und YACs auf Zelllinien.....</b>	<b>36</b>
2.2.1	Isolierung von BACs.....	36
2.2.1.1	Ansetzen einer Übernacht-Kultur aus Glycerol-Stocks.....	36
2.2.1.2	Isolierung von Region-spezifischer DNA aus BACs mittels Minipräp.....	37
2.2.2	Amplifikation von BACs und YACs.....	38
2.2.2.1	DOP-PCR.....	38
2.2.2.2	Alu-PCR.....	41
2.2.3	Nicktranslation.....	44
2.2.4	Salz-Ethanol-Fällung.....	45
2.2.5	Chromosomenpräparation.....	47
2.2.6	In-situ-Hybridisierung des kombinatorischen Nb-Pools.....	49
2.2.6.1	Vorbehandlung der Präparate.....	49
2.2.6.2	Vorbehandlung der gefällten Probe.....	50
2.2.6.3	Hybridisierung.....	51
2.2.7	Nachweis der hybridisierten Proben.....	51
2.2.8	Aufnahme und Auswertung.....	52
2.2.8.1	Mikroskopie.....	52
2.2.8.2	Statistische Analyse.....	53
<b>2.3</b>	<b>Neuroblastom: Interphase-FISH auf Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten.....</b>	<b>54</b>
2.3.1	Patienten mit Neuroblastom.....	54
2.3.2	Vorbehandlung von Formalin-fixierten Paraffinschnitten mit 10 µm Dicke.....	54
2.3.3	Centromer-spezifische Sonden.....	55
2.3.3.1	Allgemeines.....	55
2.3.3.2	Amplifikation von Centromer-Sonden mittels Insert-PCR.....	56
2.3.3.3	Nicktranslation.....	58
2.3.3.4	Verdünnung der nicktranslatierten Centromer-Sonden.....	59
2.3.3.5	In-situ-Hybridisierung der Centromer-Sonden.....	59
2.3.3.6	Nachweis.....	60
2.3.3.7	Aufnahme und Auswertung.....	61
2.3.4	BACs und YACs für eine Regionen-spezifische Hybridisierung.....	61
2.3.4.1	PCR-Amplifikation.....	61
2.3.4.2	Nicktranslation.....	62
2.3.4.3	Salz-Ethanol-Fällung.....	63
2.3.4.4	In-situ-Hybridisierung der gefällten Proben.....	64
2.3.4.5	Nachweis der hybridisierten Proben.....	65
2.3.4.6	Aufnahme und Auswertung.....	66

<b>2.4</b>	<b>Maus 7 Fluorochrom M-FISH.....</b>	<b>72</b>
2.4.1	Maus-Chromosomen spezifische DNA-Bibliotheken .....	72
2.4.2	Amplifikation der Chromosomen-spezifischen DNA-Bibliotheken .....	72
2.4.3	DNA-Pools für Maus 7 Fluorochrom M-FISH.....	75
2.4.3.1	Erstellung von DNA-Pools.....	75
2.4.3.2	Markierung der einzelnen DNA-Pools mit Fluorochromen.....	76
2.4.3.3	DNase-Verdau.....	79
2.4.4	21-Farben Ansatz für Maus 7 Fluorochrom M-FISH.....	80
2.4.5	Salz-Ethanol-Fällung .....	81
2.4.6	Maus-Chromosomen.....	82
2.4.6.1	Allgemeines .....	82
2.4.6.2	Normale Maus-Metaphasen: Präparate aus der Milz.....	82
2.4.6.3	Maus Tumoren .....	82
2.4.7	In-situ-Hybridisierung auf Maus-Chromosomen.....	83
2.4.7.1	Vorbehandlung der Präparate .....	83
2.4.7.2	Vorbehandlung des gefällten Maus 7 Fluorochrom M-FISH Pools.....	84
2.4.7.3	Hybridisierung.....	85
2.4.8	Nachweis der hybridisierten Proben.....	85
2.4.9	Aufnahme und Auswertung .....	86
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>87</b>
<b>3.1</b>	<b>Neuroblastom: In-situ-Hybridisierung mit BACs und YACs auf Zelllinien.....</b>	<b>87</b>
3.1.1	Allgemeines .....	87
3.1.2	Hybridisierung auf 46,XY.....	88
3.1.3	Hybridisierung auf Neuroblastom-Zelllinien .....	92
3.1.3.1	Zelllinie Nb90.9.....	92
3.1.3.2	Zelllinie TR-14 .....	97
3.1.3.3	Zelllinie SKN-BE .....	101
<b>3.2</b>	<b>Neuroblastom: Interphase-FISH auf Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten .....</b>	<b>106</b>
3.2.1	Allgemeines .....	106
3.2.2	Problematik der Autofluoreszenz .....	107
3.2.3	Beurteilung der verwendeten Gewebeschnitt-Dicke .....	108
3.2.3.1	Berechnung der Hybridisierungs-Effizienz mit Hilfe von 46,XY Lymphozyten.....	108
3.2.3.2	Hybridisierung der Centromer-Sonden auf Gewebeschnitte .....	111
3.2.3.3	Ermittlung der Zellkerndicke mittels 3D-Rekonstruktion .....	114
3.2.4	Hybridisierung von einfach markierten BACs und YACs auf 46,XY Lymphozyten: Berechnung der Hybridisierungs-Effizienz.....	115

3.2.5 Gewebeschnitte von Patientin TJ.....	118
3.2.5.1 Klinik .....	118
3.2.5.2 Allgemeines .....	118
3.2.5.3 Ergebnisse der Analyse des normalen Gewebes .....	121
3.2.5.4 Ergebnisse der Analyse des Tumorgewebes.....	123
3.2.6 Gewebeschnitte von Patientin HV.....	126
3.2.6.1 Klinik .....	126
3.2.6.2 Allgemeines .....	126
3.2.6.3 Ergebnisse der Analyse des Tumorgewebes.....	129
3.2.7 Gewebeschnitte des Rezidivs HV-R .....	131
3.2.7.1 Klinik .....	131
3.2.7.2 Allgemeines .....	131
3.2.7.3 Ergebnisse der Analyse des Tumorgewebes.....	133
3.2.7.4 Ergebnisse der Analyse der Zellen mit normalem Hybridisierungsmuster .....	135
<b>3.3 Maus 7 Fluorochrom M-FISH.....</b>	<b>140</b>
3.3.1 Allgemeines .....	140
3.3.2 M-FISH Analyse von normalen Metaphasen .....	141
3.3.3 Analyse verschiedener Maus-Zelllinien.....	146
3.3.3.1 TSA.....	146
3.3.3.2 AG12.....	149
<b>4 DISKUSSION.....</b>	<b>153</b>
<b>4.1 Allgemeine Strategien der Tumor-Zytogenetik .....</b>	<b>153</b>
<b>4.2 Neuroblastom: Analyse von Zelllinien .....</b>	<b>154</b>
4.2.1 Allgemeines .....	154
4.2.2 Verwendete Zelllinien und Sonden; Vorbehandlung.....	155
4.2.3 Beurteilung der Ergebnisse .....	156
<b>4.3 Neuroblastom: Analyse von Gewebeschnitten.....</b>	<b>157</b>
4.3.1 Allgemeines .....	157
4.3.2 Problematik der Autofluoreszenz .....	158
4.3.3 Gewebeschnitte und Vorbehandlung .....	159
4.3.4 Wahl der Sonden.....	160
4.3.5 Aufnahme und Dekonvolution .....	161
4.3.6 Beurteilung der Ergebnisse .....	164
4.3.7 Korrelation von Zytogenetik und klinischen Daten.....	167
4.3.8 Prognostische Modelle .....	171

<b>4.4</b>	<b>Maus 7 Fluorochrom M-FISH.....</b>	<b>173</b>
4.4.1	Allgemeines .....	173
4.4.2	Auflösungsvermögen von 7 Fluorochrom M-FISH.....	174
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....</b>	<b>177</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>180</b>
6.1	Verwendete Reagenzien .....	180
6.2	Abkürzungsverzeichnis .....	182
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>184</b>
	<b>PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>202</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>204</b>
	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>205</b>
	<b>ANLAGE .....</b>	<b>206</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Neuroblastom

### 1.1.1 Allgemeines

Neuroblastome sind Tumoren des sympathischen Nervensystems. Bei dieser Art von Tumor konnten im Vergleich zu anderen pädiatrischen Tumorerkrankungen in Bezug auf Behandlung bislang nur geringe Erfolge erzielt werden.

Die genetischen Veränderungen der Neuroblastome sind sehr heterogen, und bis heute wurde kein einzelnes Gen identifiziert, das Hinweise auf den Entstehungsmechanismus dieses Tumors geben könnte.

In vielen pädiatrischen Tumoren werden bezüglich der Tumorentstehung wenige oder sogar nur einzelne zytogenetische Ereignisse beschrieben, wie zum Beispiel spezifische Translokationen mit folgender Onkogen-Aktivierung oder Deletionen, die zu einem Verlust der Tumorsuppressorfunktion führen. Beispielsweise weist das Ewing-Sarkom Veränderungen im EWS-Gen auf; diese Veränderungen scheinen eine große Rolle bei der Initiierung der Tumorgenese zu spielen, indem eine reziproke Translokation t(11;22) eine Fusion des EWS-Gens mit einem Mitglied der ETS Onkogen-Familie zur Folge hat (Delattre et al. 1994). In anderen Tumoren wie dem Retinoblastom sind nach der so genannten „*Two Hit* Hypothese“ nach Knudson (Knudson 1971) zwei Mutationen in einem Tumorsuppressor-Gen ausreichend für die Entartung einer Zelle.

Solide Tumoren machen den Hauptteil der Krebserkrankungen aus. Bislang ist nur wenig über die zum Teil sehr komplexen Entstehungsmechanismen von soliden Tumoren sowie über die genetischen Ursachen der Proliferation, Infiltration und Metastasierung bekannt.

Um eine Einsicht in bislang beschriebene Mechanismen zur Entstehung, Disseminierung und in molekularzytogenetische Aspekte an Neuroblastomen zu erlangen, werden weltweit intensive Forschungen durchgeführt. So wurde bereits seit 1864 in Publikationen über die histologische Erscheinung (Virchow et al. 1864) berichtet, sowie in zahlreichen späteren Publikationen verschiedener Autoren Erkenntnisse über den Ursprung des Tumors, seine metabolische Aktivität, seine Differenzierung sowie Einblicke in genetische und molekularzytogenetische Veränderungen vorgestellt.



Es stellt sich bis heute die Frage, ob ein solider Tumor allein durch die normale Mutationsrate entsteht, gekoppelt mit einer klonalen Expansion seltener aberranter Zellen (Tomlinson et al. 1996), oder ob ein solider Tumor durch eine frühe Mutation in Genen hervorgerufen wird, die für die genetische Stabilität verantwortlich sind (*Mutator-Phänotyp* nach Loeb 1991).

Bei colorektalen Tumoren konnten zwei verschiedene Mechanismen gezeigt werden (Lengauer et al. 1997, 1998). Bei Patienten mit einem erblichen Nicht-Polyposis Colonkarzinom (HNPCC) kommt es durch eine Keimbahnmutation in einem oder mehreren Mismatch Repair Genen (MMR) zu einer Mikrosatelliteninstabilität (MIN). MIN Tumoren zeigen in der Regel fast-diploide Karyotypen und weisen keine gesteigerte Rate chromosomaler Gewinne oder Verluste auf. Auf der anderen Seite zeigen MMR-profiziente Tumoren, die über 85% der colorektalen Tumoren ausmachen, eine hohe Rate an Aneuploidie. Diese chromosomal instabilen Tumoren (CIN) weisen keine Mikrosatelliteninstabilität auf. Bei CIN Tumoren kann man die Aneuploidie bereits in kleinen benignen Tumoren beobachten, und die Abweichung von einem normalen Karyotyp nimmt mit Anstieg der Tumorgroße und Malignität zu (Bardi et al. 1997)

In zahlreichen adulten Neoplasien konnte ein Entstehungsprozess gezeigt werden, welcher in definierten Schritten abläuft. Eindrucksvoll wurde dieser „*multistep process*“ am Beispiel der Colonkarzinom-Entwicklung aus Adenomen veranschaulicht (Vogelstein B. 1988, Cho KR: 1992).

Weitere Daten zeigen kombinierte pathogene Effekte aus Anzahl der Mutationen, epigenetischer Regulation, Telomerinstabilität und verändertem Milieu des Gewebes (DePinho 2000). Andere Hypothesen verweisen auf einen Zusammenhang zwischen Aneuploidisierung durch Karzinogene und einer folgenden Destabilisierung mit autokatalytischer Karyotyp-Entwicklung, welche wiederum zu Neoplasien führen sollen (Duesberg et al. 2000).

Beim Neuroblastom als häufigster extrakranieller solider Tumor der Kindheit konnte bislang keine Hypothese zur Tumorentstehung etabliert werden. Veröffentlichte Daten geben nur einen kleinen Einblick in die scheinbar komplexen Mechanismen, die zu den bekannten und unten aufgeführten Veränderungen führen.

Die folgenden Kapitel geben einen Überblick in bisher beschriebene Erkenntnisse über Entstehung, Charakterisierung, genetische Veränderungen, Diagnose und Therapie beim Neuroblastom.

### 1.1.2 Entstehung

Das Neuroblastom ist ein embryonaler Tumor, der aus postganglionären sympathischen Zellen der Neuralleiste entsteht. Somit ist das Neuroblastom eine maligne Erkrankung des sympathischen Nervensystems und ist im Kindesalter mit 8-10% aller pädiatrischen Malignome der häufigste extrakranielle solide Tumor.

Die Inzidenz liegt bei 1 auf 10000 Lebendgeburten. Das Auftreten des Neuroblastoms konzentriert sich auf das frühe Kindesalter: etwa ein Drittel der Kinder erkranken bereits im ersten Lebensjahr, mit zunehmendem Lebensalter nimmt die Inzidenz ab. 90% der Patienten sind jünger als sechs Jahre. Eine Geschlechtsbevorzugung wird leicht in Richtung männlich beobachtet (männlich 1,2: weiblich 1,0).

Das Neuroblastom tritt an Stellen auf, an denen sympathisches Nervengewebe lokalisiert ist, also zum Beispiel in den Nebennieren, im zervikalen, thorakalen und abdominellen Grenzstrang sowie in den Paraganglien. Etwa 70% der Tumore liegen retroperitoneal, 20% sind mediastinal lokalisiert.

In annähernd 70% der Fälle sind bei Diagnosestellung bereits Metastasen vorhanden. Metastasen treten vor allem in den regionalen und entfernten Lymphknoten, in Knochenmark, Knochen, Leber und Haut auf, seltener im Zentralen Nervensystem (ZNS) ([www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/ponk-205.htm](http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/ponk-205.htm)).

### 1.1.3 Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung erfolgt nach INSS-Kriterien (*International Neuroblastoma Staging System*) von 1993 (Brodeur et al., 1993):

Stadium 1	Tumor ist auf seinen Ursprungsort begrenzt Kein Befall von Lymphknoten Vollständige chirurgische Entfernung möglich
Stadium 2a	Tumor infiltriert die Umgebung, ohne die Mittellinie zu überschreiten Kein Befall von Lymphknoten Keine vollständige chirurgische Entfernung möglich
Stadium 2b	Tumor infiltriert die Umgebung, ohne die Mittellinie zu überschreiten Befall von Lymphknoten Keine vollständige chirurgische Entfernung möglich
Stadium 3	Tumor überschreitet die Mittellinie Regionale Lymphknoten können beiderseits befallen sein
Stadium 4	Disseminierung des Tumors in entfernte Lymphknoten: Hämatogene Fernmetastasen
Stadium 4s	Nur Kinder unter 1 Jahr: Lokalisierter Primärtumor mit Metastasierung beschränkt auf Leber, Haut und/ oder Knochenmark (Knochenmarkbefall betrifft weniger als 10% der kernhaltigen Zellen) Ohne radiologisch nachweisbare Fernmetastasen

*Tabelle 1: INSS des Neuroblastoms.*

Stadium der Erkrankung sowie das Alter des Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose stellen gut etablierte klinisch prognostische Faktoren dar (Brodeur et al., 1993).

## Stadium 4s

Beim Neuroblastom wird - häufiger als bei anderen Tumoren - eine spontane Rückbildung im Stadium 4s bei Kindern unter 1 Jahr beobachtet. Es gibt hierfür verschiedene Erklärungsansätze (Pritchard et al. 1994):

- Während der Entwicklung muss der Mechanismus der Apoptose noch voll ausgebildet werden; diese Entwicklung ist verzögert und ist demnach nicht sofort vor oder nach der Geburt aktiv. Nach ein paar Lebensmonaten wird der Apoptose-Weg vollständig aktiviert, die Zellen sterben, der Tumor bildet sich zurück. Eine variierende Rate der Tumorregression wird durch die biologische Diversität dieses Aktivierungsmechanismus erklärt.
- An der spontanen Regression könnten natürliche anti-Neuroblastom IgM Antikörper beteiligt sein. Bolande und Mitarbeiter (1990, a) haben gezeigt, dass das Serum einer normalen schwangeren Frau eine hohe zytolytische Aktivität in Bezug auf Neuroblastom-Zellen aufweist. An Säugetierzellen konnte daraufhin nachgewiesen werden, dass diese zytolytische Aktivität das Ergebnis von natürlichen IgM Antikörpern ist, die an das Neuroblastom binden; dadurch wird das Komplementsystem aktiviert und Apoptose induziert (Bolande 1990, b). Dieser Mechanismus konnte auch beim humanen Neuroblastom gezeigt werden; als Rezeptor für IgM wurde NB-p260 gefunden, ein 260 kD Protein, das spezifisch auf humanen Neuroblastomen exprimiert wird. NB-p260 konnte auf normalen Zellen oder anderen Tumoren wie zum Beispiel Melanom, Osteosarkom oder Lymphom nicht nachgewiesen werden (Ollert et al. 1996, David et al. 1999).

## 1.1.4 Genetik

### 1.1.4.1 Genetische Prädisposition

Eine kleine Zahl von Patienten mit Neuroblastom zeigt eine Prädisposition, die einem autosomal dominanten Vererbungsmuster zu Grunde liegt (Brodeur, 1993).

Knudson und Strong nahmen an, dass 22% aller Neuroblastome Ergebnis einer Keimbahnmutation sind (Knudson and Strong, 1972). Dieses Ergebnis zeigt, dass sich das Neuroblastom wie ein so genannter "Two-Hit-Tumor" verhält.

Diesen Begriff prägte Knudson 1971 (Knudson, 1971). Nach der Two-Hit-Hypothese können sporadische Neuroblastome Ergebnis von zwei postzygotischen oder somatischen Mutationen sein, die in einer einzigen Zelle auftreten und zu einer malignen Transformation dieser Zelle führen. Vererbte Tumoren treten auf, wenn in einer Zelle bereits präzygotisch eine Mutation aufgetreten ist; als Konsequenz befindet sich die Mutation in allen Zellen. Eine zusätzliche Mutation in einer Zelle des Zielgewebes reicht dann für eine Tumorentwicklung aus. Gewöhnlich treten vererbte Tumoren in einem jüngeren Alter auf und kommen an mehreren Stellen vor; entweder erscheinen diese dann gleichzeitig oder sequenziell. Familiäre Neuroblastome gehen meist mit einer vererbten Prädisposition einher, wenngleich sie auch eher selten sind. Kushner und Kollegen fanden bei familiären Neuroblastomen ein mittleres Manifestationsalter von neun Monaten und bei spontanen Neuroblastomen 22 Monate (Kushner et al. 1986).

### 1.1.4.2 Genetische Veränderungen

In den letzten Jahren wurde beim Neuroblastom eine Reihe von genetischen Veränderungen beschrieben. Diese sind sehr heterogen; generell kann man aber bestimmte Tendenzen erkennen, die charakteristisch für die verschiedenen Stadien sind und im Folgenden näher beschrieben werden.

#### Chromosom 1

In etwa 35% der Neuroblastome allgemein und in etwa 70% der Neuroblastome in höheren Stadien werden Deletionen in 1p beobachtet. Diese Deletionen, in Form von *Loss of Heterozygosity* (LOH) von 1p-Material, resultieren aus einfachen terminalen Deletionen, interstitiellen Deletionen und unbalancierten Translokationen mit verschiedenen Chromosomenfragmenten. Die Größe der Deletionen variieren von Tumor zu Tumor, jedoch ist 1p36 häufig involviert. Ein LOH von 1p36 korreliert mit eher späten Stadien, nicht-entfernbaren Tumoren sowie Metastasenbildung (siehe unten). Ein LOH von 1p36 ist in etwa 70% mit einer MYCN-Amplifikation assoziiert.

Ferner wird häufig ein 1p Verlust im Zusammenhang mit einer unbalancierten Translokation zwischen dem kurzen Arm von Chromosom 1 und dem langen Arm von Chromosom 17 gefunden.

Analysen der Bruchpunkte zeigten jedoch, dass diese auf 1p und 17q verstreut liegen, so dass es unwahrscheinlich ist, dass diese Bruchpunkte spezifische Gene aktivieren oder inaktivieren (Caron et al. 1994, Van Roy et al. 1994).

### Kandidaten-Gene auf Chromosom 1

In 1p werden Kandidaten-Gene beschrieben, die bei der Entwicklung des Tumors eine Rolle spielen könnten. Analysen von 1p36 Deletionen lassen vermuten, dass in dieser Region mehr als ein Tumorsuppressor-Gen zu finden ist (Cheng et al. 1995). In den etwa 30% der Tumoren mit einer 1p Deletion ohne amplifizierte MYCN Region konnten Caron und Kollegen zeigen, dass Teile der Region 1p36.2-p36.3 aus dem Verlust des maternalen Allels resultiert (Caron et al. 1993, 1995). Man denkt somit, dass 1p sowohl geprägte als auch nicht geprägte Bereiche enthält und demnach mehr als ein Tumorsuppressor-Gen für die Pathogenese des Tumors eine wichtige Rolle spielen könnte (Caron et al. 1993 und 1995). Bislang sind jedoch keine eindeutigen Gene identifiziert worden. In der Literatur werden die folgenden zwei Tumorsuppressor-Gene beschrieben, die eventuell im Zusammenhang mit dem Tumor stehen:

- TP73

Das TP73 Gen liegt in der Region 1p36.2-p36.3 (Kaghad et al. 1997). Das Genprodukt von TP73 scheint bei der Zellzykluskontrolle eine Rolle zu spielen, ähnlich dem p53-Protein. Jedoch wurde bislang keine somatische Mutation in TP73 gefunden, so dass die Wichtigkeit dieses Gens bei der Entwicklung des Neuroblastoms nicht bewiesen ist (Kovalev et al. 1998).

- DFFb

DFFB (1p36.2-p36.3) codiert für die aktive Untereinheit des Apoptose-Faktors *DNA fragmentation factor* DEF40. DEF40 ist eine Caspase3 aktivierte DNase. Eine Mutation oder ein Verlust in DFFb führt zu einer fehlenden apoptotischer DNA-Degradierung, was eine Tumorpheriferation zur Folge haben kann (Liu et al. 1997; Halenbeck et al. 1998; Enari et al. 1998; Mukae et al. 1998; Sakahira et al. 1998). Judson und Mitarbeiter (2000) untersuchten dieses Gen auf die Wichtigkeit beim Neuroblastom. Allerdings konnte dieses Gen nicht mit dem maternal geprägten Bereichen in Zusammenhang gebracht werden.

## Chromosom 2

- MYCN (auch: N-myc)

Zytogenetische Analysen von Primärtumoren und Zelllinien haben ein signifikantes Vorkommen von extrachromosomalen *double minute chromosomes* (dmin) oder chromosomal integrierten *homogeneously staining regions* (HSRs) gezeigt.

Biedler et al. (1976) nahmen an, dass dmin und HSRs die zytogenetischen Manifestationen von Gen-Amplifikationen sind. Seeger und Kollegen haben 1985 beschrieben, dass eine MYCN-Amplifikation ein ungünstiger prognostischer Faktor ist und meist mit einem fortgeschrittenen Stadium und rapider Tumorprogression korreliert (Seeger et al. 1985).

Molekulare Studien haben eine enge Korrelation zwischen MYCN-Amplifikation und LOH von 1p36 gezeigt (Fong et al. 1989, Caron et al. 1993, Schleiermacher et al. 1994, Cheng et al. 1995). Hierbei wurde festgestellt, dass bei einer MYCN-Amplifikation ein LOH von 1p36 meist zu erwarten ist, nicht jedoch umgekehrt.

Die folgenden Abbildungen zeigen MYCN-Amplifikationen in Form von dmin und HSRs.

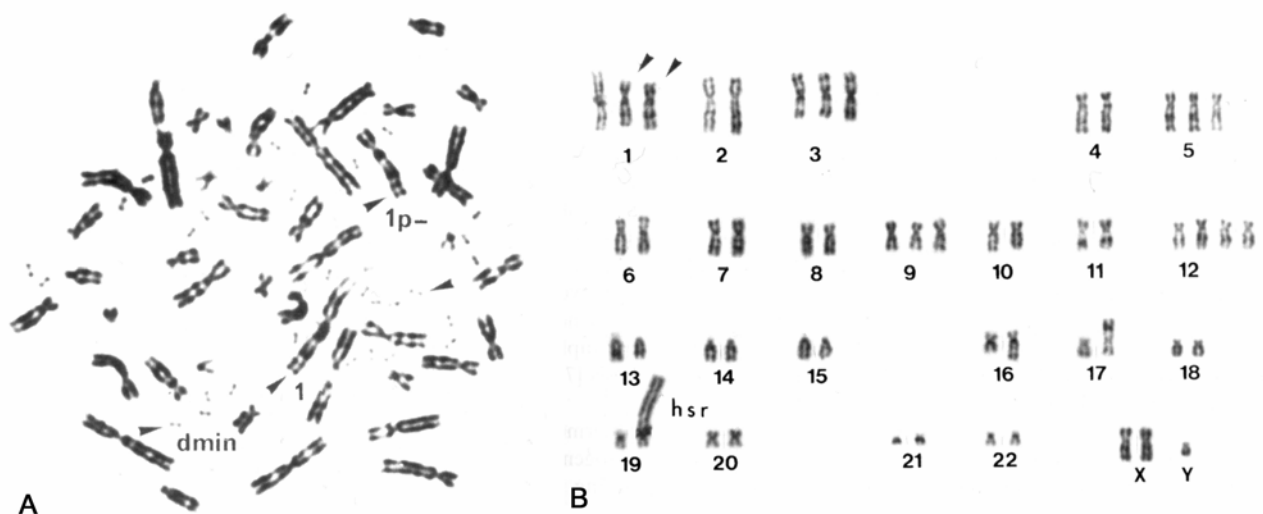


Abbildung 1: MYCN-Amplifikationen

A) Neuroblastom Metaphase mit zahlreichen dmin (double minutes), ein normales Chromosom 1 und ein 1p- Chromosom (Pfeilköpfe).

B) Neuroblastom Karyotyp mit einer HSR (homogeneously staining region) auf Chromosom 19 sowie duplizierten 1p- Chromosomen (Pfeile).

aus Kaneko et al. (2000).

### Mögliche Funktionen von MYCN

Die Lokalisation des MYCN Gens wurde auf Chromosom 2p24 identifiziert. Das MYCN Amplikon variiert in seiner Größe von etwa 350 kb bis mehr als 1 Mb. Das Genprodukt MYCN ist ein Transkriptionsfaktor (nucleäres Phosphoprotein), der während der Entwicklung des ZNS, der Spinalganglien, der Lungen und der Nieren exprimiert wird. Wahrscheinlich ist es auch wichtig für die Entwicklung der Herzgefäße, denn MYCN<sup>-</sup> Mäuse sterben *in utero* mit schwersten Herz-Lungendefekten. Außerdem reguliert es das Wachstum der Tumorgefäße.

- MYCN enthält eine N-terminale Transaktivierungsbox (Myc-Box) und eine C-terminale Region mit einem helix-loop-helix/ Leucinzipper-Motiv. Die C-terminale Region vermittelt die Bindung und Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor Max.  
Max fungiert bei Max:Max-Homodimerbildung in der G<sub>0</sub>-Phase als transkriptioneller Repressor. Bei Überexpression von MYCN kommt es zu einer Heterodimerisierung mit Max. Dies hat zur Folge, dass die Transkription von bislang unbekanntem wachstumsfördernden Genen aktiviert wird und so eine Zellproliferation resultiert.
- MYCN scheint bei der rezeptorvermittelten Apoptose eine Rolle zu spielen: durch eine Methylierung des Apoptose-Faktors Caspase-8 wird der Apoptose pathway unterbrochen. Diese Methylierung wird unter anderem durch Überexpression des MYCN Onkogens aktiviert. Tatsächlich wurde in einer hohen Prozentzahl von Neuroblastomen und anderen Tumoren, die aus der Neuralleiste entstehen, keine Caspase-8 mRNA gefunden, was daraus schließen lässt, dass das Caspase-8 Gen, CASP8, durch Methylierung inaktiviert wird (Teitz et al. 2001).
- Activin A ist ein Inhibitor der Angiogenese: es hemmt wirksam die Zellproliferation. Es wurde festgestellt, dass eine Überexpression des MYCN Onkogens in Neuroblastomzellen Activin herunterreguliert und dies zur Tumor-Angiogenese führt (Breit et al. 2000; Hatzi et al. 2000).



## Chromosom 11

In etwa 15% bis 20% der beschriebenen Neuroblastome (Primärtumoren und Zelllinien) wird ein LOH von 11q23 beobachtet. Studien haben ergeben, dass dieser LOH in einigen Fällen beschriebener Neuroblastome mit einer Tumorprogression korreliert (Srivatsan et al. 1993). Im Gegensatz zum LOH in 1p36 korreliert jedoch ein 11q23 LOH invers mit einer MYCN-Amplifikation (Plantaz et al. 2001). Plantaz und Kollegen stellten in 59% der untersuchten Tumoren eine auffallende Häufung von 11q Deletionen fest, wenn keine MYCN-Amplifikation zu finden war. Im Gegensatz dazu fanden sie in nur 11% der Tumoren ein 11q Verlust zusammen mit einer MYCN-Amplifikation.

Somit diskutiert man ein LOH in 11q23 als einen ungünstigen prognostischen Faktor unabhängig von einer MYCN-Amplifikation. Nach Plantaz (Plantaz et al. 2001) könnte man das Stadium 4 in eine weitere Subgruppe unterteilen, in der keine MYCN-Amplifikation, dafür aber ein 11q23 Verlust zu finden ist. Bislang wurde in der Literatur noch kein mögliches Kandidatengen beschrieben.

## Chromosom 17

Gilbert et al. (1984) zeigten bei Neuroblastom-Zelllinien und primären Neuroblastomen häufige 17q Veränderungen. Diese Daten wurden inzwischen von mehreren Arbeitsgruppen bestätigt (Van Roy, 1994, Savelyeva et al. 1994, Caron et al. 1994).

Die Mehrzahl der Chromosom 17-Veränderungen sind Ergebnis einer unbalancierten Translokation zwischen den Chromosomen 1 und 17, wobei 1p Material verloren geht. Die Bruchpunkte auf Chromosom 17 liegen meist in der Region 17q22-qter. Man hat festgestellt, dass diese Translokation durch nicht-homologe Rekombination während der S/G2-Phase des Zellzyklus zustande kommt. Alle 17q-Veränderungen haben eine 17q Überrepräsentation zur Folge, und somit vermutet man einen Gendosiseffekt. Man geht heute davon aus, dass Extrakopien einer oder mehrerer Gene in diesem Bereich eine Schlüsselrolle bei der Onkogenese von Neuroblastom spielen. Bislang hat man jedoch noch kein eindeutiges Kandidatengen in diesem Bereich gefunden. Aktuell diskutiert wird Survivin in 17q25, das bei einer Überexpression Apoptose inhibieren kann (Islam et al. 2000). Hohe Levels einer Survivin-Expression korrelieren nach denselben Autoren außerdem eng mit höheren Stadien des Tumors sowie einem höherem Alter des Patienten.

In einer Studie mit 204 Neuroblastomen fanden Vandosempele und Kollegen (2001) heraus, dass der Gewinn von 17q ein wichtiger prognostischer Faktor ist. In über 70% der Stadium 1 und 2 Tumoren fand sich ein Gewinn des ganzen Chromosoms 17. In 74% der Stadium 4 Tumoren konnte ein unbalancierter Gewinn von 17q Material beobachtet werden, oft in Assoziation mit MYCN-Amplifikation und Verlust von 1p. Insgesamt wurde in über 80% aller ausgewerteten Tumoren ein Gewinn von Chromosom 17 oder 17q-Material gezeigt (Vandosempele et al. 2001).

Auch in anderen Studien (Bown et al. 1999) wurde gefunden, dass ein Gewinn von 17q mit einem höheren Stadium assoziiert ist, dass außerdem ein 17q Gewinn in Tumoren von Kindern mit einem Alter von über einem Jahr vorkommt, sowie dieser Gewinn für Tumoren charakteristisch ist, welche einen gleichzeitigen Verlust von 1p sowie eine MYCN-Amplifikation aufweisen. Ebenfalls assoziiert mit einem 17q Gewinn sind Tumoren, die diploid oder tetraploid sind (siehe unten).

Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis der Untersuchung von Bown et al. (1999), welche in insgesamt 164 der 260 untersuchten Neuroblastome eine Beziehung zwischen einem 17q Gewinn, einem 1p Verlust und einer MYCN-Amplifikation gefunden hat. Auffallend ist, dass in 64 Tumoren alle drei genannten Veränderungen gleichzeitig auftreten.

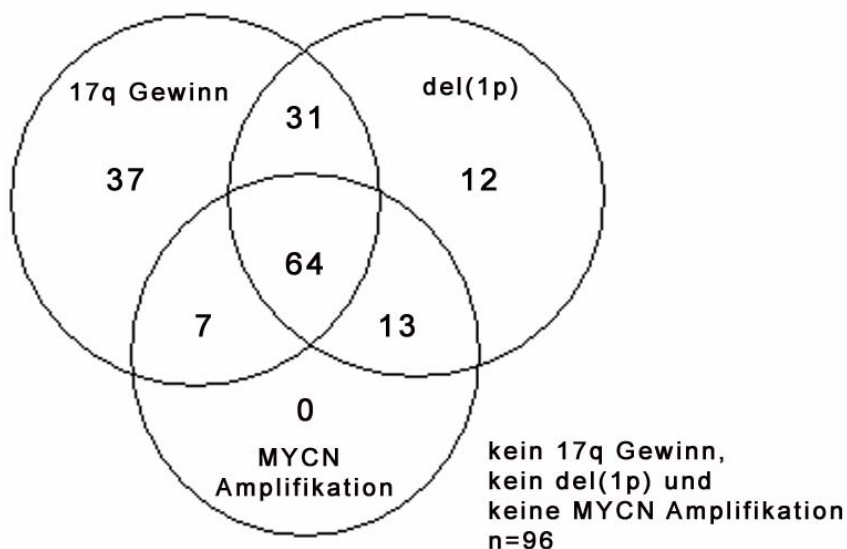


Abbildung 2: Beziehungen von 17q Gewinn, 1p Verlust und MYCN-Amplifikationen bei 260 analysierten Neuroblastomen (Abbildung nach Bown et al. 1999).

**Weitere Chromosomen: LOH 14q23, LOH 16q22-24, LOH 3pter**

Beim Neuroblastom werden noch weitere chromosomale Veränderungen beobachtet. Hierzu zählen LOH 14q23-q32, LOH 3pter, LOH 16q22-q24. Auf diese soll im Weiteren aber nicht näher eingegangen werden, da sie in der vorliegenden Arbeit für die zytogenetischen Analysen nicht verwendet wurden.

**1.1.5 Stadieneinteilung nach zytogenetischen Gesichtspunkten: Modell zur Tumorentstehung**

1995 beziehungsweise 1997 haben Brodeur und Mitarbeiter die INSS-Einteilung des Neuroblastoms nach zytogenetischen Gesichtspunkten verfeinert (Brodeur et al. 1995, 1997). Sie unterteilten den Tumor in drei Typen:

	entspricht Stadium	Alter	Ploidie	Veränderungen	Prognose
<b>Typ 1</b>	1, 2, 4s	< 1 Jahr	triploid	85%: keine 1p Deletion und keine MYCN-Amplifikation	gut
<b>Typ 2</b>	3	> 1 Jahr	fast diploid fast tetraploid	1p Deletion, keine MYCN-Amplifikation	mittel
<b>Typ 3</b>	4	> 1 Jahr	fast diploid fast tetraploid	1p Deletion, MYCN-Amplifikation, 17q Gewinn	schlecht

*Tabelle 2: Zytogenetische Einteilung des Neuroblastoms*

Bezüglich des DNA-Gehalts von Neuroblastomen fand man heraus, dass man zwischen zwei Hauptgruppen unterscheiden kann: triploide ( $\pm 3n$ ) sowie fast-diploidie ( $< 2n$ ) und/ oder tetraploide ( $4n$ ) Zellen. In beiden Gruppen sind genomische Veränderungen wie MYCN-Amplifikationen und/ oder ein Verlust von 1p zu finden, wobei diese Veränderungen bei triploiden Tumoren mit unter 15% gering sind und bei hyperdiploiden Tumoren bei über 56% liegen.

Da die Mehrzahl der triploiden Tumoren ohne weitere strukturelle Veränderungen beschrieben wird, kann man daraus schließen, dass ein Gewinn von *ganzen* Chromosomen für ein Tumorwachstum ausreicht, wobei diese Tumoren dann einen eher günstigen Verlauf zeigen. Nur in diesen Tumoren wird eine spontane Regression gefunden.

Abbildung 3 zeigt ein Modell, welches das Verhältnis von Veränderungen und Tumorwachstum in triploiden und fast-diploiden Tumoren darstellt.

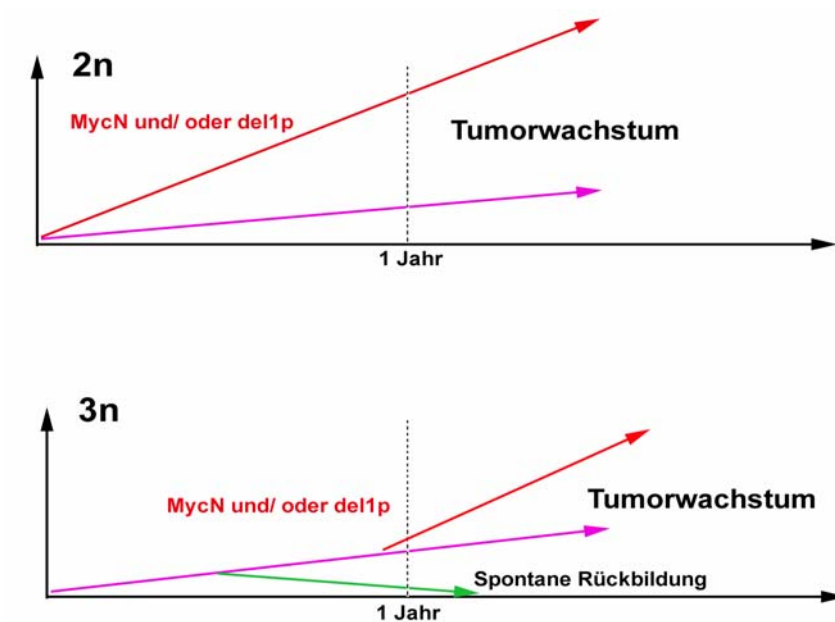


Abbildung 3: Modell zur Darstellung verschiedener Tumorwachstumskurven, die in fast-diploiden ( $2n$ ) und triploiden ( $3n$ ) Tumoren beobachtet werden. Eine spontane Regression von  $3n$  Tumoren wird bei Kindern unter 1 Jahr beobachtet. Nach Ambros und Brodeur, 2000.

Trotz oben beschriebenen eher günstigen Verlauf triploider Tumoren zeigen diese in immerhin fast 15% ein aggressives klinisches Verhalten, wenn sie mit einer MYCN-Amplifikation und/ oder einem 1p Verlust assoziiert sind (Ambros, nicht publizierte Ergebnisse). Da das Erscheinen der Triploidie der MYCN-Amplifikation und dem 1p Verlust vorausgeht, kann daraus geschlossen werden, dass diese Veränderungen spätere Ereignisse sind. Nimmt man ferner an, dass die Tumorerogenität ungefähr den Zeitpunkt widerspiegelt, zu dem diese Veränderungen erscheinen, kann man daraus schließen, dass MYCN-Amplifikationen und ein 1p Verlust wahrscheinlich im Alter zwischen sechs und 12 Monaten auftreten (Abbildung 1).

Bei diploiden Tumoren ist die Entstehung unklar.  $2n$  Tumoren weisen häufig strukturelle und kaum numerische Veränderungen auf; diese strukturellen Veränderungen kommen auch in Abwesenheit von MYCN-Amplifikationen und einem 1p Verlust vor. Deshalb scheinen andere genetische Veränderungen für die Tumorentstehung verantwortlich zu sein und Veränderungen wie MYCN, 1p Verlust und 17q für den weiteren Verlauf des Tumorwachstums eine Rolle zu spielen.

Zusammenfassend haben Ambros und Kollegen also herausgefunden, dass bei Triploidie sowie Gewinnen und Verlusten von *ganzen* Chromosomen eine günstigere Prognose besteht als bei Diploidie, Tetraploidie, MYCN-Amplifikationen, 1p Verlust, 17q Gewinn sowie Verlusten und Gewinnen von Chromosomenteilen (Ambros und Brodeur, 2000).

Neuere Veröffentlichungen gehen davon aus, dass ein Gewinn von 17q den stärksten prognostischen Faktor darstellt (Lastowska et al. 1997, Bown et al. 1999).

### 1.1.6 Symptomatik

Patienten, die am Neuroblastom erkranken, zeigen je nach Ort des Primärtumors beziehungsweise der Metastasen unterschiedliche Symptome:

Das Neuroblastom befällt in etwa 70% der Fälle den Bauchraum. Abdominelle Tumoren können Bauchschmerzen, Appetitlosigkeit, Darm- und Harnwegsprobleme zur Folge haben. In schweren Fällen kann eine Harnabfluss-Behinderung zur Hydronephrose führen.

Intrathorakale Tumoren (etwa 10%) können Luftnot, Tachypnoe sowie thorakale Schmerzen verursachen. Tumoren des Grenzstrangs zeigen die Tendenz, durch die Foramina intervertebralia nach intraspinal vorzuwachsen und neurologische Symptome bis hin zur Querschnittslähmung zu verursachen. Bei 15–20% aller zervikalen Tumoren wird bei Diagnosestellung ein Horner-Syndrom (Ptosis, Miosis und Enophthalmus) beobachtet. Des Weiteren verursachen retrobulbäre Infiltrationen typische periorbitale Ekchymosen (Brillenhämatome). Patienten mit einem metastasierten Neuroblastom fallen oft mit Schmerzen, reduziertem Allgemeinzustand, Fieber oder Blässe auf ([www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/ponk-205.htm](http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/ponk-205.htm)).

### 1.1.7 Diagnostik

#### Bildgebende Diagnostik

Primärtumor und Metastasen der inneren Organe werden mittels Sonographie und Kernspintomographie (nativ und mit Kontrastmittel) dargestellt. Ebenso kann die Darstellung über eine Computertomographie (nativ und mit Kontrastmittel) erfolgen. Bei wirbelsäulennahen Tumoren muss ein intraspinales Vorwachsen des Tumors durch eine Kernspintomographie der korrespondierenden Wirbelsäulenabschnitte ausgeschlossen werden.

Bei metastasiertem Neuroblastom wird eine Magnetresonanztomographie des Schädels zum Ausschluss und/ oder Nachweis von intrakraniellen Metastasen ergänzt.

Zur spezifischen szintigraphischen Darstellung von Primärtumor und Metastasen wird darüber hinaus in jedem Falle Metajodbenzylguanidin (MIBG) eingesetzt; beim Neuroblastom findet sich diese Substanz in der Regel deutlich angereichert.

Zum Ausschluss von Lungenmetastasen wird eine konventionelle Röntgenaufnahme angefertigt.

### Histopathologische und zytologische Diagnostik

Die histopathologische Einteilung der Tumore erfolgt nach dem Grading-System von Hughes (Hughes et al. 1974):

Gradingstufe	Histologischer Befund
Malignitätsgrad I	Mischbild aus undifferenzierten Zellen und reifen Ganglienzellen
Malignitätsgrad II	Mischbild aus undifferenzierten Zellen und einigen Zellen mit partieller Differenzierung in Ganglienzellen (vesikuläre Kerne; Nucleolus erkennbar; Cytoplasma-Kern-Relation angestiegen; cytoplasmatische Fortsätze)
Malignitätsgrad III	Undifferenziertes, kleinzelliges Tumorgewebe (Rosetten möglich)

Tabelle 3: Histologisches Grading der Neuroblastome nach Hughes.

Zur Prognoseabschätzung werden zusätzliche molekulargenetische Untersuchungen des Tumormaterials wie MYCN-Analysen (Southern Blot) eingesetzt.

Zum Ausschluss einer Metastasierung ins Knochenmark sind zweiseitige Knochenmarkpunktionen und Stanzbiopsien notwendig, die zytologisch beziehungsweise histologisch und eventuell immunhistologisch (Anti-G(D2)-Antikörper ch14.18) untersucht werden.

### Labor

Im Blut werden die neuronspezifische  $\gamma$ -Enolase (NSE) und unspezifische Tumormarker wie Lactatdehydrogenase (LDH) und Ferritin nachgewiesen. Zudem eignet sich LDH als guter Verlaufsmarker.

Im Urin sind in der Regel Katecholamin-Metabolite (Vanillinmandelsäure, Homovanillinsäure, Dopamin) erhöht.

### 1.1.8 Therapie

Beim Neuroblastom ist die Behandlung stadienabhängig. Im Stadium 1 ist eine alleinige operative Tumorentfernung in der Regel ausreichend. In den höheren Stadien 2 bis 4 ist zusätzlich der Einsatz von Chemotherapie notwendig. Die Dauer der Therapie kann abhängig vom Stadium der Erkrankung bis zu zwei Jahre betragen. Das Therapiekonzept für Patienten im Stadium 4 sieht eine maximale Therapie mit Chemotherapie, Operation und eventuell Radiotherapie vor. Die Radiotherapie kann durch externe Bestrahlung oder durch Verabreichung radioaktiv markierten MIBGs erfolgen. Die aktuelle deutsche Behandlungsstudie *Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie* (GPOH) untersucht den eventuellen Vorteil einer Hochdosischemotherapie mit anschließendem autologen Stammzell-Rescue versus Erhaltungskemotherapie. Zusätzlich wird der Therapieeffekt von Anti-G(D2)-Antikörpern gegen Ganglioside auf der Oberfläche von neuronalen Zellen getestet.

Retinoinsäure kann Neuroblastom-Zellen zur Ausreifung anregen und wird deshalb für die Behandlung von Neuroblastom-Rezidiven vorgeschlagen (Neuroblastomstudie NB 97, GPOH, 1998).

Patienten im Stadium 4s nehmen eine Sonderstellung ein. Häufig regredieren diese Tumoren spontan. Deshalb reicht oft eine engmaschige Beobachtung aus. Bei Bedrohung durch die Tumormassen beziehungsweise bei Lebermetastasierung kann eine Teilresektion und/ oder milde Chemotherapie ausreichend sein. In der Rezidivsituation kommen im Sinne experimenteller Therapieansätze immuntherapeutische Verfahren zur Anwendung.

### 1.1.9 Prognose

Die Prognose ist in erster Linie stadienabhängig. Die Fünfjahres-Überlebensrate für alle Stadien liegt bei 55%. Lokalisierte Tumoren zeigen eine Fünfjahres-Überlebensrate von etwa 90% im Stadium 1 oder 2 und von etwa 70% im Stadium 3, während im Stadium 4 eine Fünfjahres-Überlebensrate zwischen 20% und 30% zu beobachten ist. Insgesamt kann man davon ausgehen, dass die Prognose umso ungünstiger wird, je älter der Patient und je höher das Stadium ist (ausgenommen Stadium 4s) ([www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/ponk-205.htm](http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/ponk-205.htm)).

## 1.2 Multiplex-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Multiplex Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (M-FISH, Speicher et al. 1996) ist eine Technik, bei der alle 24 menschlichen Chromosomen - 22 Autosomen und die beiden Geschlechtschromosomen - simultan in verschiedenen Farben dargestellt werden können. Durch eine kombinatorische Markierungstechnik erhält jedes Chromosomenpaar eine individuelle spektrale Signatur, die es erlaubt, jedem Chromosomenpaar eine andere spezifische Farbe zuzuordnen.

Gerade in den letzten Jahren hat dieses Verfahren immer mehr an Bedeutung gewonnen.

M-FISH spielt eine wichtige Rolle insbesondere in der prä- und postnatalen Diagnostik und bei der Charakterisierung sehr komplexer Veränderungen, wie sie beispielsweise bei soliden Tumoren auftreten können. Darüber hinaus kann M-FISH in der Grundlagenforschung eingesetzt werden, um mehr über Chromosomenstruktur oder Verteilung der dreidimensionalen Organisation des Genoms im Interphase-Kern zu lernen.

Für die Routinediagnostik stellen die G-Banden nach wie vor die Standardmethode dar.

M-FISH hat das Potential, sich ebenfalls zu einer breit eingesetzten Methode zu entwickeln, da es das bessere Auflösungsvermögen bei interchromosomalen Veränderungen hat und die Analyse sehr schnell geht und automatisierbar ist.

### 1.2.1 Technik

Die Anzahl der benötigten Fluorochrome bei M-FISH resultiert aus der Booleschen Kombination  $2^n - 1$ . Hieraus ergibt sich für einen menschlichen 24-Farben-Ansatz aus der Booleschen Kombination für  $N$  Fluorochrome ein Einsatz von mindestens fünf verschiedenen Fluorochromen ( $2^5 - 1 = 31$  Kombinationsmöglichkeiten). Neuerdings hat sich der Einsatz von sieben Fluorochromen bewährt (siehe unten). Die Zahl der Fluorochrome ist auf sieben beschränkt, da das automatische Filterrad des Epifluoreszenz-Mikroskopes, welches zur Aufnahme verwendet wird, mit insgesamt acht Filterplätzen ausgestattet ist und ein Platz mit dem DAPI-Filter bereits belegt ist.

Die in dieser Arbeit verwendeten sieben Fluorochrome beziehungsweise Haptene sind DEAC (Diethylaminocoumarin), FITC (Fluoresceinisothiocyanat), Cy3, Texas Red, Cy5, Cy5.5 und Cy7.



Üblicherweise werden Absorption und Emission in Form von Kurven oder Spektren dargestellt. Tabelle 4 listet die verschiedenen Absorptions- und Emissionsspektren der Fluorochrome DAPI, DEAC, FITC, Cy3, Texas Red, Cy5, Cy5.5 und Cy7 auf. Durch DAPI (4'-6'-Diamidino-2-Phenylindol) werden alle Chromosomen sichtbar gemacht (Absorptionsmaximum 350 nm, Emissionsmaximum 456 nm).

Fluorochrom	Anregungsmaximum	Emissionsmaximum
4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)	350 nm	456 nm
Diethylaminocoumarin (DEAC)	426 nm	480 nm
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	490 nm	520 nm
CY3	554 nm	568 nm
Texas Red	595 nm	615 nm
CY5	652 nm	672 nm
CY5.5	682 nm	703 nm
CY7	755 nm	778 nm

Tabelle 4: Absorptions- und Emissionsspektren der für M-FISH eingesetzten Fluorochrome beziehungsweise Haptene

In Abbildung 4 werden die Absorptions- und Emissionsspektren graphisch dargestellt.

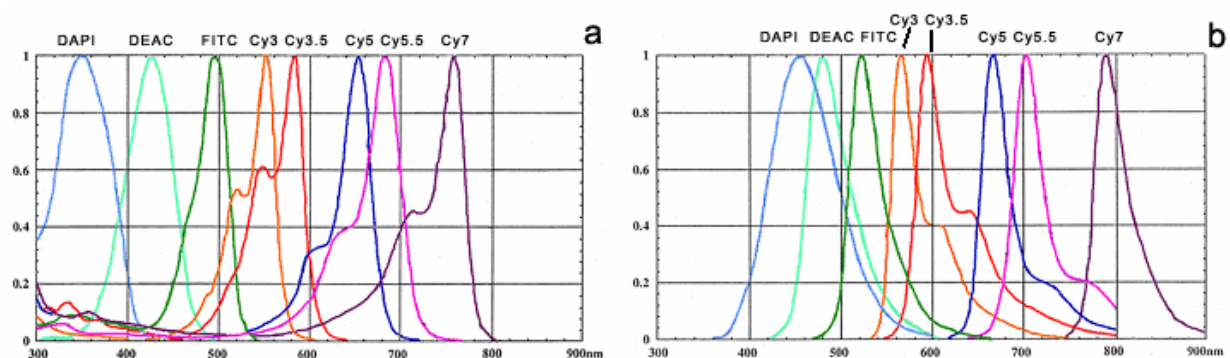


Abbildung 4: a) Absorptionsspektren und b) Emissionsspektren der Fluorochrome DAPI, DEAC, FITC, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5 und Cy7. Auf der Ordinate sind die Anregungs- beziehungsweise Emissionsspektren mit einem normalisierten Maximum von 1 aufgetragen. Die Abszisse beschreibt die Wellenlänge in nm.

Im Wesentlichen besteht M-FISH aus folgenden Schritten (Azofeifa et al. 2001):

- Es werden sieben DNA-Pools (für jedes Fluorochrom ein Pool) hergestellt. Die 24 DNA-Sonden (bei humanen Chromosomen) werden in sieben verschiedene Pools aufgeteilt und mit den oben aufgeführten Fluorochromen kombinatorisch markiert. Beispiel: Der FITC-Pool besteht aus allen DNA-Sonden, die mit FITC markiert werden sollen.
- Diese sieben Pools werden in einer DOP-PCR amplifiziert.
- Die DNA-Sonden im Pool werden mittels DOP-PCR mit Fluorochromen markiert.
- Die Sonden werden auf fixierte Chromosomenpräparate hybridisiert.
- Nach geeigneter Inkubationszeit werden die nicht-hybridisierten Sonden durch mehrere Wasch-Schritte entfernt und gleichzeitig die Haptene Biotin und Digoxigenin über Antikörper nachgewiesen (Cy5.5 und Cy7).
- Die Metaphasen werden mit einer CCD-Kamera aufgenommen und mit einer spezieller Bildanalyse-Software ausgewertet.

Die Bildaufnahme erfolgt mit einem motorisierten Epifluoreszenzmikroskop, das mit einem speziellen 8-Filter-Rad ausgestattet ist, welches erlaubt, schnell und einfach Aufnahmen von Metaphasepräparaten zu machen.

Von jeder Metaphase werden acht Bilder mit unterschiedlichen Filtern aufgenommen; nach Aufnahme der Bilder in den Einzelkanälen DAPI, DEAC, FITC, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5 und Cy7 entsteht durch Überlagerung dieser Einzelbilder ein Gesamtbild, in dem jedes Chromosomenpaar eine sogenannte Echtfarbendarstellung ("true colors") erhält.

Von diesem Echtfarbenbild wird über ein Klassifizierungsprogramm (Leica MCK) ein Bild in Klassifizierungsfarben ("false colors") erstellt: Über eine "adaptive spektrale Klassifizierung" (Eils et al. 1998) erhält jedes Chromosomenpaar eine andere Klassifizierungsfarbe, die von den anderen Chromosomenpaaren leicht zu unterscheiden ist.

Die einzelnen Schritte, die bei M-FISH durchgeführt werden, sind in den Abbildungen 5 und 6 auf den folgenden zwei Seiten zusammengefasst.

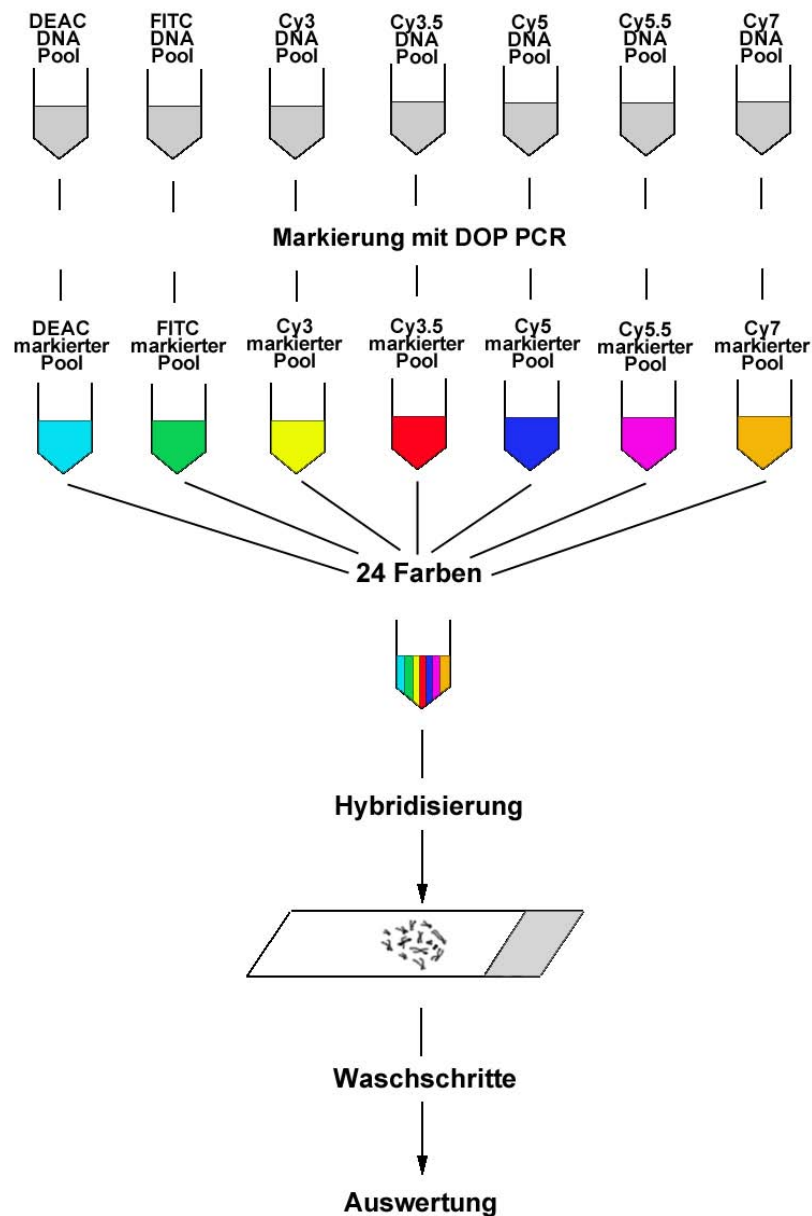


Abbildung 5: Jeder DNA-Pool besteht aus einer bestimmten Anzahl von DNA-Sonden. Nach Amplifikation jedes DNA-Pools in einer DOP-PCR werden die Pools in einer weiteren DOP-PCR mit entsprechenden Fluorochromen markiert. Nach Hybridisierung auf ein Chromosomenpräparat und Wasch-Schritten (mit Antikörpernachweis der Haptene Biotin und Digoxigenin) werden Metaphasen mit einer CCD-Kamera und einem Epifluoreszenz-Mikroskop aufgenommen.

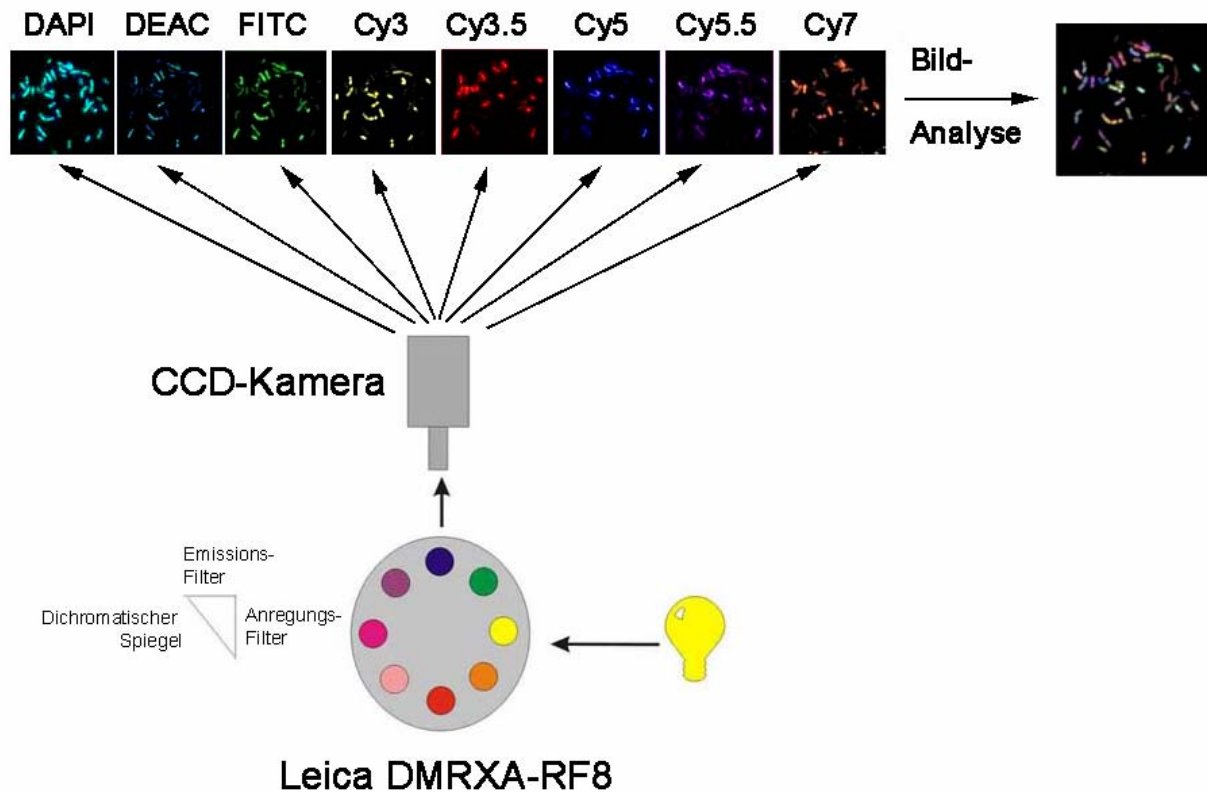


Abbildung 6: M-FISH: Prinzip der Bildaufnahme.

Das Licht einer Quecksilberdampflampe wird durch den Anregungsfilter geleitet und trifft auf das Präparat. Das von den Fluorochromen ausgesandte Licht gelangt, nachdem es den Emissionsfilter passiert hat, zur CCD-Kamera. Diese Kamera fertigt von jedem Kanal ein Bild an und speichert es. Durch eine anschließende Bildanalyse werden den Chromosomen Falschfarben zugeteilt und diese schließlich automatisch klassifiziert.

### 1.2.2 Vor- und Nachteile von M-FISH

Durch M-FISH ist es möglich, schnell und einfach numerische und strukturelle Aberrationen zu identifizieren. Translokationen, Duplikationen und Deletionen können bis zu einem gewissen Auflösungsvermögen mit M-FISH analysiert und identifiziert werden.

Im Vergleich zur G-Banden Technik, welche unten beschrieben wird, ist eine M-FISH-Präparation und -Analyse in sehr kurzer Zeit möglich; demnach kann man mit geringem zeitlichen Aufwand sehr viele Metaphasen analysieren.

Ein weiterer Vorteil besteht zudem in der Auswertbarkeit von Chromosomen, die eine schlechte Morphologie aufweisen; dies hat kaum Einfluß auf die Hybridisierungs-Fähigkeit, so dass auch solche Chromosomen schnell zu klassifizieren sind.

Ein limitierender Faktor der M-FISH-Technik ist das Auflösungsvermögen. Durch Verbesserung der Techniken und Erweiterung der Fluorochromzahl konnte die Auflösung von M-FISH bei humanen Chromosomen eingegrenzt werden (Azofeifa et al. 2000). In jeder analysierten Metaphase existiert eine interne „Kontrolle“, um Qualität der Hybridisierung und Auflösung zu überprüfen: auf dem X-Chromosom erscheinen bei einem Einsatz von sieben Fluorochromen zusätzliche Banden der ersten pseudoautosomalen Region (Xp22.3, Größe: 2,6 Mb) und der XY homologen Region (Xq21.3, Größe: 4 Mb). Da die zweite pseudoautosomale Region (Xq28, Größe 320 kb) mit sieben Fluorochrom M-FISH nie nachzuweisen ist, kann man daraus ein Auflösungsvermögen zwischen 320 kb und 2,6 Mb schließen.

Allerdings hängt die Identifikation kleinerer (unter 3 Mb) interchromosomaler Veränderungen vom Zustand und Kondensationsgrad der Chromosomen ab; außerdem spielt die Qualität der Sonden sowie die Zusammensetzung der Fluorochrome, die die an der Translokation beteiligten Chromosomen-spezifischen DNA-Bibliotheken markieren, eine große Rolle (Azofeifa et al. 2000). Bei der Zusammensetzung der Fluorochrome kann es vorkommen, dass die Fluorochrome oft in benachbarte Bereiche hineinstrahlen und eine Interpretation erschweren. Um dieses Problem zu minimieren, muss die Zahl der für die Markierung eingesetzten Fluorochrome für jedes Chromosom identisch sein (Azofeifa et al. 2000). Näheres hierzu siehe unten.

Mit M-FISH nicht nachweisbar sind intrachromosomale Insertionen, Inversionen, sowie kleinere Duplikationen und Deletionen, solange sie nicht zu deutlichen Größenunterschieden beider homologer Chromosomen führen.

## 1.2.3 Konventionelle Techniken bei der Analyse von Maus-Chromosomen

### 1.2.3.1 G-Banden

M-FISH wurde zunächst für menschliche Chromosomen entwickelt. Ähnliche Fortschritte wurden bei anderen Säugetieren in dieser Qualität bisher nicht erzielt, auch wenn die zytogenetische Analyse bei vielen Tieren immer mehr an Bedeutung gewinnt.

Die Labormaus (*Mus musculus*) wird seit Jahrzehnten als Modell für zahlreiche Krankheiten zum Studium der Auswirkung von Umwelteinflüssen eingesetzt. Bei diesen Modellen ist die detaillierte zytogenetische Analyse von außerordentlicher Wichtigkeit.

Bisherige Analysen beschränken sich vor allem auf die G-Banden-Technik. Diese Technik wurde Ende der sechziger Jahre von Lore Zech entwickelt (Zech in Caspersson et al. 1968).

Vor der Färbung mit Giemsa, einem DNA-bindenden chemischen Farbstoff, wird das Chromatin kontrolliert denaturiert und/ oder enzymatisch abgebaut (Trypsin). Die durch die Färbung resultierenden dunklen Banden in den Chromosomen werden als G-Banden bezeichnet (Charakteristika: stark kondensierte DNA, spät replizierend, transkriptionell inaktiv; "tissue specific genes"; genarm), die hellen Banden werden als G-negativ bezeichnet (Charakteristika: früh replizierend; transkriptionell aktiv; "house keeping genes"; genreich; Übersicht siehe Craig und Bickmore, 1997).

Abbildung 7 zeigt die G-Banden der Maus Chromosomen.

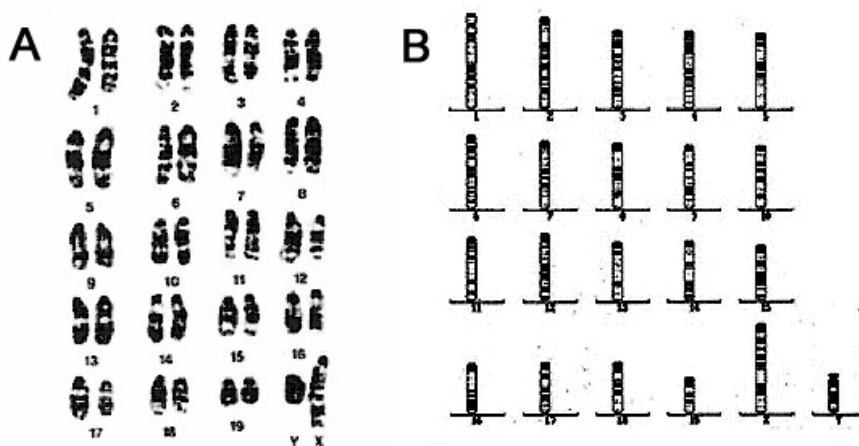


Abbildung 7: G-Banden der Maus-Chromosomen.

a) nach Giemsa-Färbung; b) schematische Darstellung.

Maus-Chromosomen sind alle akrozentrisch und ähneln sich in Größe und Morphologie.

### **Vor- und Nachteile der G-Banden-Technik**

Die G-Banden-Technik hat die Zytogenetik revolutioniert. Erstmals war es möglich, Chromosomen an Hand ihrer Morphologie zu identifizieren und kleine strukturelle Anomalien zu erkennen.

Insbesondere intrachromosomale Veränderungen wie Insertionen und Inversionen können über G-Banden identifiziert werden.

Limitierend für die G-Bänderung ist zum einen das begrenzte Auflösungsvermögen. Gerade ein Austausch von Chromosomenmaterial zwischen Chromosomen mit ähnlichem Bandenmuster erschwert eine eindeutige Identifikation. Bei der Maus kommt zusätzlich erschwerend hinzu, dass die Chromosomen alle akrozentrisch sind und sich in ihrer Größe und Morphologie ähneln (siehe Abbildung 7).

Aus diesem Grund gibt es nur wenige, die in der Lage sind, Maus-Chromosomen zu identifizieren. Bisher gelang es nicht, die Analyse der G-Bänderung bei Maus-Chromosomen zu automatisieren. Dadurch bleiben chromosomale Veränderungen wie Translokationen in ähnlichen Bandenbereichen oft unentdeckt.

Ein weiterer Nachteil der G-Banden-Technik ist, dass die Präparation sehr zeit- und kostenaufwändig und somit eine Analyse der Chromosomen mühsam ist. Die Prozedur ist zudem sehr personalintensiv und erfordert wie oben bereits erwähnt ein geschultes Personal.

### **1.2.3.2 Vielfarben-FISH bei der Maus**

Die Entwicklung der kombinatorischen Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung bei der Maus beschränkte sich bis vor kurzem auf einzelne Kombinationen chromosomen-spezifischer DNA-Bibliotheken (Boyle et al. 1990, Breneman et al. 1993, Rabbitts et al. 1995).

#### **SKY bei der Maus**

1996 haben Liyanage und Kollegen einen Vorstoß zur Ergänzung von chromosomalen G-Banden der Maus erzielt. Die Arbeitsgruppe benutzte die SKY-Technik (SKY = Spektral Karyotyping) für die simultane Darstellung aller Maus-Chromosomen einer Metaphase.

Probenmarkierung und Hybridisierungs-Strategie sind mit der M-FISH-Technik identisch. Der Unterschied zwischen M-FISH und SKY liegt in der Bildaufnahme und Bildverarbeitung. Bei SKY werden durch Benutzung eines Interferometers Spektren gemessen.

Mittels Fourier-Analyse und Aufnahme über eine CCD-Kamera wird mit nur einer einzigen Aufnahme das Spektrum der Fluoreszenz-Emission in allen Pixeln simultan ausgewertet (Schröck et al. 1996, Coleman et al. 1997, Macville et al. 1997).

### **5-Fluorochrom M-FISH bei der Maus**

Maus 5 Fluorochrom M-FISH erlaubt eine einfache, schnelle und objektive Analyse chromosomaler Veränderungen.

1999 habe ich im Rahmen meiner Diplomarbeit ein 5 Fluorochrom Multiplex-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-System für Maus-Chromosomen entwickelt und seine Anwendbarkeit überprüft.

Es wurde eine schnelle und eindeutige Klassifizierung aller Maus-Chromosomen erreicht.

So konnten mehrere chromosomale Aberrationen mit Maus 5 Fluorochrom M-FISH untersucht und identifiziert werden. Hierbei wurden mir verschiedene Knochenmarkpräparate von Mäusen zur Verfügung gestellt, die durch Zuführung verschiedener Agenzien (zum Beispiel Dacarbacin oder 1,3-Butadien) chromosomale Aberrationen aufwiesen. Die chromosomalen Aberrationen, die in dieser Blindstudie analysiert wurden, konnten mittels Maus 5 Fluorochrom M-FISH alle korrekt identifiziert werden. Darüber hinaus wurden weitere – bislang unerkannte – Veränderungen gezeigt.

Die Ergebnisse können in meiner Diplomarbeit eingesehen werden; außerdem wurde die Arbeit kürzlich veröffentlicht (Jentsch et al. 2001, Adler et al. 2002).

Seitdem wurde Maus 5 Fluorochrom M-FISH in mehreren Projekten angewendet; die Hybridisierung verlief stets stabil und zuverlässig (zum Beispiel Eggen et al. 2002).



## **1.3 Aufgabenstellung und Zielsetzung der Doktorarbeit**

### **1.3.1 Interphase Zytogenetik beim Neuroblastom**

In dieser Arbeit sollten neue molekularzytogenetische Verfahren zur Tumordiagnostik entwickelt werden.

Durch Hybridisierung auf Gewebeschnitten sollte es ermöglicht werden, zytogenetische Studien an Zellkernen innerhalb ihres Gewebeverbandes durchzuführen.

Bislang wurde in der Literatur noch keine simultane Hybridisierung von mehreren Sonden wichtiger bekannter Neuroblastom-spezifischer Regionen beschrieben. So sollte im Rahmen dieser Doktorarbeit ein Vielfarben Interphase Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Ansatz etabliert werden, der es ermöglicht, sowohl auf Neuroblastom-Zelllinien als auch auf 10 µm Formalin-fixierten Paraffinschnitten zytogenetische Untersuchungen an Hand simultan hybridisierter BAC-/ und YAC-Sonden durchzuführen. Es sollten für diese Etablierung Sonden eingesetzt werden, die beim Neuroblastom bezüglich zytogenetischer Veränderungen eine wichtige Rolle spielen und durch gleichzeitige Hybridisierung neue Möglichkeiten und Hinweise hinsichtlich Prognose, Tumorentstehung, Verhalten im Gewebeverband und Diagnostik liefern können.

Für die zytogenetische Untersuchung der Zelllinien sollte ein kombinatorischer BAC-/ und YAC-Pool entwickelt werden. Durch kombinatorische Doppelmarkierung der einzelnen Regionenspezifischen Sonden ist es möglich, den Zellkernen eindeutige Signale zuzuordnen und sie vom Hintergrund zu unterscheiden. Es sollten mehrere Zelllinien ausgewertet werden, die von Dr. Frank Speleman vom Center für Medical Genetics in Ghent zur Verfügung gestellt wurden.

Für die Analyse von Gewebeschnitten standen 10 µm Schnitte von drei Patientinnen zur Verfügung, die freundlicherweise von Frau Dr. Uta Behrens aus der Abteilung für pädiatrische Onkologie der Kinderklinik München Schwabing bereitgestellt wurden. Bei den Schnitten handelt es sich um gepufferte (4% PBS) Formalin-fixierte Paraffinschnitte. Die Anfertigung von solchen Schnitten wird in der Pathologie routinemäßig zur Archivierung von Tumormaterial durchgeführt. Dadurch ist es möglich, für retrospektive zytogenetische Studien auf ein großes Archiv mit Patientenmaterial zuzugreifen. Neben Hybridisierung von Centromer-spezifischen Sonden, die eine Aussage über eine generelle Beurteilung und Hybridisierbarkeit der verwendeten Neuroblastom-Gewebeschnitte ermöglichen, sollte ein Regionen-spezifischer

BAC-/ und YAC-Pool entwickelt werden, der Einblicke in die zytogenetischen Veränderungen sowie in das Verhältnis der Veränderungen zueinander liefert sowie Aussagen über die Beziehung von Tumorzellen im Gewebeverband ermöglicht.

Mit der Entwicklung eines BAC-/ und YAC-Pools sollte ein Einblick in die Ausbreitung und Lage von Tumorzellen im Vergleich zu normalen nicht veränderten Zellen des umliegenden Gewebes sowie in die Heterogenität des Tumors gewonnen und eine mögliche Infiltration der Tumorzellen in das umliegende normale Gewebe beurteilt werden. Durch einen simultan hybridisierten Vielfarben FISH-Ansatz sollte es außerdem möglich sein, einen Bezug der Regionenspezifischen Sonden zueinander herstellen zu können.

Des Weiteren sollten die aufgenommenen Zellkerne des Gewebes mittels Dekonvolution und 3D-Rekonstruktion genau ausgewertet werden. Durch diese Auswertung sollte es ermöglicht werden, einen Zellkern von allen Richtungen (X, Y und Z) zu betrachten und zu beurteilen.

Ferner war es für eine Hybridisierung auf Neuroblastom-Paraffingewebe nötig, ein Protokoll zu entwickeln, das exakte Hybridisierungs-Signale liefert und störende Faktoren wie Autofluoreszenz, welche für Tumoren neuronalen Ursprungs nicht ungewöhnlich ist, zu reduzieren.

### **1.3.2 Maus 7 Fluorochrom M-FISH**

Die M-FISH-Technik hat bei menschlichen Chromosomen große Erfolge erzielt.

Maus M-FISH wurde bislang nur in wenigen speziellen Labors für zytogenetische Analysen eingesetzt. Da Chromosomenaberrationen, welche mit G-Bänderung beim Menschen nicht identifiziert werden konnten (Uhrig et al. 1999), aufgeschlüsselt werden können, hat M-FISH ein großes Potential in der humanen Zytogenetik entwickelt; menschliche Chromosomen lassen sich inzwischen mit M-FISH schnell und einfach klassifizieren und untersuchen.

Deshalb stellte sich die Frage, ob es möglich ist, M-FISH auch bei der Analyse von Maus-Chromosomen anwenden zu können. Falls dies möglich ist, könnte Maus-M-FISH die konventionelle G-Bänderung ergänzen und die Analyse von Maus-Chromosomen vereinfachen. Mit der Entwicklung von 5 Fluorochrom M-FISH bei der Maus konnte gezeigt werden, dass eine solche Ergänzung möglich ist und sogar Translokationen klassifizieren kann, die mit der G-Banden-Technik nicht gesehen wurden.

Um die Auflösung bei Maus M-FISH - ähnlich wie es für 7 Fluorochrom M-FISH beim Menschen in Azofeifa et al. (2000) beschrieben wurde - zu verbessern, sollte Maus M-FISH auf sieben Fluorochrome erweitert werden.

Bei humanen Chromosomen zeigt eine Erhöhung von fünf auf sieben Fluorochrome sehr gute Resultate und eine zuverlässige Anwendbarkeit. Die Chromosomen zeichnen sich durch eine sehr homogene Färbung in Echtfarben sowie Klassifikationsfarben aus und zeigen auch bei kleineren chromosomalen Anomalien weniger Bildartefakte; zum Beispiel konnten dadurch kleine Translokationen besser identifiziert werden (Azofeifa et al. 2000, Fauth et al. 2001).

Interchromosomale Aberrationen resultieren in Farbkombinationen, die beim Karyotypisieren der 24 Farben bei menschlichen Chromosomen und 21 Farben bei Maus-Chromosomen bezüglich Sensitivität und Spezifität in der Signalerkennung in drei verschiedene Typen unterteilt werden können. Dabei hat die Fluorochromkombination unterschiedliche Auswirkung, wie in Abbildung 8 dargestellt wird.

A	B	Signalerkennung		Frequenz (%)		Spezifität	Sensitivität	
		visuell	auto	5f	7f			
				81,7	50	gering	hoch	a)
				5,7	50	hoch	hoch	b)
				12,6	0	gering	gering	c)

Abbildung 8: Schematische Darstellung zur unterschiedlichen Auswirkung der Fluorochromkombination auf Spezifität und Sensitivität. Erläuterung im Text. Nach Fauth et al. 2001.

Die Abbildung zeigt die verschiedenen möglichen Farbkombinationen bei Maus 5 Fluorochrom M-FISH im Vergleich zu 7 Fluorochrom M-FISH: bei kleinen interchromosomalen Umbauten (unter 3 Mb) hat die Wahl der Fluorochromkombination beträchtliche Auswirkungen auf die Identifizierung. In dem Schema ist dies nur für Translokationen dargestellt; ähnliche Überlegungen würden auch für Insertionen zutreffen.

In 8a) und b) ist dargestellt, dass eine kleine Translokation in der Regel leichter nachzuweisen ist, wenn das translozierte Segment ein neues Fluorochrom zum Translokations-Chromosom hinzufügt. Dies ist gegeben, wenn jedes Chromosom mit der gleichen Anzahl an Fluorochromen markiert ist. Das translozierte Segment kann sowohl durch visuelle Inspektion („visuell“) als auch durch automatische Klassifikation mittels der Klassifizierungs-Software („auto“) nachgewiesen werden.

In 8c) wird eine Typ 3 Farbkombination gezeigt: eine kleine Translokation ist schwieriger nachzuweisen, wenn translozierte Segment nur mit Fluorochromen markiert ist, die auch im zentralen Segment vorkommen. Diese kleine Translokation hat sowohl eine geringe Spezifität als auch Sensitivität. In diesem Beispiel ist Chromosom A mit einem roten und einem gelben Fluorochromen markiert, Chromosom B nur mit einem gelben Fluorochrom. Wenn ein Segment des Chromosoms B auf Chromosom A transloziert, ist das translozierte Segment nur mit einem Fluorochrom markiert, das auf dem involvierten Chromosom A bereits vorkommt. Eine solche Translokation wird möglicherweise durch Fluoreszenz überstrahlt und wird so unter Umständen bei der visuellen („visuell“) und automatischen Klassifizierung („auto“) übersehen. Auf Grund dieser Gegebenheit könnten beim herkömmlichen Maus 5 Fluorochrom M-FISH insgesamt 12,6% der 420 möglichen Translokationen übersehen werden.

Mit Maus 7 Fluorochrom M-FISH reduziert sich die Häufigkeit auf 0%, da bei den 40 Maus-Chromosomen alle Chromosomen mit derselben Anzahl an Fluorochromen markiert werden können: jedes Chromosom erhält eine Doppelmarkierung und verhält sich nach Schemazeichnung a) oder b).

Es wird bei der Klassifizierung einer Translokation also immer ein Fluorochrom auftreten, das das andere involvierte Chromosom nicht hat. Dies hat zur Folge, dass die Auflösung von M-FISH erhöht wird. Das oben beschriebene Phänomen gilt auch für andere strukturelle Veränderungen wie kleine Insertionen.

Die Anwendbarkeit von Maus 7 Fluorochrom M-FISH sollte an Hand der Klassifizierung mehrerer Maus-Tumoren (Mamma-CA) überprüft werden, die freundlicherweise von Dr. Jochen Geigl aus der Arbeitsgruppe Dr. Christoph Klein (Institut für Immunologie der LMU München) zur Verfügung gestellt wurden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Schematische Darstellung der verwendeten Protokolle

Die Doktorarbeit ist in drei Bereiche mit unterschiedlichen Protokollen unterteilt:

Neuroblastom Zelllinien, Neuroblastom Gewebe, Maus 7 Fluorochrom M-FISH.

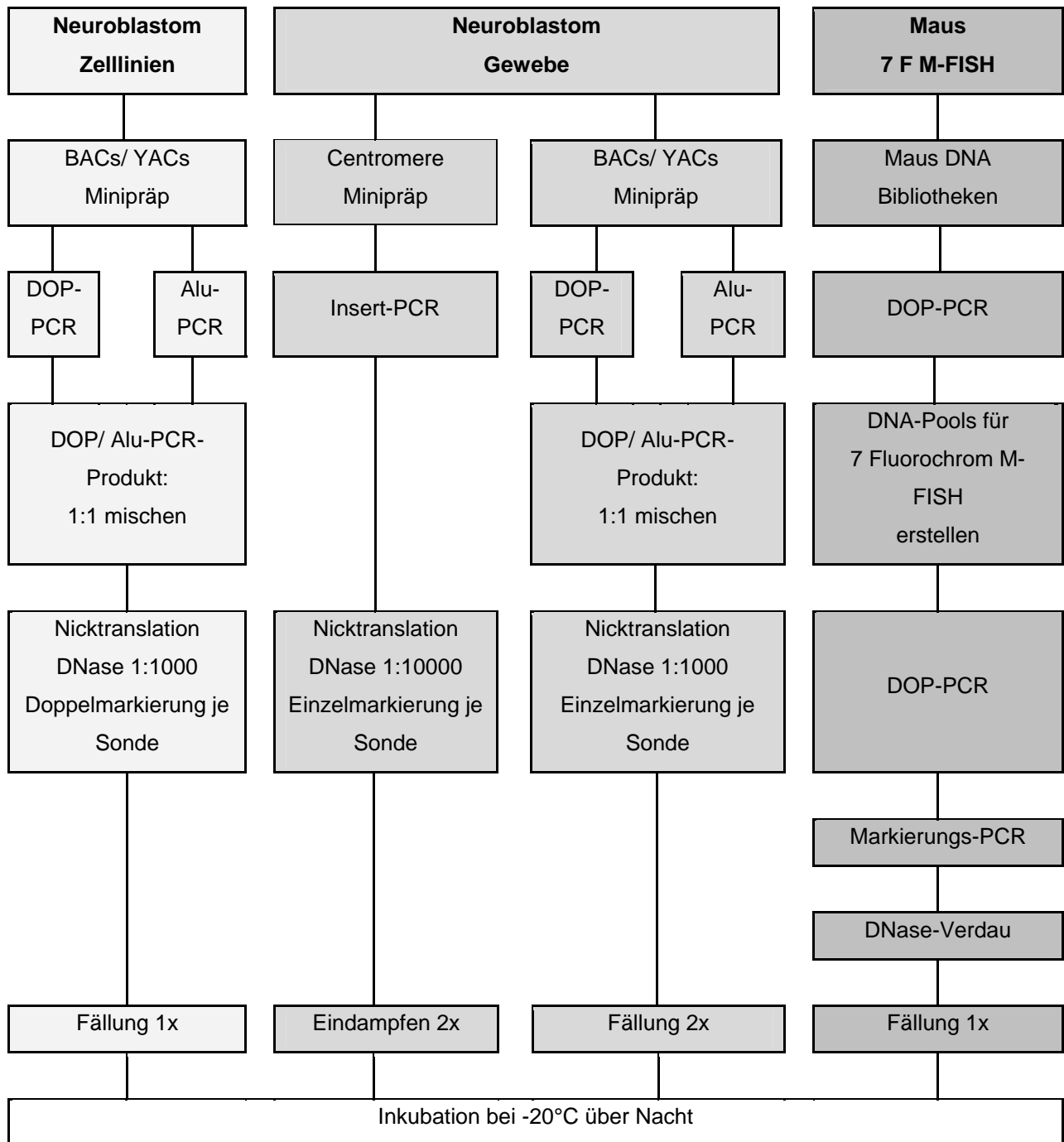
Um einen Einblick in die Komplexität der jeweils verwendeten Protokolle zu geben, sind auf den nächsten Seiten schematische Übersichtsdarstellungen der unterschiedlichen Protokolle aufgeführt.

Die auf den kommenden Seiten gezeigten schematischen Darstellungen werden wie folgt unterteilt; die in der rechten Spalte angegebenen Kapitel beziehen sich auf die ausführlichen Protokolle der beschriebenen Experimente.

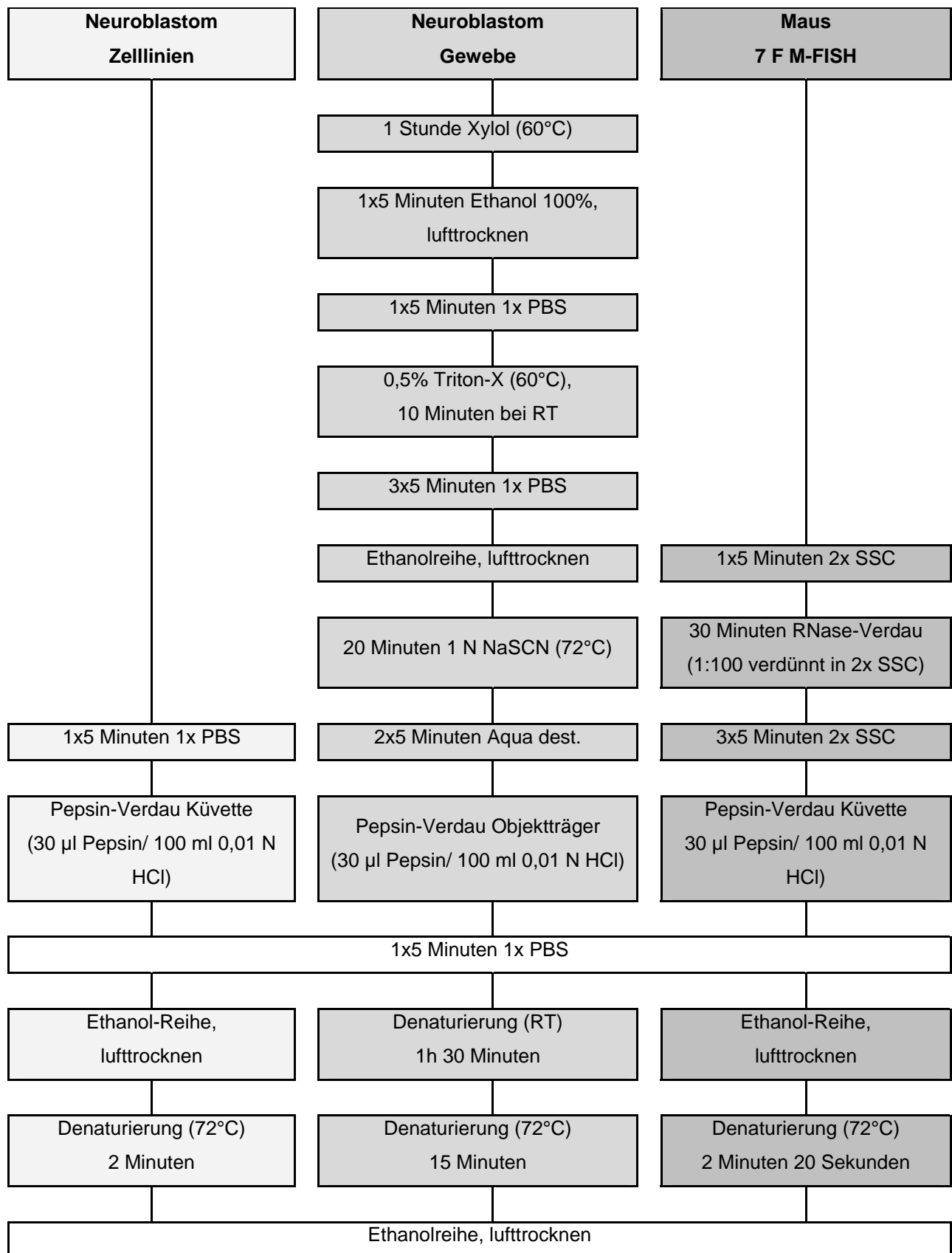
2.1.1 Vorbereitung der DNA-Sonden:	Siehe Kapitel	2.2.1 - 2.2.4 2.3.3.1 - 2.3.3.4 2.4.1 - 2.4.5	Zelllinien Gewebe Maus M-FISH
2.1.2 Vorbehandlung der Präparate:	Siehe Kapitel	2.2.6.1 2.3.2 2.4.7.1	Zelllinien Gewebe Maus M-FISH
2.1.3 Hybridisierung:	Siehe Kapitel	2.2.6.2 – 2-2-6-3 2.2.3.5 2.4.7.2 – 2.4.7.3	Zelllinien Gewebe Maus M-FISH
2.1.4 Nachweis:	Siehe Kapitel	2.2.7 2.3.3.6; 2.3.4.5 2.4.8	Zelllinien Gewebe Maus M-FISH
2.1.5 Aufnahme und Auswertung:	Siehe Kapitel	2.2.8 2.3.3.7; 2.3.4.6 2.4.9	Zelllinien Gewebe Maus M-FISH

*Tabelle 5: Übersicht und Querverweise auf die folgenden Protokolle*

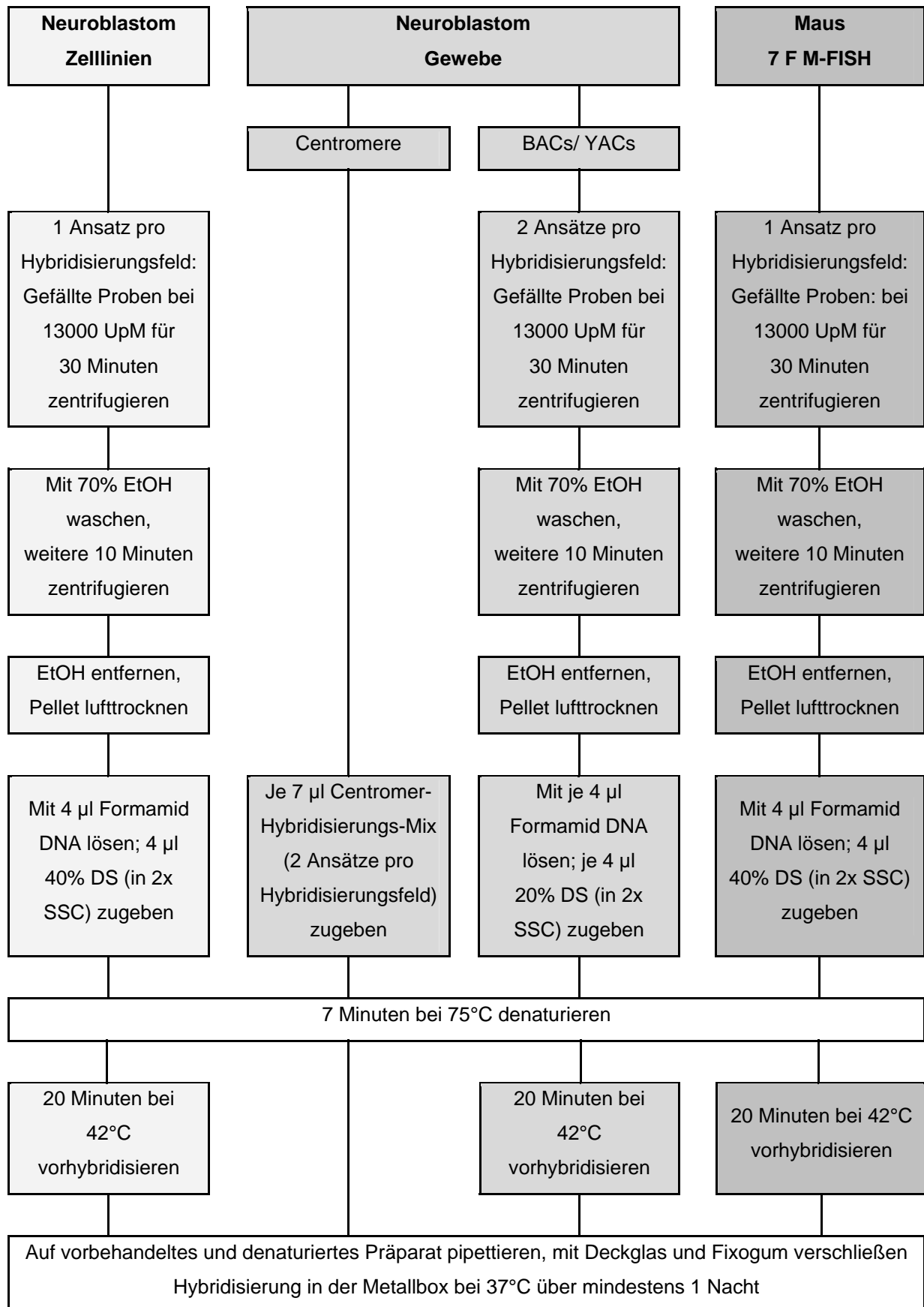
### 2.1.1 Übersicht: Vorbereitung der DNA-Sonden



### 2.1.2 Übersicht: Vorbehandlung der Präparate

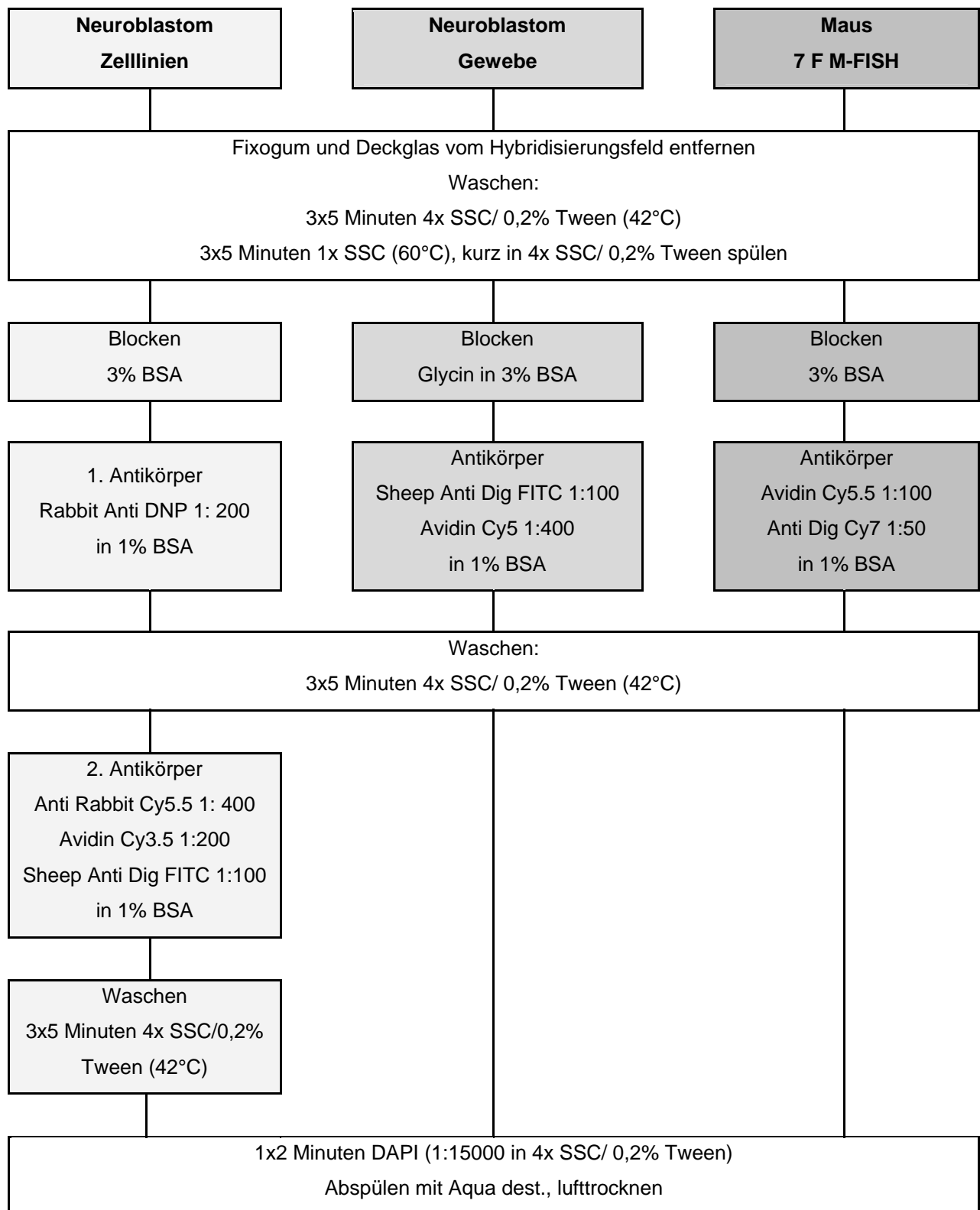


### 2.1.3 Übersicht: Hybridisierung

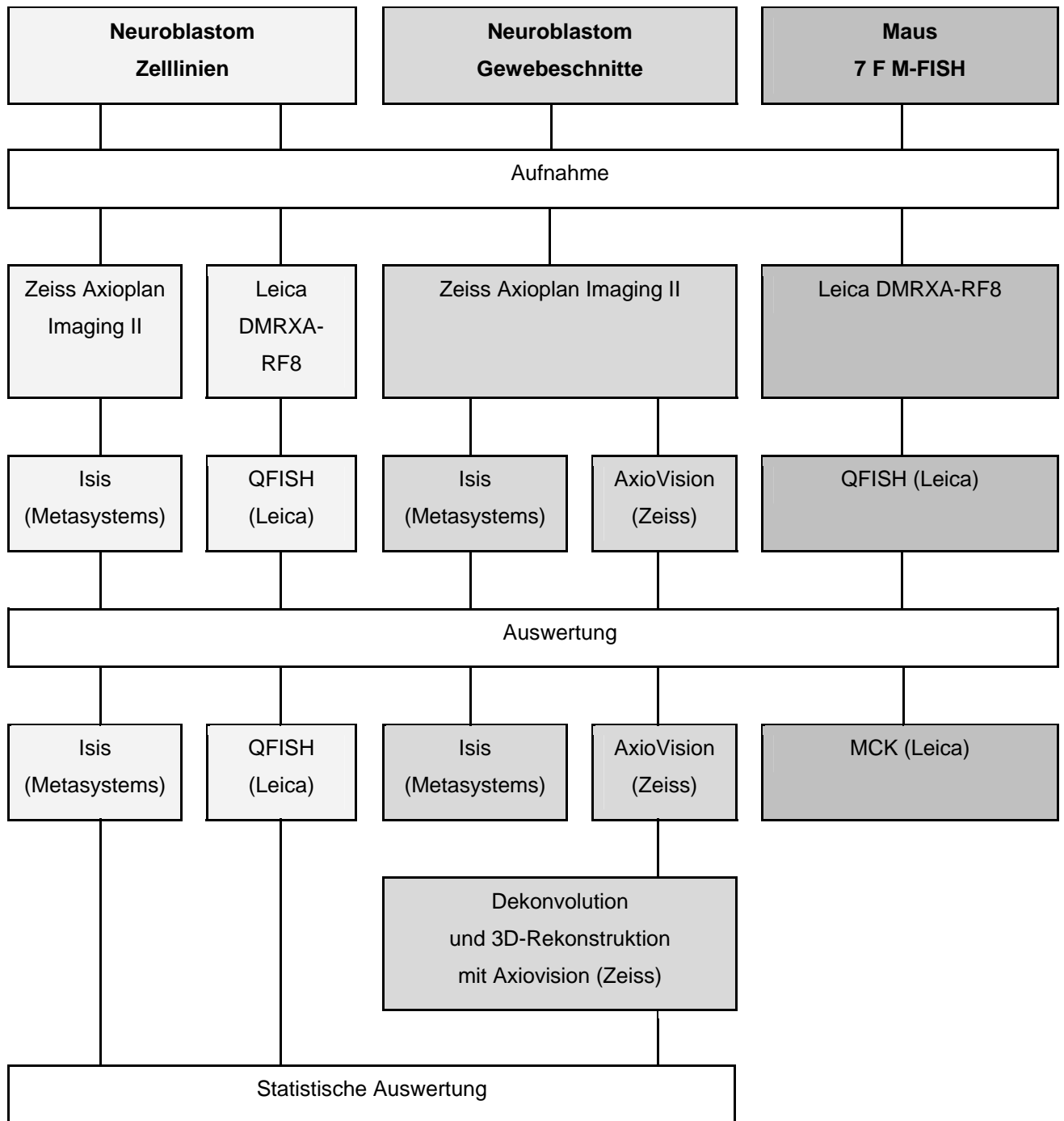




### 2.1.4 Übersicht: Nachweis



### 2.1.5 Übersicht: Aufnahme und Auswertung



## 2.2 Neuroblastom:

### In-situ-Hybridisierung mit BACs und YACs auf Zelllinien

#### 2.2.1 Isolierung von BACs

BACs (*bacterial artificial chromosomes*; Shizuya et al. 1992) sind künstliche Bakterien-Chromosomen. Die inserierte DNA hat eine Größe von bis zu 300 Kilobasen (kb).

Um die Regionen-spezifische BAC-DNA aus *Escherichia coli* Kulturen zu isolieren, muss eine Minipräp durchgeführt werden.

Folgende BACs wurden für den kombinatorischen Hybridisierungs-Ansatz verwendet:

Sonde	Klonname	Resistenz	Lokalisation
BAC	760H24	Chloramphenicol	11q23
BAC	628O18	Chloramphenicol	17p12
BAC	1124B17	Chloramphenicol	17q25
BAC	60J11	Chloramphenicol	1p36

Tabelle 6: für den kombinatorischen Hybridisierungs-Ansatz verwendete BACs.

Die BACs wurden als Glycerol-Stocks zur Verfügung gestellt.

#### 2.2.1.1 Ansetzen einer Übernacht-Kultur aus Glycerol-Stocks

##### Reagenzien

Glycerol-Stocks mit BACs in *Escherichia coli* Kulturen

LB-Medium (siehe Anhang)

Antibiotikum: Chloramphenicol 1: 1000 in Ethanol; Fluka BioChemica

- Von den bei -80°C gelagerten und auf Trockeneis gebrachten Glycerolstocks eine kleine Menge abkratzen und in sterile verschließbare Zentrifugenröhrchen mit 5 ml LB-Medium/ Chloramphenicol (1:1000 verdünnt in Ethanol) geben.
- Die Kulturen bei 37°C und einer Schüttel-Frequenz von 120 in einem Inkubator über Nacht inkubieren.

### 2.2.1.2 Isolierung von Region-spezifischer DNA aus BACs mittels Minipräp

#### Reagenzien

Übernacht-Kulturen der Regionen-spezifischen BACs  
QIAprep® Miniprep Kit; Qiagen

Die Minipräp wurde mit Hilfe des QIAprep® Miniprep Kit's der Firma Qiagen nach Anleitung durchgeführt. Zur Erfolgskontrolle wurde je 5 µl auf einem 1%igen Agarose-Gel aufgetragen.

#### Reagenzien

1x TAE-Puffer zur Gelelektrophorese (siehe Anhang)  
Agarose NEE0; Roth  
Ethidiumbromid, 1% flüssige Lösung; Merck  
Gellaufpuffer (siehe Anhang)  
Marker: 100 Basenpaar Leiter, 1 µg/ µl; New England Biolabs; (gebrauchsfertige Verdünnung siehe Anhang)

#### **1%iges Agarose-Gel:**

- 0,5 g Agarose in 50 ml 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle lösen und anschließend diese Lösung etwas abkühlen lassen.
- Nach Zugabe von 1 µl Ethidiumbromid die Lösung in eine Gelkammer gießen und die Kämme für die Geltaschen aufstecken.
- Nach Erkalten der Agarose Kämme entfernen, das Gel in das Gelelektrophorese-Gerät einbringen und mit 1x TAE-Puffer knapp überschichten.
- 1/10 Volumen des Proben-Ansatzes mit je 1 µl Gelloading-Puffer mischen und in die Geltaschen einpipettieren.
- Zur Kontrolle der Fragmentlänge in eine freie Geltasche einen Längenmarker pipettieren, zum Beispiel einen 100 Basenpaar-Leiter, der alle 100 Basenpaare eine Bande zeigt; bei 500 Basenpaaren und 1000 Basenpaaren weist der Marker jeweils eine verdickte Bande auf.
- Proben bei Anlegen einer Spannungsdifferenz von 110 Volt im elektrischen Feld entsprechend ihrer Länge von - nach + auftrennen.
- Anschließend die Banden auf dem Gel mittels eines Geltransilluminators sichtbar machen.

Abbildung 9 zeigt die isolierte BAC-DNA:

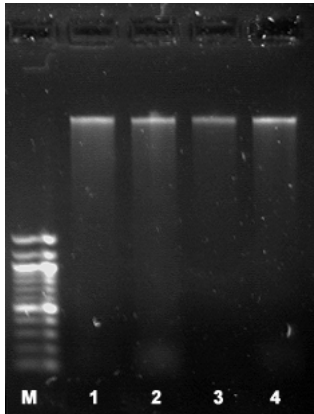


Abbildung 9: Isolierte BAC-DNA M: Marker (100 Basenpaar Leiter).

Der Marker zeigt bei 500 bp und 1000 bp eine verdickte Bande.

1: 760H24; 2: 628O18; 3: 1124B17; 4: 60J11.

## 2.2.2 Amplifikation von BACs und YACs

### 2.2.2.1 DOP-PCR

Bei der DOP-PCR (*degenerate oligonucleotide primed polymerase chain reaction*; Telenius et al. 1992,a,b) handelt es sich um eine PCR-Technik, bei der alle Zielsequenzen unspezifisch amplifiziert werden. Dies wird durch die Verwendung von teilweise degenerierten, universell amplifizierenden Primern erreicht, die an vielen Stellen in der Ausgangs-DNA binden können.

Für diese unspezifische Amplifikation menschlicher DNA wird der Primer 6MW verwendet. Der DOP-Primer 6MW besteht aus definierten Sequenzen am 5'- und am 3'-Ende. Die mittlere Sequenz besteht aus statistisch zufälligen Reihenfolgen von sechs Nukleotiden. Die Primer hybridisieren bei niedriger Stringenz etwa alle vier Kilobasen.

Die Region-spezifischen BACs, deren DNA mittels einer Minipräp isoliert wurde, wurden sowohl mit einer Alu-PCR (Lengauer et al. 1992) als auch mit einer DOP-PCR (Telenius et al. 1992,a,b) amplifiziert.

Für die kombinatorische Markierung wurden außerdem Regionen-spezifische YACs zur Verfügung gestellt. YACs (*yeast artificial chromosomes*, Schlessinger, 1990) sind künstliche Hefechromosomen; die Größe der inserierten DNA liegt zwischen 200 und 2000 Kilobasen (kb).

Folgende YACs wurden für den kombinatorischen Ansatz verwendet:

Sonde	Klonname	Lokalisation	Markierung
YAC	879B10	11p15	Cy3, Digoxigenin
YAC	906E08	1q12	Biotin, Cy5
YAC	875B11	2p24 (MYCN)	DNP

Tabelle 7: Für den kombinatorischen Hybridisierungs-Ansatz verwendete YACs.

Die erste Amplifikation der DNA wurde mittels niedrig-stringenter Zyklen durchgeführt („Telenius DOP-PCR“).

Programm der Telenius DOP-PCR:

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Anfangsdenaturierung	95°C	5 Minuten
2. Denaturierung	95°C	1 Minute
3. Annealing	30°C	1 Minute 30 Sekunden
4. Elongation	72°C	3 Minuten
5. Denaturierung	95°C	1 Minute
6. Annealing	62°C	1 Minute 30 Sekunden
7. Elongation	72°C	3 Minuten
8. Finale Elongation	72°C	5 Minuten
Schritte 2-4: 5 Zyklen Schritte 5-7: 35 Zyklen	Schritt 4: 0,2 Sekunden-Schritte auf 72°C Schritt 7: + 1 Sekunde/ Zyklus	

Tabelle 8: Programm der Telenius DOP-PCR.

Reagenzien

Primer 6MW: 5'- CCG ACT CGA GNN NNN AT GTG G-3', 100 pmol/ µl; Genzentrum  
(N = zufällige Reihenfolge der Nukleotide A, G, C oder T)

10x PCR Puffer; Invitrogen Life Technologies

Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>), 50 mM; Invitrogen Life Technologies

5 mM dNTP's:

2'Deoxyadenosin-5'Triphosphat (dATP), 100 mM, pH 7,5; Amersham Biosciences

2'Deoxycytidin-5'Triphosphat (dCTP), 100 mM, pH 7,5; Amersham Biosciences

2'Deoxyguanosin-5'Triphosphat (dGTP), 100 mM, pH 7,5; Amersham Biosciences

2'Deoxythymidin-5'Triphosphat (dTTP), 100 mM, pH 7,5; Amersham Biosciences

Taq-Polymerase, 500 Units (5U/ µl); Invitrogen Life Technologies

PCR-Maschine; MJ Research PTC-225

Telenius DOP-PCR Ansatz:

Endkonzentration	Ausgangskonzentration
1x	10x PCR Puffer
2 mM	MgCl <sub>2</sub>
0,2 mM	5 mM dNTP's
2 µM	100 µM 6MW
1 U	Taq DNA Polymerase
add 25 µl	ddH <sub>2</sub> O
100 ng	DNA
Gesamtvolumen 25 µl	

Tabelle 9: Ansatz der Telenius DOP-PCR.

Zur Erfolgskontrolle wurde 1/10 Volumen des PCR-Ansatzes, also 2,5 µl zusammen mit 1,5 µl Laufpuffer auf einem 1%igen Agarose-Gel aufgetragen.

Abbildung 10 zeigt die Telenius DOP-PCR der BAC- und YAC-DNA.

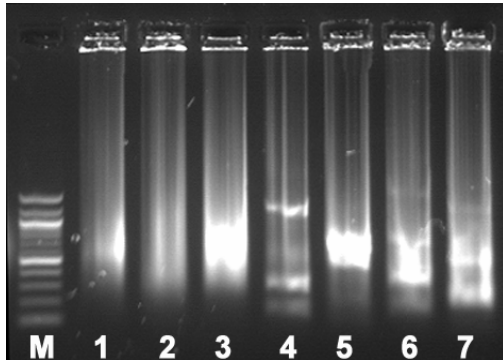


Abbildung 10: Gelbild der Telenius DOP-PCR der BAC- und YAC-DNA.

M: Marker (100 Basenpaar Leiter).

1: 760H24; 2: 628O18; 3: 1124B17; 4: 60J11; 5: 879B10; 6: 906E08; 7: 875B11.

### 2.2.2.2 Alu-PCR

Die Alu-PCR (Lengauer et al. 1992) ist eine PCR-Reaktion, bei der man einen Oligonukleotid-Primer mit einer Sequenz verwendet, die von der Alu-Sequenz abstammt. Er wird benutzt, um Basenfolgen zwischen benachbarten Alu-Sequenzen zu vermehren, die aufeinander zulaufen. Alu-Sequenzen sind über das gesamte Genom verteilt. Die Vektor-DNA wird nicht mitamplifiziert, da sie keine Alu-Sequenzen enthält.

Programm der Alu-PCR:

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Anfangsdenaturierung	95°C	5 Minuten
2. Denaturierung	95°C	1 Minute
3. Annealing	30°C	30 Sekunden
4. Elongation	72°C	6 Minuten
5. Finale Elongation	72°C	5 Minuten
Schritte 2-4 : 30 Zyklen		

Tabelle 10: Programm der Alu-PCR.



Reagenzien

Primer 6C11: 5'-TCC CAA AGT GCT GGG ATT ACA G-3'; 100 pmol/ µl; Genzentrum

Primer 6C12: 5'-CTG CAC TCC AGC CTG GG-3'; 100 pmol/ µl; Genzentrum

10x PCR Puffer; Invitrogen Life Technologies

Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>), 15 mM; Invitrogen Life Technologies

25 mM dNTP's: dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 100 mM, pH 7,5; Amersham Biosciences

Taq-Polymerase, 500 Units (5 U/ µl); Invitrogen Life Technologies

PCR-Maschine; MJ Research PTC-225

Alu-PCR Ansatz:

Endkonzentration	Ausgangskonzentration
1x	10x PCR Puffer
1,5 mM	15 mM MgCl <sub>2</sub>
0,25 mM	25 mM dNTP's
0,5 µM	100 µM C11
0,5 µM	100 µM C12
1 U	Taq DNA Polymerase
add 100 µl	ddH <sub>2</sub> O
200 ng	DNA
Gesamtvolumen 100 µl	

Tabelle 11: Ansatz der Alu-PCR.

Zur Erfolgskontrolle wurden je 5 µl des Alu-PCR-Ansatzes auf einem 1%igen Agarose-Gel aufgetragen.

Abbildung 11 zeigt die Alu-PCR Produkte.

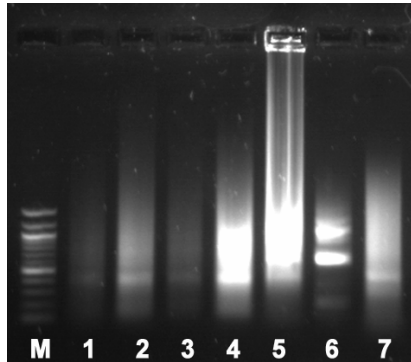


Abbildung 11: Gelbild der Alu-PCR.

M: Marker (100 Basenpaar Leiter); 1: 760H24; 2: 628O18; 3: 1124B17; 4: 60J11;  
5: 879B10; 6: 906E08; 7: 875B11.

Durch eine anschließende Salz-Ethanol-Fällung wird die DNA gereinigt.

#### Reagenzien

Alu-PCR Produkt

3 M NaOAc, pH 5,2 (siehe Anhang)

Ethanol absolut, eiskalt; Merck

- Für die Fällung die DNA mit 1/10 Volumen NaOAc und 2,5 Gesamtvolumen 100% eiskaltes, reines Ethanol versetzen, mischen und über Nacht bei -20°C fällen.
- Fällung in der Kühlzentrifuge bei 13000 Umdrehungen pro Minute (UpM) und 4°C für 30 Minuten zentrifugieren, anschließend mit 200 µl 70% reinem, eiskaltem Ethanol waschen und in der Kühlzentrifuge bei 13000 UpM und 4°C für weitere zehn Minuten zentrifugieren.
- Überstand entfernen, das Pellet bei 37°C auf einem Heizblock trocknen und in 44 µl H<sub>2</sub>O (*Ampuwa*) aufnehmen und lösen. Die Konzentration so wählen, dass 11 µl dieser Lösung etwa 1 µg DNA entsprechen.

### 2.2.3 Nicktranslation

Bei der Nicktranslation werden durch DNase 1 in der DNA Einzelstrangbrüche ("nicks") gesetzt. Von diesen Einzelstrangbrüchen aus baut die Polymerase I (Kornberg-Enzym) durch ihre 5'-3' Exonucleaseaktivität Nukleotide ab und baut gleichzeitig durch ihre Polymerase-Aktivität Nukleotide ein. Hierbei werden in statistischen Abständen markierte Nukleotide eingebaut.

#### Reagenzien

10x Nicktranslationspuffer (siehe Anhang)

0,1 M  $\beta$ -Mercaptoethanol; Merck

0,5 mM AGC: dATP, dCTP, dGTP, je 100 mM, pH 7,5; Amersham Biosciences

Biotin: Biotin-16-dUTP, 50 nM; Roche

Digoxigenin-11-dUTP, 125 nM; Roche

Cy5-dUTP, 25 nM; Amersham Biosciences

Cy3: Cy3-dUTP, 25 nM; Amersham Biosciences

DNP: DNP-11-dUTP, 10 mM; NEN Life Sciences

DNA Polymerase 1, Kornberg-Enzym, 5 U/  $\mu$ l; New England Biolabs

DNase 1 (1:1000 Verdünnung); aus bovinem Pankreas, Stocklösung 3 mg/ ml; Roche

Für die Nicktranslation wurde eine 1:1 Mischung aus dem DOP-PCR-/ sowie Alu-PCR-Produkt verwendet. Es hat sich gezeigt, dass diese Mischung bei der Hybridisierung schönere Signale im Vergleich zu einzeln nicktranslatierten PCR-Produkten ergibt, also zu entweder einzeln eingesetzten DOP-PCR-/ oder Alu-PCR- Produkten in die Nicktranslation.

Nicktranslations-Ansatz:

Endkonzentration (1x)	Ansatz
Proben DNA	Je 500 ng aus DOP-PCR und Alu-PCR
10x NT-Puffer	5 µl
0,1 M β-Mercaptoethanol	5 µl
0,5 M AGC-Mix	5 µl
Fluorochrom	1 µl
Polymerase 1	1 µl
DNase 1	10 µl
ddH <sub>2</sub> O	add 50 µl
Gesamtvolumen 50 µl	

Tabelle 12: Ansatz der Nicktranslation.

Die Sonden werden in einem 15°C Wasserbad 2 Stunden nicktranslatiert. Nach dem Verdau sollte die DNA zwischen 200 und 600 bp lang sein (Kontrolle im 1% Agarose-Gel mit je 5 µl).

## 2.2.4 Salz-Ethanol-Fällung

Für eine in-situ-Hybridisierung muss die nicktranslatierte DNA zunächst gefällt werden.

### Reagenzien

Nicktranslatierte DNA

Human Cot-1 DNA, 1 mg/ ml; Roche

Salmon testes DNA (Lachstestes), 10,2 mg/ ml; Sigma

3 M NaOAc, pH 5,2 (siehe Anhang)

Ethanol absolut, eiskalt; Merck

Salmon testes DNA sättigt unspezifische DNA-Bindungsstellen ab (Supprimierung unspezifischer Wechselwirkungen) und dient zudem als „Carrier-DNA“ bei sehr geringen Probenkonzentrationen.

Cot-1-DNA besteht aus nicht-markierten repetitiven Sequenzen und sättigt durch Zugabe im Überschuss repetitive DNA-Sequenzen der Sonden-DNA ab (CISS-Hybridisierung, Cremer et al. 1988, Lichter et al. 1988).

Folgendes kombinatorisches Schema wurde für die Fällung und anschließende Hybridisierung der Regionen-spezifischen BACs und YACs verwendet:

Sonde	Klonname	Lokalisation	Markierung
YAC	879B10	11p15	Cy3, Digoxigenin
BAC	760H24	11q23	Digoxigenin, Cy5
BAC	628O18	17p12	Cy3, Cy5
BAC	1124B17	17q25	Cy3, Biotin
BAC	60J11	1p36	Digoxigenin, Biotin
YAC	906E08	1q12	Biotin, Cy5
YAC	875B11	2p24 (MYCN)	DNP

Tabelle 13: Kombinatorisches Schema der verwendeten BACs und YACs.

Fällungsschema der Sonden (im Folgenden kombinatorischer Nb-Pool):

Sonden	Markierung	µl	Cot1 DNA	Salmon testes DNA	Σ	NaOAc	EtOH 100% eiskalt
11p15	Digoxigenin Cy3	1,0 4,0	70	5	136	13,6	374
17p12	Cy3 Cy5	8,0 5,0					
11q23	Digoxigenin Cy5	5,5 6,0					
17q25	Cy3 Biotin	5,0 5,0					
1q12	Bio Cy5	1,5 6,0					
1p36	Digoxigenin Biotin	5,0 8,0					
2p24	DNP	1,0					

Tabelle 14: Fällungsschema der kombinatorisch markierten BACs und YACs; alle Angaben in µl.

- Für die Fällung zur DNA 5 µl Salmon testes DNA sowie 70 µl human Cot-1 DNA zugeben und mischen.
- Dann 1/10 Volumen NaOAc und das 2,5-fache Gesamtvolumen 100% eiskaltes, reines Ethanol zupipettieren, mischen und über Nacht bei -20°C fällen.

## 2.2.5 Chromosomenpräparation

Die kombinatorisch markierten BACs und YACs wurden auf Lymphozyten (46,XY) -Präparate sowie auf Neuroblastom-Zelllinien hybridisiert. Die Zelllinien wurden von Frank Speleman zur Verfügung gestellt. Die Herstellung von Metaphasepräparaten aus Lymphozyten (46,XY) erfolgte aus heparinisiertem Vollblut.

### Reagenzien

RPMI 1640 Medium mit folgenden Zusätzen:

100 I.E. Penicillin/ ml

100 µg Streptomycin/ ml

Fetales Kälberserum (FCS) (20%)

Phytohämagglutinin

Colchicin (10 µg/ ml) = Colcemid

Kaliumchlorid (KCl) (75 mM); bei 37°C vorgewärmt

Fixativ (Methanol/ Eisessig, 3:1 Vol:Vol); bei -20°C gekühlt

- 10 ml heparinisiertes Vollblut 5 Minuten bei 1000 UpM abzentrifugieren und die Lymphozyten-angereicherte Schicht mit einer Spritze absaugen.
- 2 ml dieser abgesaugten Schicht in 50 ml Medium mit 0,4 ml Phytohämagglutinin für 72 Stunden inkubieren.

### **Colcemid-Behandlung**

- Colcemid zugeben und bei 37°C für 15 bis 20 Minuten inkubieren.
- 10 Minuten bei 1000 UpM in einem Zentrifugenröhrchen abzentrifugieren und Überstand verwerfen.

### Hypotonie

- Pellet mit einer Glaspipette kurz resuspendieren und gegebenenfalls kurz vortexen (Vermeidung von Klumpenbildung).
- Zuerst langsam, dann schneller vorgewärmtes KCl zugeben und auf 8 ml auffüllen. Klumpenbildung vermeiden.
- 20 Minuten in einem 37°C Wasserbad inkubieren, dann 5 Minuten bei 1000 UpM abzentrifugieren.
- Überstand bis auf etwa 1 ml absaugen.

### Fixierung

- Etwa 1 ml gekühltes Fixativ zugeben und vorsichtig mit der Pipette resuspendieren - zuerst langsam, dann schneller.
- Auf 8 ml auffüllen, durchmischen und 5 Minuten bei 1000 UpM zentrifugieren.
- Fixativ bis auf etwa 1 ml absaugen und Pellet erneut resuspendieren.
- Mit frischem Fixativ auf 8 ml auffüllen und Vorgang einige Male wiederholen.
- Beim letzten Waschschrift nur so viel Fixativ zugeben, bis Mischung leicht „milchig“ erscheint.

### Auftropfen und Lagerung

- Objektträger („Super Frost“) über Nacht in 100% Ethanol waschen und am nächsten Tag in Aqua bidest. (ddH<sub>2</sub>O) auf Eis oder im Kühlschrank lagern.
- Das Zell-Fixativ-Gemisch auf den feuchten Objektträger auftropfen, überschüssige Flüssigkeit auf einem Tuch kurz abrinnen lassen.
- Objektträger auf einer 37°C Wärmeplatte, die mit einem feuchten Tuch ausgelegt ist, trocknen lassen.

Die Chromosomenpräparate sollten vor der Hybridisierung altern. Hierfür kann man sie für etwa drei bis vier Tage bei Raumtemperatur lagern und stellt sie dann in 70% Ethanol bei 4°C in den Kühlschrank. Bei längerer Lagerung sollten die Präparate mit Silikagel bei - 80°C eingefroren werden.

## 2.2.6 In-situ-Hybridisierung des kombinatorischen Nb-Pools

### 2.2.6.1 Vorbehandlung der Präparate

#### Pepsin-Verdau

##### Reagenzien

1x PBS (siehe Anhang)

Pepsin, Stocklösung 10% (100mg/ ml); Sigma

0,01 N HCl-Lösung (siehe Anhang)

aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%)

Um eine optimale Hybridisierung zu erreichen, muss überschüssiges Cytoplasma auf den Präparaten entfernt werden. Vor allem die mit Digoxigenin markierten und mit Antikörpern nachgewiesenen Chromosomen (siehe später) weisen ohne Vorbehandlung ein inhomogenes Hybridisierungsmuster sowie viel Hintergrund (unspezifische Bindungen) auf.

Eine Vorbehandlung wird erzielt durch einen Pepsin-Verdau.

- Das Präparat 1x 5 Minuten in 1x PBS äquilibrieren.
- Das Präparat in 100 ml 0,01 N HCl-Lösung, in die 30 µl Pepsin-Stocklösung zugegeben wurde, für 1-12 Minuten inkubieren.
- Nach 2x 5 Minuten Waschen mit 1x PBS im Schüttler das Präparat je 3 Minuten durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) ziehen, anschließend lufttrocknen lassen.

Beim Pepsin-Verdau erwies sich das Cytoplasma auf den Präparaten mit Tumor-Zelllinien im Vergleich zu Lymphozyten-Präparaten als viel beständiger (Verdau-Zeit von Tumor-Zelllinien: bis zu 12 Minuten; Verdau-Zeit von Lymphozyten: bis zu drei Minuten).

#### Denaturierung der Objektträger

##### Reagenzien

Denaturierungslösung für einen 50 ml Ansatz:

35 ml Formamid reinst; Merck

15 ml 2x SSC (siehe Anhang)

pH 7,0 mit 1 N HCl



- Präparat für 2 Minuten bei 72°C in einer Küvette mit 70% Formamid/ 2x SSC pH 7,0 denaturieren.
- Durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100% eiskaltes Ethanol) das Präparat dehydrieren.
- Anschließend Präparat lufttrocknen.

### 2.2.6.2 Vorbehandlung der gefällten Probe

#### Reagenzien

Formamid deionisiert (pH 7,0)

40% Dextransulfat in 2x SSC (siehe Anhang)

- Den gefällten Ansatz bei 13000 UpM in einer Kühlzentrifuge bei 4°C 30 Minuten zentrifugieren.
- Nach Verwerfen des Überstandes 200 µl 70% Ethanol zum Waschen zupipettieren und für 10 Minuten bei 13000 UpM nochmals zentrifugieren.
- Überstand wieder verwerfen, das Präzipitat bei 37°C im Heizblock lufttrocknen.
- Präzipitat in 4 µl deionisiertem Formamid (pH 7,0) aufnehmen und bei 37°C Inkubation mindestens 30 Minuten lösen.
- Anschließend 4 µl 40% Dextransulfat (in 2x SSC) zugeben, gut vortexen.
- Die gelöste DNA 7 Minuten bei 75°C denaturieren.
- Die denaturierte DNA 20 Minuten bei 42°C vorhybridisieren.

### 2.2.6.3 Hybridisierung

#### Reagenzien

Fixogum (Rubber cement); Marabu

15x15 mm Deckglas

denaturierte und vorhybridisierte DNA-Probe

vorbehandeltes und denaturiertes Chromosomen-Präparat (Objektträger)

- Nach dem Vorhybridisieren die DNA-Probe vorsichtig auf das vorbehandelte und denaturierte Präparat luftblasenfrei pipettieren.
- Nach Auflegen eines 15x15 mm Deckglases das Deckglas mit Fixogum versiegeln, damit die darunter liegende zu hybridisierende DNA nicht austrocknen kann.
- Das Präparat in einer Metallbox bei 37°C über mindestens 1 Nacht inkubieren.

### 2.2.7 Nachweis der hybridisierten Proben

#### Reagenzien

4x SSC/ 0,2% Tween-20, 42°C (siehe Anhang)

1x SSC, 60°C (siehe Anhang)

Block-Lösung: 3% BSA in 4x SSC/ 0,2% Tween-20

Antikörper für den Nachweis von Digoxigenin, Biotin und DNP:

Avidin Cy3.5, 1:300 verdünnt in 1% BSA; Amersham Biosciences

Sheep Anti Dig FITC, 1:100 verdünnt in 1% BSA; Sigma

Rabbit-Anti-DNP, 1:200 verdünnt in 1% BSA; Sigma

Anti-Rabbit-Cy5.5, 1:400 verdünnt in 1% BSA; Amersham Biosciences

DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol 2 HCl); Serva (siehe Anhang)

Antifade: 15 ml p-Phenylendiamidihydrochlorid-Lösung (siehe Anhang)

- Das Fixogum mit Hilfe einer Pinzette vom Präparat entfernen.
- Präparat 3x5 Minuten mit 42°C warmen 4x SSC/ 0,2% Tween-20 waschen (schütteln).
- Anschließend 3x5 Minuten mit 60°C warmen 1x SSC waschen (schütteln).
- Nach kurzem Spülen in 4x SSC/0,2% Tween-20 das Präparat mit 1 ml 3% BSA 30 Minuten blocken (37°C, feuchte Kammer).

- Nach dem Blocken das Präparat wieder kurz mit 4x SSC/ 0,2% Tween-20 spülen (Entfernung der überschüssigen Block-Lösung).
- Antikörper-Stocklösung vor der Verdünnung für 2 Minuten bei 13000 UpM zentrifugieren, um Komplexbildungen zu vermeiden.
- 200 µl verdünnte Antikörper-Lösung auf den Objektträger pipettieren: Rabbit Anti DNP 1:200 in 1% BSA.
- Das Präparat mit einem Deckglas bedecken und 45 Minuten bei 37°C (feuchte Kammer) inkubieren.
- Das Präparat 3x5 Minuten mit 42°C warmen 4x SSC/ 0,2% Tween-20 waschen.
- 200 µl Antikörper-Lösung auf den Objektträger pipettieren: Anti Rabbit Cy5.5 1:400, Avidin Cy3.5 1:200 und Sheep Anti Dig FITC 1:100 in 1% BSA.
- Das Präparat mit einem Deckglas bedecken und 45 Minuten bei 37°C (feuchte Kammer) inkubieren.
- Das Präparat 3x5 Minuten mit 42°C warmen 4x SSC/ 0,2% Tween-20 waschen.
- Durch Aufbringen von 1 ml DAPI-Lösung auf das Präparat (0,5 µl DAPI in 15 ml 4x SSC/ 0,2% Tween-20; 2 Minuten) werden alle Chromosomen angefärbt.
- Nach Abspülen mit destilliertem Wasser das Präparat lufttrocknen und mit 35 µl Antifade eindeckeln.

## 2.2.8 Aufnahme und Auswertung

### 2.2.8.1 Mikroskopie

Die Präparate wurden mit zwei verschiedenen Epifluoreszenz-Mikroskopen ausgewertet:

#### Leica DMRXA-RF8: Leica Microsystems (Eils et al. 1998)

Dieses Mikroskop ist mit einem automatisiertem 8-Filter-Rad und speziell entwickelten Filtern (Chroma Technology Corp.) ausgestattet, so dass für jedes Fluorochrom ein separater Anregungs-, Teilungs und Emissionsfilter zur Verfügung steht (Uhrig et al. 1997). Die Metaphasen wurden mit einem 63x Objektiv aufgenommen. Als Lichtquelle diente eine 100 W Quecksilberdampfampe. Für die Bildaufnahmen wurde eine gekühlte Sensys CCD (*charge coupled device*) -Kamera (Photometrics, Kodak KAF 1400 Chip) verwendet. Über diese Kamera werden die Fluorochrome als skalierbare zweidimensionale Grauwertbilder aufgenommen, denen dann eine bestimmte Farbe zugeordnet werden kann.

Man erhält auf diese Weise eine Bildsequenz der verwendeten Fluorochrome. Durch Überlagerung der Farbkanäle (Fluorochrome) erhält man ein so genanntes Pseudofarbbild.

Kamera und Mikroskop werden über die Leica Software *QFISH* (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd, Cambridge, UK) gesteuert. Durch diese Software ist es möglich, eine Metaphase (M-FISH) in etwa 20 Sekunden aufzunehmen.

### Zeiss Axioplan Imaging II

Auch dieses Mikroskop ist mit einem automatisierten 8-Filter-Rad und speziell entwickelten Filtern (Chroma Technology Corp.) ausgestattet. Das Mikroskop ist in X, Y und Z-Richtung motorisiert und erlaubt so die automatisierte Aufnahme eines Objektes in alle drei Ebenen. Über eine Axiocam-MRm CCD-Kamera werden auch hier die Fluorochrome als skalierbare zweidimensionale Grauwertbilder aufgenommen. Zur weiteren Bildverarbeitung siehe die Beschreibung des Leica-Mikroskops.

Die Bilder wurden mit dem Computerprogramm *Isis* (Version 3.4.0) der Firma Metasystems aufgenommen und mit einer integrierten Software ausgewertet.

### **2.2.8.2 Statistische Analyse**

Insgesamt wurden je Zelllinie 100 Zellkerne ausgewertet. Die Anzahl der Hybridisierungssignale der kombinatorischen BAC- und YAC Proben wurde pro Zellkern und Tumor bestimmt. Die ermittelte Anzahl der einzelnen Signale jeder Zelllinie wurde in Diagrammen dargestellt.

Anschließend wurde mittels der Software *Excel* (Microsoft) ein „2-Stichproben t-Test“ unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen (Welch-Test) durchgeführt. Der „2-Stichproben t-Test“ ermittelt für jede Sonde Mittelwert, Standardabweichung und P-Wert, bezogen auf die Gesamtzahl der ausgewerteten Zellkerne. Hierbei geben die Standardabweichungen den Grad der chromosomalen Instabilität an: je größer die Standardabweichung, desto höher der Grad der chromosomalen Instabilität. Der P-Wert gibt an, ob eine ausreichende Anzahl von Zellkernen in die Analyse mit einbezogen wurde, denn erst ab einer bestimmten Mindestzahl kann eine statistische Aussage getroffen werden. Diese so genannte „statistische Signifikanz“ wird in Dezimalstellen angegeben. Bei einem P-Wert von  $\leq 0,05$  ist die erforderliche Mindestanzahl der in die Berechnung einbezogenen Zellkerne erreicht, das Ergebnis ist also statistisch signifikant.

## 2.3 Neuroblastom: Interphase-FISH auf Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten

### 2.3.1 Patienten mit Neuroblastom

Die Neuroblastom-Gewebeschnitte wurden freundlicherweise von Frau Dr. Uta Behrends aus der Abteilung für pädiatrische Onkologie der Kinderklinik München Schwabing zur Verfügung gestellt.

Bei den analysierten Gewebeschnitten handelt es sich um Tumoren folgender Patientinnen:

- Patientin TJ
- Patientin HV mit einem Lokal-Rezidiv HV-R

### 2.3.2 Vorbehandlung von Formalin-fixierten Paraffinschnitten mit 10 µm Dicke

#### Reagenzien

Xylol; Merck

Ethanol, absolut; Merck

1x PBS (siehe Anhang)

Triton X-100; Merck (0,5% in 1x PBS)

Glycin; Sigma: Glycin-BSA (siehe Anhang); Ethanol-Reihe: 70%, 90%, 100%

1 M Natriumthiocyanat (NaSCN)

Pepsin Stocklösung (100 mg/ ml, in 0,01 N HCl pH 2,3); Boehringer Mannheim

Denaturierungslösung für je einen 50 ml Ansatz: für Denaturierung bei Raumtemperatur sowie für Denaturierung bei 72°C:

35 ml Formamid reinst; Merck

15 ml 2x SSC (siehe Anhang)

pH 7,0 mit 1 N HCl

Für die Vorbehandlung von Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten wurde folgendes Protokoll entwickelt.

- Inkubation des auf einen Superfrost++ Objektträger aufgebrauchten Paraffinschnittes für 60 Minuten in Xylol bei 55°C.
- 1x5 Minuten waschen mit Ethanol absolut (reinst).
- Präparat lufttrocknen.
- 1x5 Minuten waschen in 1x PBS (Raumtemperatur).
- Inkubation in 0,5% Triton X-100 für 15 Minuten.  
Hierfür 0,5% Triton X-100 bei 60°C vorwärmen; Inkubation erfolgt bei Raumtemperatur.
- 3x5 Minuten mit 1x PBS waschen.
- 1000 µl Glycin-BSA direkt auf Präparat pipettieren. Inkubation bei 37°C in der feuchten Kammer.
- Präparat je 3 Minuten durch eine aufsteigende Ethanolreihe ziehen; anschließend lufttrocknen.
- 20 Minuten in 1 M NaSCN Lösung bei 72°C inkubieren.
- 2x5 Minuten waschen in Aqua dest.
- Pepsin-Verdau: 1 ml Pepsinlösung (30 µl Pepsin-Stocklösung/ ml 0,01 N HCl) direkt auf Gewebeschnitt geben und mit Deckglas bedecken. Inkubation für 20 Minuten bei 37°C in der feuchten Kammer.
- 1x5 Minuten in 1x PBS waschen, einen Tropfen 1x PBS auf Präparat tropfen und mit Deckglas bedecken: Cytoplasma-Verdau im Lichtmikroskop kontrollieren. Gegebenenfalls Pepsin-Verdau mit frischer Pepsinlösung wiederholen.
- Präparat je 3 Minuten durch eine aufsteigende Ethanolreihe ziehen; lufttrocknen.
- Präparat für 2 Stunden in 70% Formamid/ 2x SSC bei Raumtemperatur inkubieren.
- Denaturierung des Präparates in 70% Formamid/ 2x SSC bei 72°C für 15 Minuten.
- Präparat je 3 Minuten durch eine aufsteigende eiskalte Ethanolreihe ziehen; lufttrocknen.

### 2.3.3 Centromer-spezifische Sonden

#### 2.3.3.1 Allgemeines

Für die Hybridisierung von chromosomenspezifischen Centromer-Sonden wurden mehrere Sonden ausgewählt, die als Minipräp-Stocklösungen zur Verfügung standen. Sie stammen alle von Mariano Rocchi aus Bari (Italien).

Für die Hybridisierungen wurden folgende Centromer-Sonden verwendet:

Centromer-Sonde	Markierung (Beschreibung siehe unten)
Centromer 8	Digoxigenin
Centromer 11	Cy5
Centromer 17	Cy3
Centromer 18	Texas Red

Tabelle 15: Centromer-Sonden für die Hybridisierung auf Lymphozyten und Gewebeschnitt.

Zur selektiven Amplifikation wurde eine Insert-PCR (Strachan & Read, 1996) durchgeführt. Anschließend wurden die amplifizierten Centromer-Sonden in einer Nicktranslation markiert.

### 2.3.3.2 Amplifikation von Centromer-Sonden mittels Insert-PCR

Die Centromer-Sonden wurden zunächst mittels einer Insert-PCR amplifiziert. Als zu amplifizierende DNA wurde 1 µl einer 1:10 Verdünnung der reinen Plasmide aus einer Minipröp in die PCR eingesetzt.

Programm der Insert-PCR:

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Anfangsdenaturierung	95°C	5 Minuten
2. Denaturierung	95°C	45 Sekunden
3. Annealing	66°C	45 Sekunden
4. Elongation	72°C	1 Minute
5. Finale Elongation	72°C	5 Minuten
Schritte 2-4 : 30 Zyklen		

Tabelle 16: Programm der Insert-PCR.

Reagenzien

Primer pUC forward (10 µM): 5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3';  
 100 pmol/ µl; Genzentrum  
 Primer pUC reverse (10 µM): 5'-AGCGGATAACAATTTACACACAGG-3';  
 100 pmol/ µl; Genzentrum  
 10x PCR Puffer; Invitrogen Life Technologies  
 W1 (1%); Invitrogen Life Technologies  
 Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>), 50 mM; Invitrogen Life Technologies  
 5 mM dNTP's: dATP, dCTP, dGTP, dTTP. je 100 mM, pH 7,5; Amersham Biosciences  
 Taq-Polymerase, 500 Units (5 U/ µl); Invitrogen Life Technologies  
 PCR-Maschine; MJ Research PTC-225

Ansatz der Insert-PCR:

Endkonzentration	Ausgangskonzentration
1x	10x PCR Puffer
1,5 mM	15 mM MgCl <sub>2</sub>
W1 (1%)	0,05%
0,25 mM	5 mM dNTP's
0,2 µM	100 µM pUC forward
0,2 µM	100 µM pUC reverse
1 U	Taq DNA Polymerase
Add 22 µl	ddH <sub>2</sub> O
100 ng	DNA
Gesamtvolumen 22 µl	

Tabelle 17: Ansatz der Insert-PCR.

Zur Erfolgskontrolle wurden je 3 µl zusammen mit 1,5 µl Laufpuffer auf einem 1%igen Agarose-Gel aufgetragen.



### 2.3.3.3 Nicktranslation

Die Insert-Fragmente müssen im nächsten Schritt mit einer Nicktranslation markiert werden.

#### Reagenzien

10x Nicktranslationspuffer (siehe Anhang)  
 0,1 M  $\beta$ -Mercaptoethanol; Merck  
 0,5 mM AGC dATP, dCTP, dGTP. je 100 mM, pH 7,5; Amersham Biosciences  
 Digoxigenin-11-dUTP, 125 nM; Roche  
 Cy5-dUTP, 25 nM; Amersham Biosciences  
 Cy3: Cy3-dUTP, 25 nM; Amersham Biosciences  
 Texas Red: Texas Red-12-dUTP, 1 mM; Molecular Probes  
 DNA Polymerase 1, Kornberg-Enzym, 5 U/  $\mu$ l; New England Biolabs  
 DNase 1 (1:10000 Verdünnung); aus bovinem Pankreas, Stocklösung 3 mg/ ml; Roche

Nicktranslations-Ansatz:

Endkonzentration (1x)	Ansatz
Proben DNA	Gesamtes Insert-PCR-Produkt
10x NT-Puffer	5 $\mu$ l
0,1 M $\beta$ -Mercaptoethanol	5 $\mu$ l
0,5 M AGC-Mix	5 $\mu$ l
Fluorochrom	1 $\mu$ l
Polymerase 1	1 $\mu$ l
DNase 1	14 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	add 50 $\mu$ l
Gesamtvolumen 50 $\mu$ l	

*Tabelle 18: Ansatz der Nicktranslation.*

- Die Sonden in einem 15°C Wasserbad 2 Stunden nicktranslatieren. Nach dem Verdau sollte die DNA zwischen 200 und 600 Basenpaare (bp) lang sein.
- Zur Erfolgskontrolle je 5  $\mu$ l der nicktranslatierten Sonden auf einem 1%igen Agarose-Gel auftragen.

### 2.3.3.4 Verdünnung der nicktranslatierten Centromer-Sonden

Für eine Hybridisierung müssen die nicktranslatierten Centromer-Sonden verdünnt werden. Es werden für die Hybridisierung mehrere Centromer-Sonden eingesetzt.

Hieraus ergibt sich folgender Mix:

Centromer-Sonde	Markierung	Verdünnung in ddH <sub>2</sub> O
Centromer 8	Digoxigenin	1:25
Centromer 11	Cy5	1:10
Centromer 17	Cy3	1:25
Centromer 18	Texas Red	1:25

*Tabelle 19: Verdünnung der nicktranslatierten Centromer-Sonden.*

### 2.3.3.5 In-situ-Hybridisierung der Centromer-Sonden

Die verdünnten Centromer-Sonden werden eingedampft; dadurch wird die Flüssigkeit von der DNA entfernt. Für die Hybridisierung auf ein Lymphozytenpräparat wurde ein einfacher Ansatz, für die Hybridisierung auf einen 10 µm Schnitt ein doppelter Ansatz verwendet. Bei letzterem wurde also der Centromer-Mix zweimal hergestellt, unabhängig voneinander prozessiert und erst zum Schluss auf das gleiche Hybridisierungsfeld pipettiert.

#### Reagenzien

Verdünnte Centromer-Sonden (siehe oben), je 5 µl  
 Human Cot-1 DNA, 1 mg/ ml; Roche, 5 µl  
 Speed Vac; Christ; Eindampfzeit etwa 30 Minuten bei 48°C  
 Hybridisierungs-Mix für Centromer-Sonden (siehe Anhang)

- Präzipitat in 7 µl Hybridisierungs-Mix aufnehmen.
- Anschließend 7 Minuten bei 78°C denaturieren.
- Auf vorbehandeltes und denaturiertes Lymphozytenpräparat (46,XY) pipettieren (siehe Kapitel 2.2.6.1) und mit Deckglas und Fixogum verschließen.
- Die Inkubation erfolgt in einer Metallbox im 37°C Wasserbad über zwei Nächte.

### 2.3.3.6 Nachweis

Der Nachweis erfolgt sowohl für die Lymphozyten-Präparate als auch für die Gewebeschnitte auf folgende Art und Weise:

#### Reagenzien

4x SSC/ 0,2% Tween-20, 42°C (siehe Anhang)

1x SSC, 60°C (siehe Anhang)

Block-Lösung: Glycin-BSA (siehe Anhang)

Antikörper für den Nachweis von Digoxigenin und Biotin:

Sheep Anti Dig FITC, 1:100 verdünnt in 1% BSA; Sigma

DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol 2 HCl); Serva (siehe Anhang)

Antifade: 15 ml p-Phenylendiamidihydrochlorid-Lösung (siehe Anhang)

- Das Fixogum mit Hilfe einer Pinzette vom Präparat entfernen.
- Das Präparat 3x5 Minuten mit 42°C warmen 4x SSC/ 0,2% Tween-20 waschen (schütteln). Hierbei sollte sich bereits nach 1x Waschen das Deckglas soweit vom Objektträger lösen, dass es ohne „Gewaltanwendung“ abgezogen werden kann.
- Anschließend 3x5 Minuten mit 60°C warmen 1x SSC waschen (schütteln).
- Präparat kurz in 4x SSC/0,2% Tween-20 spülen und anschließend 1 ml Glycin- BSA 30 Minuten blocken (37°C, feuchte Kammer).
- Nach dem Blocken das Präparat wieder kurz mit 4x SSC/ 0,2% Tween-20 spülen (Entfernung der überschüssigen Block-Lösung).
- Antikörper-Stocklösung vor der Verdünnung für 2 Minuten bei 13000 UpM zentrifugieren, um Komplexbildungen zu vermeiden.
- 200 µl verdünnte Antikörper-Lösung auf den Objektträger pipettieren: Sheep Anti Dig FITC 1:100 in 1% BSA.
- Den Objektträger mit einem Deckglas bedecken und 45 Minuten bei 37°C (feuchte Kammer) inkubieren.
- Das Präparat 3x5 Minuten mit 42°C warmen 4x SSC/ 0,2% Tween-20 waschen.
- 1 ml DAPI-Lösung (0,5 µl DAPI in 15 ml 4x SSC/ 0,2% Tween-20 für 2 Minuten) auf das Präparat aufbringen.
- Nach Abspülen mit destilliertem Wasser den Objektträger lufttrocknen und mit 35 µl Antifade eindecken.

### 2.3.3.7 Aufnahme und Auswertung

Die Auswertung wird wie in Kapitel 2.2.8.1 beschrieben mit dem Epifluoreszenz-Mikroskop Zeiss Axioplan Imaging II über die Metasystems-Software *Isis* (Version 3.4.0) durchgeführt.

Für die Beurteilung der Hybridisierungs-Effizienz wurden insgesamt 100 Lymphozyten-Zellkerne aufgenommen und ausgewertet.

Für die Beurteilung der Schnittdicke wurde vom Gewebeschnitt 100 Zellkerne aus einem Areal mit Normalgewebe sowie als Kontrolle 100 Zellkerne aus einem Tumoreal aufgenommen und ausgewertet.

## 2.3.4 BACs und YACs für eine Regionen-spezifische Hybridisierung

### 2.3.4.1 PCR-Amplifikation

Folgende Regionen-spezifische BACs und YACs wurden für die Hybridisierung auf Gewebeschnitte verwendet:

Sonde	Klonname	Resistenz	Lokalisation	Markierung
BAC	760H24	Chloramphenicol	11q23	Biotin
BAC	1124B17	Chloramphenicol	17q25	Cy3
BAC	60J11	Chloramphenicol	1p36	Digoxigenin
YAC	875b11	--	2p24	Texas Red

Tabelle 20: BACs und YACs für die Hybridisierung auf Gewebeschnitte.

Die BACs und YACs wurden wie in Kapitel 2.2 beschrieben isoliert und mit DOP-PCR und Alu-PCR amplifiziert (siehe Kapitel 2.2.2).

### 2.3.4.2 Nicktranslation

Die BACs und YACs werden im nächsten Schritt nicktranslatiert. Auch hier wird bei den BACs ein 1:1 Gemisch aus DOP-/ und PCR-Produkt eingesetzt.

#### Reagenzien

10x Nicktranslationspuffer (siehe Anhang)  
 0,1 M  $\beta$ -Mercaptoethanol; Merck  
 0,5 mM AGC: dATP, dCTP, dGTP, je 100 mM, pH 7,5; Amersham Biosciences  
 Biotin: Biotin-16-dUTP, 50 nM; Roche  
 Digoxigenin-11-dUTP, 125 nM; Roche  
 Cy3: Cy3-dUTP, 25 nM; Amersham Biosciences  
 Texas Red: Texas Red-12-dUTP, 1 mM; Molecular Probes  
 DNA Polymerase 1, Kornberg-Enzym, 5 U/  $\mu$ l; New England Biolabs  
 DNase 1 (1:2000 Verdünnung); aus bovinem Pankreas, Stocklösung 3 mg/ ml; Roche

Nicktranslations-Ansatz:

Endkonzentration (1x)	Ansatz
Proben DNA	Je 500 ng aus DOP-PCR und Alu-PCR
10x NT-Puffer	5 $\mu$ l
0,1 M $\beta$ -Mercaptoethanol	5 $\mu$ l
0,5 M AGC-Mix	5 $\mu$ l
Fluorochrom	1 $\mu$ l
Polymerase 1	1 $\mu$ l
DNase 1	12 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	add 50 $\mu$ l
Gesamtvolumen 50 $\mu$ l	

Tabelle 21: Ansatz der Nicktranslation.

- Die Sonden in einem 15°C Wasserbad 2 Stunden lang nicktranslatieren. Nach dem Verdau sollte die DNA zwischen 200 und 600 Basenpaare (bp) lang sein.
- Zur Erfolgskontrolle je 5  $\mu$ l der nicktranslatierten Sonden auf einem 1%igen Agarose-Gel auftragen.

### 2.3.4.3 Salz-Ethanol-Fällung

Nach der Nicktranslation müssen die Sonden nach folgendem Schema gefällt werden.

Der Ansatz erfolgt doppelt, um eine optimale „Durchtränkung“ des Gewebeschnittes zu gewährleisten.

Sonden	Markierung	µl	Cot1 DNA	Salmon testes DNA	Σ	NaOAC	EtOH 100% eiskalt
11q23	Biotin	15	50	5	105	10,5	289
17q25	Cy3	9					
1p36	Digoxigenin	12					
2p24	Texas Red	12					

Tabelle 22: Fällungsschema für die Hybridisierung auf Gewebeschnitte; alle Angaben in µl.

Die Hybridisierungs-Effizienz der Sonden wurde zunächst auf Lymphozyten 46,XY getestet. Das Protokoll der Chromosomenpräparation und Vorbehandlung ist wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben.

Für das Austesten der Hybridisierungs-Effizienz wurde folgender Fällungsansatz verwendet:

Sonden	Markierung	µl	Cot1 DNA	Salmon testes DNA	Σ	NaOAC	EtOH 100% eiskalt
11q23	Biotin	5	30	5	55	5,5	152
17q25	Cy3	5					
1p36	Digoxigenin	5					
2p24	Texas Red	5					

Tabelle 23: Fällungsschema für die Hybridisierung auf Lymphozyten; alle Angaben in µl.

#### 2.3.4.4 In-situ-Hybridisierung der gefällten Proben

Die Vorbehandlung wird sowohl für die Fällung für den Gewebeschnitt als auch für die Fällung für die Lymphozyten-Hybridisierung auf die gleiche Art und Weise durchgeführt:

##### Reagenzien

Formamid deionisiert (pH 7,0)

20% Dextransulfat in 2x SSC (siehe Anhang)

- Den gefällten Ansatz bei 13000 UpM in einer Kühlzentrifuge bei 4°C 30 Minuten zentrifugieren.
- Nach Verwerfen des Überstandes ca. 200 µl 70% Ethanol zum Waschen zupipettieren und für 10 Minuten bei 13000 UpM nochmals zentrifugieren.
- Überstand wieder verwerfen, das Präzipitat bei 37°C im Heizblock lufttrocknen.
- Präzipitat in je 4 µl deionisiertem Formamid (pH 7,0) aufnehmen und bei 37°C Inkubation mindestens 30 Minuten lösen.
- Anschließend je 4 µl 20% Dextransulfat (in 2x SSC) zugeben, einige Sekunden vortexen.
- Die gelöste DNA 7 Minuten bei 75°C denaturieren.
- Die denaturierte DNA 20 Minuten bei 42°C vorhybridisieren.

Die Sonden für die Gewebeschnitte werden auf die vorbehandelten Gewebeschnitte (siehe Kapitel 2.3.2) hybridisiert. Anschließend wird der Schnitt mit einem Deckglas (15x15 mm) bedeckt und mit Fixogum versiegelt. Die Hybridisierung erfolgt über drei Nächte in der Metallbox im 37°C Wasserbad.

Die Hybridisierung auf Lymphozyten-Präparate erfolgt wie in Kapitel 2.2.6.3 beschrieben. Die Hybridisierung erfolgt über zwei Nächte in der Metallbox im 37°C Wasserbad.

### 2.3.4.5 Nachweis der hybridisierten Proben

Der Nachweis wird sowohl für die Lymphozyten-Präparate als auch für die Gewebeschnitte auf folgendermaßen durchgeführt:

#### Reagenzien

4x SSC/ 0,2% Tween-20, 42°C (siehe Anhang)

1x SSC, 60°C (siehe Anhang)

Block-Lösung: Glycin-BSA (siehe Anhang)

Antikörper für den Nachweis von Digoxigenin und Biotin:

Avidin Cy5, 1:400 verdünnt in 1% BSA; Amersham Biosciences

Sheep Anti Dig FITC, 1:100 verdünnt in 1% BSA; Sigma

DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol 2 HCl); Serva (siehe Anhang)

Antifade: 15 ml p-Phenylendiamindihydrochlorid-Lösung (siehe Anhang)

- Das Fixogum mit Hilfe einer Pinzette vom Präparat entfernen.
- Das Präparat 3x5 Minuten mit 42°C warmen 4x SSC/ 0,2% Tween-20 waschen.
- Anschließend 3x5 Minuten mit 60°C warmen 1x SSC waschen (schütteln).
- Nach kurzem Spülen in 4x SSC/0,2% Tween-20 das Präparat mit 1 ml Glycin-BSA 30 Minuten blocken (37°C, feuchte Kammer).
- Nach dem Blocken den Objektträger wieder kurz mit 4x SSC/ 0,2% Tween-20 spülen (Entfernung der überschüssigen Block-Lösung).
- Antikörper-Stocklösung vor der Verdünnung für 2 Minuten bei 13000 UpM zentrifugieren, um Komplexbildungen zu vermeiden.
- 200 µl verdünnte Antikörper-Lösung auf den Objektträger pipettieren: Avidin Cy5 1:400 und Sheep Anti Dig FITC 1:100 in 1% BSA.
- Den Objektträger mit einem Deckglas bedecken und 45 Minuten bei 37°C (feuchte Kammer) inkubieren.
- Das Präparat 3x5 Minuten mit 42°C warmen 4x SSC/ 0,2% Tween-20 waschen.
- 1 ml DAPI-Lösung (0,5 µl DAPI in 15 ml 4x SSC/ 0,2% Tween-20 für 2 Minuten) auf das Präparat aufbringen.
- Nach Abspülen mit destilliertem Wasser den Objektträger lufttrocknen und mit 35 µl Antifade eindeckeln.



### 2.3.4.6 Aufnahme und Auswertung

#### Aufnahme der Gewebeschnitte

Für die Beurteilung der Hybridisierungs-Effizienz wurden insgesamt 100 Lymphozyten-Zellkerne aufgenommen und ausgewertet: Die Bilder wurden über das Epifluoreszenz-Mikroskop Zeiss AxioPlan Imaging II der Firma Zeiss (siehe Kapitel 2.2.8) und einem 63x PlanApochromat Öl-Immersionsobjektiv mittels des Computerprogramms *Isis* (Version 3.4.0) der Firma Metasystems aufgenommen und ausgewertet. Das Epifluoreszenz-Mikroskop ist in X, Y und Z-Richtung motorisiert.

Für Stapelaufnahmen der Gewebeschnitte wurde die Computersoftware *AxioVision* (Version 3.1) der Firma Zeiss verwendet. Diese Software erlaubt es, Zellkernen in verschiedenen Ebenen aufzunehmen. Gewöhnlich werden pro Bildeinheit etwa 45 bis 65 Stapel in Z-Richtung aufgenommen; von diesen Stapeln kann über eine integrierte Dekonvolutionssoftware auf den Zellkern rückgerechnet werden (siehe folgendes Kapitel). Die Größe der einzelnen Bildabstände betrug in Z-Richtung 0,25  $\mu\text{m}$ . Für jede Z-Ebene erhält man so eine Bildsequenz bestehend aus den Fluorochromen DAPI, FITC, CY3, CY3.5, und Cy5. Die folgende Abbildung stellt die Stapelaufnahmen in Z-Richtung schematisch dar.

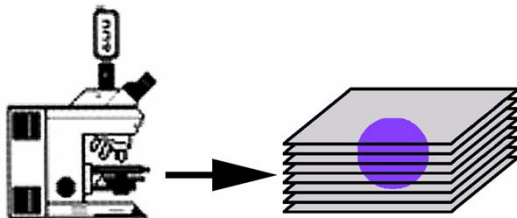


Abbildung 12: Aufnahme von Bildstapeln in Z-Richtung über ein Epifluoreszenz-Mikroskop.

*Um die gesamte 3D-Information eines Zellkerns zu erhalten, müssen lichtoptische Serienschritte durch das Objekt gelegt werden. Die violette Fläche stellt einen Zellkern dar.*

Von den Gewebeschnitten wurden je Tumor 100 Zellkerne aus einem Tumorareal sowie 100 Zellkerne aus einem Areal mit Normalgewebe aufgenommen und ausgewertet.

## Auswertung der Gewebeschnitte mittels Dekonvolution

### Allgemeines

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, wurden die Gewebeschnitte in einzelnen Schichten in Z-Richtung aufgenommen. Bei einem Epifluoreszenz-Mikroskop bestehen die aufgenommenen Bilder neben den für die Auswertung wesentlichen Fluoreszenzsignalen der entsprechenden Ebene auch aus dem Licht des gesamten Objektes und aus der Fluoreszenz, die sich außerhalb des Fokus befindet („out of focus“-Fluoreszenz). Dies erschwert die Beurteilung der fokalen Ebene. Für eine eindeutige Zuordnung und Analyse der Fluoreszenzsignale in den einzelnen Ebenen und der Rückrechnung der einzelnen aufgenommenen Schichten zu einem ganzen Zellkern müssen deshalb die Bildstapel mit einer speziellen Dekonvolutionssoftware bearbeitet werden. Die Dekonvolutionssoftware ist also ein 3D-Rekonstruktionsprogramm und ist in der *AxioVision*-Software (Version 3.1) der Firma Zeiss integriert.

### Dekonvolution

Durch die Aufnahme von Objekten mit einem Mikroskop wird ein Objekt optisch verzerrt. Durch die so genannte *Point Spread Function* (PSF) des Mikroskops wird das ursprüngliche Objekt gefaltet. Diesen Vorgang nennt man Konvolution (Agard et al. 1989). Das entstandene abgebildete Objekt erscheint unscharf.

Die Konvolution ist abhängig von der Beleuchtung sowie von den Mikroskopkomponenten, die den Lichtweg kreuzen (Objektiv, Spiegel, Filter, Reflektionen innerhalb des Lichtweges, Einstellung der Lampe, Kamera und ähnliches). Eine ideale Konvolution wird erreicht, wenn alle Komponenten optimal aufeinander abgestimmt sind und das Bild eines punktförmigen Objekts nur noch von der Wellenlänge und der numerischen Apertur abhängt (van der Voort et al. 1989).

Abbildung 13 stellt den Vorgang der Konvolution dar.

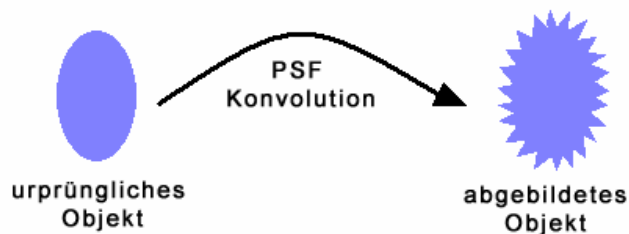


Abbildung 13: Objektaufnahme durch ein Mikroskop.

Darstellung eines Objektes vor und nach der Konvolution

Durch eine spezielle Software kann diese Faltung durch mathematische Algorithmen rückgängig gemacht werden. Das abgebildete Objekt wird geglättet. Es findet also eine so genannte Dekonvolution statt. Das Ergebnis ist ein Bild, das dem ursprünglichen Objekt relativ ähnelt.

### Point Spread Function (PSF)

Die Point Spread Function beschreibt die Art und Weise, wie das Licht eines punktförmigen Objektes durch die Aufnahme mit dem Epifluoreszenz-Mikroskop verzerrt wird. Dadurch entsteht die oben beschriebene „out of focus“- Fluoreszenz, die von einem dreidimensionalen Bild einer punktförmigen Lichtquelle ausgeht. Deshalb ist das dreidimensionale Bild eines Punktes nicht ein Punkt, sondern hat die Form eines Sanduhrglases. Durch die numerische Apertur entsteht eine Brechung, die ein definiertes Ringmuster zur Folge hat. Berechnet man die PSF theoretisch, erhält man ein symmetrisches Ringmuster. Da aber auch die sphärischen Aberrationen eine Rolle spielen, die durch eine unterschiedliche Dicke des Objektes, dem Abstand von Objekt zu Deckglas und dem Brechungsindex des verwendeten Einbettmediums zustande kommt, erhält man bei einer axiale Asymmetrie der PSF eine Größenzunahme, speziell entlang der z-Achse (experimentelle PSF).

Die folgende Abbildung verdeutlicht den Unterschied zwischen symmetrischer (theoretische gemessener) und asymmetrischer (experimentell gemessener) PSF (McNally et al. 1999):

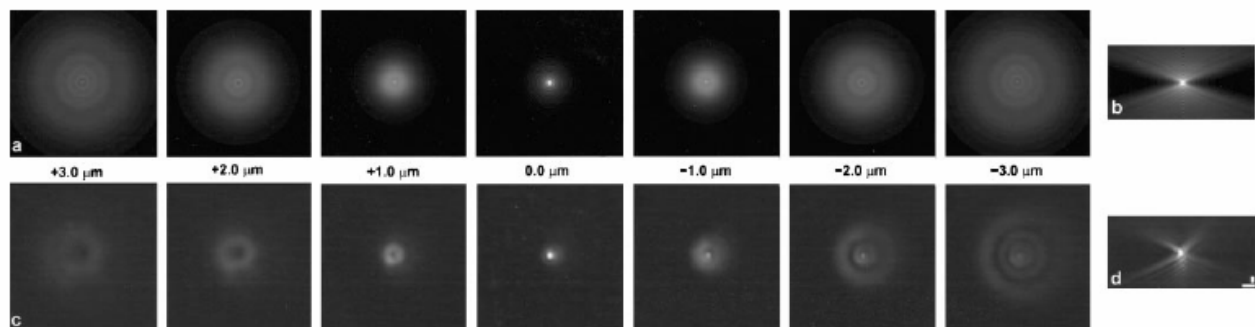


Abbildung 14: Verschiedene fokale Ebenen für eine theoretische (a) und experimentelle (c) PSF.

b) XZ-Ansicht der theoretischen PSF (symmetrisches Ringmuster)

d) XZ-Ansicht der experimentellen PSF (asymmetrisches Ringmuster auf Grund der sphärischen Aberration).

Diese asymmetrische PSF hat vor allem entlang der Z-Achse eine Größenzunahme zur Folge, was ein Verlust von Signalintensität und Auflösung bedeutet. Eine Bildanalyse wird so erschwert.

Nachfolgende Tabelle gibt die Parameter an, die zur Bestimmung der PSF notwendig sind:

Numerische Apertur des Objektivs
Arbeitsabstand des Objektivs (Zeiss 63x PlanApochromat 0,09 mm)
Dicke des Deckglases (0,170 mm)
Dicke des Objektes (0,01 mm)
Wellenlänge der Lichtquellen
XYZ Dimension der PSF
Pixelgröße der Kamera (107x107 mm)
Voxelgröße (107 nm lateral, 250 nm axial)
Z-Abstand (250 nm)
Brechungsindex des Immersions-Öls (Zeiss Immersions-Öl: 1,515)
Brechungsindex des Einbettmediums (Phenylendiamin: 1,42)

Tabelle 24: Parameter zur Bestimmung der PSF (McNally et al. 1999).

### Dekonvolutions-Algorithmen

Die zur Berechnung verwendeten Algorithmen werden von einer mathematischen Formel abgeleitet, die den Aufnahmeprozess eines Mikroskops beschreibt. Für nähere Informationen zur mathematischen Berechnung und Hintergrundinformation möchte ich an dieser Stelle auf die eingereichte Doktorarbeit von Christine Maierhofer, Labor PD Dr. Michael Speicher verweisen, da es Aufgabe meiner Arbeit war, die kommerziell erhältliche *AxioVision*-Software mit dem integrierten Dekonvolutions-/ und 3D-Visualisierungsprogramm (3D-Dekonvolution und Inside 4D; Zeiss; Schaefer et al. 2001) anzuwenden.

Um eine möglichst gute Bildqualität der Gewebeschnitte zu erreichen, wurden die Bildstapel mit statistischen iterativen Dekonvolutions-Algorithmen berechnet (*accelerated maximum likelihood image restoration algorithm*, *AxioVision*, Version 3.1; Zeiss). Bei diesem Programm kann neben einer theoretischen PSF auch eine PSF berechnet werden, die sphärische Aberrationen mit einbezieht.

Folgende Parameter wurden für diese PSF eingegeben (McNally et al. 1999, sowie nach persönlichen Erfahrungen von Christine Maierhofer, Labor PD Dr. Michael Speicher):

PSF Aberration Parameters			
Design immersion index	1.515	Design coverslip thickness	0.170 mm
Design coverslip index	1.515	Used coverslip thickness	0.170 mm
Used coverslip index	1.515	Design working distance	0.090 mm
Specimen index	1.420	Design tubus length	160.000 mm
Thickness of specimen	0.030 mm	Used tubus length	160.000 mm
Automatic size threshold	0.00010		

Abbildung 15: Parameter der sphärischen Aberration zur Bestimmung der PSF.

Die Einstellungen, die zur Berechnung der Glättung der einzelnen Kanäle benötigt werden, sind folgendermaßen eingegeben worden (siehe auch Abbildung 16):

Mittlere Glättung: DAPI  
 höchst mögliche Glättung: FITC, Cy3, Cy3.5, Cy5 und Cy5.5

Cy5.5 wurde in dieser Arbeit nicht verwendet.

The image shows two side-by-side screenshots of a software interface for deconvolution. Both screenshots have tabs for '1 Deconvolution' and '2 Point Spread Function'. Below the tabs are six numbered buttons (1-6). A dropdown menu is set to 'Constrained Iterative'. A checkbox 'Set strength manually' is checked. Below this is a slider with labels 'Weak', 'Medium', and 'Strong'. In the left screenshot (a), the slider is positioned at 'Medium'. In the right screenshot (b), the slider is positioned at 'Strong'.

Abbildung 16: Software-Einstellungen für Glättungen der einzelnen Kanäle

a) Mittlere Glättung für DAPI (1)

b) Höchstmögliche Glättung für FITC (2), CY3 (3), Cy3.5 (4), Cy5 (5) und Cy5.5 (6)

Cy5.5 wurde in dieser Arbeit nicht verwendet.

### 3D-Bildaufnahme, Auswertung und Darstellung

Von jedem Gewebeschnitt wurden nach Hybridisierung der BAC/ und YAC spezifischen Sonden 100 Kerne als dreidimensionale Bildstapel aufgenommen und ausgewertet.

Von jedem Zellkern wurde die Zellkerngrenze bestimmt und den einzelnen Zellkernen die Hybridisierungs-Signale zugeordnet. Die jeweilige Zuordnung der Zellkerngrenzen erfolgte an Hand der Z-Ebenen. Die Zellkerngrenzen wurden in dichteren Zellbereichen zusätzlich zur Dekonvolution durch visuelle Inspektion bestimmt. Regionen mit einer besonders hohen Zelldichte, bei denen es auch durch visuelle Inspektion nicht mehr möglich ist, Zellkerngrenzen zu definieren, können in der Regel nicht ausgewertet werden und entfallen deshalb für eine detaillierte Analyse. Das Ergebnis der Dekonvolution wurde durch einen Vergleich mit den Original-Bildstapeln überprüft.

Es wurden bei jedem Gewebeschnitt verschiedene Areale analysiert, um zu vermeiden, dass die Auswertung durch eine mögliche „Clusterung“ der Tumorzellen zu einem verfälschten Ergebnis führen.

Mittels einer 3D-Rekonstruktion ist es möglich, die Zellkerne in alle Richtungen (X, Y und Z) zu drehen, um sie von allen Seiten betrachten zu können. Zudem gibt es die Option, den Zellkernen verschiedene Texturen zu verleihen: mit der Einstellung „Surface“ ist es möglich, den Zellkern mit einer undurchsichtigen Außenhaut auszustatten. Hierbei wird über eine plastische Darstellung in etwa die originale Oberfläche der Zellkerne wiedergegeben. Mit der Einstellung „Maximum“ können alle verwendeten Kanäle gleichzeitig dargestellt werden. Man sieht dadurch die Signale in ihrer Lage zueinander und in Bezug auf die Verteilung im Zellkern. Diese Einstellung erlaubt es, den Zellkern mit einer DAPI-Maske anzudeuten oder auszublenden. Abbildungen zu den beschriebenen Darstellungsformen werden an geeigneter Stelle gezeigt (siehe unten). Es gibt noch weitere Darstellungsmöglichkeiten, die ich in meiner Arbeit jedoch nicht verwendet habe, da sie für die Aufgabenstellung keine zusätzliche Information liefern und für die Auswertungen nicht relevant sind.

Erste Anwendungen zur Analyse von FISH-Signalen auf dicken (30 µm) Gewebeschnitten wurden kürzlich publiziert (Maierhofer et al. 2003).

## Statistische Analyse

Die Anzahl der Hybridisierungs-Signale der Centomersonden und der BAC-/ und YAC Proben wurde pro Zellkern und Tumor bestimmt.

Von jedem Gewebeschnitt wurden die einzelnen veränderten Sonden in Diagrammen dargestellt. Außerdem wurde für die Gesamtzahl der ausgewerteten Zellkerne für jede Sonde Mittelwert, Standardabweichung und P-Wert ermittelt. Die Berechnung dieser Werte erfolgte über einen „2 Stichproben t-Test“ unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen (siehe Kapitel 2.2.8.2).

## 2.4 Maus 7 Fluorochrom M-FISH

### 2.4.1 Maus-Chromosomen spezifische DNA-Bibliotheken

Für die Amplifizierung von Maus-Chromosomen-spezifischen DNA-Bibliotheken wird der Primer 6A1 verwendet. Im Gegensatz zum 6MW-Primer, der zum Beispiel bei der unspezifischen (DOP-) Amplifikation menschlicher DNA eingesetzt wird, reduziert der 6A1-Primer die Anzahl von Kreuzhybridisierungen in den Centromeren von Maus-Chromosomen. Es wurde festgestellt, dass die akrozentrischen kurzen Arme von Maus-Chromosomen weniger stark amplifiziert werden als bei Verwendung des 6MW-Primers (Rabbitts et al. 1995 sowie persönliche Mitteilung von Nigel Carter, 1998). Die durch die Verwendung des 6A1-Primers nur noch schwach vorhandenen Kreuzhybridisierungen können mit Cot1-DNA supprimiert werden (Rabbitts et al. 1995).

Der DOP-Primer 6A1 besteht aus definierten Sequenzen am 5'- und am 3'-Ende. Die mittlere Sequenz besteht aus statistisch zufälligen Reihenfolgen von sechs Nukleotiden. Die Primer hybridisieren bei niedriger Stringenz alle vier Kilobasen.

### 2.4.2 Amplifikation der Chromosomen-spezifischen DNA-Bibliotheken

Bei den DNA-Sonden handelt es sich um Chromosomen-spezifische DNA-Bibliotheken der Maus-Chromosomen 1-19, X und Y, die mittels Durchflusszytometrie aus Antigen-stimulierten Zellen von Inzuchtmäusen gewonnen wurden (Rabbitts et al. 1995).

Alle DNA-Sonden wurden mit einer Konzentration von etwa 500 Chromosomen in 30 µl Wasser von Johannes Wienberg und Nigel Carter (Cambridge, UK) zur Verfügung gestellt.

Diese Chromosomen-spezifischen DNA-Bibliotheken müssen in einer DOP-PCR zunächst amplifiziert werden. Die erste Amplifikation der DNA wurde mittels niedrig-stringenter Zyklen durchgeführt („Telenius DOP-PCR“).

Programm der Telenius DOP-PCR:

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Anfangsdenaturierung	95°C	5 Minuten
2. Denaturierung	95°C	1 Minute
3. Annealing	30°C	1 Minute 30 Sekunden
4. Elongation	72°C	3 Minuten
5. Denaturierung	95°C	1 Minute
6. Annealing	62°C	1 Minute 30 Sekunden
7. Elongation	72°C	3 Minuten
8. Finale Elongation	72°C	5 Minuten
Schritte 2-4: 5 Zyklen Schritte 5-7: 35 Zyklen		
Schritt 4: 0,2 Sekunden-Schritte auf 72°C Schritt 7: + 1 Sekunde/ Zyklus		

Tabelle 25: Programm der Telenius DOP-PCR.

#### Reagenzien

Primer 6A1: 5'- CCG ACT CGA GNN NNN NTA CAC C -3' 100 pmol/ µl; Genzentrum  
(N = zufällige Reihenfolge der Nukleotide A, G, C oder T)  
10x PCR Puffer, Invitrogen Life Technologies  
Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>), 50 mM; Invitrogen Life Technologies  
dNTP's: dATP, dGTP, dCTP, dTTP, je 100 mM, pH 7,5; Amersham Biosciences  
Taq-Polymerase, 500 Units (5U/ µl); Invitrogen Life Technologies  
PCR-Maschine; MJ Research PTC-225



PCR-Ansatz:

Endkonzentration	Ausgangskonzentration
1x	10x PCR Puffer
2 mM	MgCl <sub>2</sub>
0,2 mM	5 mM dNTP's
2 µM	100 µM 6A1
1 U	Taq DNA Polymerase
add 25 µl	ddH <sub>2</sub> O
100 ng	DNA
Gesamtvolumen 25 µl	

Tabelle 26: Ansatz der Telenius DOP-PCR.

Zur Erfolgskontrolle wurden 1/10 Volumen des PCR-Ansatzes (entspricht hier 2,5 µl) auf einem 1%igen Agarose-Gel aufgetragen.

Nachfolgende Abbildung zeigt das Ergebnis der Telenius DOP-PCR- amplifizierten Maus-Chromosomen DNA.

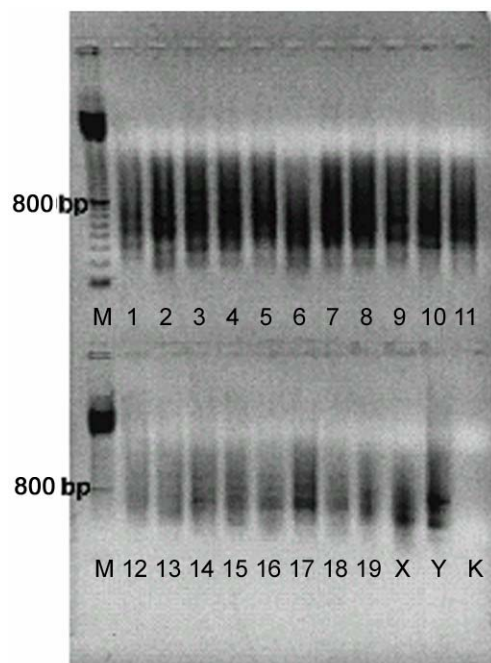


Abbildung 17: Telenius DOP-PCR der Maus-Chromosomen-spezifischen DNA-Bibliotheken; M: Marker (100 Basenpaar Leiter; in diesem Fall zeigt der Marker bei 800 bp eine verdickte Bande); K: Kontrolle; 1-19, X, Y entsprechen den Maus-Chromosomen.

### 2.4.3 DNA-Pools für Maus 7 Fluorochrom M-FISH

Ein großer Vorteil der DOP-PCR ist, dass sich die DNA-Sonden in der PCR mit Fluorochromen markieren lassen. Wie in der Einleitung erwähnt, werden die Chromosomen in sieben Pools aufgeteilt, welche dann jeweils mit einem anderen Fluorochrom markiert werden.

Hieraus ergeben sich folgende Schritte:

- Erstellung von DNA-Pools.
- Amplifikation der DNA-Pools (Telenius DOP-PCR).
- Markierung der einzelnen DNA-Pools mit Fluorochromen (Labeling DOP-PCR).

#### 2.4.3.1 Erstellung von DNA-Pools

Für die Markierung wurden DNA-Pools mit sieben verschiedenen Fluorochromen erstellt. Jeder DNA-Pool enthält sechs DNA-Sonden. Bei den Fluorochromen handelt es sich um DEAC, FITC, Cy3, Texas Red, Cy5, Biotin (→ Cy5.5) sowie Digoxigenin (→ Cy7).

DEAC		FITC		Cy3		Texas Red	
Chromosom	µl	Chromosom	µl	Chromosom	µl	Chromosom	µl
3	2,0	3	1,5	4	2,0	1	3,5
5	2,0	8	1,5	9	2,0	2	2,5
10	2,0	13	2,0	10	2,0	6	2,0
11	2,0	15	3,0	12	2,0	12	2,0
14	2,0	19	2,0	16	4,0	13	3,0
Y	0,5	X	2,0	19	2,0	Y	0,5

Cy5		Biotin		Digoxigenin	
Chromosom	µl	Chromosom	µl	Chromosom	µl
1	3,5	6	2,0	2	3,0
4	2,5	7	2,0	7	3,0
5	2,0	8	2,0	14	3,0
17	2,0	9	2,5	15	3,0
18	7,0	11	1,5	16	6,0
X	2,0	18	7,0	17	2,5

Tabelle 27: Erstellung der Maus 7 Fluorochrom M-FISH DNA-Pools.

Die Konzentrationen einzelner Sonden wurden so eingestellt, dass alle ähnlich intensive Fluoreszenzsignale geben. Die Werte wurden durch eine Serie von Experimenten empirisch gewonnen. Für Chromosom 18 (Biotin- und Cy5-Markierung) musste zum Beispiel im Vergleich zu den anderen Sonden sehr viel DNA-Sonde (je 7  $\mu$ l) eingesetzt werden, weil sich diese Sonde nur schwer in den in den jeweiligen Pool integrieren ließ: mit wenig DNA-Einsatz wies Chromosom 18 im Pool nur eine schwache Markierungs-Intensität auf.

Die einzelnen Pools wurden mittels der Telenius DOP-PCR amplifiziert (siehe oben) und die DNA auf einem 1%igen Agarose-Gel aufgetragen.

Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis der Telenius DOP-PCR amplifizierten DNA-Pools.

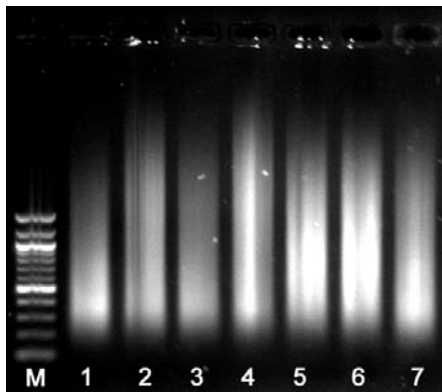


Abbildung 18: Telenius DOP-PCR der einzelnen Maus 7 Fluorochrom M-FISH Pools; M: Marker (100 Basenpaar Leiter; in diesem Fall zeigt der Marker bei 500 bp und 1000 bp eine verdickte Bande). 1: DEAC, 2: FITC, 3: Cy3, 4: Texas Red, 5: Cy5, 6: Biotin, 7: Digoxigenin.

#### 2.4.3.2 Markierung der einzelnen DNA-Pools mit Fluorochromen

Anschließend wurden in die Pools die jeweiligen Fluorochrome mit Hilfe einer „Markierungs-DOP-PCR“ eingebaut. Hierfür wurde ein PCR-Programm verwendet, das im Vergleich zur Telenius DOP-PCR durch höher-stringente Zyklen charakterisiert ist.

Reagenzien

Primer 6A1: 5'- CCG ACT CGA GNN NNN NTA CAC C -3' 100 pmol/μl; Genzentrum

(N = zufällige Reihenfolge der Nukleotide A, G, C oder T)

10x PCR Puffer; Invitrogen Life Technologies

Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>), 50 mM; Invitrogen Life Technologies

5 mM AGC: dATP, dCTP, dGTP, je 100 mM, pH 7,5; Amersham Biosciences

5 mM dTTP, 100 mM, pH 7,5; Amersham Biosciences

DEAC: 25 nmol; Perkin Elmer

FITC: Fluorgreen dUTP, 25 nmol; Amersham Biosciences

Cy3: Cy3-dUTP, 1 mM; Amersham Biosciences

Texas Red (TR), 1 mM, Molecular Probes

Cy5: Cy5-dUTP, 1mM Amersham Biosciences

Biotin: Biotin-16-dUTP, 1 mM; Amersham Biosciences

Digoxigenin: Dig-11-dUTP, 1 mM; Amersham Biosciences

Taq-Polymerase, 500 Units (5 U/ μl); Invitrogen Life Technologies

PCR-Maschine; MJ Research PTC-225

Programm der Markierungs-DOP-PCR:

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Anfangsdenaturierung	94°C	3 Minuten
2. Denaturierung	94°C	1 Minute
3. Annealing	56°C	1 Minute
4. Elongation	72°C	4 Minuten
8. Finale Elongation	72°C	20 Minuten
Schritte 2-4: 30 Zyklen		

Tabelle 28: Programm der Markierungs-DOP-PCR.

Markierungs-DOP-PCR-Ansatz:

Cy3/ Texas Red/ Biotin		DEAC/ FITC/ Cy5/ Digoxigenin	
End-konzentration	Ausgangs-konzentration	End-konzentration	Ausgangs-konzentration
1x	10x PCR Puffer	1x	10x PCR Puffer
2 mM	MgCl <sub>2</sub>	2 mM	MgCl <sub>2</sub>
0,2 mM	5 mM AGC	0,2 mM	5 mM AGC
0,15 mM	5 mM T	0,1 mM	5 mM T
0,05 mM	Fluorochrom	0,1 mM	Fluorochrom
2 µM	100 µM 6A1	2 µM	100 µM 6A1
1 U	Taq DNA Polymerase	1 U	Taq DNA Polymerase
add 25 µl	ddH <sub>2</sub> O	add 25 µl	ddH <sub>2</sub> O
	DNA-Pool		DNA-Pool
Gesamtvolumen 25 µl		Gesamtvolumen 25 µl	

Tabelle 29: Ansatz der Markierungs-DOP-PCR.

Die in der Markierungs- DOP-PCR amplifizierten DNA-Pools wurden auch hier auf einem 1%igen Agarose-Gel kontrolliert (Protokoll siehe oben).

Die folgende Abbildung zeigt die sieben DNA-Pools nach der Markierungs-DOP-PCR.

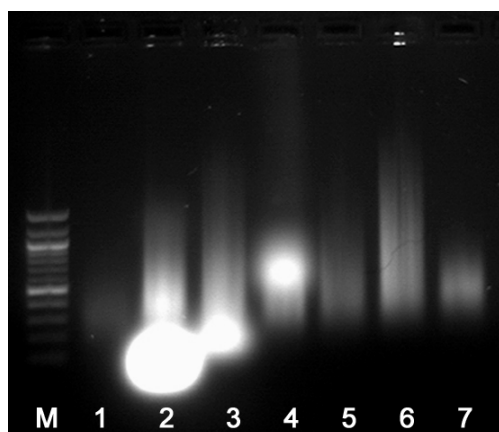


Abbildung 19: Markierungs- DOP-PCR der einzelnen Maus 7 Fluorochrom M-FISH Pools; M: Marker (100 Basenpaar Leiter; in diesem Fall zeigt der Marker bei 500 bp und 1000 bp eine verdickte Bande).

1: DEAC, 2: FITC, 3: Cy3, 4: Texas Red, 5: Cy5, 6: Biotin, 7: Digoxigenin.

### 2.4.3.3 DNase-Verdau

Eine optimale Länge der amplifizierten DNA liegt zwischen 300 und 700 Basenpaaren. Ist der Schmier auf dem Gelbild zu lang, muss die DNA durch Zugabe von DNase 1 (=DNase-Verdau) auf eine optimale Länge verdaut werden. Die Inkubationszeit ist abschätzbar auf Grund der auf dem Gelbild nach der Labeling-PCR zu sehenden Länge des Schmiere.

#### Reagenzien

Für einen 25 µl-PCR-Ansatz:

15 µl ddH<sub>2</sub>O

5 µl Nicktranslations-Puffer (siehe Anhang)

5 µl DNase 1, 1:1000 verdünnt, aus bovinem Pankreas, Stocklösung 3 mg/ ml; Roche

Die DNase-Inkubation erfolgt bei 15°C im Wasserbad.

Nachfolgende Abbildung stellt die Markierungs-DOP-PCR nach dem DNase Verdau dar.

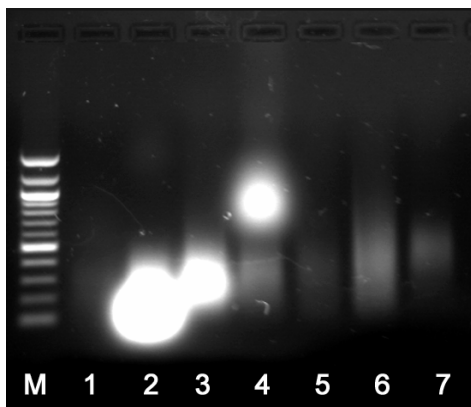


Abbildung 20: DNase Verdau der markierten DNA-Pools; M: Marker (100 Basenpaar Leiter; in diesem Fall zeigt der Marker bei 500 bp und 1000 bp eine verdickte Bande).

1: DEAC, 2: FITC, 3: Cy3, 4: Texas Red, 5: Cy5, 6: Biotin, 7: Digoxigenin.

### 2.4.4 21-Farben Ansatz für Maus 7 Fluorochrom M-FISH

Ziel einer Multiplex-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ist es, jedes Chromosom durch verschiedene Kombination von Fluorochromen unterschiedlich anzufärben. Durch Kombination der einzelnen DNA-Pools ergab sich für die Maus-Chromosomen folgender 21-Farben-Ansatz:

Chromosom	DEAC	FITC	Cy3	TR	Cy5	Bio	Dig
1				Red	Blue		
2				Red			Orange
3	Cyan	Green					
4			Yellow		Blue		
5	Cyan				Blue		
6				Red		Magenta	
7						Magenta	Orange
8		Green				Magenta	
9			Yellow			Magenta	
10	Cyan		Yellow				
11	Cyan					Magenta	
12			Yellow	Red			
13		Green		Red			
14	Cyan						Orange
15		Green					Orange
16			Yellow				Orange
17					Blue		Orange
18					Blue	Magenta	
19		Green	Yellow				
X		Green			Blue		
Y	Cyan			Red			

Tabelle 30: Markierungsschema des Maus 7 Fluorochrom M-FISH.

## 2.4.5 Salz-Ethanol-Fällung

Für die in-situ-Hybridisierung müssen die DNA-Pools zunächst gefällt werden.

### Reagenzien

Markierte DNA-Pools

Maus Cot-1 DNA, 1 mg/ ml; Invitrogen Life Technologies

Salmon testes DNA (Lachstestes), 10,2 mg/ ml; Sigma

3 M NaOAc, pH 5,2 (siehe Anhang)

Ethanol absolut, eiskalt; Merck

Wie bereits beschrieben sättigt Salmon testes -DNA unspezifische DNA-Bindungsstellen ab (Supprimierung unspezifischer Wechselwirkungen) und dient als Carrier-DNA bei sehr geringen Probenkonzentrationen.

Maus Cot-1-DNA besteht aus nicht-markierten repetitiven Sequenzen und sättigt durch Zugabe im Überschuss repetitive DNA-Sequenzen der Sonden-DNA ab (CISS-Hybridisierung, Cremer et al. 1988, Lichter et al. 1988).

Für die Hybridisierung wurden von jedem DNA-Pool 200-300 ng DNA eingesetzt. Für die Fällung wurde folgender Ansatz verwendet:

Fällungsschema:

Pools	$\mu\text{l}$	Cot1 DNA	Salmon testes DNA	$\Sigma$	NaOAc	EtOH 100% eiskalt
DEAC	6	80	5	118	11,8	328
FITC	7					
Cy3	6					
Texas Red	2,5					
Cy5	6					
Biotin	2,5					
Digoxigenin	3					

Tabelle 31: Fällungsschema des Maus 7 Fluorochrom M-FISH Ansatzes; alle Angaben in  $\mu\text{l}$ .

Der Ansatz wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über Nacht gefällt.



Die einzelnen Konzentrationen der Pools wurden so gewählt, dass die Pools nach der Hybridisierung ausreichend hohe Intensitäten haben. Die dazu notwendigen Mengen wurden empirisch bestimmt.

## **2.4.6 Maus-Chromosomen**

### **2.4.6.1 Allgemeines**

Menschliche Chromosomen gewinnt man in der Regel aus Lymphozytenkulturen.

Im Gegensatz dazu ist es schwierig, brauchbare Maus-Chromosomen herzustellen. Maus-Chromosomen aus Blut sind sehr stark kondensiert beziehungsweise weisen meist eine kugelige Gestalt auf, so dass sie sich für zytogenetische Analysen als nicht sinnvoll erwiesen haben.

### **2.4.6.2 Normale Maus-Metaphasen: Präparate aus der Milz**

In dieser Arbeit wurden für die Etablierung des Maus 7 Fluorochrom M-FISH-Systems Chromosomen verwendet, die aus der Milz einer weiblichen Maus gewonnen wurden.

### **2.4.6.3 Maus Tumoren**

Für die Austestung wurden zwei Mamma-CA Tumorzelllinien der Maus verwendet (siehe Rovero et al. 2000):

- AG12 Tubo  
AG12 Tubo (im Folgenden AG12) ist eine klonierte Zelllinie aus dem Primärtumor eines Mamma-CA's einer Her2neu-transgenen Maus. Diese überexprimiert Her2neu als Protein, und das Gen ist amplifiziert.
- TSA  
TSA ist eine Zelllinie eines spontanen Mamma-CA's der Maus.

Die Metaphasen- Präparation wurde von Dr. Jochen Geigl durchgeführt und orientiert sich an Weaver et al. (1999).

## 2.4.7 In-situ-Hybridisierung auf Maus-Chromosomen

Die in-situ-Hybridisierung wurde im Wesentlichen nach Anleitung (Speicher et al. 1996) durchgeführt. Die Änderungen sind in Jentsch et al. 2001 beschrieben.

### 2.4.7.1 Vorbehandlung der Präparate

#### RNase Vorbehandlung und Pepsin-Verdau

##### Reagenzien

RNase A, Stocklösung 10 mg/ ml; Boehringer Mannheim  
2x SSC (siehe Anhang)  
1x PBS (siehe Anhang)  
Pepsin, Stocklösung 10% (100mg/ ml); Boehringer Mannheim  
0,01 N HCl-Lösung (siehe Anhang)  
aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%)

Um störende RNA von den Präparaten zu entfernen, werden diese mit RNase behandelt; das überschüssige Cytoplasma wird wie beschrieben durch eine Pepsin-Vorbehandlung entfernt.

- Das Präparat kurz in 2x SSC äquilibrieren.
- 200 µl RNase-Lösung (1:100 in 2x SSC) auf das Präparat pipettieren, mit einem Deckglas bedecken und 1 Stunde bei 37°C in der feuchten Kammer inkubieren.
- Anschließend Präparat 3x5 Minuten mit 2x SSC waschen (Schüttler).
- Das Präparat in 100 ml 0,01 N HCl-Lösung, in die 30 µl der Pepsin-Stocklösung zugegeben wurde, für zehn Minuten inkubieren.
- Nach 2x 5 Minuten Waschen mit 1x PBS im Schüttler das Präparat je 3 Minuten durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) ziehen, anschließend lufttrocknen lassen.

## Denaturierung der Objektträger

### Reagenzien

35 ml Formamid reinst; Merck  
15 ml 2x SSC (siehe Anhang)  
pH 7,0 mit 1 N HCl

- Das Präparat für 2 Minuten 30 Sekunden bei 72°C in einer Küvette mit 70% Formamid/ 2x SSC pH 7,0 denaturieren.
- Durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100% eiskaltes Ethanol) wird das Präparat dehydriert; danach lufttrocknen.

## 2.4.7.2 Vorbehandlung des gefällten Maus 7 Fluorochrom M-FISH Pools

### Reagenzien

Formamid, deionisiert  
40% Dextransulfat in 2x SSC (siehe Anhang)

- Den gefällten Ansatz bei 13000 UpM in einer Kühlzentrifuge bei 4°C 30 Minuten abzentrifugieren.
- Nach Verwerfen des Überstandes ca. 200 µl 70% Ethanol zum Waschen zupipettieren und für 10 Minuten bei 13000 UpM nochmals zentrifugieren.
- Überstand wieder verwerfen, das Präzipitat bei 37°C im Heizblock lufttrocknen.
- Präzipitat in 4 µl deionisiertem Formamid (pH 7,0) aufnehmen und bei 37°C Inkubation mindestens 30 Minuten lösen.
- Anschließend 4 µl 40% Dextransulfat (in 2x SSC) zugeben, gut vortexen.
- Die gelöste DNA 7 Minuten bei 75°C denaturieren.
- Die denaturierte DNA 20 Minuten bei 42°C preannealen (= vorhybridisieren).

### 2.4.7.3 Hybridisierung

#### Reagenzien

Fixogum (Rubber cement); Marabu

15x15 mm Deckglas

denaturierte und vorhybridisierte DNA-Probe

vorbehandeltes und denaturiertes Chromosomen-Präparat (Objektträger)

- Nach dem Vorhybridisieren die DNA-Probe vorsichtig auf das vorbehandelte und denaturierte Präparat luftblasenfrei pipettieren.
- Nach Auflegen eines 15x15mm Deckglases das Deckglas mit Fixogum versiegeln, damit die darunter liegende zu hybridisierende DNA nicht austrocknen kann.
- Das Präparat in einer Metallbox bei 37°C über zwei Nächte inkubieren.

### 2.4.8 Nachweis der hybridisierten Proben

#### Reagenzien

4x SSC/ 0,2% Tween-20, 42°C (siehe Anhang)

1x SSC, 60°C (siehe Anhang)

Block-Lösung: 3% BSA in 4x SSC/ 0,2% Tween-20

Antikörper für Haptene Digoxigenin, Biotin und DNP:

Avidin Cy5.5, 1:100 verdünnt in 1% BSA; Amersham Biosciences

Sheep Anti Dig Cy7, 1:50 verdünnt in 1% BSA; Amersham Biosciences

DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol 2 HCl); Serva (siehe Anhang)

Antifade: 15 ml p-Phenylendiamidihydrochlorid-Lösung (siehe Anhang)

- Das Fixogum mit Hilfe einer Pinzette vom Präparat entfernen.
- Das Präparat 3x5 Minuten mit 42°C warmen 4x SSC/ 0,2% Tween-20 waschen (schütteln). Hierbei sollte sich bereits nach 1x Waschen das Deckglas soweit vom Objektträger lösen, dass es ohne „Gewaltanwendung“ abgezogen werden kann.
- Anschließend 3x5 Minuten mit 60°C warmen 1x SSC waschen (schütteln).
- Präparat kurz in 4x SSC/ 0,2% Tween-20 spülen.
- Mit 1 ml 3% BSA 30 Minuten blocken (37°C, feuchte Kammer).

- Nach dem Blocken den Objektträger kurz mit 4x SSC/ 0,2% Tween-20 spülen (Entfernung der überschüssigen Block-Lösung).
- Antikörper-Stocklösung vor Verdünnung für 2 Minuten bei 13000 UpM zentrifugieren, um Komplexbildungen zu vermeiden.
- 200 µl verdünnte Antikörper-Lösung auf den Objektträger pipettieren: Avidin Cy5.5 1:100 und Sheep Anti Dig Cy7 1: 50 in 1% BSA.
- Den Objektträger mit einem Deckglas bedecken und 45 Minuten bei 37°C (feuchte Kammer) inkubieren.
- Das Präparat 3x5 Minuten mit 42°C warmen 4x SSC/ 0,2% Tween-20 waschen.
- Aufbringen von 1 ml DAPI-Lösung auf das Präparat (0,5 µl DAPI in 15ml 4x SSC/ 0,2% Tween-20; 2 Minuten).
- Nach Abspülen mit destilliertem Wasser den Objektträger lufttrocknen und mit 35 µl Antifade eindeckeln.

### 2.4.9 Aufnahme und Auswertung

Die Präparate wurden mit einem Epifluoreszenz-Mikroskop Leica DMRXA-RF8 (Leica Microsystems) analysiert (Eils et al. 1998); Beschreibung siehe Kapitel.2.2.8.

Die Karyotypisierung erfolgte über über ein Klassifizierungsprogramm (Leica MCK, Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd, Cambridge, UK), das bei Eils et al. (1998) ausführlich beschrieben wurde.

## **3 ERGEBNISSE**

### **3.1 Neuroblastom:**

#### **In-situ-Hybridisierung mit BACs und YACs auf Zelllinien**

##### **3.1.1 Allgemeines**

In dieser Arbeit wurde ein kombinatorisch markierter Pool aus sieben Neuroblastom-spezifischen BACs und YACs entwickelt, der den simultanen Nachweis von Veränderungen bei untersuchtem Material aus Neuroblastomen zulässt:

Die Sonden wurden in einem 7-Farben-Ansatz kombinatorisch markiert, um durch Analyse von je zwei Fluoreszenz-Kanälen Signale eindeutig vom Hintergrund unterscheiden zu können. Die kombinatorische Markierung hat also den Vorteil, dass eventuell schwach hybridisierte oder zweifelhafte Signale in einem Fluoreszenzkanal mit Hilfe eines zweiten Kanals kontrolliert werden können. Nur ein Signal, welches in beiden Fluoreszenzkanälen auftritt, wird gezählt. Neben Sonden, die beim Neuroblastom in bekannte Veränderungen kartieren, wurden auch Kontrollsonden eingesetzt, die an anderer Stelle, aber auf dem entsprechenden Chromosom hybridisieren.

Die Auswahl der Sonden wurde an Hand verschiedener Veröffentlichungen und in Zusammenarbeit mit Frank Speleman getroffen.

Die Sonden für die Regionen 1p36, 2p24, 11q23 und 17q25 kartieren in Regionen, die speziell beim Neuroblastom unter-/ oder überrepräsentiert sind. Bei 1p36 und 11q23 zeigen beim Neuroblastom in Abhängigkeit der Stadien häufig Deletionen; 17q25 und 2p24 (MYCN) weisen - wiederum in Abhängigkeit der Stadien - häufig Amplifikationen auf (siehe hierzu Kapitel 1.1).

Die Sonden für die Regionen 1q12, 11p15 und 17p12 dienen als Kontrolle.

Die Sonden wurden in einer DOP-PCR sowie in einer Alu-PCR aus einer Minipröpä amplifiziert. Die Markierung mit Fluorochromen erfolgte mittels einer Nicktranslation durch Einsatz eines 1:1 Gemisches aus DOP-PCR- und Alu-PCR-Produkt. Es hat sich in mehreren Versuchen gezeigt, dass durch Einsatz dieses Gemisches die Hybridisierungs-Intensität am stärksten ist. Die eingesetzten Sonden wurden in zahlreichen Vorversuchen sorgfältig ausbalanciert. Das bedeutet, dass die Hybridisierungs-Intensität in jedem Kanal ungefähr gleich ist und so ein Durchstrahlen in andere Kanäle sowie ein Überstrahlen kleinerer oder schwächerer Sonden vermieden wird.

Tabelle 32 zeigt nochmals das kombinatorische Hybridisierungs-Schema der für die Analysen eingesetzten BACs und YACs. Diese Sonden werden im Folgenden *kombinatorischer Nb-Pool* genannt.

Sonde	Klonname	Lokalisation	Fluoreszenzkanäle
BAC	60J11	1p36	FITC, Cy3.5
YAC	906E08	1q12	Cy3.5, Cy5
YAC	875B11	2p24 (MYCN)	Cy5.5
YAC	879B10	11p15	Cy3, FITC
BAC	760H24	11q23	FITC, Cy5
BAC	628O18	17p12	Cy3, Cy5
BAC	1124B17	17q25	Cy3, Cy3.5

*Tabelle 32: Kombinatorischer Nb-Pool für die Hybridisierung auf Zelllinien, wie er nach dem Nachweis in den einzelnen Fluoreszenzkanälen erscheint.*

### 3.1.2 Hybridisierung auf 46,XY

#### Allgemeine Auswertung

Um die Hybridisierungs-Effizienz der kombinatorisch markierten BACs und YACs zu bestimmen, wurden die Sonden zunächst auf normale Lymphozyten hybridisiert.

In Abbildung 21 ist das Hybridisierungs-Ergebnis auf einer 46,XY Metaphase zu sehen.

In A) ist eine Metaphase und in B) ist ein Zellkern gezeigt.

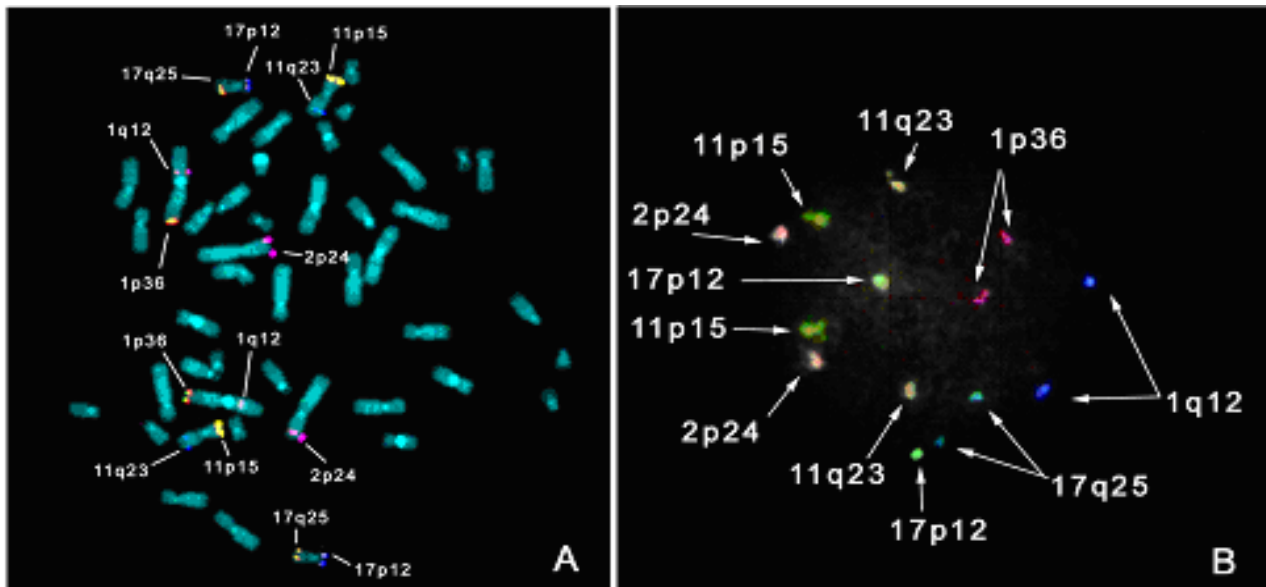


Abbildung 21: Kombinatorischer Nb-Pool A) 46,XY Metaphase und B) 46,XY Zellkern.  
Falschfarben-Darstellung.

Insgesamt wurde die Hybridisierungs-Effizienz von 100 Lymphozyten-Zellkernen ausgezählt. In Tabelle 33 sowie in Diagramm 1 ist das Ergebnis der Auswertung zu sehen.

46,XY	Sonde	Signale			
		Anzahl der Zellkerne in %			
		0	1	2	3
	1p36	0	2	98	0
	1q12	0	4	96	0
	2p24	0	2	98	0
	11p15	0	0	100	0
	11q23	1	7	92	0
	17p12	0	4	96	0

Tabelle 33: Hybridisierungs-Effizienz des kombinatorischen Nb-Pools bei 100 ausgewerteten Zellkernen (46,XY).



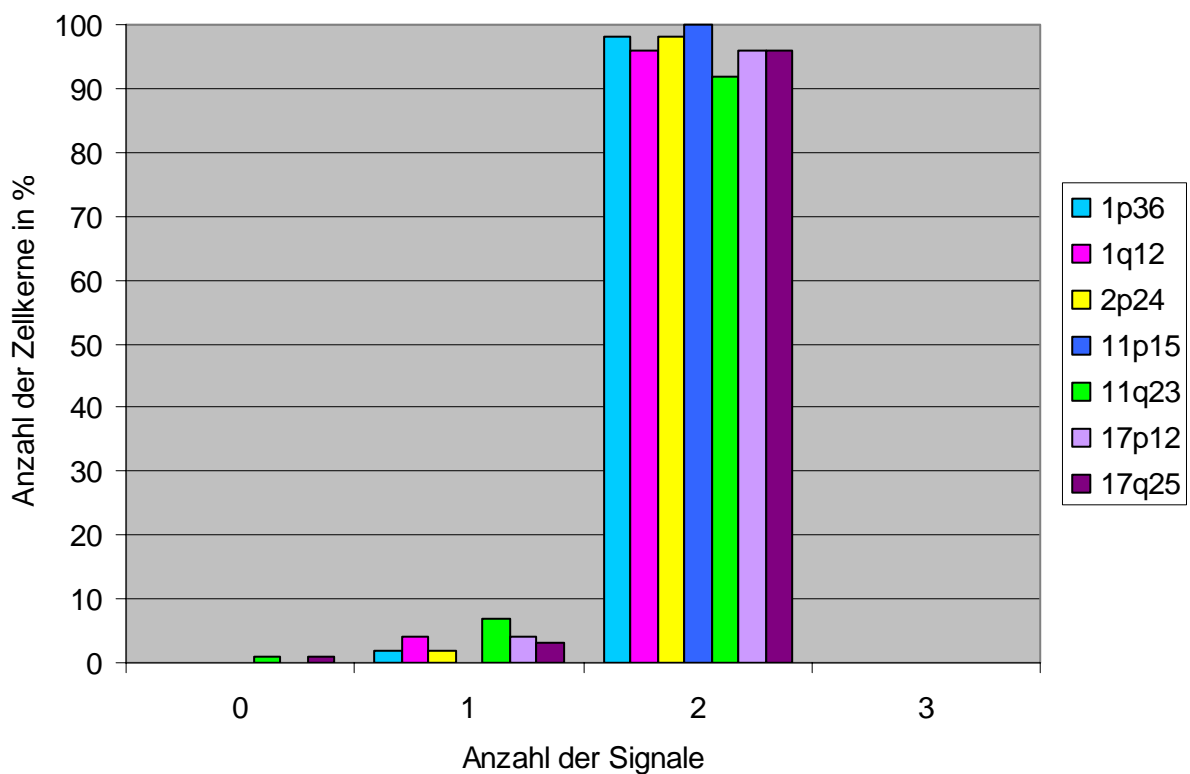


Diagramm 1: Hybridisierungs-Effizienz des kombinatorischen Nb-Pools bei 100 ausgewerteten Zellkernen (46,XY).

Zu erwarten ist, dass jede Sonde sowohl im Zellkern als auch in der Metaphase je zwei Signale zeigt, die in je zwei Kanälen identisch sind. Wie aus vorheriger Tabelle und dem Diagramm hervorgeht, liegt die tatsächliche Hybridisierungs-Effizienz in 100 ausgezählten Zellkernen bei 92% (11q23), 96 % (1q12, 17p15, 17q25), 98% (1p36, 2p24) und 100% (11p15).

### Statistische Auswertung

Für jede Sonde wurde über einen „2 Stichproben t-Test“ unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen (Welch-Test) Mittelwert, Standardabweichung und P-Wert ermittelt, bezogen auf die Gesamtzahl der ausgewerteten Zellkerne (siehe Kapitel 2.2.8.2).

Die folgende Tabelle und das folgende Diagramm gibt die Berechnung der Mittelwerte und der Standardabweichung des kombinatorischen Nb-Pools auf 46,XY an:

46,XY	Sonde	Mittelwert	Standardabweichung
	1p36	1,98	0,02
	1q12	1,96	0,04
	2p24	1,98	0,02
	11p15	2,00	0,00
	11q23	1,91	0,10
	17p12	1,96	0,04
	17q25	1,95	0,07

Tabelle 34: Mittelwerte und Standardabweichungen des kombinatorischen Nb-Pools auf 46,XY  
Die Farben vor der Tabelle entsprechen den Farben im Diagramm.

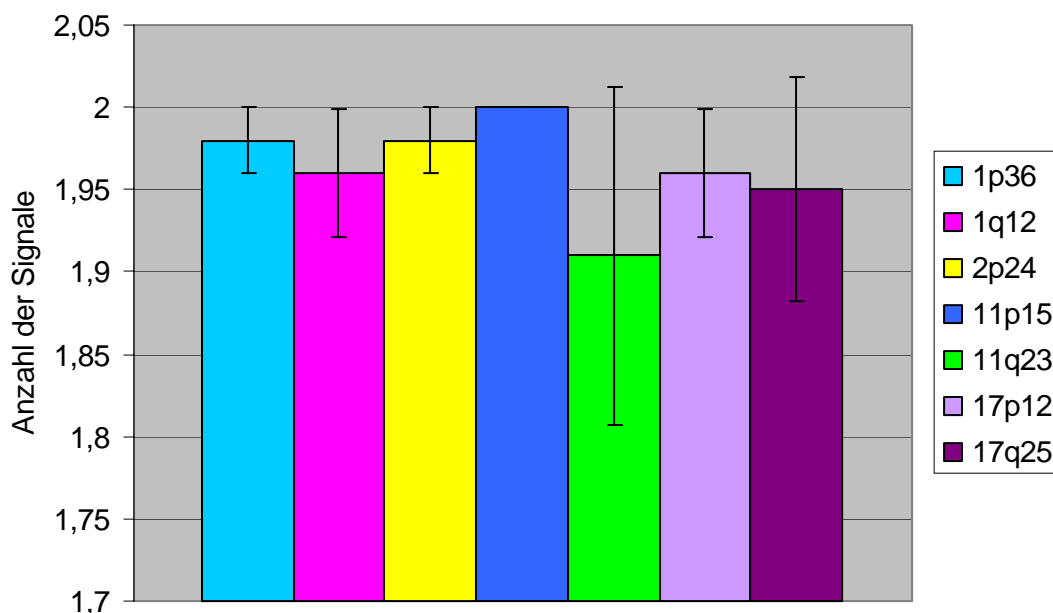


Diagramm 2: Mittelwerte und Standardabweichungen des kombinatorischen Nb-Pools auf 46,XY.

Die Mittelwerte des kombinatorischen Nb-Pools (46,XY) liegen zwischen 1,91 (11q23) und 2,00 (11p15). Die Standardabweichungen ergaben Werte zwischen 0,00 (11p15) und 0,10 (11q23) und sind somit sehr gering. Daraus lässt sich eine sehr hohe Hybridisierungs-Effizienz schließen, die von den erwarteten 2 Signalen je kombinatorische Sonde kaum abweicht. Die P-Werte liegen unter 0,001 zeigen somit statistische Signifikanz (ohne Abbildung).

### 3.1.3 Hybridisierung auf Neuroblastom-Zelllinien

Mittels des kombinatorischen Nb-Pools wurden die Zelllinien Nb90.9, TR-14 und SKN-BE analysiert. Bei diesen Zelllinien handelt es sich um etablierte Zelllinien, die von zahlreichen Arbeitsgruppen für FISH- und CGH (*comparative genomic hybridization*)-Studien herangezogen werden. Bislang wurden in den Veröffentlichungen Untersuchungen beschrieben, die neben CGH auch Hybridisierungen einzelner verwendeter Regionen-spezifischer Sonden verwenden, zum Beispiel Van Roy et al. 2001, O'Neill et al. 2001, Kim et al. 2001, Vandesompele et al. 1998, Altura et al. 1997. Von einer Hybridisierung eines kombinatorischen Nb-Pools auf Neuroblastom-Material wurde bislang jedoch nicht berichtet.

Der kombinatorische Nb-Pool wurde auf die oben genannten vier Zelllinien hybridisiert und ausgewertet: je Zelllinie wurden die Signale von je 100 Zellkernen ausgezählt.

#### 3.1.3.1 Zelllinie Nb90.9

Der Zellkern der folgenden Abbildung zeigt ein Hybridisierungsbild des kombinatorischen Nb-Pools auf die Zelllinie Nb90.9 mit seinen bereits hier ersichtlichen zahlreichen Veränderungen.

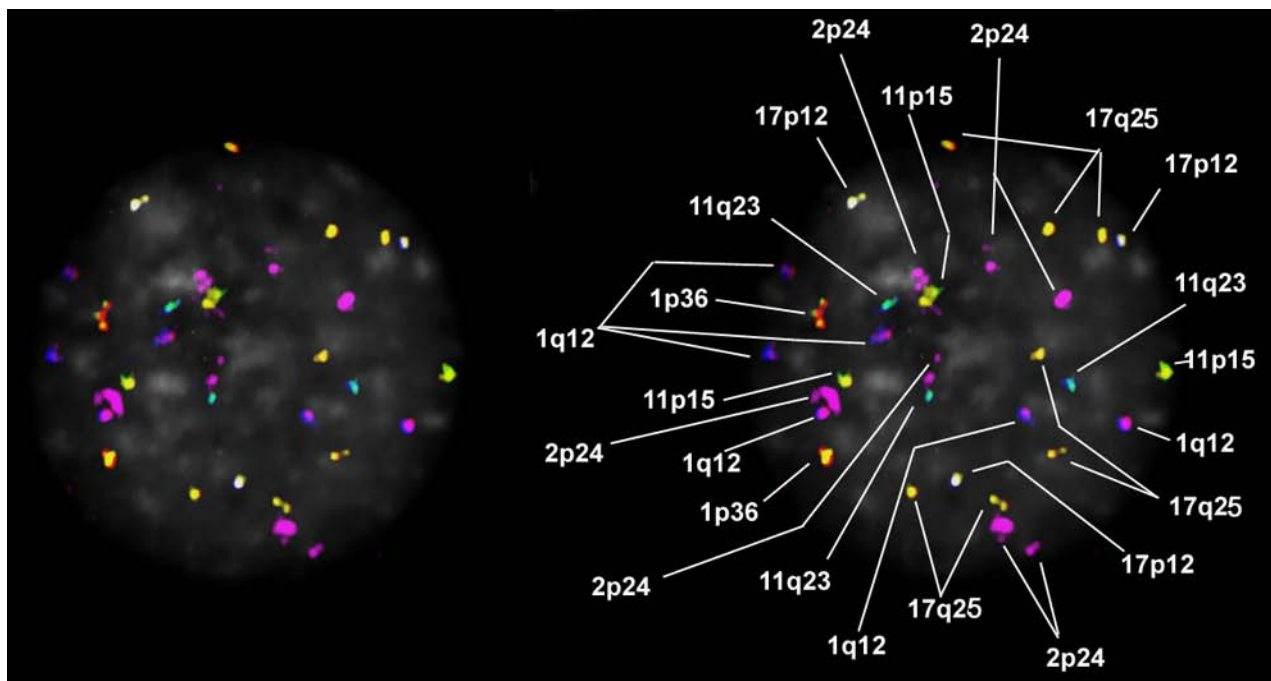


Abbildung 22: Kombinatorischer Nb-Pool bei der Zelllinie „Nb90.9“. Gezeigt ist jeweils derselbe Zellkern ohne (links) und mit (rechts) Angabe der hybridisierten Chromosomen-Regionen. Falschfarben-Darstellung.

**Allgemeine Auswertung**

Durch Analyse von 100 Zellkernen ergibt sich folgendes Ergebnis, das in Tabelle 35 und Diagramm 3 aufgeführt ist:

Nb90.9	Sonde	Signale								
		Anzahl der Zellkerne in %								
		0	1	2	3	4	5	6	7	8
	1p36	0	0	98	2	0	0	0	0	0
	1q12	0	0	0	1	6	68	25	0	0
	2p24	0	2	1	10	11	48	23	4	1
	11p15	0	0	2	79	18	1	0	0	0
	11q23	0	0	10	70	20	0	0	0	0
	17p12	0	2	22	75	1	0	0	0	0

Tabelle 35: Kombinatorischer Nb-Pool bei 100 Zellkernen der Neuroblastom- Zelllinie „Nb90.9“. Die Farben vor der Tabelle entsprechen den Farben im Diagramm; die hellgrau unterlegten Felder zeigen die Haupt-Prozentzahl der gefundenen Signale an.

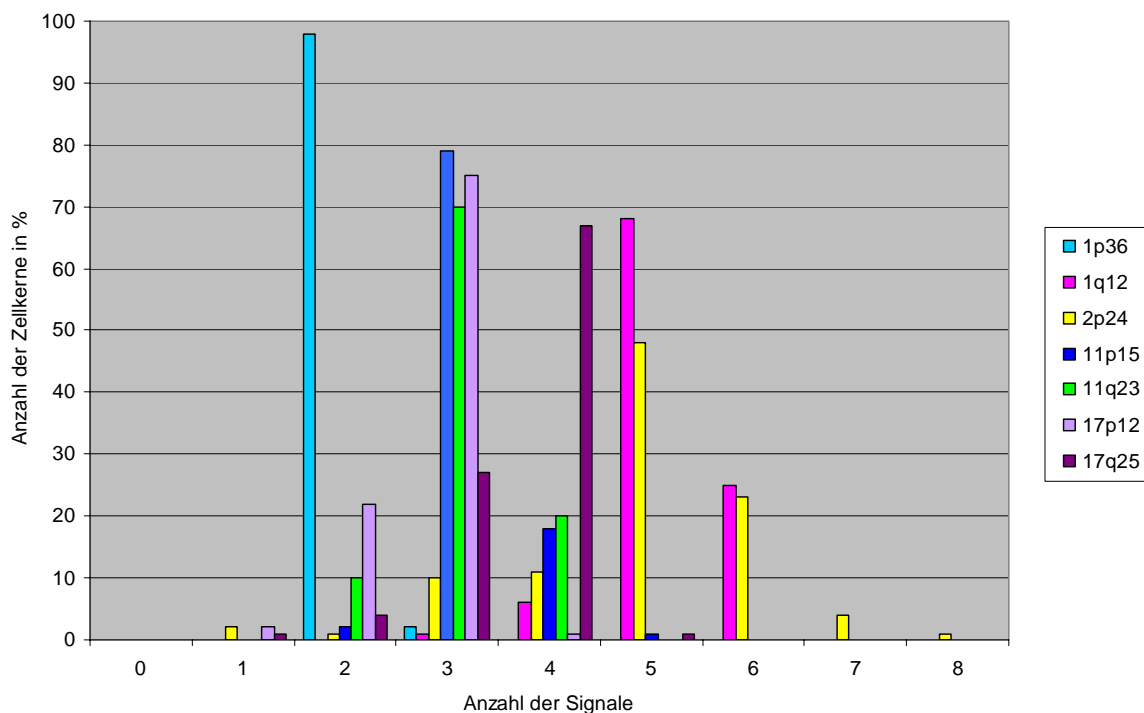


Diagramm 3: Ergebnis der Auswertung von 100 Zellkernen der Neuroblastom- Zelllinie „Nb90.9“.

### Auswertung von Metaphasen

Im Hybridisierungsfeld konnten insgesamt zwei auswertbare Metaphasen gefunden werden. Die folgende Abbildung zeigt den kombinatorischen Nb-Pool auf einer Metaphase von Nb90.9.

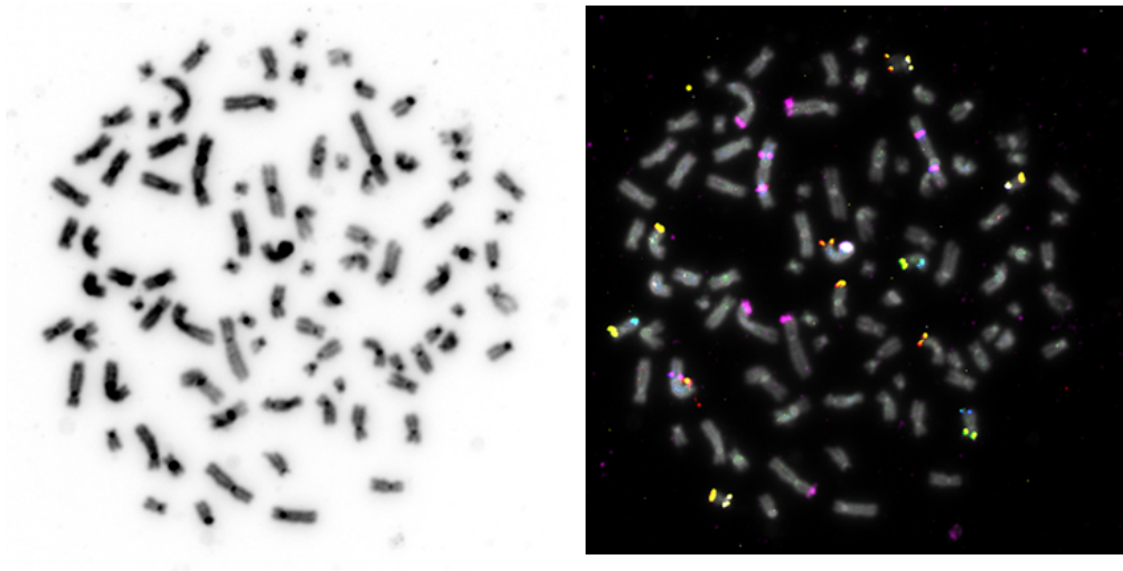


Abbildung 23: Kombinatorischer Nb-Pool auf einer Metaphase der Zelllinie Nb90.9.  
Linkes Bild: Invertiertes DAPI; rechtes Bild: Falschfarben-Darstellung.

Eine Analyse der Veränderungen, die durch Hybridisierung des kombinatorischen Nb-Pools ersichtlich wurde, ergab das in der folgenden schematischen Darstellung gezeigte Ergebnis:

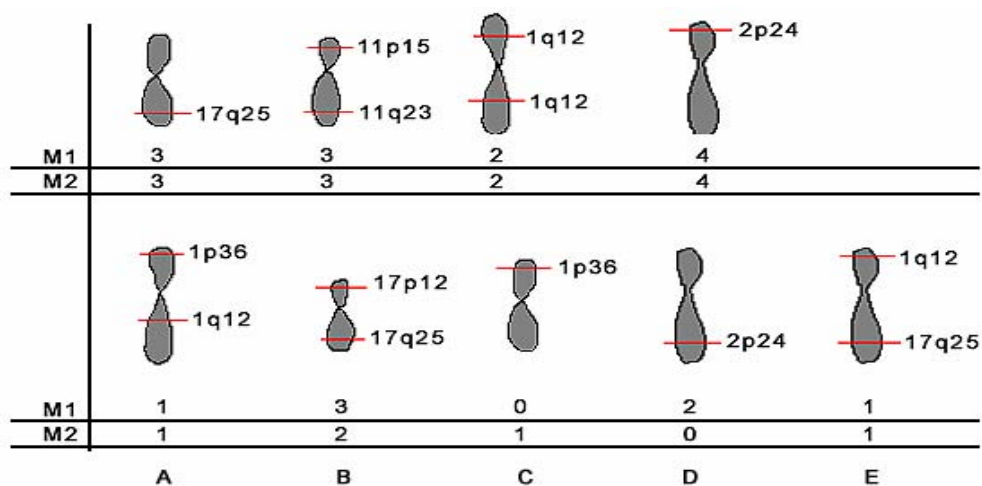


Abbildung 24: Schematische Darstellung der identifizierten Veränderungen bei zwei Metaphasen der Zelllinie Nb90.9. M = Metaphase. Die Zahlen in den Reihen geben die Anzahl der gefundenen Veränderungen je Chromosom an.

Bei Betrachtung der schematisch dargestellten Chromosomen (siehe Abbildung 24) wird ersichtlich, dass neben den erwarteten Chromosomen 11 (Zeile 1 Spalte B), 2 (Zeile 1 Spalte D), 1 (Zeile 2 Spalte A) und 17 (Zeile 2 Spalte B) auch mehrere Chromosomen mit Translokationen beziehungsweise Deletionen vorhanden sind (Zeile 1 Spalten A und C; Zeile 2 Spalten C, D und E). Allerdings kann weder für die unveränderten noch für die veränderten Chromosomen nur auf Grund der Hybridisierung des kombinatorischen Nb-Pools auf ihren tatsächlichen Ursprung geschlossen werden. Hierzu wären M-FISH Analysen nötig. Eine Auswertung der Zellkerne kann also keine an der Translokation beteiligten Chromosomen nachweisen. Beispiel: Zeile 1 Spalte C: an Hand der visuellen Inspektion der Zellkerne wird nicht ersichtlich, dass sich auf einem Chromosom zwei 1q12 Regionen befinden.

Wie aus Analysen der Metaphasen der Zelllinie Nb90.9 ersichtlich wird (siehe Abbildungen 23 und 24), handelt es hierbei um einen hypotetraploiden Tumor. Die Chromosomenzahl betrug in den analysierten Metaphasen etwa 86. Laut ISCN-Nomenklatur (1995) handelt es sich somit bei Nb90.9 um eine hypotetraploide Zelllinie (Hypotetraploidie zwischen 81 und 91 Chromosomen). Unter Berücksichtigung der Tetraploidie ergibt sich daraus folgendes Ergebnis (siehe Tabelle 35 und Diagramm 3): Bei 1p36 wurde in 98% ein Verlust von 2 Regionen gezählt. Die Kontrollsonde 1p15 hingegen zeigt in 68% eine zusätzliche Region. 2p24 ist in 48% amplifiziert. In 70% ist bei 11q23 ein Verlust zu beobachten, wobei auch die Kontrolle 11p15 in 97% nur drei anstatt der erwarteten vier Signale zeigt. Man könnte daraus auf einen Verlust des ganzen Chromosoms schließen. Bei 17q25 wurde in 67% eine Amplifikation ermittelt; die Kontrolle 7p12 hingegen zeigt in 75% ein Signal zu wenig.

### **Statistische Auswertung**

Für jede Sonde wurde über einen „2 Stichproben t-Test“ unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen (Welch-Test) Mittelwert, Standardabweichung und P-Wert ermittelt, bezogen auf die Gesamtzahl der ausgewerteten Zellkerne (siehe Kapitel 2.2.8.2).

Die folgende Tabelle und das folgende Diagramm gibt das Ergebnis der Berechnung der Mittelwerte und der Standardabweichung der Zelllinie Nb90.9 an.

Nb90.9	Sonde	Mittelwert	Standardabweichung
	1p36	2,02	0,02
	1q12	5,18	0,33
	2p24	4,92	1,40
	11p15	3,18	0,21
	11q23	3,09	0,30
	17p12	2,75	0,25
	17q25	6,63	0,40

Tabelle 36: Mittelwerte und Standardabweichung von 100 ausgewerteten Zellkernen der Zelllinie Nb90.9. Die Farben vor der Tabelle entsprechen den Farben im Diagramm.

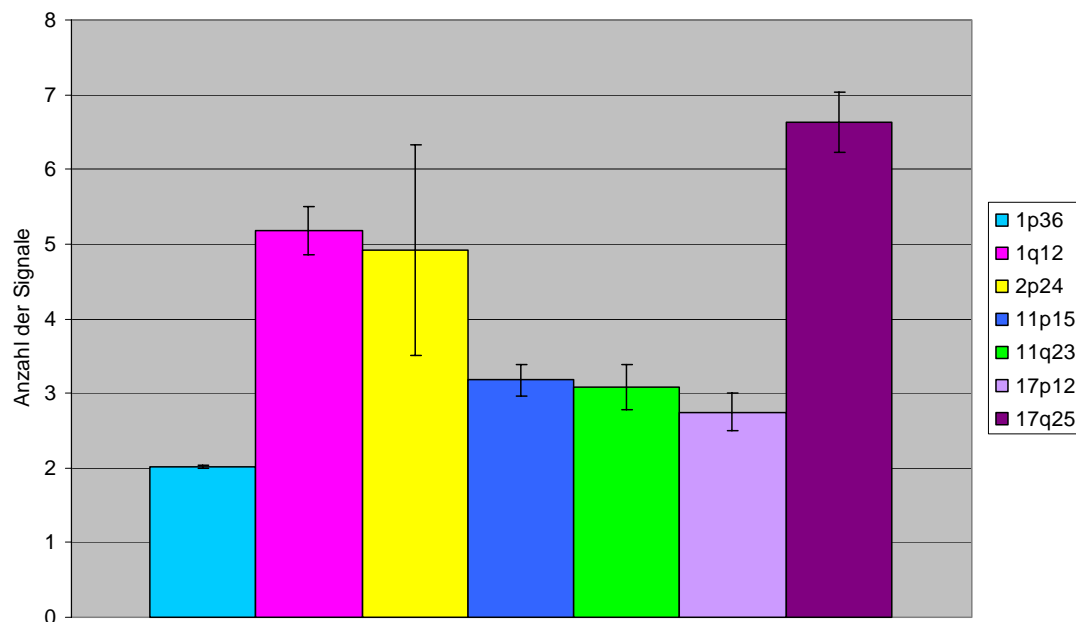


Diagramm 4: Mittelwerte und Standardabweichung von 100 ausgewerteten Zellkernen der Zelllinie Nb90.9.

Wie aus obiger Tabelle und Diagramm hervorgeht, liegen die Mittelwerte bei der Auswertung der Zelllinie Nb90.9 zwischen 2,02 (1p36) und 6,63 (17q25) und die Standardabweichungen zwischen 0,02 (1p36) und 1,40 (2p24). Ausgehend von einer hypotetraploiden Zelllinie (siehe oben) und unter Rücksichtnahme der Kontrollsonden zeigt 1p36 mit einem Mittelwert von 2.02 (Kontrolle: 1q12: 5,18) einen Verlust, 2p24 mit einem Mittelwert von 4,92 eine Amplifikation, sowie 17q25 mit einem Mittelwert von 6,63 (Kontrolle 17p12: 2,75) einen Gewinn (siehe Tabelle 36). Die P-Werte liegen unter 0,001 zeigen somit statistische Signifikanz (ohne Abbildung).

### 3.1.3.2 Zelllinie TR-14

Abbildung 25 zeigt den kombinatorisch markierten Nb-Pool auf der Zelllinie TR-14. Abgebildet ist eine Metaphase. Auch hier sind bereits auf den ersten Blick zahlreiche Veränderungen zu sehen.

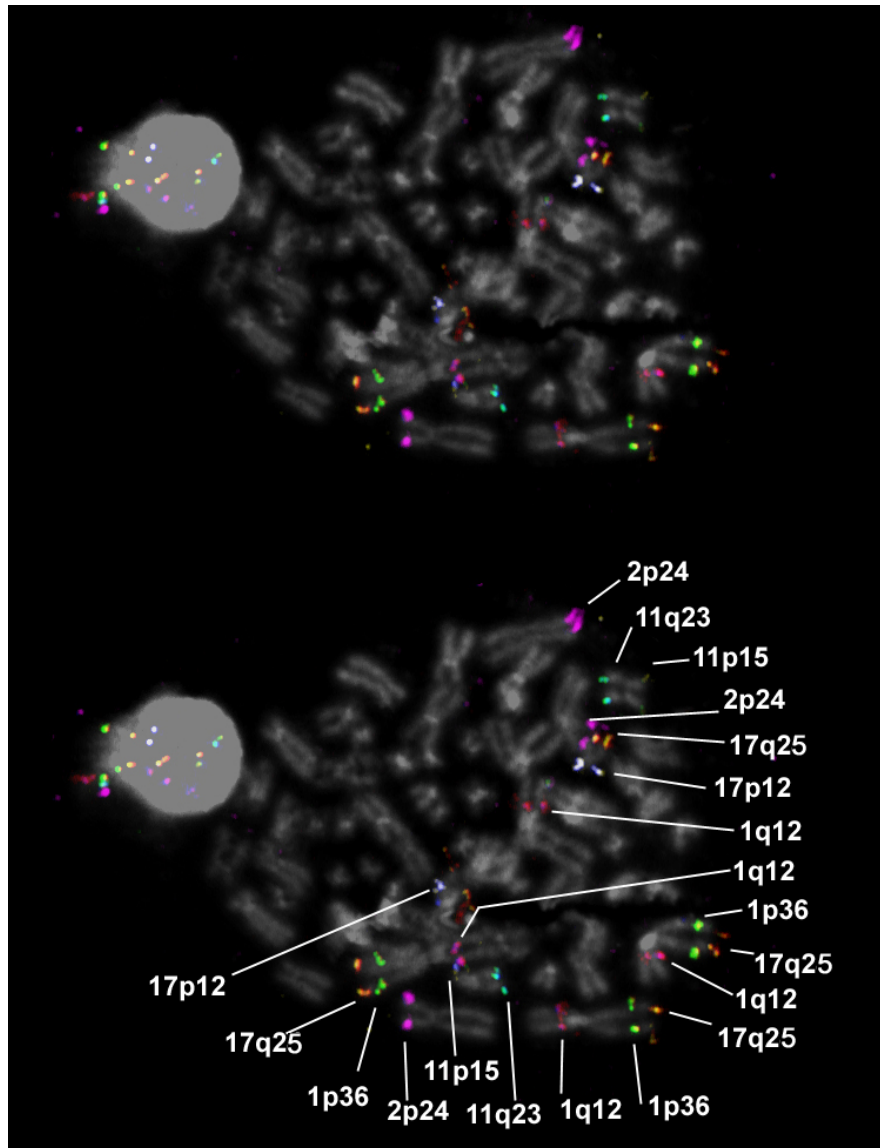


Abbildung 25: Kombinatorischer Nb-Pool bei der Zelllinie „TR-14“. Gezeigt ist jeweils derselbe Zellkern ohne (oben) und mit (unten) Angabe der hybridisierten Chromosomen-Regionen. Falschfarben-Darstellung.



**Allgemeine Auswertung**

Die Analyse von 100 Zellkernen der Zelllinie TR-14 ergab folgendes Ergebnis (siehe Tabelle 37 und Diagramm 5).

TR-14	Sonde	Signale								
		Anzahl der Zellkerne in %								
		0	1	2	3	4	5	6	7	8
	1p36	0	8	67	24	0	0	1	0	0
	1q12	0	0	12	37	46	4	0	0	1
	2p24	0	12	31	47	6	2	1	0	1
	11p15	0	7	76	15	1	1	0	0	0
	11q23	0	5	82	10	2	1	0	0	0
	17p12	0	8	85	4	2	1	0	0	0
	17q25	0	0	0	8	67	23	1	1	0

Tabelle 37: Kombinatorischer Nb-Pool bei 100 Zellkernen der Neuroblastom- Zelllinie „TR-14“.

Die Farben vor der Tabelle entsprechen den Farben im Diagramm;

die hellgrau unterlegten Felder zeigen die Haupt-Prozentzahl der gefundenen Signale an.

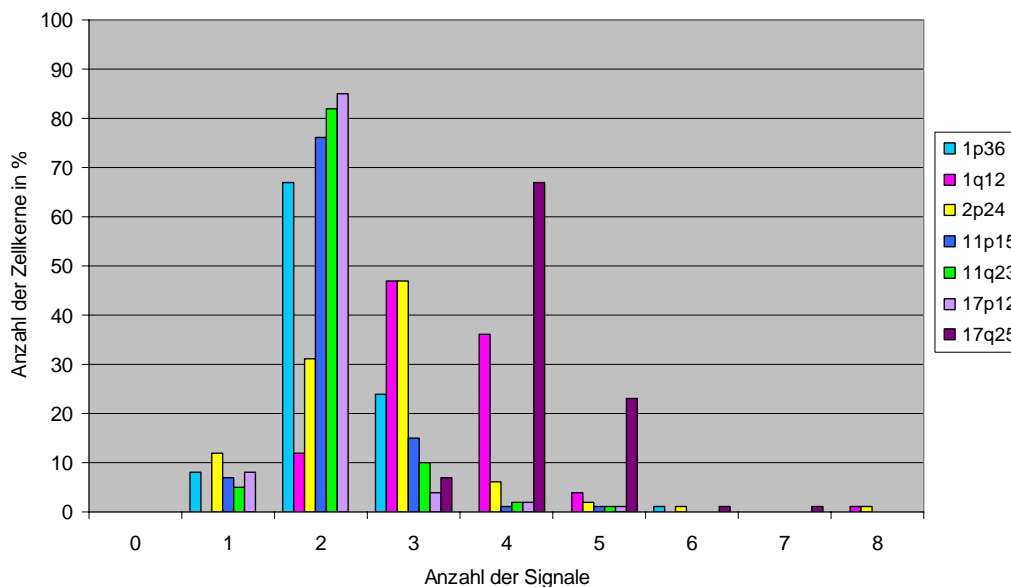


Diagramm 5: Ergebnis der Auswertung von 100 Zellkernen der Neuroblastom- Zelllinie „TR-14“.

## Auswertung von Metaphasen

Insgesamt konnte nur eine auswertbare Metaphase gefunden werden. Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis der Veränderungen dieser Metaphase.

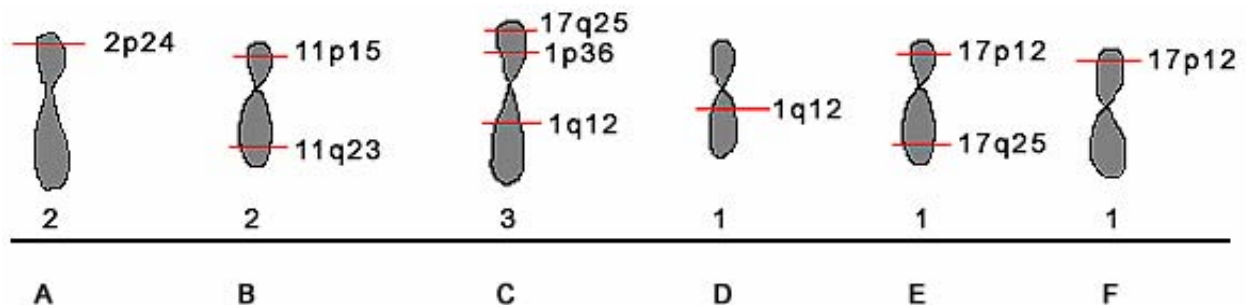


Abbildung 26: Schematische Darstellung der identifizierten Veränderungen bei einer Metaphase der Zelllinie TR-14. Die Zahlen in der Reihe geben die Anzahl der gefundenen Veränderungen je Chromosom an.

Bei der Zelllinie TR-14 handelt es sich um eine hyperdiploide Zelllinie (ISCN-Nomenklatur, 1995). Die Chromosomenzahl lag bei den analysierten Metaphasen zwischen 49 und 57 (Hyperdiploidie zwischen 47 und 57 Chromosomen); siehe Abbildungen 25 bis 26.

Von Diploidie ausgehend, zeigte 1p36 in 67% keine Veränderung, die Kontrolle 1q12 hingegen war in insgesamt 83% amplifiziert. 2p24 zeigte in 47% eine Amplifikation mit drei Signalen. In 82% wurde bei 11q23 keine Veränderung beobachtet, auch die Kontrolle 11p15 zeigte in 76% keine Veränderung. Bei 17q25 wurde in 67% eine Amplifikation mit vier Signalen gezählt, die Kontrolle 17p12 hingegen war in 85% unverändert.

Bei Analyse der schematisch dargestellten Chromosomen (siehe Abbildung 26) fällt auf, dass neben den erwarteten Chromosomen 2 (Spalte A), 11 (Spalte B) und 17 (Spalte E) auch mehrere Chromosomen mit Translokationen beziehungsweise Deletionen vorhanden sind (Spalten C, D und F). Allerdings kann auch hier weder für die unveränderten noch für die veränderten Chromosomen nur auf Grund der Hybridisierung des kombinatorischen Nb-Pools auf ihren tatsächlichen Ursprung geschlossen werden. Hier wären ebenfalls M-FISH Analysen nötig.

## Statistische Auswertung

Für jede Sonde wurde über einen „2 Stichproben t-Test“ unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen (Welch-Test) Mittelwert, Standardabweichung und P-Wert ermittelt, bezogen auf die Gesamtzahl der ausgewerteten Zellkerne (siehe Kapitel 2.2.8.2).

Die folgende Tabelle und das folgende Diagramm gibt das Ergebnis der Berechnung der Mittelwerte und der Standardabweichung der Zelllinie TR-14 an.

TR-14	Sonde	Mittelwert	Standardabweichung
	1p36	2,20	0,44
	1q12	3,37	0,76
	2p24	2,63	1,14
	11p15	2,13	0,34
	11q23	2,12	0,30
	17p12	2,03	0,29
	17q25	4,27	0,72

Tabelle 38: Mittelwerte und Standardabweichung von 100 ausgewerteten Zellkernen der Zelllinie TR-14. Die Farben vor der Tabelle entsprechen den Farben im Diagramm.

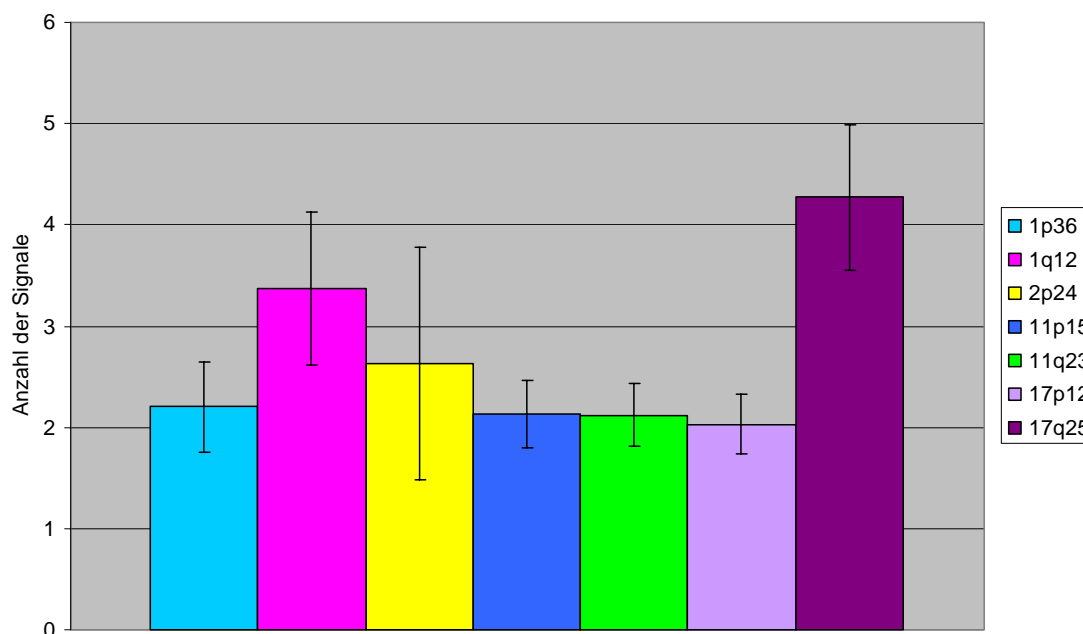


Diagramm 6: Mittelwerte und Standardabweichung von 100 ausgewerteten Zellkernen der Zelllinie TR-14.

Aus Tabelle 38 und Diagramm 6 ist folgendes Ergebnis zu schließen: Als hyperdiploide Zelllinie (siehe oben) ergibt sich bei 1p36 mit einem Mittelwert von 2,20 wahrscheinlich ein Verlust (Kontrolle 1q12; 3,37), bei 2p24 wahrscheinlich keine Amplifikation (Mittelwert 2,63) und bei 17q25 mit einem Mittelwert von 4,27 (Kontrolle 17p12: 2,03) ein Gewinn. Die P-Werte liegen unter 0,001 zeigen somit statistische Signifikanz (ohne Abbildung).

### 3.1.3.3 Zelllinie SKN-BE

In der folgenden Abbildung ist die Hybridisierung des kombinatorisch markierten Nb-Pools auf einen Zellkern der Zelllinie SKN-BE zu sehen.

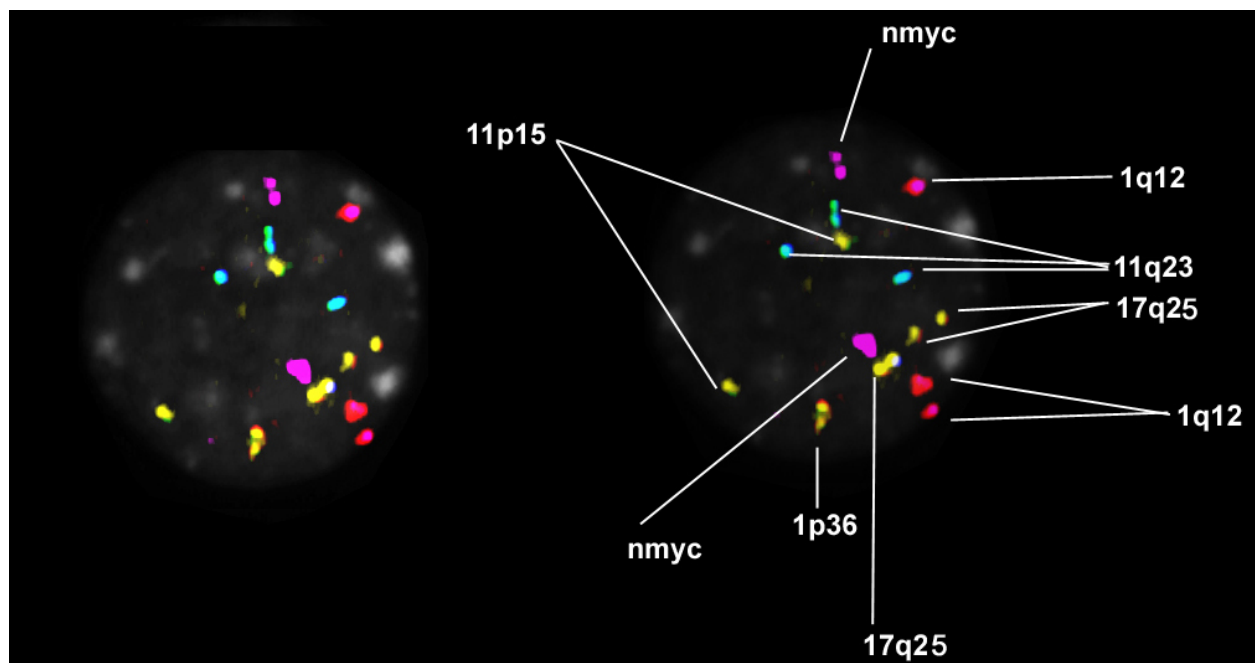


Abbildung 27: Kombinatorischer Nb-Pool bei der Zelllinie „SKN-BE“. Gezeigt ist jeweils derselbe Zellkern ohne (links) und mit (rechts) Angabe der hybridisierten Chromosomen-Regionen. Falschfarben-Darstellung.

**Allgemeine Auswertung**

Die Analyse von 100 Zellkernen der Zelllinie SKN-BE ergab folgende Signalverteilung (siehe Tabelle 39 und Diagramm 7):

SKN-BE	Sonde	Signale					
		Anzahl der Zellkerne in %					
		0	1	2	3	4	5
	1p36	0	97	3	0	0	0
	1q12	0	0	8	90	1	1
	2p24	1	9	36	52	2	0
	11p15	0	7	90	3	0	0
	11q23	0	1	16	80	2	1
	17p12	2	97	1	0	0	0

Tabelle 39: Kombinatorischer Nb-Pool bei 100 Zellkernen der Neuroblastom- Zelllinie „SKN-BE“. Die Farben vor der Tabelle entsprechen den Farben im Diagramm; die hellgrau unterlegten Felder zeigen die Haupt-Prozentzahl der gefundenen Signale an.

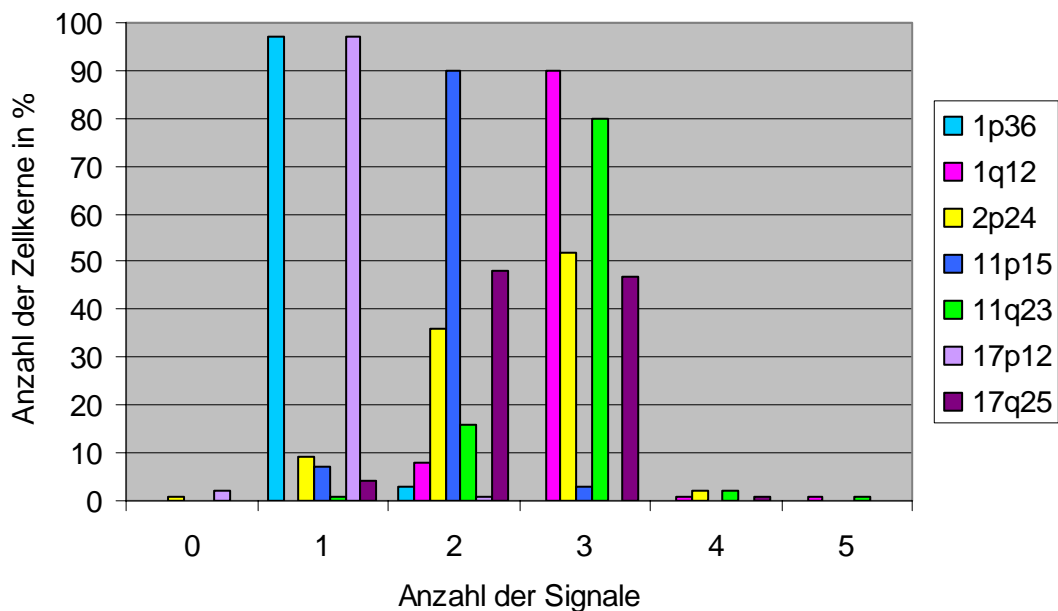


Diagramm 7: Ergebnis der Auswertung von 100 Zellkernen der Neuroblastom- Zelllinie „SKN-BE“.

### Auswertung von Metaphasen

Die folgende Abbildung zeigt den kombinatorischen Nb-Pool auf einer Metaphase der Zelllinie SKN-BE.

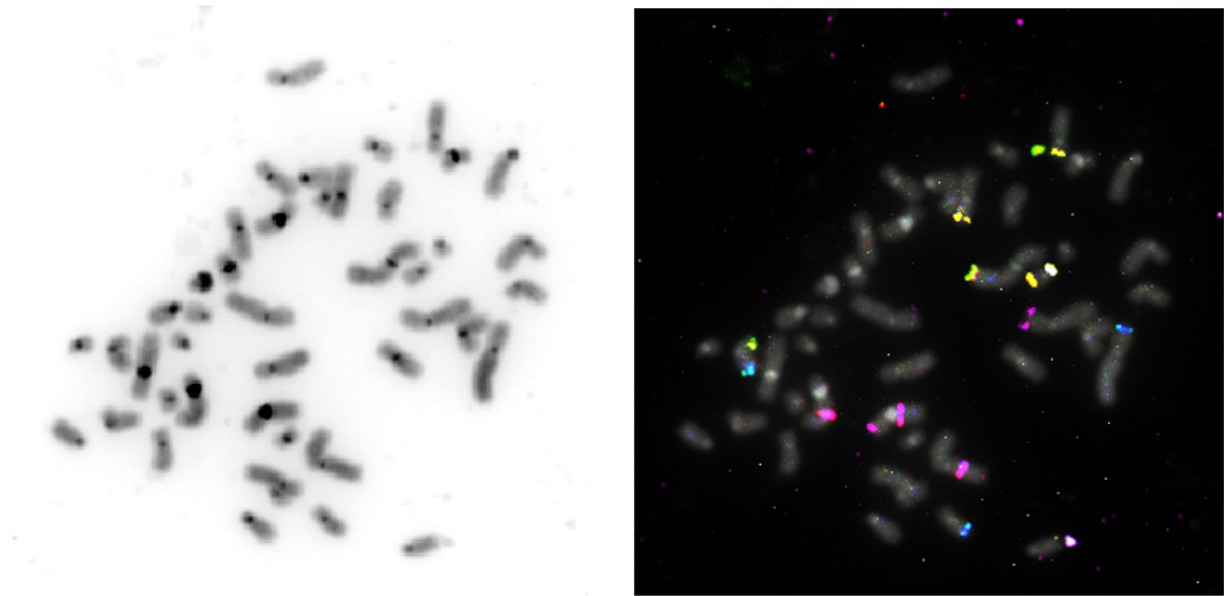


Abbildung 28: Kombinatorischer Nb-Pool auf einer Metaphase der Zelllinie SKN-BE.

In Abbildung 29 sind schematisch die gefundenen Veränderungen der analysierten Metaphasen dargestellt.

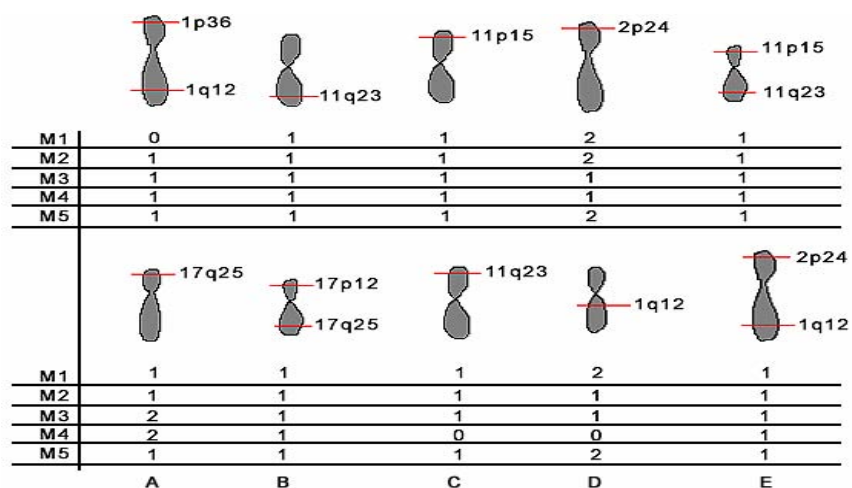


Abbildung 29: Schematische Darstellung der identifizierten Veränderungen bei fünf Metaphasen der Zelllinie SKN-BE. M = Metaphase. Die Zahlen in den Reihen geben die Anzahl der gefundenen Veränderungen je Chromosom an.

Bei SKN-BE konnten insgesamt fünf Metaphasen für weitere Analysen von Veränderungen herangezogen werden. Hierbei ergab sich eine diploide Zelllinie (siehe auch Abbildung 28-29). Die Chromosomenzahl lag bei den analysierten Metaphasen um 46. Von Diploidie ausgehend, resultiert aus obiger Tabelle und Diagramm folgendes Ergebnis: In 97% wurde bei 1p36 ein Verlust beobachtet. Die Kontrolle 1q12 zeigte hingegen in 90% eine Amplifikation mit drei Signalen. 2p24 war in 52% mit drei Signalen amplifiziert. Bei 11q23 wurden in 80% eine Amplifikation von drei Signalen beobachtet; die Kontrolle 11p15 war in 90% mit zwei Signalen unverändert. 17q25 zeigte in 48% keine Veränderung, in 47% wurde eine Amplifikation mit drei Signalen beobachtet; die Kontrolle wies in 97% mit einem Signal einen Verlust auf.

Aus den schematisch dargestellten Chromosomen der Zelllinie SKN-BE (Abbildung 29) ist erkennbar, dass neben den erwarteten Chromosomen 1 (Zeile 1 Spalte A), 2 (Zeile 1 Spalte D), 11 (Zeile 1 Spalte E) und 17 (Zeile 2 Spalte B) auch mehrere Chromosomen mit Translokationen beziehungsweise Deletionen vorhanden sind (Zeile 1 Spalten B und C; Zeile 2 Spalten A, C, D und E). Auch hier kann weder für die unveränderten noch für die veränderten Chromosomen nur auf Grund der Hybridisierung des kombinatorischen Nb-Pools auf ihren tatsächlichen Ursprung geschlossen werden; hier wären ebenfalls M-FISH Analysen nötig.

Die Ergebnisse bei der Auswertung der Signalzahl der einzelnen Sonden korrelieren wie bei der Analyse der anderen Zelllinien gut mit den Ergebnissen der Auswertung der Zellkerne (siehe oben).

### **Statistische Auswertung**

Für jede Sonde wurde über einen „2 Stichproben t-Test“ unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen (Welch-Test) Mittelwert, Standardabweichung und P-Wert ermittelt, bezogen auf die Gesamtzahl der ausgewerteten Zellkerne (siehe Kapitel 2.2.8.2).

Die folgende Tabelle und das folgende Diagramm gibt das Ergebnis der Berechnung der Mittelwerte und der Standardabweichung der Zelllinie SKN-BE an.

SKN-BE	Sonde	Mittelwert	Standardabweichung
	1p36	1,03	0,03
	1q12	2,94	0,14
	2p24	2,43	0,55
	11p15	1,96	0,10
	11q23	2,86	0,24
	17p12	0,99	0,03
	17q25	2,45	0,35

Tabelle 40: Mittelwerte und Standardabweichung von 100 ausgewerteten Zellkernen der Zelllinie SKN-BE. Die Farben vor der Tabelle entsprechen den Farben im Diagramm.

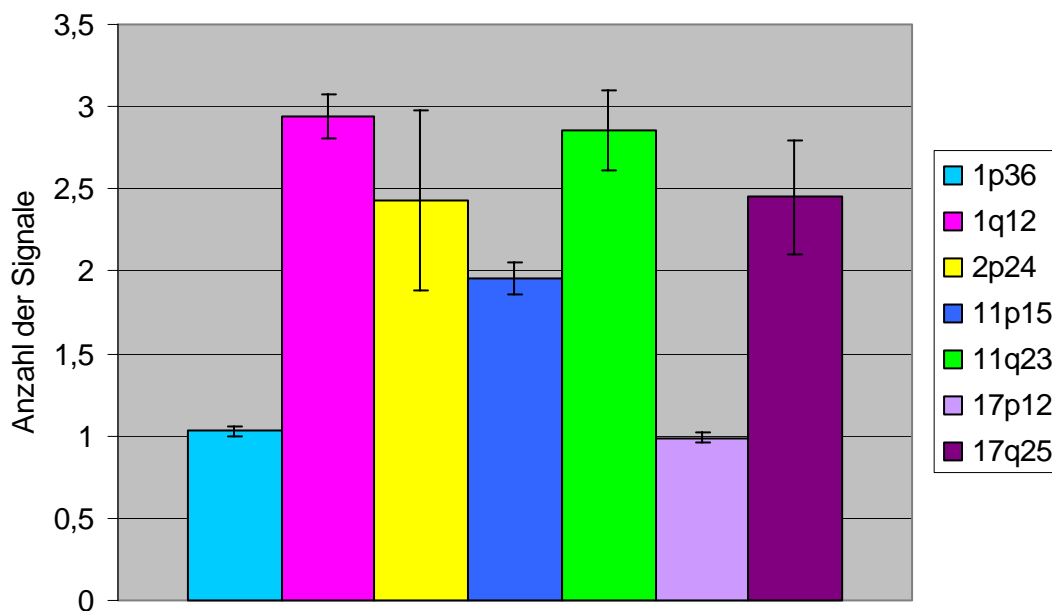


Diagramm 8: Mittelwerte und Standardabweichung von 100 ausgewerteten Zellkernen der Zelllinie SKN-BE.

Unter Berücksichtigung der häufig beschriebenen Assoziation von 1p Verlust, 17q25 Gewinn und MYCN-Amplifikation in späteren Stadien ergibt sich bei Nb.90 folgendes Ergebnis: Als diploide Zelllinie ergibt sich bei 1p36 mit einem Mittelwert von 1,03 ein Verlust (Kontrolle 1q12; 2,94), bei 2p24 wahrscheinlich eine Amplifikation (Mittelwert 2,43) und bei 17q25 mit einem Mittelwert von 2,45 (Kontrolle 17p12: 0,99) ein Gewinn (siehe Tabelle 40), wobei der geringe Mittelwert der Kontrolle 17p12 nicht erklärbar ist. Die P-Werte liegen unter 0,001 zeigen somit statistische Signifikanz (ohne Abbildung).



## 3.2 Neuroblastom:

### Interphase-FISH auf Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten

#### 3.2.1 Allgemeines

Alle verwendeten Gewebeschnitte wurden in gepuffertem Formalin (4% PBS) fixiert, wobei die Zeitdauer der Fixierung nicht bekannt ist. Nach Einbetten in Paraffinblöcke wurden die Schnitte mit 10 µm Dicke auf Superfrost++ Objektträger aufgebracht.

Superfrost++ Objektträger sind wichtig, da sich bei der recht aggressiven Vorbehandlung die Schnitte auf allen anderen Objektträgerarten relativ leicht ablösen können. Es hat sich ferner gezeigt, dass eine Verwendung von Schnitten, die in ungepuffertem Formalin fixiert wurden, nur unzureichende Hybridisierungs-Ergebnisse liefern.

Um von den Formalin-fixierten Schnitten das Paraffin zu entfernen und anschließend die Autofluoreszenz (siehe auch unten) zu reduzieren und schließlich das Cytoplasma zu reduzieren, muss der Schnitt zunächst in mehreren Schritten vorbehandelt werden. Hierbei ist der Einsatz folgender Schritte unerlässlich:

Xylol	→ Entfernung des Paraffins
Triton X-100	→ Erhöhung der Zellpermeabilität
Glycin-BSA	→ Reduktion der Autofluoreszenz
NaSCN	→ Lockerung der Bindungen zwischen DNA und Proteinen; Hopman et al. 1991
Pepsin-Verdau	→ Reduktion des Cytoplasmas
70% Formamid (RT)	→ Denaturierungs-Vorbereitung

Der Pepsin-Verdau muss sehr aggressiv durchgeführt werden. Dabei ist darauf zu achten, eine gute Balance zwischen ausreichender Entfernung des Cytoplasmas und möglichst geringem Angreifen der Zellkerne zu finden. Nur bei ausreichendem Pepsin-Verdau erhält man befriedigende Hybridisierungs-Ergebnisse. Zu viel Cytoplasma hindert die Sonden daran, in die Zellkerne einzudringen und werden vorher vom Cytoplasma „abgefangen“.

Im Folgenden werden zahlreiche Bilder gezeigt, die nach einer 3D-Rekonstruktion aufgenommen wurden. Ergänzend zu diesen Bildern wurden Animationen erstellt, die der Original-Arbeit als CD beigefügt sind.

### 3.2.2 Problematik der Autofluoreszenz

Beim Neuroblastom handelt es sich um einen Tumor, der von neuronalem Gewebe abstammt. Zahlreiche Veröffentlichungen und auch meine eigenen Versuche beobachten bei neuronalen Tumoren eine starke Tendenz zur Autofluoreszenz. Das bedeutet, dass der Tumor ohne adäquate Vorbehandlung im Epifluoreszenz-Mikroskop sehr stark leuchtet. Dieses Strahlen ist so stark, dass ohne eingreifende Maßnahmen eine Analyse von hybridisierten DNA-Sonden unmöglich wird: die Signalintensität der Autofluoreszenz ist im Vergleich zu den hybridisierten Signalen um ein Vielfaches stärker.

Bislang sind in der Literatur nur wenige Möglichkeiten beschrieben worden, diese Autofluoreszenz zu vermindern. In dieser Arbeit wurde ein Protokoll entwickelt, das eine Reduzierung der Gewebedicke, ein Einsatz von Glycin-BSA, eine aggressive Pepsin-Vorbehandlung, sowie eine Verringerung der Dextransulfat-Konzentration bei der Vorbehandlung der Sonden beinhaltet. Dadurch konnte die Autofluoreszenz gesenkt werden. Abbildung 30 zeigt einen 10 µm Gewebeschnitt nach einer Hybridisierung mit Neuroblastom-spezifischen BACs und YACs. Hieraus wird ersichtlich, dass ohne Vorbehandlung (A bis C) die Autofluoreszenz die hybridisierten Sonden sehr stark überstrahlt, so dass eine Auswertung der Signale nicht möglich wäre. Nach einer entsprechenden Vorbehandlung (D bis F) wird die Autofluoreszenz so weit reduziert, dass die Signale in den Vordergrund treten.

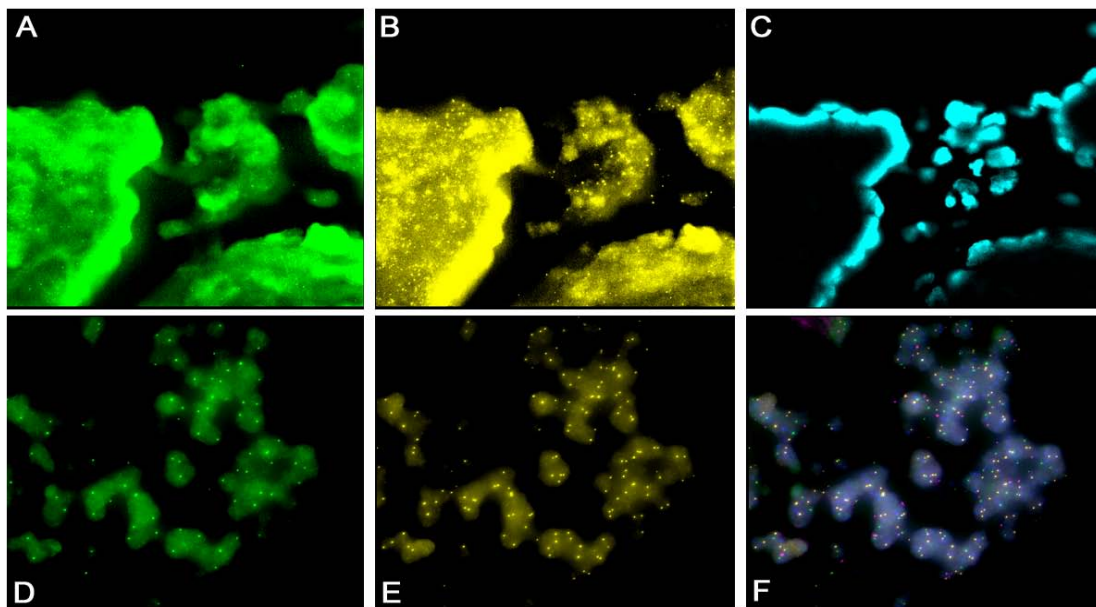


Abbildung 30: Zellkerne aus einem Gewebeschnitt nach Hybridisierung mit BACs und YACs.

A) bis C) DAPI ohne Vorbehandlung; D) bis F) nach Vorbehandlung.

A) FITC, B) Cy3, C) DAPI, D) FITC, E) Cy3, F) Überlagerungsbild (Falschfarben).

### 3.2.3 Beurteilung der verwendeten Gewebeschnitt-Dicke

Die verwendeten Neuroblastom-Gewebeschnitte haben eine Dicke von 10  $\mu\text{m}$ . Zunächst musste gezeigt werden, ob eine Schnittdicke von 10  $\mu\text{m}$  für eine vollständige Hybridisierung ausreicht. Möglicherweise werden durch die geringe Schnittdicke die Zellkerne angeschnitten, und Signale gehen verloren, was eine Verfälschung der Ergebnisse zur Folge haben kann. Die Ermittlung der Zellkerndicke wurde zum einen mittels Hybridisierung verschiedener Centromer-Sonden auf 10  $\mu\text{m}$  Gewebeschnitte untersucht (das Ergebnis wird exemplarisch am Tumorschnitt von Patientin TJ gezeigt). Hierbei musste in einem ersten Schritt die Hybridisierungs-Effizienz der eingesetzten Centromer-Sonden durch Hybridisierung auf Lymphozyten-Zellkerne ermittelt werden. Zum anderen wurde die Zellkerngröße mit Hilfe einer 3D-Rekonstruktion nach der Dekonvolution ermittelt und wird auch hier beispielhaft am Tumorschnitt von TJ vorgestellt.

#### 3.2.3.1 Berechnung der Hybridisierungs-Effizienz mit Hilfe von 46,XY

##### Lymphozyten

Zunächst wurde die Hybridisierungs-Effizienz der eingesetzten Centromer-Sonden durch Hybridisierung auf Lymphozyten-Zellkerne (46,XY) getestet. Hierfür wurden insgesamt 100 Zellkerne ausgewertet.

Bei den verwendeten Centromer-Sonden handelt es sich nicht um Regionen mit Neuroblastom-spezifischen Veränderungen, sondern sie wurden auf Grund der guten Hybridisierbarkeit eingesetzt. Die Centromer-Sonden sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Centromer-Sonde	Markierung
Centromer 8	FITC
Centromer 17	Cy3
Centromer 18	Cy3.5
Centromer 11	Cy5

*Tabelle 41: Verwendete Centromer-Sonden.*

Um eine Kreuzhybridisierung zu vermeiden, wurde zu diesem Mix eine geringe Menge an Cot-1-DNA zugegeben.

Abbildung 31 zeigt die verwendeten Centromer-Sonden auf einer 46,XY Metaphase. In dieser Abbildung ist noch eine zusätzliche Centromer-Sonde angegeben (Centromer 7, markiert mit Digoxigenin, Nachweis mit Anti-Dig Cy5.5), die aber nicht ausgewertet wurde, da es sich herausgestellt hat, dass die Schnitte im Cy5.5 Kanal eine so große Hintergrundinformation aufweisen, dass es fast unmöglich war, Signale von diesem Hintergrund zu unterscheiden.

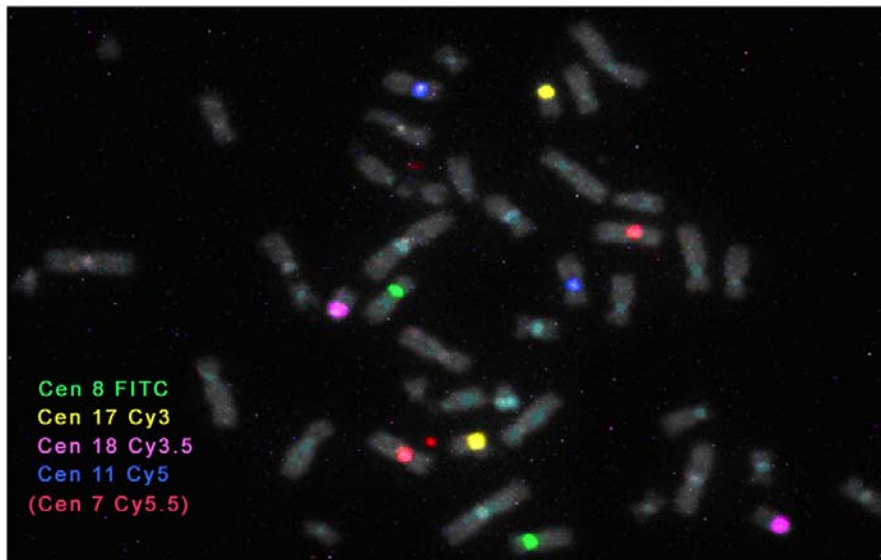


Abbildung 31: Centromer-Sonden auf einer 46,XY Metaphase. Die in Klammern angegebene Centromer-Sonde (Chromosom 7) wurde nicht in die Auswertung miteinbezogen.  
Cen = Centromer-Sonde

Tabelle 42 und Diagramm 9 geben die Effizienz der Hybridisierung von Centromer-Sonden auf 46,XY an.

46,XY	Sonde	Signale			
		Anzahl der Zellkerne in %			
		0	1	2	3
	Centromer 8	0	1	99	0
	Centromer 17	1	1	98	0
	Centromer 18	0	2	97	1

Tabelle 42: Hybridisierungs-Effizienz der Centromer-Sonden, mit 46,XY Lymphozyten berechnet.  
Die Farben vor der Tabelle entsprechen den Farben im Diagramm;  
Die hellgrau unterlegten Felder zeigen die Haupt-Prozentzahl der gefundenen Signale an.

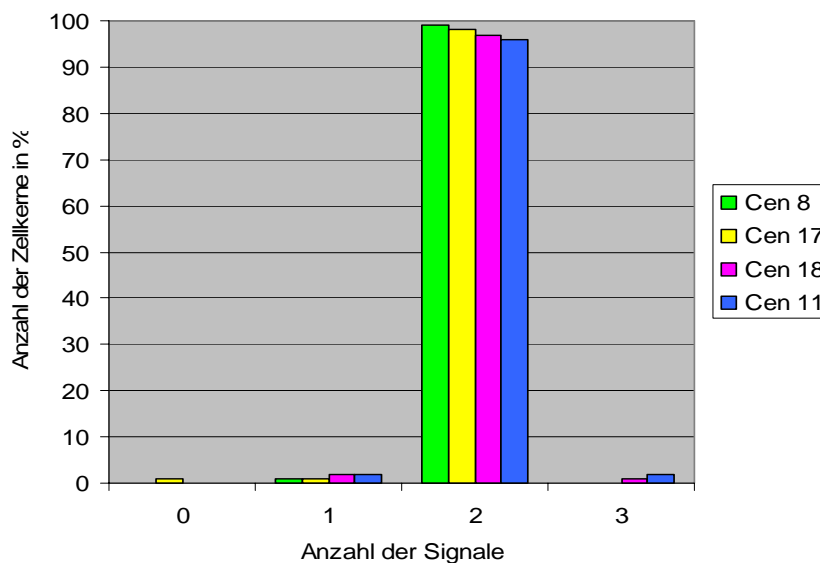


Diagramm 9: Hybridisierungs-Effizienz der Centromer-Sonden auf 46,XY. Cen = Centromer-Sonde.

Das Ergebnis zeigt, dass die Hybridisierungs-Effizienz der Centromer-Sonden auf 46,XY zwischen 96% (Centromer-Sonde für Chromosom 11) und 99% (Centromer-Sonde für Chromosom 8) liegt und demnach sehr hoch ist.

### Statistische Auswertung

Für jede Sonde wurde über einen „2 Stichproben t-Test“ unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen (Welch-Test) Mittelwert, Standardabweichung und P-Wert ermittelt, bezogen auf die Gesamtzahl der ausgewerteten Zellkerne (siehe Kapitel 2.2.8.2).

Die folgende Tabelle und das folgende Diagramm gibt das Ergebnis der Berechnung der Mittelwerte und der Standardabweichung der Centromer-Sonden auf 46,XY an.

46,XY Centromere	Sonde	Mittelwert	Standardabweichung
	Cen 8	1,99	0,01
	Cen 17	1,97	0,05
	Cen 18	1,99	0,03
	Cen 11	2,00	0,04

Tabelle 43: Mittelwerte und Standardabweichung der Centromer-Sonden auf 46,XY.  
Die Farben vor der Tabelle entsprechen den Farben im Diagramm.

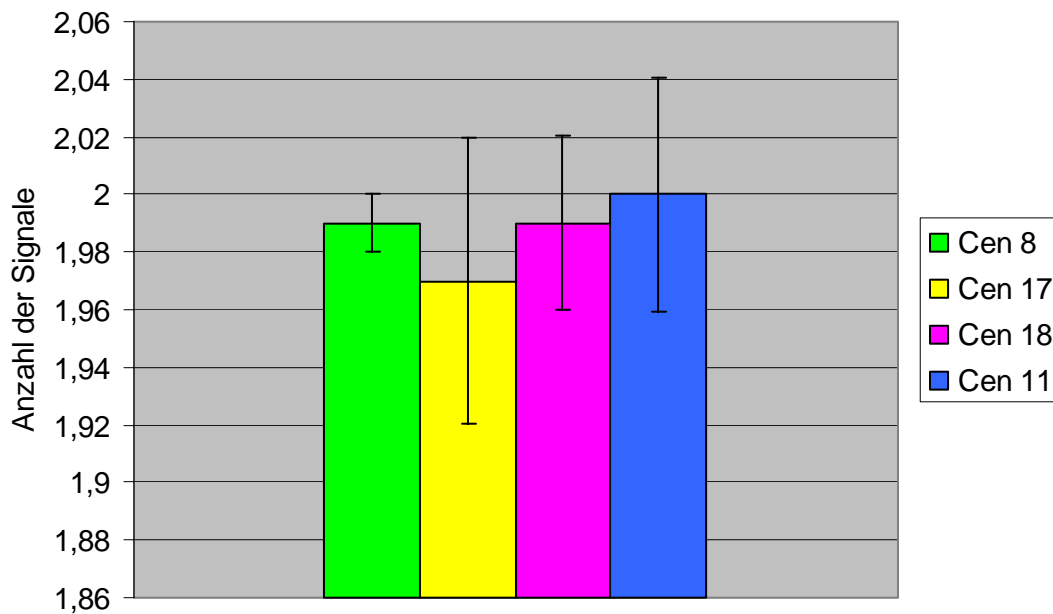


Diagramm 10: Mittelwerte und Standardabweichung der Centromer-Sonden auf 46,XY.

*Cen = Centromer-Sonde.*

Wie aus Tabelle 43 und Diagramm 10 ersichtlich ist, liegen die Mittelwerte zwischen 1,97 (Centromer 17) und 2,00 (Centromer 11), die Varianz liegt zwischen 0,01 (Centromer 8) und 0,05 (Centromer 17). Die P-Werte liegen unter 0,001 zeigen somit statistische Signifikanz (ohne Abbildung).

### 3.2.3.2 Hybridisierung der Centromer-Sonden auf Gewebeschnitte

Um die Gewebedicke von 10  $\mu\text{m}$  zu beurteilen, wurde obiger Centromer-Mix auf Gewebeschnitte von TJ hybridisiert und 100 Zellkerne aus einem Areal mit normalem Gewebe ausgezählt. Parallel hierzu und als Kontrolle wurden weitere 100 Zellkerne aus einem Areal mit Tumorgewebe aus demselben Schnitt ausgewertet.

Tabelle 44 und Diagramm 11 zeigt das Ergebnis von je 100 ausgezählten Zellkernen von Tumor-/ und Normalgewebe (ohne Abbildung):

TJ 10 µm Normalgewebe						
Signale						
Centromer	0	1	2	3	4	
8 FITC	1	8	90	1	0	
17 Cy3	0	9	90	1	0	
18 Cy3.5	0	7	90	3	0	
11 Cy5	1	9	87	2	1	

TJ 10 µm Tumorgewebe						
Signale						
Centromer	0	1	2	3	4	
8 FITC	1	12	81	3	3	
17 Cy3	0	20	74	3	3	
18 Cy3.5	2	8	85	2	3	
11 Cy5	6	16	73	2	3	

Tabelle 44: Hybridisierungs-Ergebnisse von Normal-/ und Tumoreal von TJ.  
Die hellgrau unterlegten Felder zeigen das erwartete Ergebnis von je 2 Signalen.

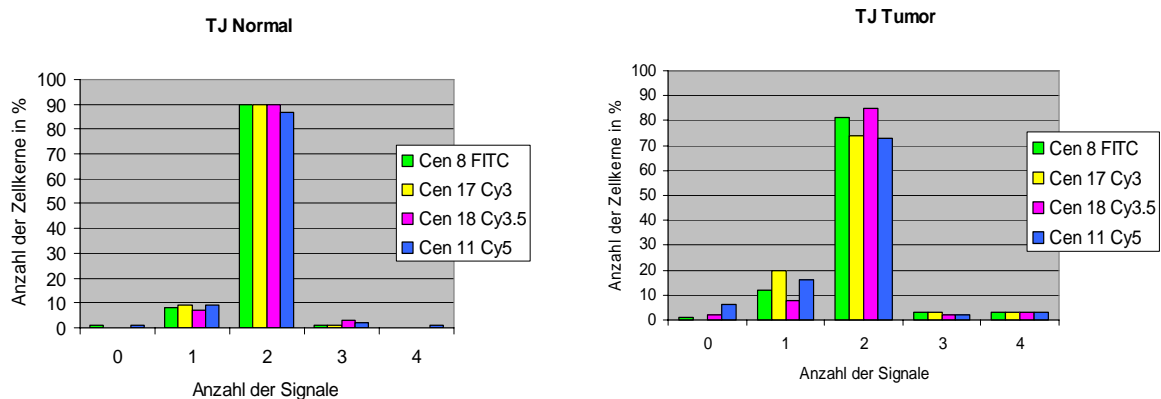


Diagramm 11: Ergebnis der Centromer-Hybridisierung auf 100 Zellkernen aus Normalgewebe und auf Tumorgewebe von TJ.

Das Normalgewebe zeigt bei je 90% beziehungsweise bei 87% für Centromer 11 (Cy5) 2 Signale, was bezüglich einer Hybridisierung auf Schnitten einem ausreichenden Hybridisierungsergebnis spricht (persönliche Rücksprache mit Christine Maierhofer) Auf Grund dieses Resultates kann man davon ausgehen, dass 10 µm Schnittdicke ausreichen, um den Hauptteil der Zellkerne im Ganzen zu erfassen.

Das Tumorgewebe zeigt ebenfalls eine Hauptverteilung bei zwei Signalen. Das Ergebnis liegt mit 73 – 85% unter dem Ergebnis des Normalgewebes. Dieses Ergebnis ist zu erwarten, da ja Neuroblastome zahlreiche strukturelle wie numerische Veränderungen aufweisen.

## Statistische Auswertung

Für jede Sonde wurde über einen „2 Stichproben t-Test“ unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen (Welch-Test) Mittelwert, Standardabweichung und P-Wert ermittelt, bezogen auf die Gesamtzahl der ausgewerteten Zellkerne (siehe Kapitel 2.2.8.2).

Die folgende Tabelle und das folgende Diagramm gibt die Berechnung der Mittelwerte und der Standardabweichung der Centromer-Sonden auf Tumor-/ normalem Areal von TJ an.

TJ 10 µm Normalgewebe				TJ 10 µm Tumorgewebe			
Centromer-Sonde		Mittelwert	Standard-Abweichung	Centromer-Sonde		Mittelwert	Standard-Abweichung
8 FITC		1,91	0,12	8 FITC		1,95	0,31
17 Cy3		1,93	0,10	17 Cy3		1,89	0,34
18 Cy3.5		1,96	0,10	18 Cy3.5		1,96	0,30

Tabelle 45: Mittelwerte und Standardabweichungen der Hybridisierung von Centromer-Sonden auf Normal-/ und Tumorgewebe von TJ.

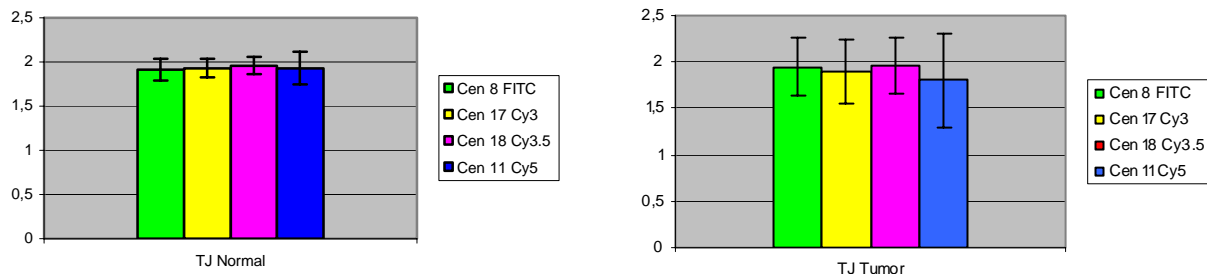


Diagramm 12: Schematische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Hybridisierung von Centromer-Sonden auf Normal- und Tumorgewebe von TJ.

Cen = Centromer-Sonde.

Wie aus obiger Tabelle und Diagramm ersichtlich wird, liegen für das Normalgewebe die Mittelwerte zwischen 1,91 (Centromer 8) und 1,96 (Centromer 18). Die Berechnung der Standardabweichungen ergaben Werte zwischen 0,10 (Centromer 17 und 18) und 0,19 (Centromer 11). Diese Werte zeigen eine Annäherung an zwei Signale mit relativ hoher genomischer Stabilität, wie es auch für Normalgewebe zu erwarten ist.



Beim Tumorgewebe liegen die Mittelwerte zwischen 1,80 (Centromer 11) und 1,95 (Centromer 8). Die Standardabweichungen ergaben Werte zwischen 0,31 (Centromer 8) und 0,50 (Centromer 11) und sind im Vergleich zu den Standardabweichungen des Normalgewebes höher. Dies korreliert mit den erwarteten Werten für ein Tumorgewebe, da ja hier von einer höheren genomischen Stabilität ausgegangen wird. Die P-Werte liegen unter 0,001 zeigen somit statistische Signifikanz (ohne Abbildung).

Das Ergebnis zeigt außerdem, dass das Gewebe tatsächlich in Normal-/ und Tumoreareale differenziert werden kann.

### 3.2.3.3 Ermittlung der Zellkerndicke mittels 3D-Rekonstruktion

Zur Bestimmung der Zellkerndicke eignet sich außerdem eine 3D-Rekonstruktion der Zellkerne, die nach einer Dekonvolution der Gewebeschnitte durchgeführt werden kann: mit Hilfe der 3D-Rekonstruktion ist es möglich, einen in der Software integrierten Maßstab mit Größenangaben einzublenden.

In der folgenden Abbildung ist ein 3D-rekonstruiertes Areal aus Tumorzellkernen (A) und normalen Zellkernen (B) nach einer Dekonvolution zu sehen.

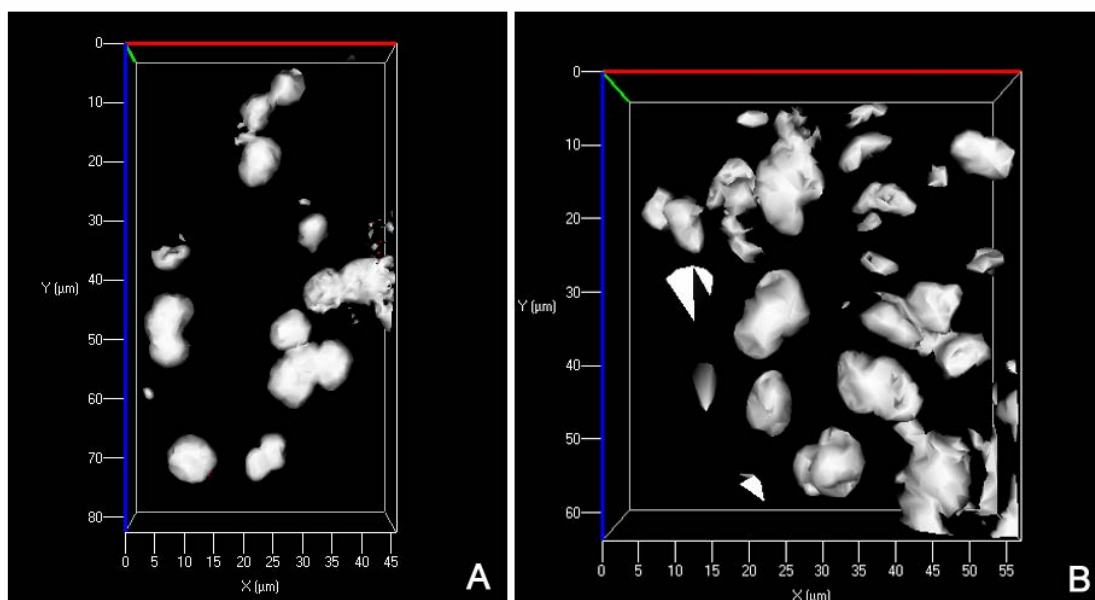


Abbildung 32: 3D-Rekonstruktion: Darstellung „Surface“. Einblendung eines Maßstabes zur ungefähren Größenbestimmung. A) Zellkerne aus Tumor-Areal, B) Normale Zellkerne.

Der eingeblendete Maßstab sowie das Ergebnis der 100 ausgezählten normalen/ und Tumor-Zellkerne zeigt, dass die Zellkerne eine Größe unter 10 µm haben (siehe Abbildung 32). Somit ist eine Dicke von 10 µm ausreichend, um eine Analyse von vollständigen (nicht angeschnittenen Zellkernen) durchführen zu können

### 3.2.4 Hybridisierung von einfach markierten BACs und YACs auf 46,XY Lymphozyten: Berechnung der Hybridisierungs-Effizienz

Der Einsatz von kombinatorisch markierten BACs und YACs hatte eine Hybridisierung mit relativ hohem Hintergrundrauschen zur Folge. Erfahrungsgemäß hat sich gezeigt, dass bei einer Erhöhung der Probenkomplexität vor allem bei Gewebeschnitten dieses Hintergrundrauschen noch verstärkt wird. Aus diesem Grund wurden aus oben beschriebenem Pool folgende für die Analyse von Neuroblastom-Schnitten relevante Sonden ausgewählt, wobei diese Sonden eine wichtige Rolle bei der Erfassung des Stadiums und der Auswahl der Therapie spielen.

Sonde	Markierung
1p36	FITC
17q25	Cy3
2p24 (MYCN)	Cy3.5
11q23	Cy5

*Tabelle 46: Pool für die Hybridisierung auf Gewebeschnitte.*

Bei diesem Mix – im Folgenden Nb-Pool – wurde darauf geachtet, dass die Sonden mit Fluorochromen/ Haptenen markiert sind, die entweder direkt nachzuweisen sind oder höchstens eine Antikörperschicht benötigen. Experimente haben ergeben, dass jede weitere Antikörperschicht und die damit verbundenen Wasch-Schritte, wie sie zum Beispiel zum Nachweis von DNP nötig wären, die Signalintensität durch gleichzeitige Erhöhung des Hintergrundes verringern.

Um die Hybridisierungs-Effizienz zu beurteilen, wurde dieser Mix zunächst auf Lymphozyten (46,XY) hybridisiert, um dann insgesamt 100 Zellkerne auszuwerten.

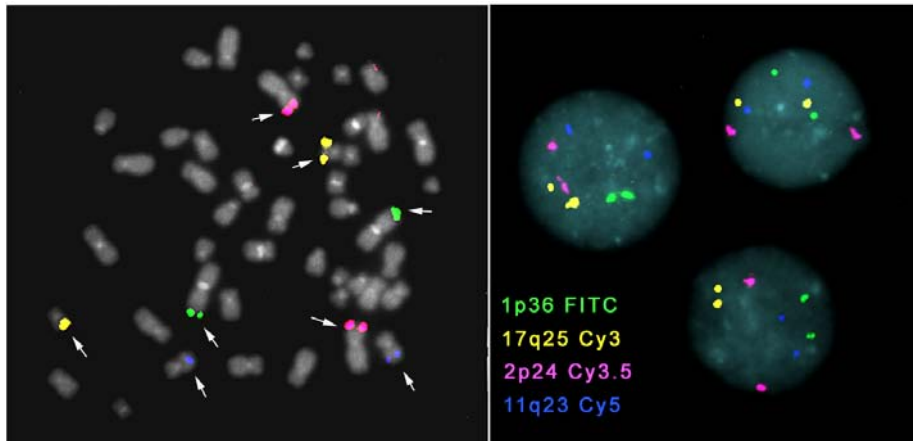


Abbildung 33: Einfach markierter Nb-Pool auf 46,XY Lymphozyten. Die Farben der angegebenen Sonden im rechten Bild entsprechen den Farben der Signale.

Die nachfolgende Tabelle und das Diagramm listet das Ergebnis der Auswertung auf.

46,XY Nb-Pool	Sonde	Signale (in %)		
		<2	2	>2
	1p36 FITC	2	97	1
	17q25 Cy3	3	97	0
	2p24 Cy3.5	0	96	4

Tabelle 47: Hybridisierungs-Effizienz bei 46,XY. In der Tabelle sind die erwarteten 2 Signale hellgrau unterlegt; die Farben vor der Tabelle entsprechen den Farben im Diagramm.

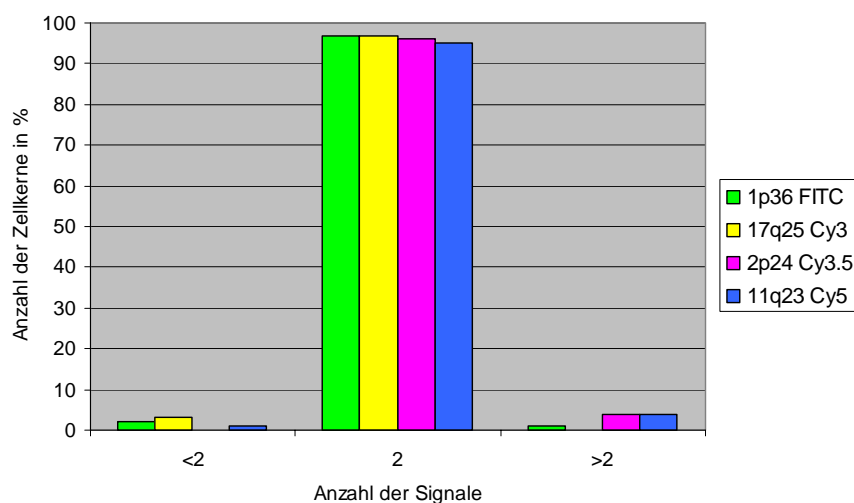


Diagramm 13: Hybridisierungs-Effizienz des Nb-Pools bei 100 ausgewerteten Zellkernen (46,XY).

Das Ergebnis zeigt eine Hybridisierungs-Effizienz bei 100 ausgewerteten Zellkernen (46,XY) von 97% bei 1p36 (FITC) und 17q25 (Cy3), 96% bei 2p24 (Cy3.5) und 95% bei 11q23 (Cy5). Das bedeutet, dass in mehr als 95 von 100 Zellkernen je zwei Signale pro Sonde gezählt wurden. Das Ergebnis zeigt eine sehr gute Hybridisierungs-Effizienz und ist im Folgenden für die Hybridisierung auf Schnitten einsetzbar.

### Statistische Auswertung

Für jede Sonde wurde über einen „2 Stichproben t-Test“ unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen (Welch-Test) Mittelwert, Standardabweichung und P-Wert ermittelt, bezogen auf die Gesamtzahl der ausgewerteten Zellkerne (siehe Kapitel 2.2.8.2).

Die folgende Tabelle gibt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Sonden des Nb-Pools auf 46,XY an.

46,XY Nb-Pool	Sonde	Mittelwert	Standardabweichung
	1p36 FITC	1,99	0,03
	17q25 Cy3	1,97	0,03
	2p24 Cy3.5	2,04	0,04
	11q23 Cy5	2,02	0,08

Tabelle 48: Mittelwerte und Standardabweichung der Sonden des Nb-Pools auf 46,XY  
Die Farben vor der Tabelle entsprechen den Farben im Diagramm.

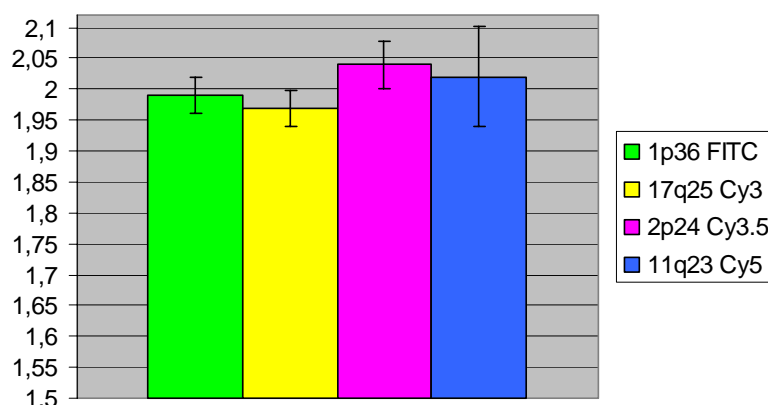


Diagramm 14: Mittelwerte und Standardabweichung der Sonden des Nb-Pools auf 46,XY.

Die Mittelwerte (t-Terst) liegen für den verwendeten Nb-Pool für jede Sonde nahezu bei 2, die Werte für die Standardabweichungen liegen zwischen 0.03 (1p36 FITC) und 0.08 (11q23 Cy5) und sind damit erwartungsgemäß niedrig. Daraus lässt sich eine sehr hohe Hybridisierungseffizienz schließen, die von den erwarteten 2 Signalen je Sonde kaum abweicht. Die P-Werte liegen unter 0,001 und zeigen somit statistische Signifikanz (ohne Abbildung).

### **3.2.5 Gewebeschnitte von Patientin TJ**

#### **3.2.5.1 Klinik**

Bei TJ handelt es sich um eine Patientin mit einem Neuroblastom in INSS Stadium 4 histologischer Hughes Grad 2. Das Knochenmark war befallen. In der molekulargenetischen Routinediagnostik wurde eine MYCN-Amplifikation mittels Southern Blot nachgewiesen; ein LOH von 1p wurde nicht untersucht.

#### **3.2.5.2 Allgemeines**

Die Gewebeschnitte von Patientin TJ beinhalteten abgegrenzte Areale mit Normalbeziehungsweise Tumorgewebe. Dies hat den Vorteil, dass beide Areale bezüglich Veränderungen miteinander verglichen werden konnten.

Mit einem Epifluoreszenz-Mikroskop wurden je 100 Zellkerne aus einem Areal mit normalen Zellen und einem Areal mit Tumorzellen in dreidimensionalen Bildstapeln aufgenommen, einer Dekonvolution unterzogen und ausgewertet. Hierbei wurde jeder Zellkern einzeln ausgezählt, um auch eine mögliche Beziehung der veränderten Bereiche zueinander bestimmen zu können.

Um einen Einblick in die Effektivität einer Dekonvolution zu geben, sind in der folgenden Abbildung Zellkerne nach der Aufnahme ohne Dekonvolution und mit Dekonvolution gezeigt. Die hier abgebildeten Zellkerne stammen aus einem Tumorareal.

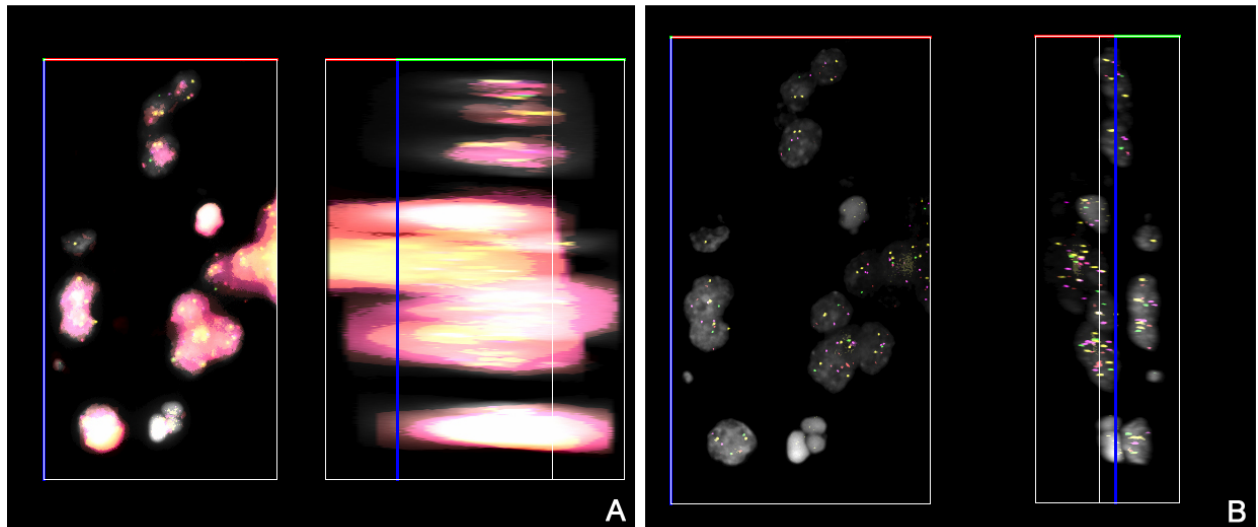


Abbildung 34: Zellkerne aus einem Schnitt von TJ A) vor und B) nach der Dekonvolution.

Achsen: rot: X, blau: Y, grün: Z. Drehung in Y-Richtung.

Die nächsten drei Abbildungen zeigen jeweils dieselben Zellkerne nach der Dekonvolution und 3D-Bildbearbeitung in verschiedenen Darstellungsarten. Die Zellkerne wurden in Y-Richtung gedreht. Die Farben an den Achsen geben die unterschiedlichen Richtungen an: die X-Achse ist rot, die Y-Achse blau und die Z-Richtung ist grün gefärbt.

Abbildung 35 zeigt die Zellkerne in verschiedenen Richtungen in der Darstellung „Surface“, das heißt es werden die Zellkerne in ihrer berechneten Oberfläche dargestellt.

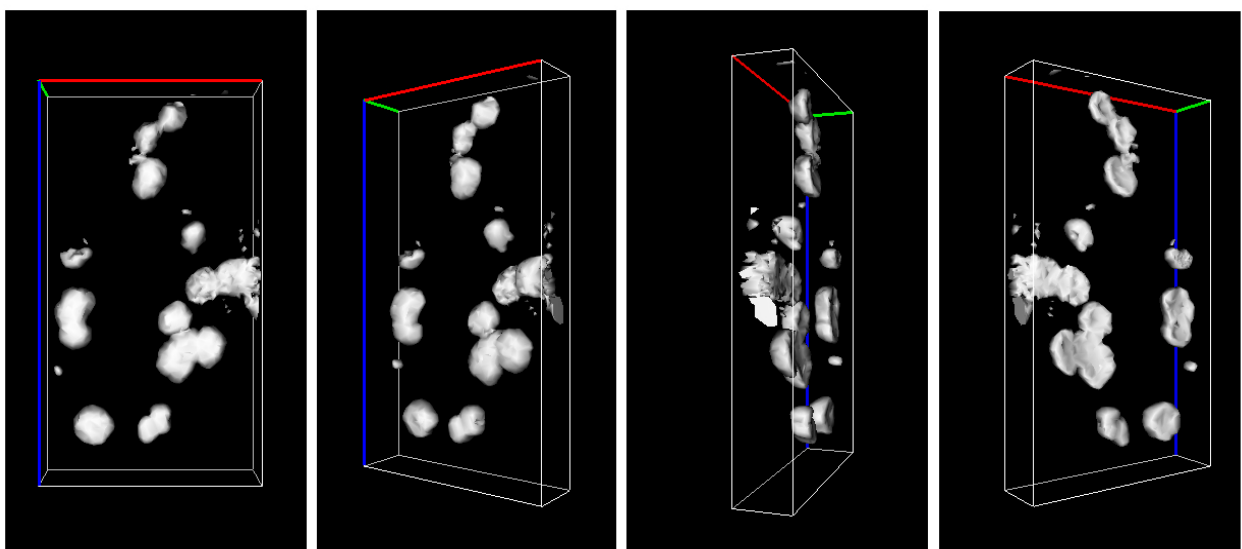


Abbildung 35: Zellkerne von Schnitt der Patientin TJ mit der Darstellungsform „Surface“ nach der 3D-Rekonstruktion. Die Zellkerne stammen aus einem Tumorareal.

Abbildung 36 zeigt dieselben Zellkerne in der Darstellung „Maximum“ in allen Kanälen DAPI, FITC (1p36, grün), Cy3 (17q25, gelb), Cy3.5 (2p24, rot) und Cy5 (11q23, hellblau).

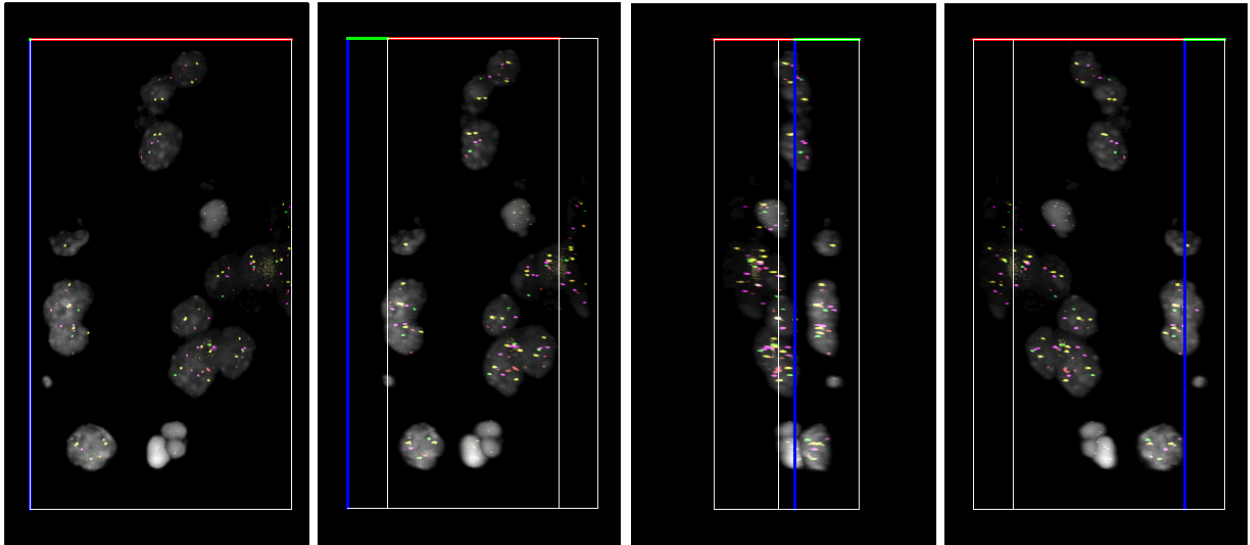


Abbildung 36: Zellkerne aus Abbildung 35 mit der Darstellungsform „Maximum“ nach der 3D-Rekonstruktion. Die Zellkerne wurden in Y-Richtung gedreht.

Abbildung 37 zeigt die Darstellung „Maximum“ ohne DAPI. Die Signale könnte bei Druckgebung etwas schwach zu sehen ein.

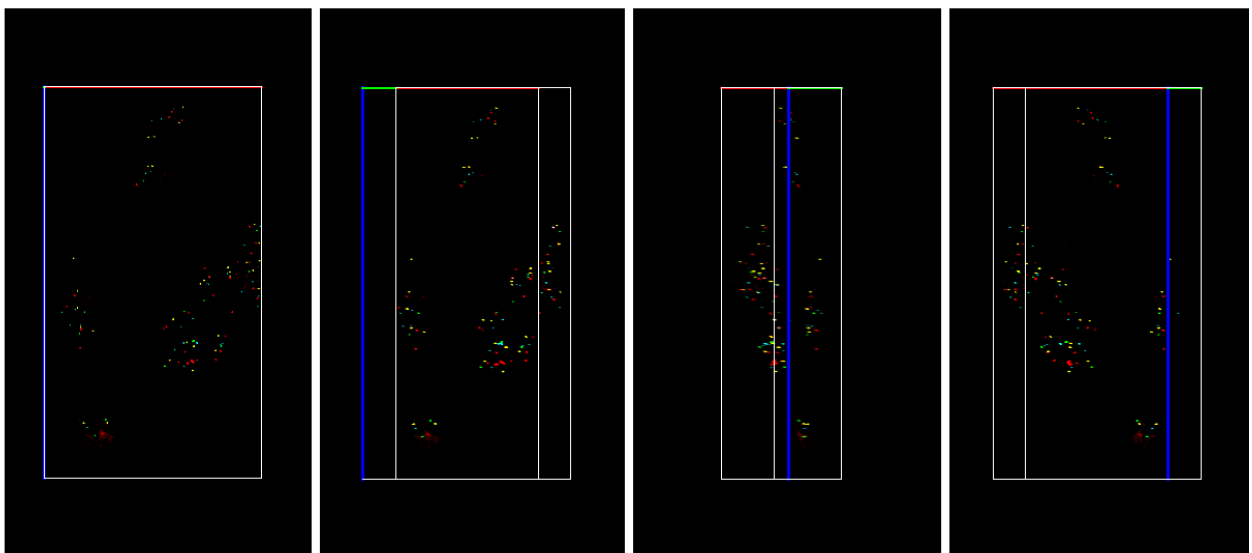


Abbildung 37: Zellkerne aus Abbildung 35 mit der Darstellungsform „Maximum“ nach der 3D-Rekonstruktion. Die Zellkerne wurden in Y-Richtung gedreht. Darstellung in den Kanälen FITC (grün), Cy3 (gelb), Cy3.5 (rot) und Cy5 (hellblau).

Die 3D-Rekonstruktion hat den Vorteil, dass die Zellkerne in verschiedenen Darstellungsformen gezeigt und die Zellkerne in verschiedene Richtungen (X, Y und Z) gedreht werden können, um sie von allen Seiten zu betrachten.

### 3.2.5.3 Ergebnisse der Analyse des normalen Gewebes

#### Allgemeine Auswertung

Die folgende Tabelle zeigt das Ergebnis der Auszählung des Areals mit Normalgewebe.

TJ Normal	Sonde	Signale			
		Anzahl der Zellkerne in %			
		0	1	2	3
	1p36 FITC	2	9	88	1
	17q25 Cy3	0	5	92	3
	2p24 Cy3.5	-	-	-	-
	11q23 Cy5	0	7	93	0

Tabelle 49: Ergebnis der Auswertung von 100 Zellkernen aus Normalgewebe von TJ.  
Die hellgrau unterlegten Felder zeigen die Haupt-Prozentzahl der gefundenen Signale an.

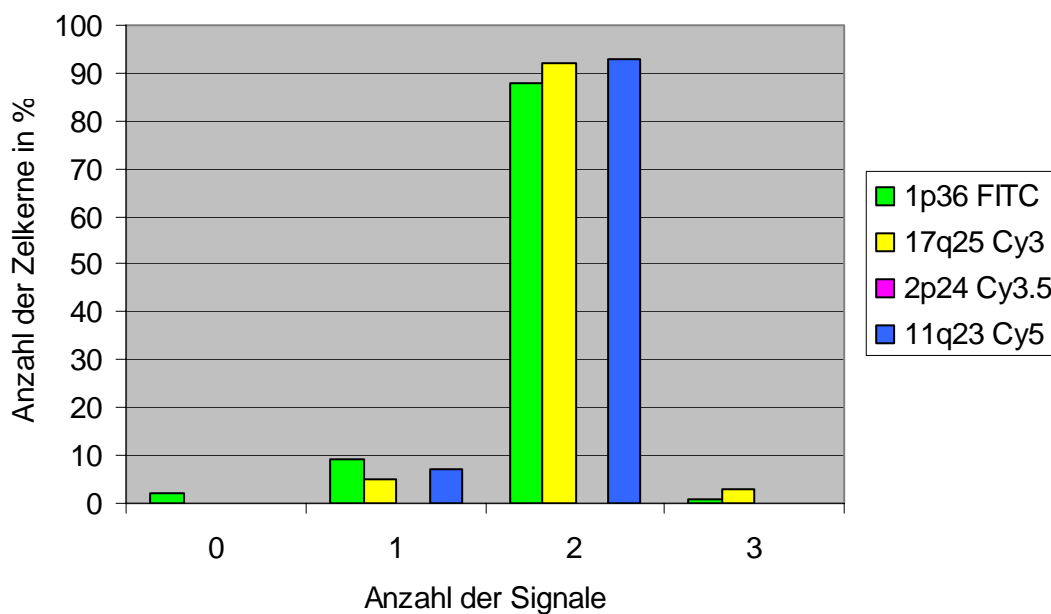


Diagramm 15: Darstellung der Auszählung von 100 Zellkernen aus Normalgewebe von TJ.



Die Auswertung der normalen Zellen war vor allem im Cy3.5 Kanal nicht einfach. In diesem Kanal war der Hintergrund so störend, dass oftmals nicht von einem tatsächlichen Signal unterschieden werden konnte. Deshalb musste auf eine Auszählung der Sonde 2p24 verzichtet werden. Die Sonden 1p36 (FITC), 17q25 (Cy3) und 11q23 (Cy5) haben bei 100 Zellkernen in 98%, 92% und 93% jeweils zwei Signale ergeben.

Das sehr homogene Ergebnis bedeutet zum einen, dass man im Vergleich zu der Auswertung des Tumor-Areals (siehe unten) mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgehen kann, dass es sich bei dem analysierten Areal um Normalgewebe handelt. Zum anderen bedeutet dieses Ergebnis, dass im Normalgewebe keine signifikante Veränderung gefunden werden konnte, die Hinweis auf eine mögliche folgende Entartung geben könnte.

### Statistische Auswertung

Für jede Sonde wurde über einen „2 Stichproben t-Test“ unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen (Welch-Test) Mittelwert, Standardabweichung und P-Wert ermittelt, bezogen auf die Gesamtzahl der ausgewerteten Zellkerne (siehe Kapitel 2.2.8.2).

Die folgende Tabelle gibt die Mittelwerte und Standardabweichungen des Normalgewebes von TJ an.

TJ Normal	Sonde	Mittelwert	Standardabweichung
	1p36 FITC	1,88	0,17
	17q25 Cy3	1,98	0,08
	2p24 Cy3.5	-	-
	11q23 Cy5	1,93	0,06

Tabelle 50: Mittelwerte und Standardabweichung der Sonden des Nb-Pools auf Normalgewebe von TJ; die Farben vor der Tabelle entsprechen den Farben im Diagramm.

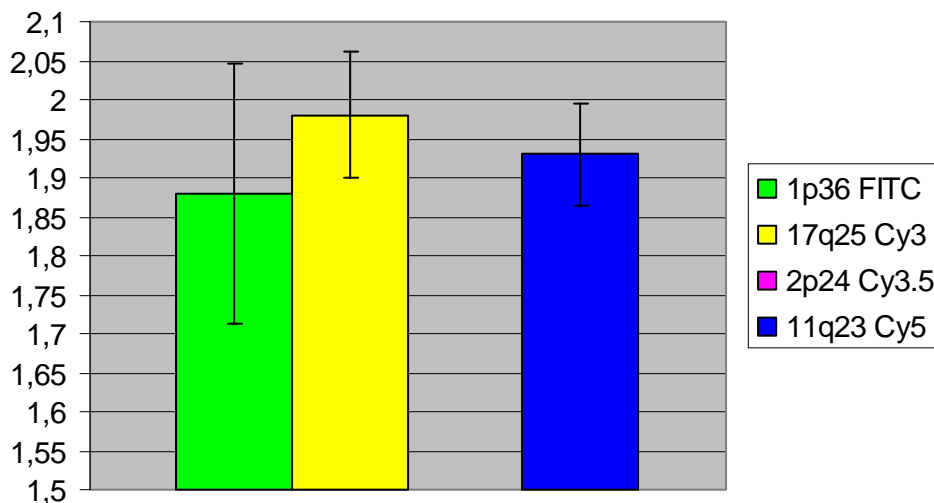


Diagramm 16: Mittelwerte und Standardabweichung des Nb-Pools auf Normalgewebe von TJ.

Die Mittelwerte (t-Test) liegen für den verwendeten Nb-Pool knapp unter 2. Die Werte für die Standardabweichungen liegen zwischen 0.06 (11q23) und 0.17 (1p36) und sind damit erwartungsgemäß relativ gering. Die P-Werte liegen unter 0,001 zeigen somit statistische Signifikanz (ohne Abbildung).

### 3.2.5.4 Ergebnisse der Analyse des Tumorgewebes

#### Allgemeine Auswertung

In der nächsten Tabelle ist das Ergebnis der Auszählung des Tumor-Areals zu sehen.

TJ Tumor	Sonde	Signale						
		Anzahl der Zellkerne in %						
		0	1	2	3	4	5	6
	1p36 FITC	4	93	2	1	0	0	0
	17q25 Cy3	6	4	66	20	4	0	0
	2p24 Cy3.5	2	7	24	58	7	1	1

Tabelle 51: Ergebnis der Auszählung von 100 Zellkernen aus einem Tumor-Areal von TJ. Die hellgrau unterlegten Felder zeigen die Haupt-Prozentzahl der gefundenen Signale an; die Farben vor der Tabelle entsprechen den Farben im Diagramm.

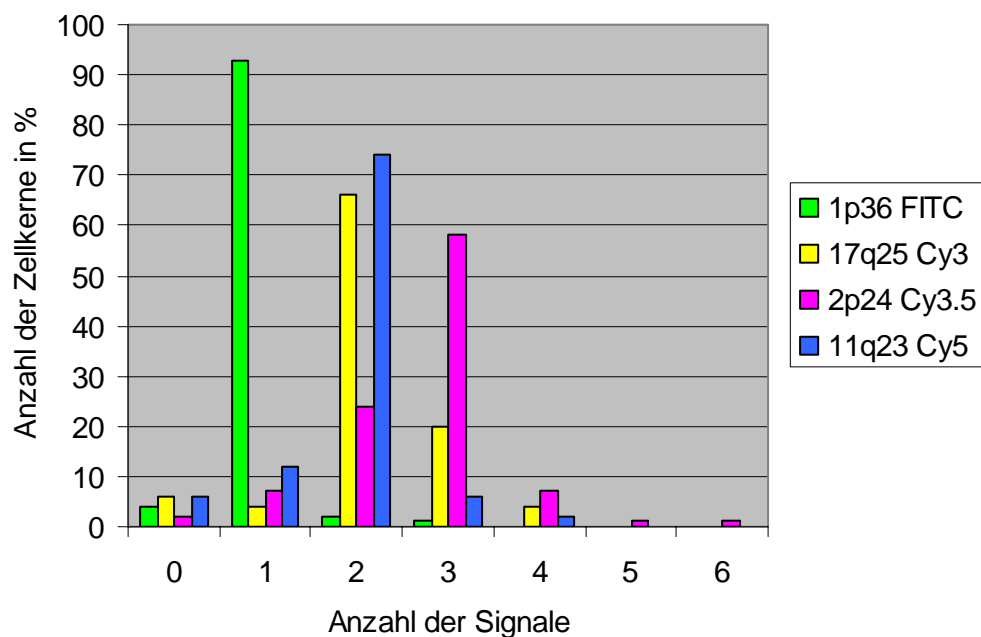


Diagramm 17: Darstellung der Auszählung von 100 Zellkernen aus einem Tumor-Areal von T.J.

Im Vergleich zum Normalgewebe zeigen im Tumor-Areal alle Sonden signifikante Veränderungen: Geht man davon aus, dass es sich bei dem untersuchten Material um einen diploiden Tumor handelt, liegt in 93% bei 1p36 ein LOH vor. In 66% der untersuchten Zellkerne wurden bei 17q25 2 Signale gezählt, in 20 % der Fälle 3 Signale, was eine Amplifikation in einer Subpopulation von Zellen bedeutet. MYCN (2p24) ist bei Annahme eines diploiden Tumors in 58% mit 3 Signalen amplifiziert, in 24% sind 2 Signale zu sehen. Bei 11q23 wurden in 74% je 2 Signale beobachtet und sind somit nicht verändert. In 12% fand sich ein LOH von 11q23.

### Statistische Auswertung

Für jede Sonde wurde über einen „2 Stichproben t-Test“ unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen (Welch-Test) Mittelwert, Standardabweichung und P-Wert ermittelt, bezogen auf die Gesamtzahl der ausgewerteten Zellkerne (siehe Kapitel 2.2.8.2).

Die folgende Tabelle zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen für die einzelnen Sonden des Nb-Pools bei 100 ausgezählten Tumorzellen.

TJ Tumor	Sonde	Mittelwert	Standardabweichung
	1p36 FITC	1,00	0,10
	17q25 Cy3	2,12	0,63
	2p24 Cy3.5	2,68	0,80
	11q23 Cy5	1,86	0,48

Tabelle 52: Mittelwerte und Standardabweichung der Sonden des Nb-Pools auf Tumorgewebe von TJ; die Farben vor der Tabelle entsprechen den Farben im Diagramm.

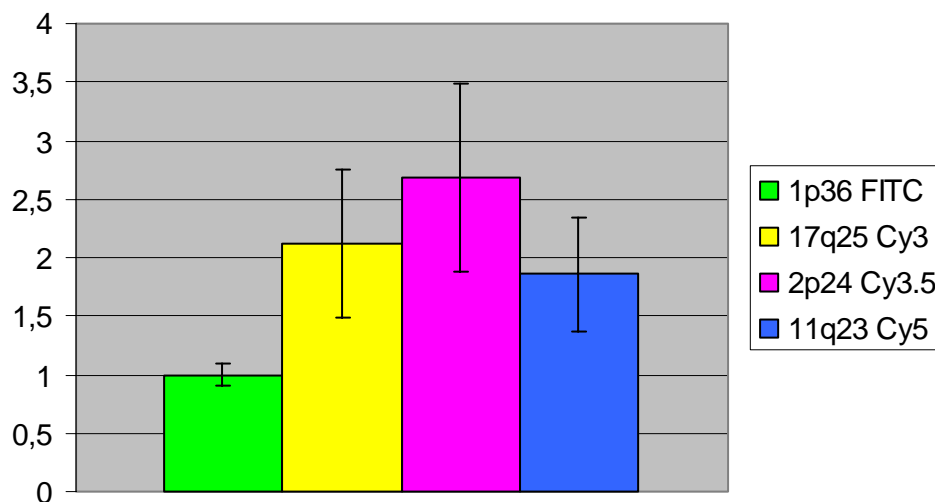


Diagramm 18: Mittelwerte und Standardabweichung der Sonden des Nb-Pools auf Tumorgewebe von TJ.

Die Mittelwerte der einzelnen Sonden des Nb-Pools liegen zwischen 1,00 (1p36) und 2,68 (2p24). Die Werte für die Standardabweichung liegen zwischen 0,1 (1p36) und 0,8 (2p24) und liegen außer bei 1p36 signifikant höher als beim Normalgewebe. Auch dies kann als Hinweis für die Existenz verschiedener Subpopulationen interpretiert werden. Die P-Werte liegen unter 0,001 zeigen somit statistische Signifikanz (ohne Abbildung).

### 3.2.6 Gewebeschnitte von Patientin HV

#### 3.2.6.1 Klinik

Bei HV handelt es sich um eine Patientin mit einem Neuroblastom in INSS Stadium 3, Hughes Grad 2. Der Tumor wurde zunächst bei klinischem Verdacht auf Wilmstumor (MIBG Szintigraphie negativ, Catecholamine negativ) einer präoperativen Chemotherapie (Protokoll SiOP 93-01 der GPOH) unterzogen und erst nach Operation histologisch als Neuroblastom identifiziert. Das Knochenmark war nicht befallen. Die molekulargenetische Routinediagnose ergab eine MYCN-Amplifikation (Southern Blot); ein LOH von 1p wurde nicht untersucht.

#### 3.2.6.2 Allgemeines

Bei diesem Schnitt bestand das Gewebe ausschließlich aus Tumorzellen. Aus diesem Grund war eine vergleichende Analyse zwischen normalen Zellen und veränderten Tumorzellen nicht möglich. Insgesamt wurden mit einem Epifluoreszenz-Mikroskop 100 Zellkerne in verschiedenen fokalen Ebenen aufgenommen, mit Dekonvolution prozessiert und analysiert. Die folgenden Abbildungen zeigen Zellkerne aus diesem Schnitt in der Darstellung „Maximum“, in der alle Kanäle (1p36 FITC (grün), 17q25 Cy3 (gelb), 2p24 Cy3.5 (rot), 11q23 Cy5 (pink)) zugleich dargestellt werden; Abbildung 38 mit DAPI, Abbildung 39 ohne DAPI. Die Abbildungen wurden in Y-Richtung gedreht, um einen Einblick der Sonden in verschiedene Richtungen zu vermitteln. Rote Achse: X, Blaue Achse: Y, Grüne Achse: Z-Richtung.

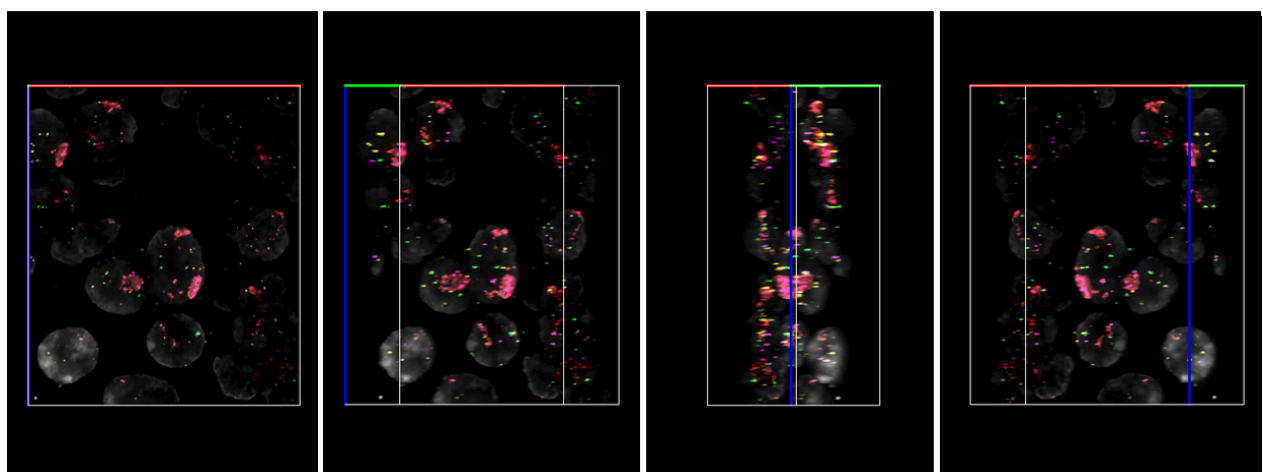


Abbildung 38: Zellkerne mit der Darstellungsform „Maximum“ nach der 3D-Rekonstruktion. Die Zellkerne wurden in Y-Richtung gedreht. Darstellung in den Kanälen DAPI (grau unterlegt Zellkerne).

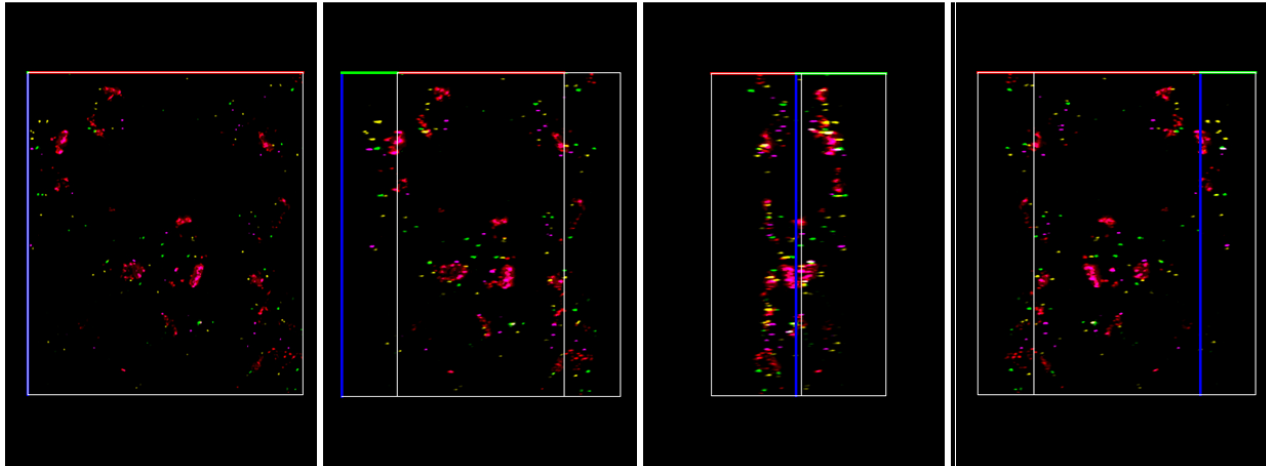


Abbildung 39: Zellkerne mit der Darstellungsform „Maximum“ nach der 3D-Rekonstruktion. Die Zellkerne wurden in Y-Richtung gedreht.

Bei der Analyse dieses Gewebeschnittes fiel auf, dass in den meisten Zellkernen große Signalblöcke im Cy3.5-Kanal vorhanden waren, bei denen es sich wahrscheinlich um HSR-Amplifikationen handelt. In den Abbildungen 38 und 39 sind die zahlreichen HSR-Amplifikationen (rot) gut zu erkennen.

Die folgenden zwei Abbildungen zeigen einen einzelnen Zellkern von verschiedenen Seiten, gedreht in Y-Richtung. Die Darstellung „Surface“ (Abbildung 40) zeigt den Zellkern mit der rekonstruierten Zellkern-Oberfläche.

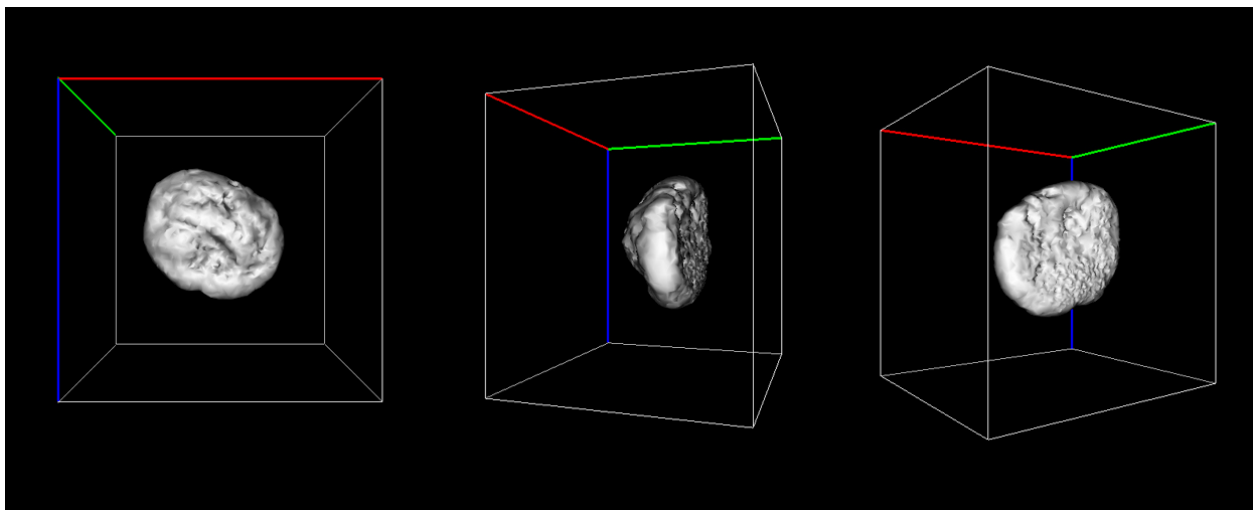


Abbildung 40: Einzelner Zellkern in der Darstellung „Surface“ nach der 3D-Rekonstruktion. Diese Darstellungsform gibt die mögliche ursprüngliche Oberfläche des Zellkerns wieder.

Die einzelnen Sonden sind in der folgenden Darstellung „Maximum“ gut zu erkennen. Deutlich zu sehen ist der große rote Bereich (HSR-Amplifikation) und die vielen gelben Signale (17q25-Amplifikationen).

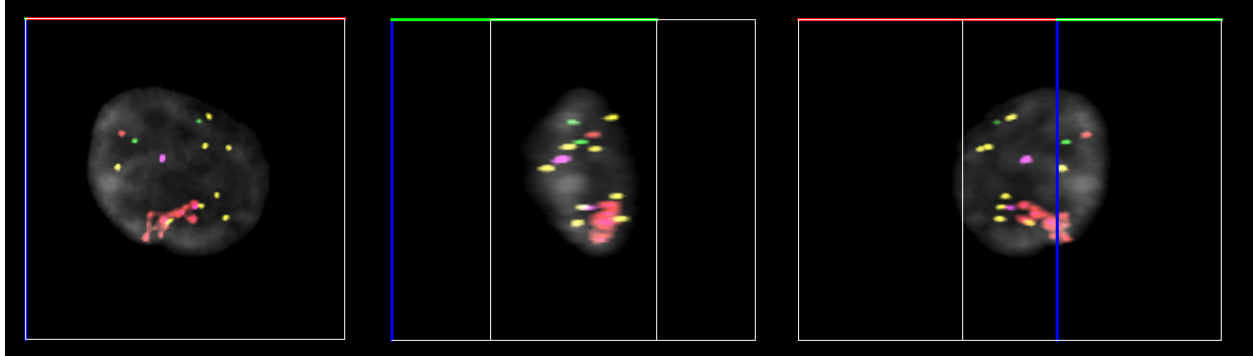


Abbildung 41: Zellkern aus Abbildung 40 in der Darstellung „Maximum“, die die einzelnen Kanäle DAPI (grau unterlegter transparenter Zellkern), FITC (1p36, grün), Cy3.5 (17q25, gelb), Cy3.5 (MYCN 2p24, rot) und Cy5 (11q23, pink) wiedergibt.

Die folgende Abbildung zeigt denselben Zellkern im Vergleich „Maximum“ und „Surface“, also DAPI-Maske mit Sonden und Oberflächenstruktur.

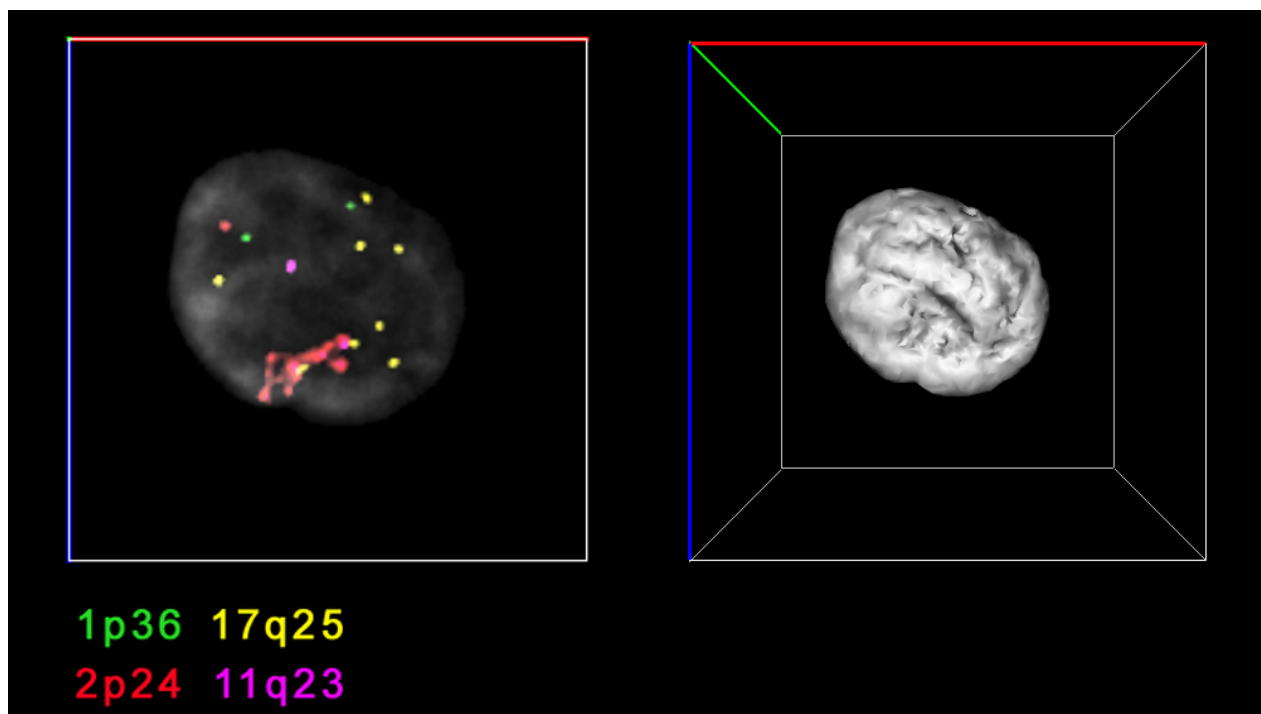


Abbildung 42: Darstellungsformen „Maximum“ und „Surface“ im Vergleich. Die Farben der angegebenen Chromosomen im Bild links unten repräsentieren die Farben der Sonden im Zellkern.

### 3.2.6.3 Ergebnisse der Analyse des Tumorgewebes

#### Allgemeine Auswertung

Wie bereits beschrieben, zeigte der Gewebeschnitt zahlreiche HSR-Amplifikationen (Cy3.5-Kanal). Außerhalb der Amplifikationen wurden zusätzlich 0 bis 3 Signale im gleichen Kanal gezählt (siehe folgende Tabelle).

Folgende Tabelle und Diagramm zeigen das Ergebnis der Analyse von 100 Zellkernen.

HV Tumor	Sonde	Signale										
		Anzahl der Zellkerne in %										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	12
	1p36 FITC	0	19	65	16	0	0	0	0	0	0	0
	17q25 Cy3	0	1	6	9	22	27	24	4	5	1	1
	2p24 HSR Cy3.5	5	55	36	4	0	0	0	0	0	0	0
	2p24 Signale Cy3.5	13	42	30	11	4	0	0	0	0	0	0

Tabelle 53: Ergebnis der Auszählung von 100 Zellkernen aus einem Tumor-Areal von HV. Die hellgrau unterlegten Felder zeigen die Haupt-Prozentzahl der gefundenen Signale an.

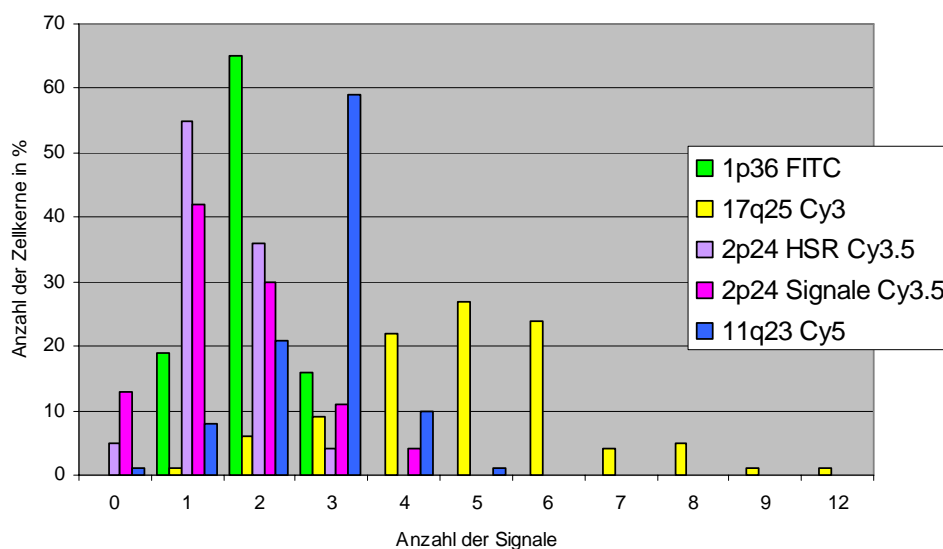


Tabelle 54: Schematische Darstellung Auszählung von 100 Zellkernen aus einem Tumor-Areal von HV.



Das Ergebnis zeigt in 65% 2 Signale von 1p36, in insgesamt 90% eine Amplifikation von 17q25 (4-12 Signale zusammengerechnet), im Cy3.5 Kanal HSR-Amplifikationen von MYCN, nämlich in 55% 1 HSR und 36% 2 HSR Amplifikationen von 2p24, wobei in insgesamt 87% zusätzliche Einzelsignale von 2p24 beobachtet wurden (in 4% 4 Signale, in 11% 3 Signale, in 30% 2 Signale und in 42% 1 zusätzliches Signal). In 59% wurden für 11q23 3 Signale gezählt. In Zellkernen mit HSRs wurden also auch für die anderen Signale stets Verluste und Gewinne entsprechender Regionen beobachtet.

### Statistische Auswertung

Für jede Sonde wurde über einen „2 Stichproben t-Test“ unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen (Welch-Test) Mittelwert, Standardabweichung und P-Wert ermittelt, bezogen auf die Gesamtzahl der ausgewerteten Zellkerne (siehe Kapitel 2.2.8.2). Die folgende Tabelle gibt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Sonden des Nb-Pools bei HV an

HV Tumor	Sonde	Mittelwert	Standardabweichung
	1p36 FITC	1,97	0,37
	17q25 Cy3	4,96	2,80
	2p24 Cy3.5 HSR	1,41	4,67
	2p24 Cy3.5 Signale	1,51	0,98
	11q23 Cy5	2,77	0,78

Tabelle 55: Mittelwerte und Standardabweichung der Sonden des Nb-Pools auf einen Gewebeschnitt von HV; die Farben vor der Tabelle entsprechen den Farben im Diagramm.

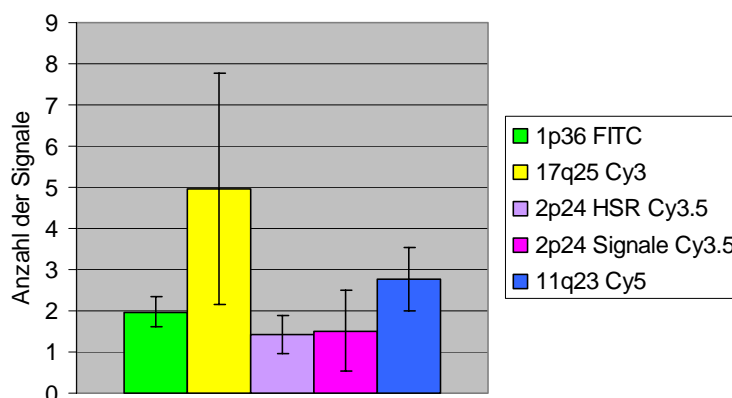


Diagramm 19: Mittelwerte und Standardabweichung der Sonden des Nb-Pools auf einen Gewebeschnitt von HV.

Die Mittelwerte der einzelnen Sonden des Nb-Pools liegen zwischen 1,41 (2p24 HSR) und 2,77 (11q23). Die Werte für die Standardabweichung liegen zwischen 0,37 (1p36) und 4,67 (2p24 HSR) und liegen insgesamt recht hoch im Vergleich zu der Auswertung des Nb-Pools auf 46,XY Lymphozyten, was eine Heterogenität dieses Tumors von Patientin HV zeigt. (siehe unten). Die P-Werte liegen unter 0,001 zeigen somit statistische Signifikanz (ohne Abbildung).

### **3.2.7 Gewebeschnitte des Rezidivs HV-R**

#### **3.2.7.1 Klinik**

Bei HV-R handelt es sich um ein Lokal-Rezidiv des Tumors von HV im Sinne eines Stadiums 3 (Hughes Grad 2) mit einer positiven MYCN-Amplifikation. Ein LOH von 1p wurde nicht untersucht.

#### **3.2.7.2 Allgemeines**

Der Schnitt dieses Rezidiv-Tumors beinhaltet ähnlich wie beim Primärtumor ausschließlich Tumormaterial.

Allerdings fanden sich zwischen den Tumorzellkernen auch Zellkerne, die für die eingesetzten Sonden ein normales Hybridisierungsmuster aufwiesen (siehe unten). Das Verhältnis der Tumorzellkerne zu diesen „nicht veränderten“ Zellkernen wurde auf 85:15 geschätzt (auf Grund der schlechten Darstellungsmöglichkeit der verwendeten Objektive (10x, 20x, 40x und 63x) wird an dieser Stelle auf eine Abbildung verzichtet). Bei diesen Zellkernen könnte es sich um normale Stromazellen (siehe auch Shimada et al. 1999) handeln, worauf in der Diskussion noch näher eingegangen wird. Im Folgenden werden diese „nicht veränderten“ Zellpopulationen auch als „normale“ Zellen bezeichnet.

Sowohl von den Tumorzellkernen als auch von den „normalen“ Zellkernen wurden je 100 in verschiedenen fokalen Ebenen aufgenommen und eine weitere Bearbeitung mittels Dekonvolution und 3D-Rekonstruktion durchgeführt.

Die folgenden drei Abbildungen zeigen Tumorzellkerne in verschiedenen Darstellungsformen und gedreht in Y-Richtung. Abbildung 43 zeigt Zellkerne in der Darstellung „Surface“. Hier wird die Oberfläche der Zellkerne dargestellt.

Die Abbildungen 44 und 45 zeigen dieselben Zellkerne in der Darstellung „Maximum“ in den Kanälen FITC (1p36, grün), Cy3 (17q25, gelb), Cy3.5 (2p24, rot) und Cy5 (11q23, pink) sowie in DAPI in Abbildung 44 (grau unterlegt Zellkerne). Drehung in Y-Richtung; rote Achse: X, Blaue Achse: Y, Grüne Achse: Z.

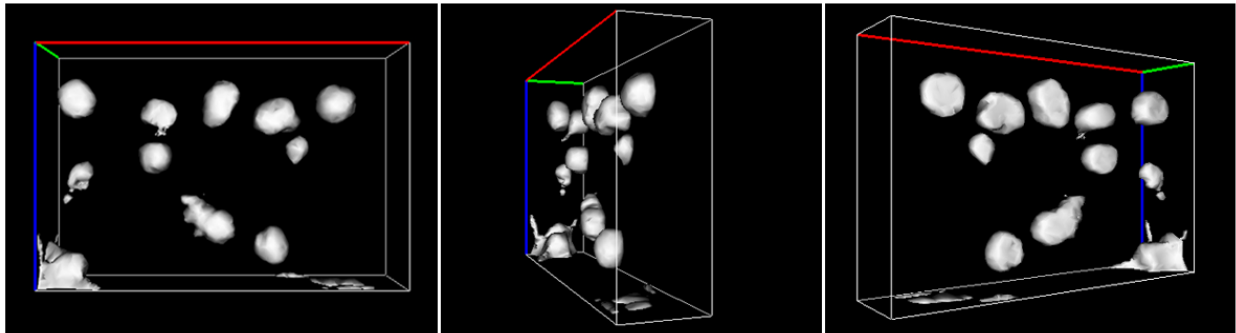


Abbildung 43: Zellkerne von Schnitt HV-R mit der Darstellungsform „Surface“ nach der 3D-Rekonstruktion. Die Zellkerne stammen aus einem Tumorareal.

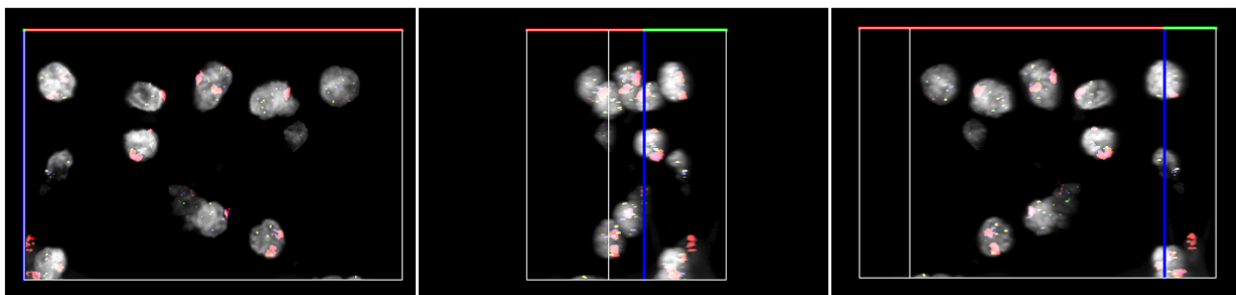


Abbildung 44: Zellkerne aus Abbildung 43 mit der Darstellungsform „Maximum“ nach der 3D-Rekonstruktion.

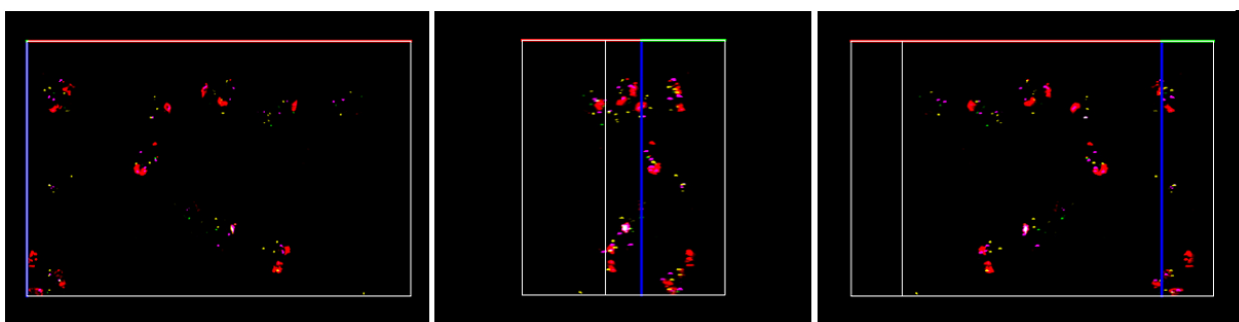


Abbildung 45: Zellkerne aus Abbildung 43 mit der Darstellungsform „Maximum“ nach der 3D-Rekonstruktion. Gut zu sehen sind die HSR-Amplifikationen (rot) von MYCN.

### 3.2.7.3 Ergebnisse der Analyse des Tumorgewebes

#### Allgemeine Auswertung

Auch bei der Analyse dieses Gewebeschnittes fiel auf, dass in den meisten Zellkernen zahlreiche HSR-Amplifikationen im Cy3.5-Kanal vorhanden waren. Außerhalb der Amplifikationen wurden in diesem Kanal zusätzlich 0 - 3 Signale gezählt (siehe folgende Tabelle). In Zellkernen mit HSRs wurden für die anderen Signale auch stets Verluste und Gewinne entsprechender Regionen beobachtet.

Versprengt zwischen den Tumorzellkernen wurden weitere Zellkerne gefunden, die keine Signalblöcke im Cy3.5 Kanal zeigten. Auffällig war hier, dass auch die anderen Signale kaum Veränderungen aufwiesen und es sich somit um die oben angesprochenen „normalen“ Stromazellen handeln könnte.

Die folgende Tabelle und das folgende Diagramm zeigt das Ergebnis der Auswertung von 100 Zellkernen. Hierbei wurde jeder Zellkern einzeln ausgewertet, um auch auf mögliche Verhältnisse der veränderten Sonden zueinander eingehen zu können.

HV-R Rezidiv	Sonde	Signale					
		Anzahl der Zellkerne in %					
		0	1	2	3	4	5
	1p36 FITC	1	10	85	4	0	0
	17q25 Cy3	0	3	4	11	72	10
	2p24 HSR Cy3.5	0	64	35	1	0	0
	2p24 Signale Cy3.5	33	31	28	8	0	0

*Tabelle 56: Ergebnis der Auszählung von 100 Zellkernen aus einem Areal des Rezidivs HV-R. Die hellgrau unterlegten Felder zeigen die Haupt-Prozentzahl der gefundenen Signale an.*

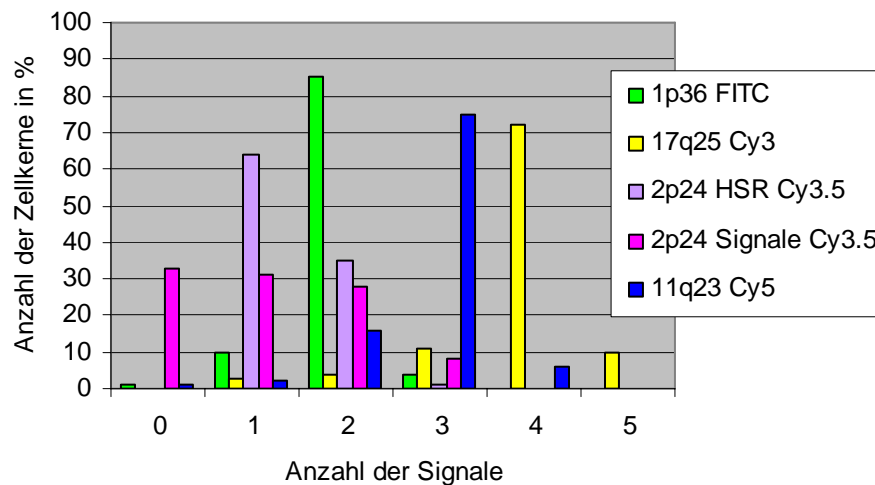


Diagramm 20: Schematische Darstellung der Auszählung von 100 Zellkernen aus einem Areal des Rezidivs HV-R.

### Statistische Auswertung

Für jede Sonde wurde über einen „2 Stichproben t-Test“ unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen (Welch-Test) Mittelwert, Standardabweichung und P-Wert ermittelt, bezogen auf die Gesamtzahl der ausgewerteten Zellkerne (siehe Kapitel 2.2.8.2).

Die folgende Tabelle gibt die Mittelwerte und Standardabweichungen des Rezidivgewebes von HV-R an.

HV-R Rezidiv	Sonde	Mittelwert	Standardabweichung
	1p36 FITC	1,93	0,19
	17q25 Cy3	3,83	0,63
	2p24 HSR Cy3.5	1,38	0,28
	2p24 Signale Cy3.5	1,11	0,93
	11q23 Cy5	2,83	0,36

Tabelle 57: Mittelwerte und Standardabweichung der Sonden des Nb-Pools auf einen Gewebeschnitt von HV-R.

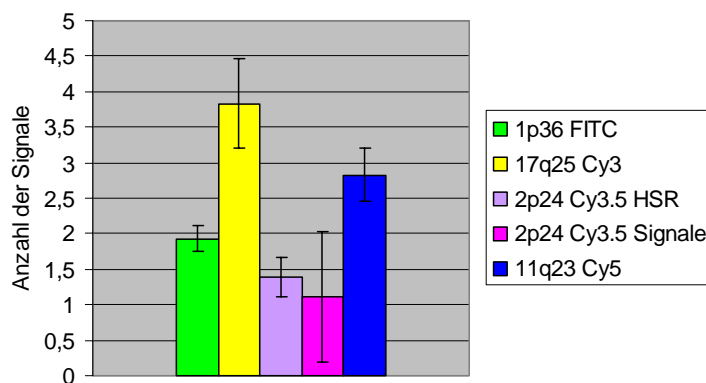


Diagramm 21: Mittelwerte und Standardabweichung der Sonden des Nb-Pools auf einen Gewebeschnitt von HV-R.

Die Mittelwerte der einzelnen Sonden des Nb-Pools liegen zwischen 1,11 (2p24 zusätzliche Signale) und 3,83 (17q25). Die Werte für die Standardabweichung liegen zwischen 0,19 (1p36) und 0,93 (2p24 zusätzliche Signale) und liegen außer bei 1p36 signifikant höher als bei der Auswertung der angenommenen normalen Zellkerne (siehe unten). Die P-Werte liegen unter 0,001 zeigen somit statistische Signifikanz (ohne Abbildung).

### 3.2.7.4 Ergebnisse der Analyse der Zellen mit normalem Hybridisierungsmuster

#### Allgemeine Auswertung

Das Ergebnis der Auszählung von 100 Zellkernen ohne HSR-Amplifikation ist in unten stehender Tabelle und Diagramm aufgeführt.

HV-R „Normal“	Sonde	Signale				
		Anzahl der Zellkerne in %				
		0	1	2	3	4
	1p36 FITC	2	8	90	0	0
	17q25 Cy3	0	9	81	6	4
	2p24 Cy3.5	5	9	77	9	0
	11q23 Cy5	2	11	83	4	0

Tabelle 58: Ergebnis der Auszählung von 100 Zellkernen bei „normalen“ Zellen von HV-R  
Die hellgrau unterlegten Felder zeigen die Haupt-Prozentzahl der gefundenen Signale an; die Farben vor der Tabelle entsprechen den Farben im Diagramm.

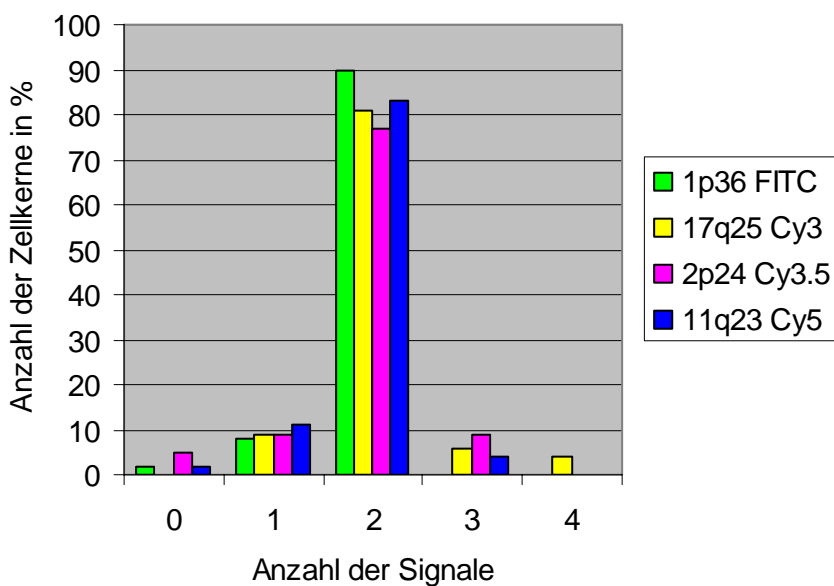


Diagramm 22: Schematische Darstellung der Auszählung von 100 Zellkernen bei „normalen“ Zellen von HV-R.

Wie beschrieben fanden sich neben Zellkernen mit deutlichen HSR-Amplifikationen auch Zellkerne ohne HSRs. Die Zellkerne ohne HSRs zeigen in 77% (2p24) bis 90 % (1p36) je 2 Signale, was der Signalverteilung einer normalen Zelle entspricht. Es gibt nur geringe Abweichungen von diesem Ergebnis (siehe unten). Aus diesem Grund und verglichen mit oben aufgeführten Tumorzellkernen kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei analysierten Zellkernen tatsächlich um normale Zellen handelt (siehe Diskussion).

Die folgenden Abbildungen 46 bis 47 zeigen eine solche angenommene normale Zelle und eine Tumorzelle von Schnitt HV-R im Vergleich. In beiden Abbildungen ist der Zellkern nach der Dekonvolution und 3D-Rekonstruktion dargestellt.

Abbildung 46A zeigt einen angenommenen normalen Zellkern in der Darstellung „Maximum“ mit DAPI als grau hinterlegten Zellkern, 1p36 (grün), 17q25 (gelb), 2p24 (rot) und 11q23 (pink) zu sehen. Jede Sonde zeigt die für normale Zellen erwartete Signalanzahl von 2.

Abbildung 46B stellt denselben Zellkern in „Surface“ als 3D-Rekonstruktion der Zellkern-Oberfläche (ein weiterer Zellkern ist angeschnitten) dar.

Abbildung 47A zeigt zum Vergleich einen Tumor-Zellkern in der Darstellung „Maximum“ mit DAPI als grau hinterlegten Zellkern, 1p36 grün, 17q25 gelb, 2p24 rot und 11q23. Im Gegensatz zum normalen Zellkern ist hier die HSR-Amplifikation im Cy3.5 Kanal (rot) deutlich zu sehen. In Abbildung 47B wird derselbe Tumorzellkern in der Darstellung „Surface“ dargestellt.

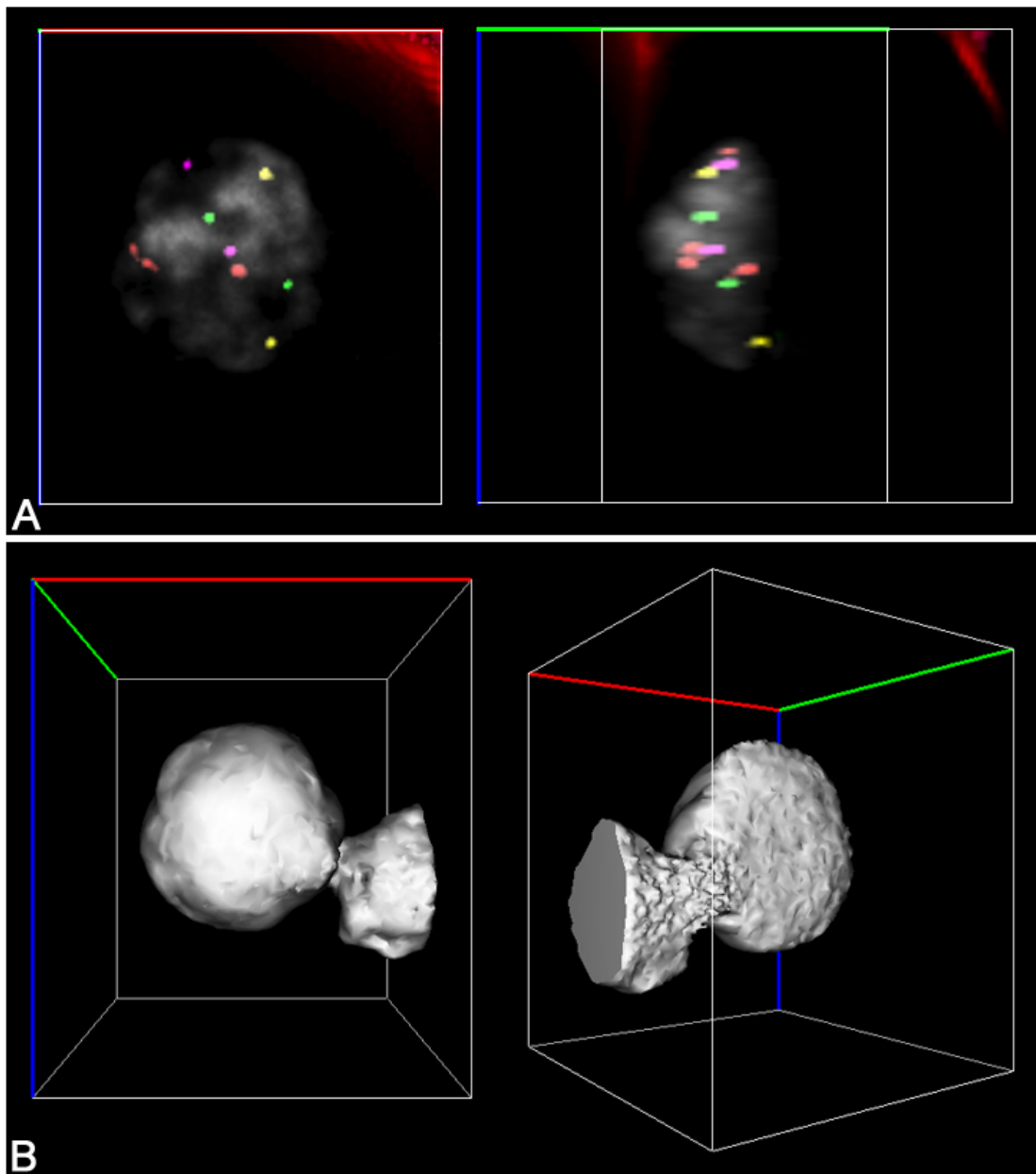


Abbildung 46: Tumorzelle nach der Dekonvolution und 3D-Rekonstruktion. Je zwei Ansichten nach Drehung in Y-Richtung.

A) Darstellung „Maximum“. Jede Sonde zeigt zwei Signale (1p36 grün, 17q25 gelb, 2p24 rot und 11q23 pink). Grau hinterlegter Zellkern in DAPI-Ansicht.

B) Darstellung „Surface“: Rekonstruktion der ursprünglichen Zellkern-Oberfläche. Ein zweiter Zellkern ist angeschnitten.



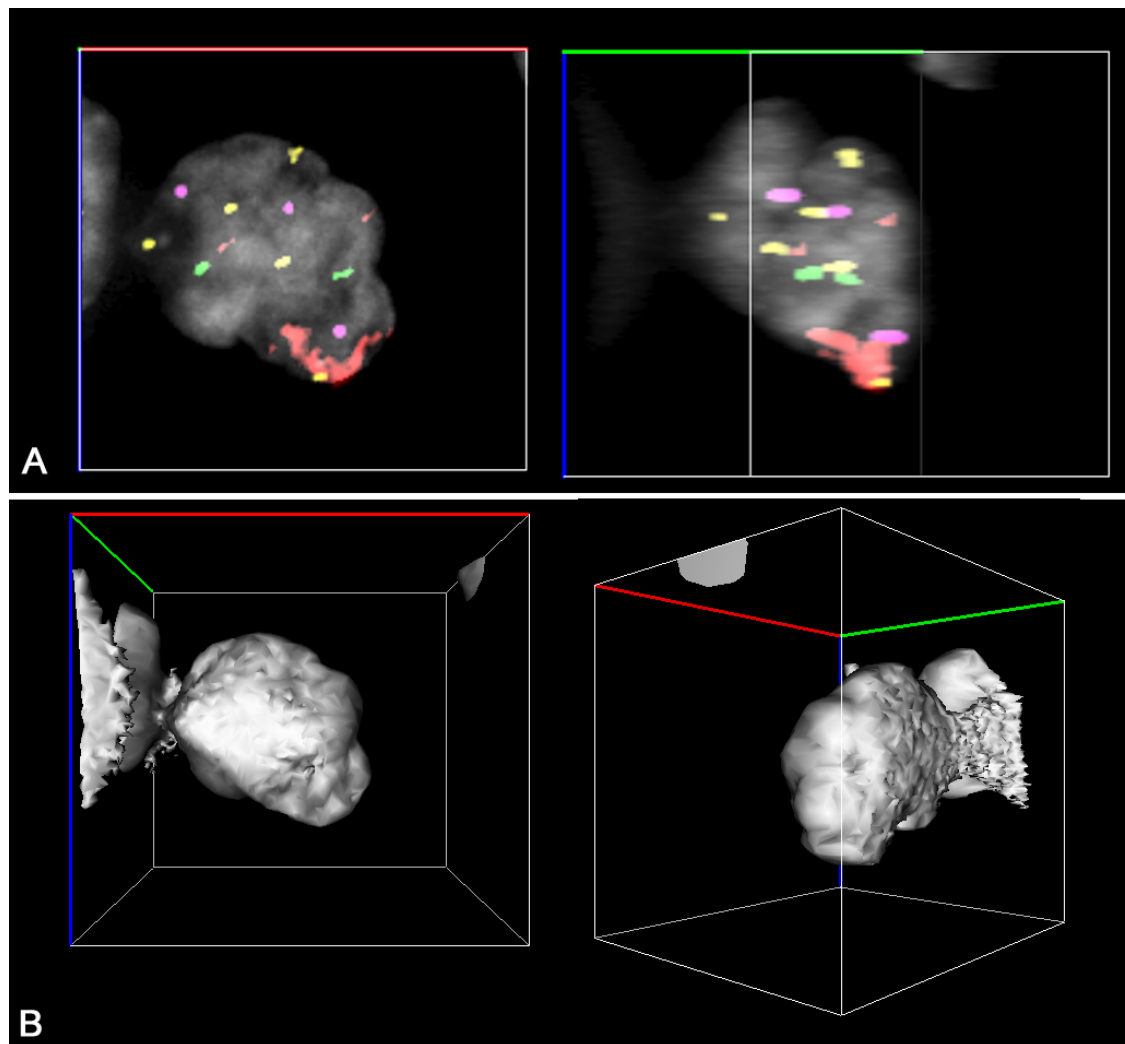


Abbildung 47: Tumorzelle nach der Dekonvolution und 3D-Rekonstruktion. Je zwei Ansichten nach Drehung in Y-Richtung.

A) Darstellung „Maximum“. Deutlich zu sehen die HSR-Amplifikation von 2p24 (rot) und die für dieses Rezidiv typische Amplifikation von 17q25 (gelb). Der Zellkern ist mit einer DAPI-Maske grau hinterlegt.

B) Darstellung „Surface“: 3D-Rekonstruktion der ursprünglichen Zellkern-Oberfläche. Ein zweiter Zellkern ist angeschnitten.

### Statistische Auswertung

Für jede Sonde wurde über einen „2 Stichproben t-Test“ unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen (Welch-Test) Mittelwert, Standardabweichung und P-Wert ermittelt, bezogen auf die Gesamtzahl der ausgewerteten Zellkerne (siehe Kapitel 2.2.8.2).

Die folgende Tabelle gibt die Mittelwerte und Standardabweichungen der angenommenen normalen Zellen von HV-R an und wird in Diagramm 23 schematisch dargestellt.

HV-R Normal	Sonde	Mittelwert	Standardabweichung
	1p36 FITC	1,88	0,15
	17q25 Cy3	2,03	0,35
	2p24 Cy3.5	1,89	0,38
	11q23 Cy5	1,89	0,22

Tabelle 59: Mittelwerte und Standardabweichung der Sonden des Nb- bei „normalen“ Zellen von HV-R; die Farben vor der Tabelle entsprechen den Farben im Diagramm.

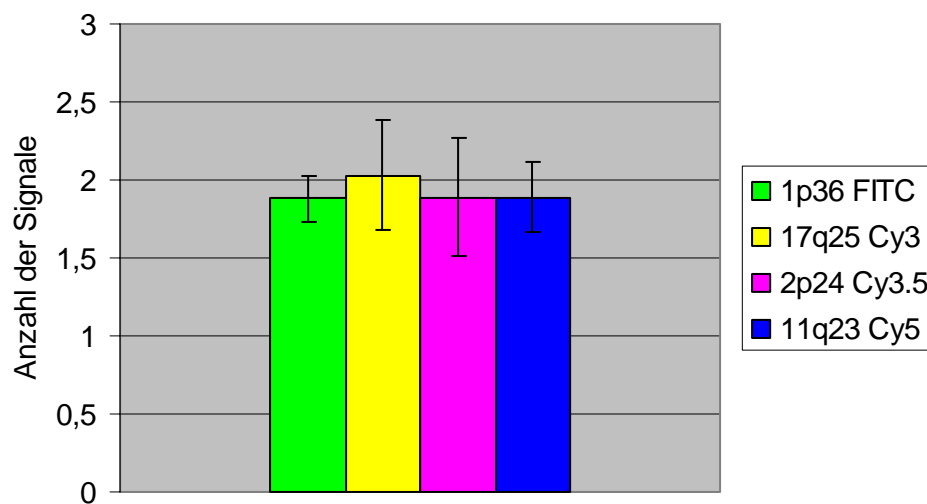


Diagramm 23: Mittelwerte und Standardabweichung der Sonden des Nb-Pools bei „normalen“ Zellen von HV-R.

Die Mittelwerte der einzelnen Sonden des Nb-Pools liegen zwischen 1,88 (1p36) und 2,03 (17q25). Die Werte für die Standardabweichung liegen zwischen 0,15 (1p36) und 0,38 (2p24) und liegen außer bei 1p36 signifikant niedriger als bei der Auswertung der Tumorzellen (siehe unten). Die P-Werte liegen unter 0,001 zeigen somit statistische Signifikanz (ohne Abbildung).

### 3.3 Maus 7 Fluorochrom M-FISH

#### 3.3.1 Allgemeines

Die 19 Autosomen und die beiden Geschlechtschromosomen der Maus wurden wie beschrieben in sieben Pools unterteilt, entsprechend unten aufgeführtem Kombinations-schema mit Fluorochromen markiert und auf Metaphasenpräparate aus Milz beziehungsweise Zelllinien hybridisiert.

Das Kombinationsschema ergab sich durch vorangegangene Versuche. Nicht jedes Chromosom ließ sich mit entsprechenden Fluorochromen gleich gut markieren, so dass zahlreiche Vorversuche notwendig waren, um für jedes Chromosom seine „optimale“ Fluorochromkombination zu finden.

Jedem Chromosom wurde mittels der Software MCK eine bestimmte – frei gewählte – Klassifizierungsfarbe zugeordnet, was in der folgenden Abbildung zu sehen ist:

Number of combinations:

Note: To change a value, double-click on the grid.

Name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	X	Y
Colour	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
SC8			X		X					X	X			X							X
FITC			X					X				X		X					X	X	
Cy3				X					X	X		X				X			X		
Cy3.5	X	X				X						X	X								X
Cy5	X			X	X												X	X		X	
Cy5.5						X	X	X	X		X							X			
Cy7		X					X							X	X	X	X				

Abbildung 48: Klassifizierungsfarben aller Maus-Chromosomen.

Unter den Farben ist für jedes Chromosom die jeweilige Kombination der Fluorochrome angegeben. SC8 = DEAC.

Die Maus-Chromosomen wurden mit der Leica-Software MCK karyotypisiert. Mit Hilfe von MCK sollte das Ziel erreicht werden, alle Chromosomen ohne Fehler, das heißt ohne falsche Zuordnung der Chromosomen durch die Software, zu klassifizieren.

An dieser Stelle sei anzumerken, dass jede Metaphase sowie die Karyogramme in ihren Originalaufnahmen abgebildet sind; sie wurden mit Hilfe von weiteren Bildverarbeitungsprogrammen nicht verändert.

### 3.3.2 M-FISH Analyse von normalen Metaphasen

Maus 7 Fluorochrom M-FISH wurde zunächst auf normalen Metaphasen (40,XX) getestet und die Klassifizierbarkeit mit der Software MCK überprüft.

Alle Chromosomen ließen sich eindeutig und ohne Fehler, also ohne falsche Zuordnungen durch die Software, klassifizieren.

In Abbildung 49 bis Abbildung 52 ist eine normale weibliche Metaphase zu sehen.

Abbildung 49 zeigt die einzelnen Chromosomen-Pools in den Kanälen DEAC, FITC, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5 und Cy7, und in Abbildung 50 wird dieselbe Metaphase in A) Klassifizierungsfarben und in B) in invertiertem DAPI dargestellt, was ungefähr den G-Banden entspricht.

An Hand der visuellen Inspektion der Bilder ist bereits ersichtlich, dass die Hybridisierungs-Intensität jedes Chromosoms in etwa ausgeglichen ist, so dass jedes Chromosom gleich intensiv angefärbt ist.

Durch Überlagerung der einzelnen Kanäle entsteht ein Echtfarbenbild, welches hier nicht abgebildet wird, da es von der Software nicht zufrieden stellend dargestellt werden kann: MCK ist nur für die Überlagerung von fünf Kanälen ausgelegt.

Abbildung 51 zeigt dieselbe Metaphase nach der Klassifizierung mit der Software MCK. Die Software erstellt ein Karyogramm, welches in dieser Abbildung in den einzelnen Kanälen DEAC, FITC, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5 und Cy7 gezeigt ist.

Abbildung 52 stellt dieselbe Metaphase nach Klassifizierung in A) Klassifizierungsfarben und in B) in invertiertem DAPI dar.

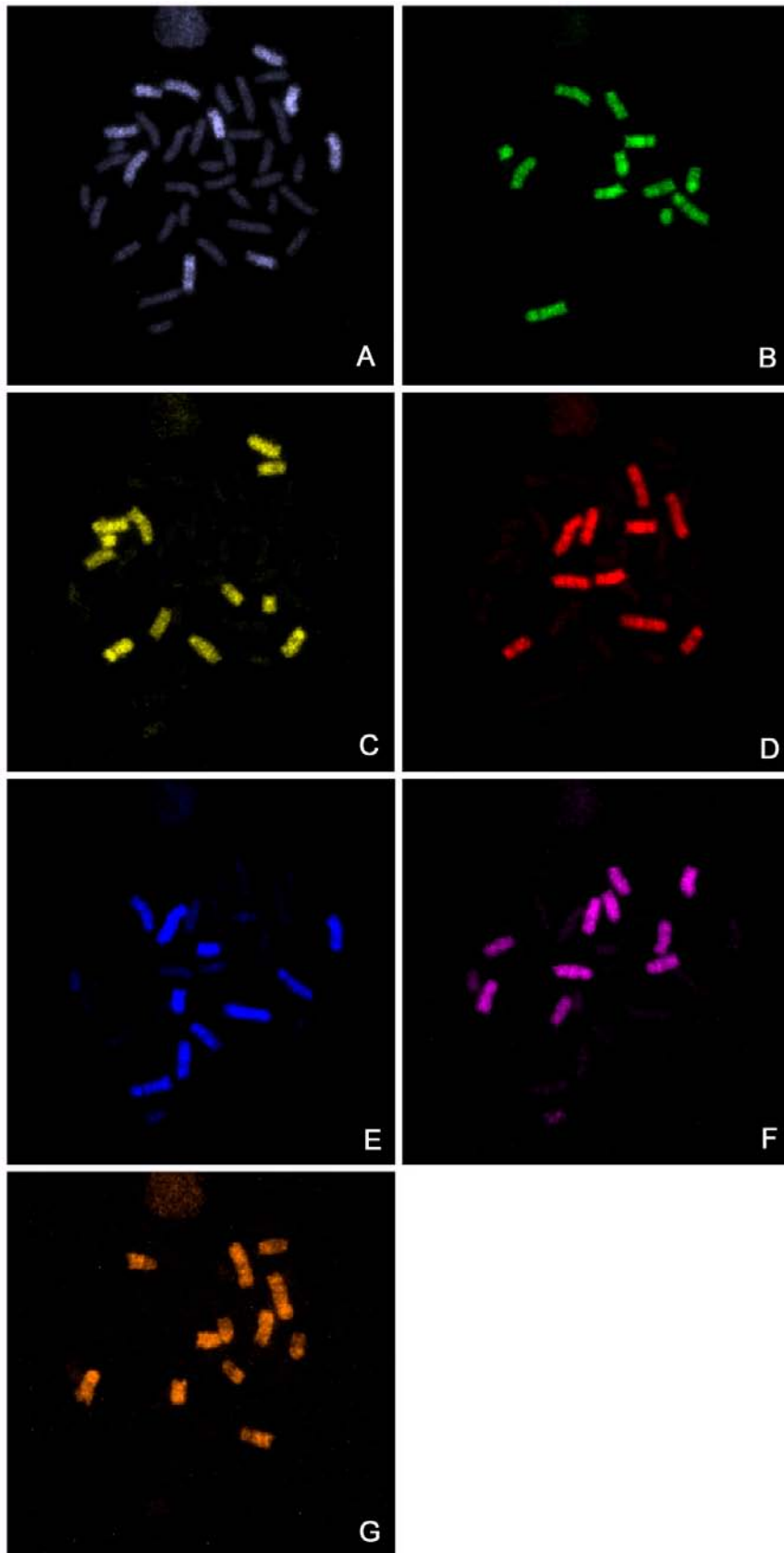


Abbildung 49: Normale weibliche Metaphase (40,XX)

A) DEAC, B) FITC, C) Cy3, D) Cy3.5, E) Cy5, F) Cy5.5, G) Cy7.

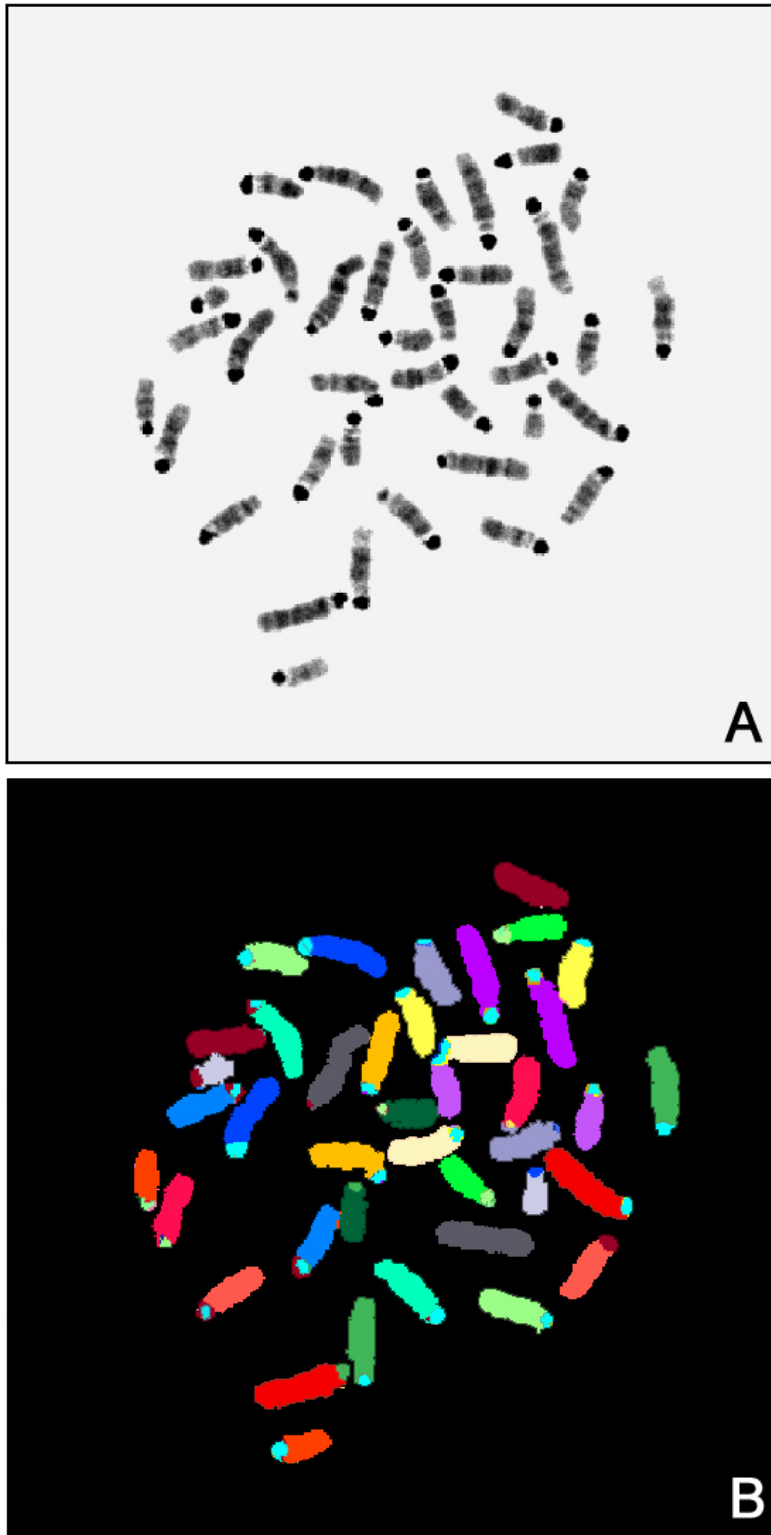


Abbildung 50: Normale weibliche Metaphase aus Abbildung 49.  
A) Invertiertes DAPI und B) Klassifizierungsfarben.

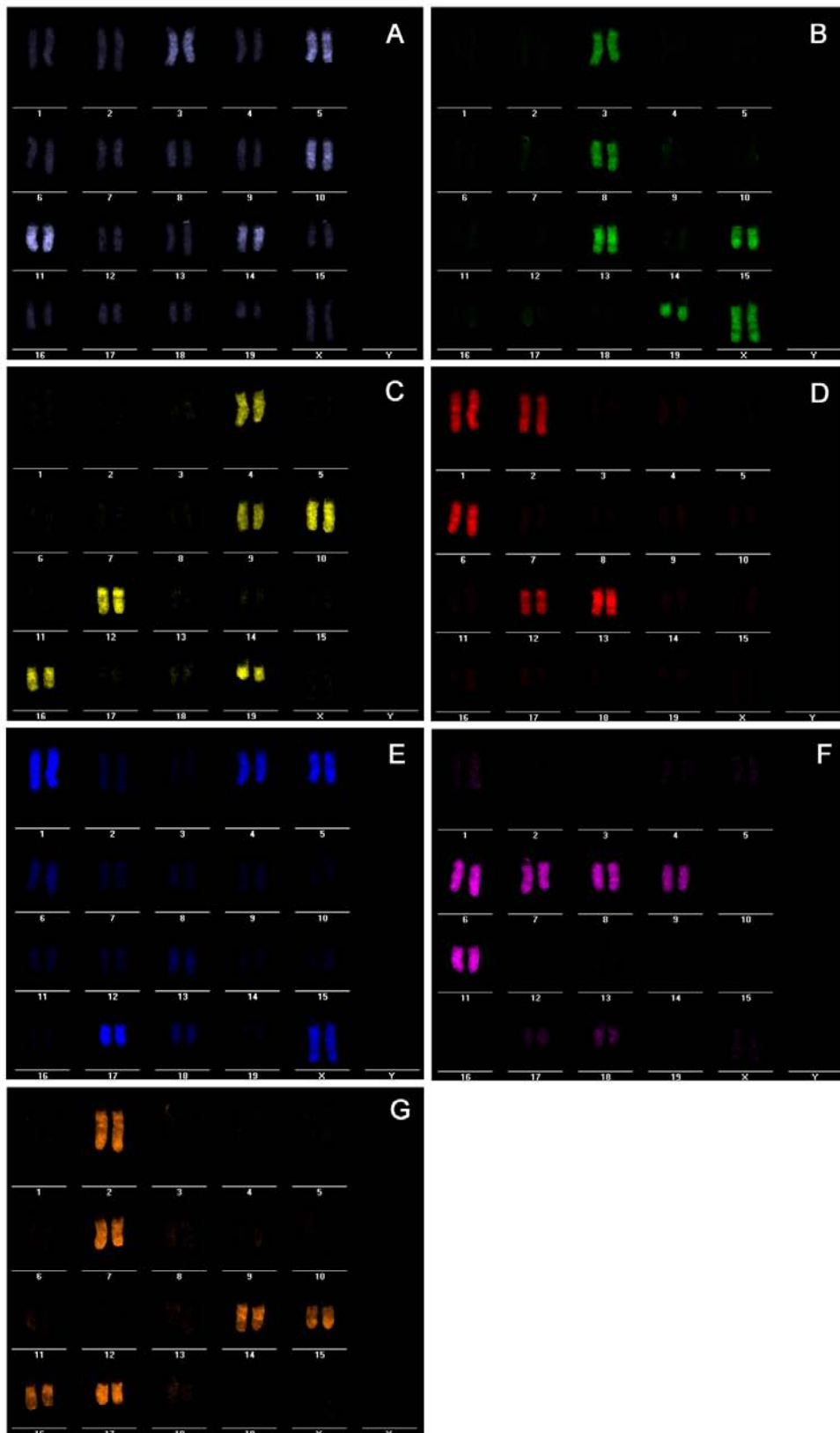


Abbildung 51: Normale weibliche Metaphase nach Klassifizierung (Karyogramm) aus Abbildung 49-50.

A) DEAC, B) FITC, C) Cy3, D) Cy3.5, E) Cy5, F) Cy5.5 und G) Cy7.

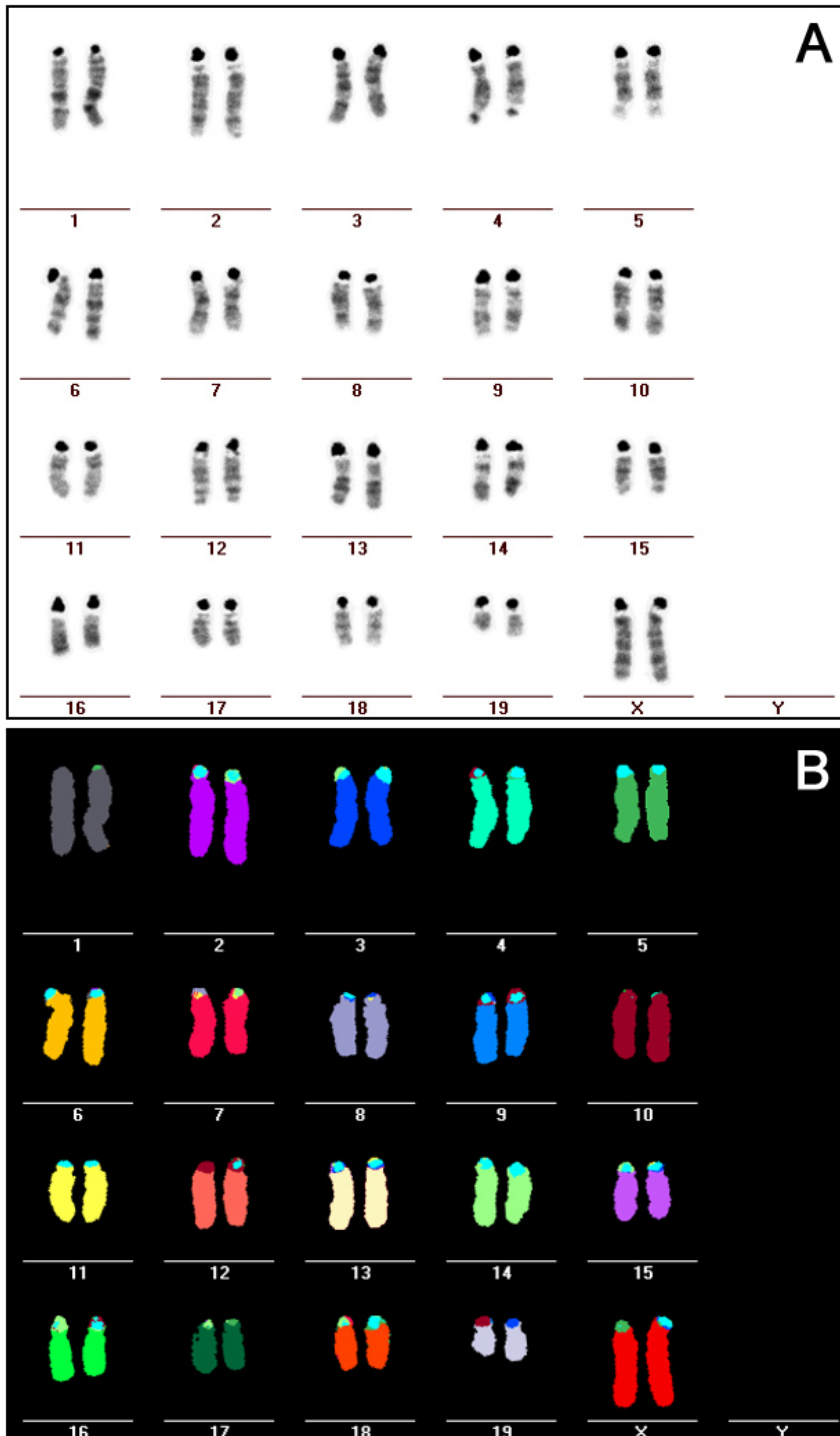


Abbildung 52: Normale weibliche Metaphase nach Klassifizierung (Karyogramm) aus Abbildung 49-50.

A) Invertiertes DAPI B) Klassifizierungsfarben.



### 3.3.3 Analyse verschiedener Maus-Zelllinien

Um die Anwendbarkeit von Maus 7 Fluorochrom M-FISH zu zeigen, wurden Maus-Zelllinien mit chromosomalen Aberrationen analysiert. Von diesen waren weder Geschlecht noch Art der Aberrationen bekannt und sind auch bislang in der Literatur nicht beschrieben.

Von jedem der Aberrationsträger wurde mittels M-FISH ein Karyotyp erstellt und die Aberrationen identifiziert.

Es wurden folgende Maus-Zelllinien analysiert:

- AG12 Tubo.

Bei der Zelllinie AG12 Tubo (im Folgenden AG12) handelt es sich um eine klonierte Zelllinie aus dem Primärtumor eines Mamma-CA's einer Her2neu-transgenen Maus.

- TSA

TSA ist eine Zelllinie aus einem spontanen Mamma-CA einer Maus.

Je Zelllinie wurden mehrere Metaphasen ausgewertet. Auf den folgenden Seiten wird je Zelllinie ein exemplarisches Karyogramm angegeben.

#### 3.3.3.1 TSA

Für die Zelllinie TSA wurde folgender Karyotyp identifiziert:

$<3n>63-65,X,-X,-X,+1,+2,der(2)t(2;X),+del(3),-4,del(4)[1],+5[1],+6,-7,dic(8),del(10)+12,der(13)t(13;14),+del(15),+del(15),+17,-18[2],del(18)[1],[cp3]$

In Abbildung 53 ist ein Karyotyp dieser Zelllinie in Klassifizierungsfarben und in invertiertem DAPI zu sehen. In Abbildung 54 sind die beteiligten Translokations-Chromosomen dargestellt.

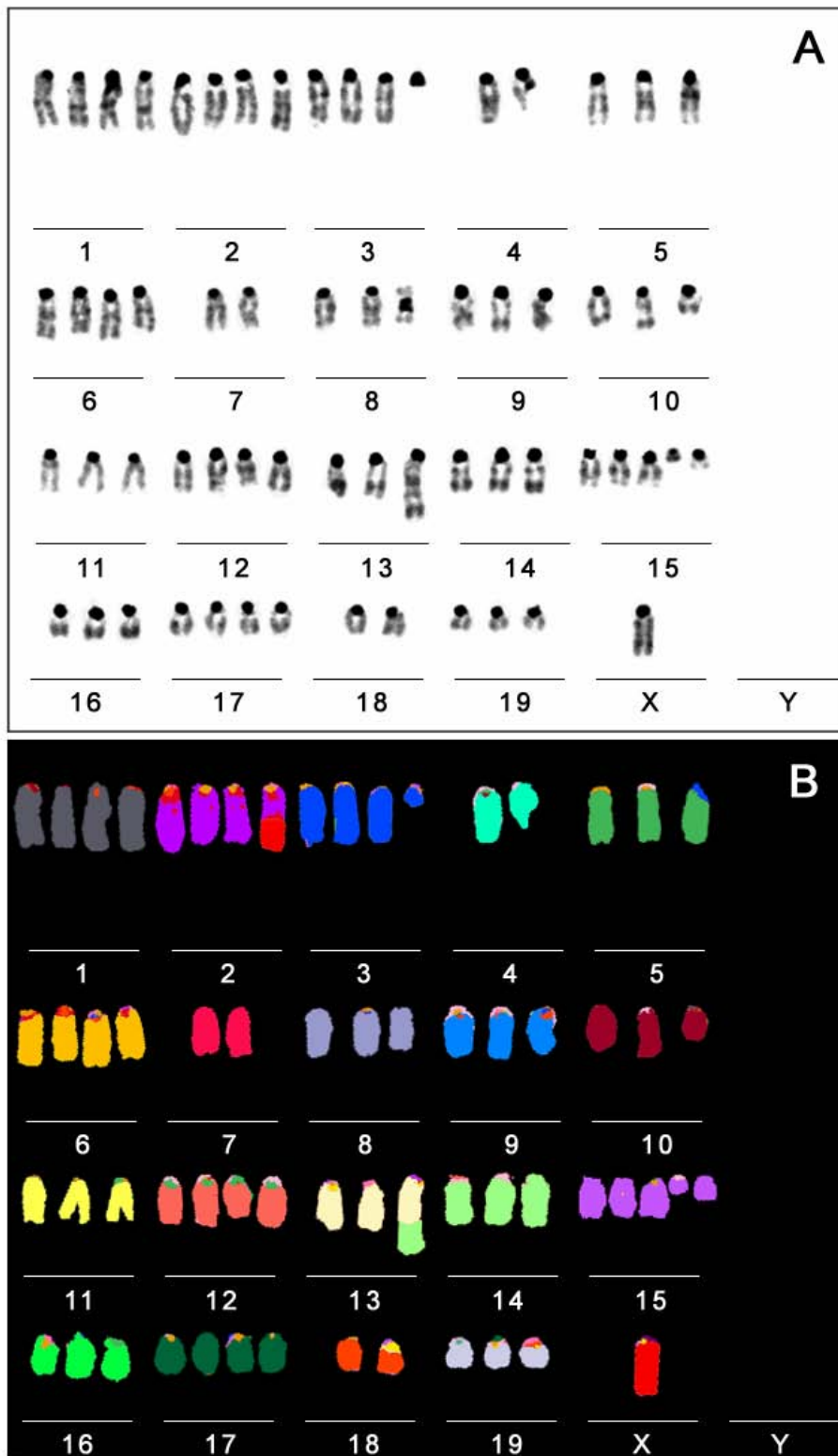


Abbildung 53: Zelllinie TSA. A) Invertiertes DAPI; B) Klassifizierungsfarben.

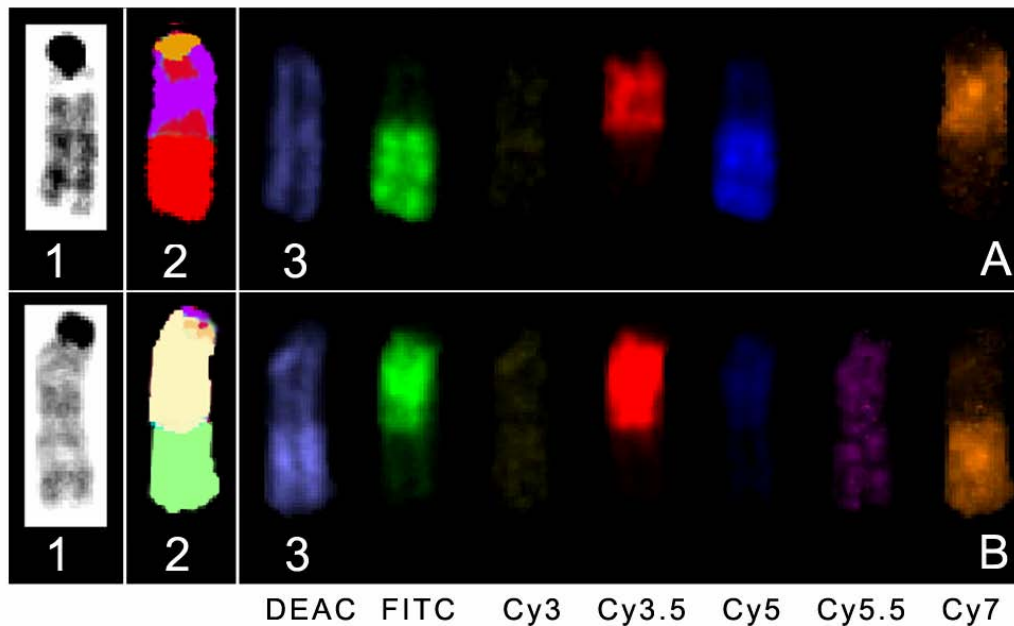


Abbildung 54: Zelllinie TSA.

A) Translokations-Chromosom  $der(2)t(2;X)$ .

A1) Invertiertes DAPI; A2) Klassifizierungsfarben; A3) Kanäle DEAC, FITC, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7.

B) Translokations-Chromosom  $der(13)t(13;14)$ .

B1) Invertiertes DAPI; B2) Klassifizierungsfarben; B3) Kanäle DEAC, FITC, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7.

Chromosom 2: Cy3.5, Cy7; Chromosom X: FITC, Cy5;

Chromosom 13: FITC, Cy3.5; Chromosom 14: DEAC, Cy7.

In Abbildung 54 sind die Translokations-Chromosomen  $der(2)t(2;X)$  und  $der(13)t(13;14)$  gezeigt. Diese Abbildung sei an Hand des Abbildungsteils A exemplarisch erläutert: Abbildungsteil B ergibt sich daraus entsprechend:

54A zeigt ein derivatives Chromosom 2 mit einem translozierten Teil von Chromosom X. Das Chromosom wird in A1 in invertiertem DAPI, in A2 in Klassifizierungsfarben und in A3 in den einzelnen Kanälen dargestellt. Der obere Teil des Translokations-Chromosoms, also Chromosom 2, zeigt die Fluorochromkombination Cy3.5 und Cy7 (siehe Abbildung 48). Der untere Teil des Chromosoms, also das translozierte Chromosom X zeigt die Fluorochromkombination FITC und Cy5, was charakteristisch für Chromosom X ist.

### 3.3.3.2 AG12

Für die Zelllinie AG12 wurde folgender Karyotyp klassifiziert:

37-40,XX,del(3)[3],-4[3],t(4;10),der(4)t(4;13),del(7)[3],del(9)[3],+11[1],del(14)[3],-14[4],  
del(15)[1],-15[3],-16[1],-17[1],+del(17)[3],der(17)t(15;17)[3],+19[3],[cp7]

Abbildung 55 zeigt ein Karyogramm dieser Zelllinie in Klassifizierungsfarben und in invertiertem DAPI.

In Abbildung 56 sind die beteiligten Translokations-Chromosomen der(4)t(4;13), der(4)t(4;10), der(10)t(4;10), und der(17)t(15;17) zu sehen.

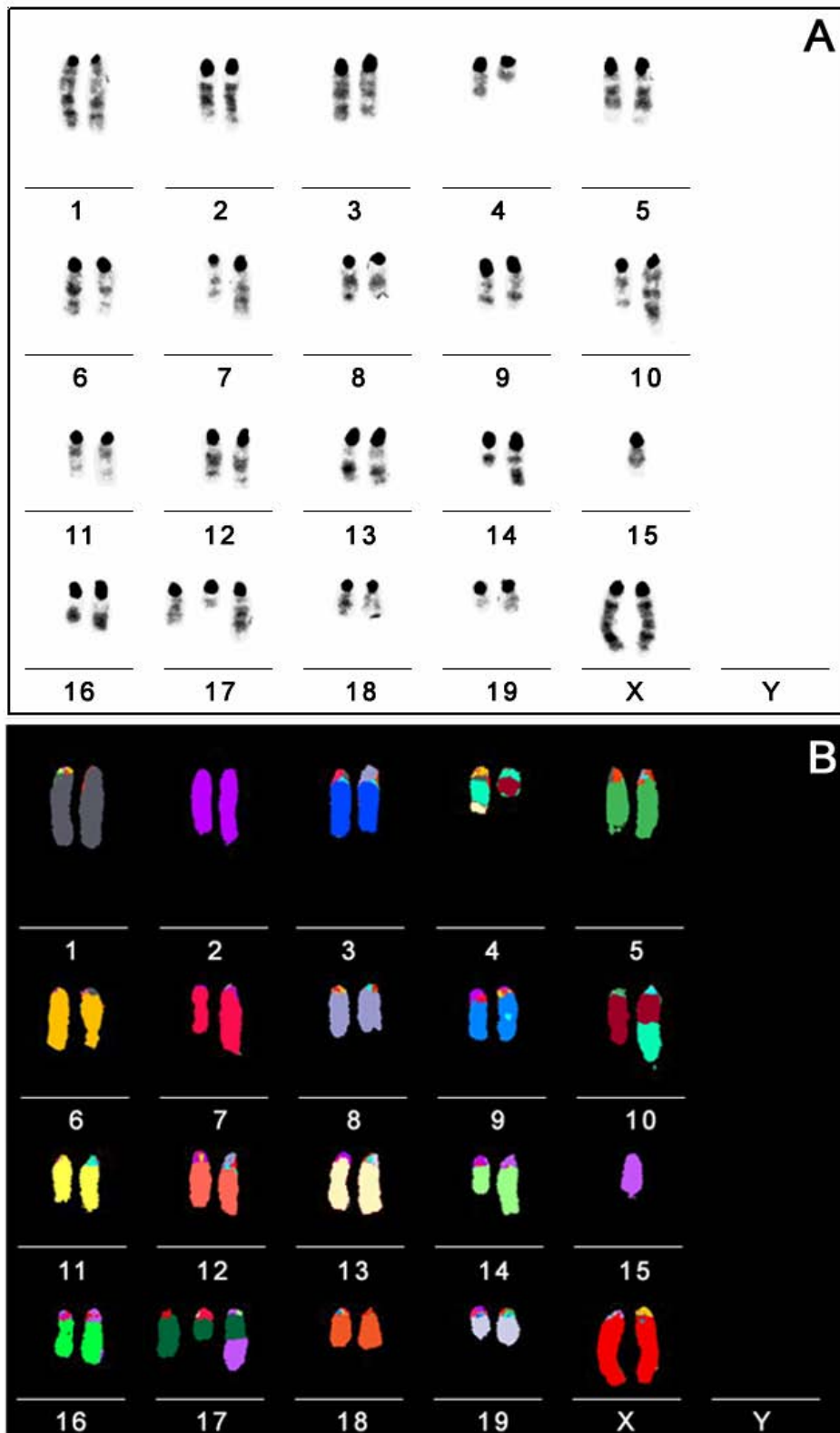


Abbildung 55: Zelllinie AG12. A) Invertiertes DAPI; B) Klassifizierungsfarben.

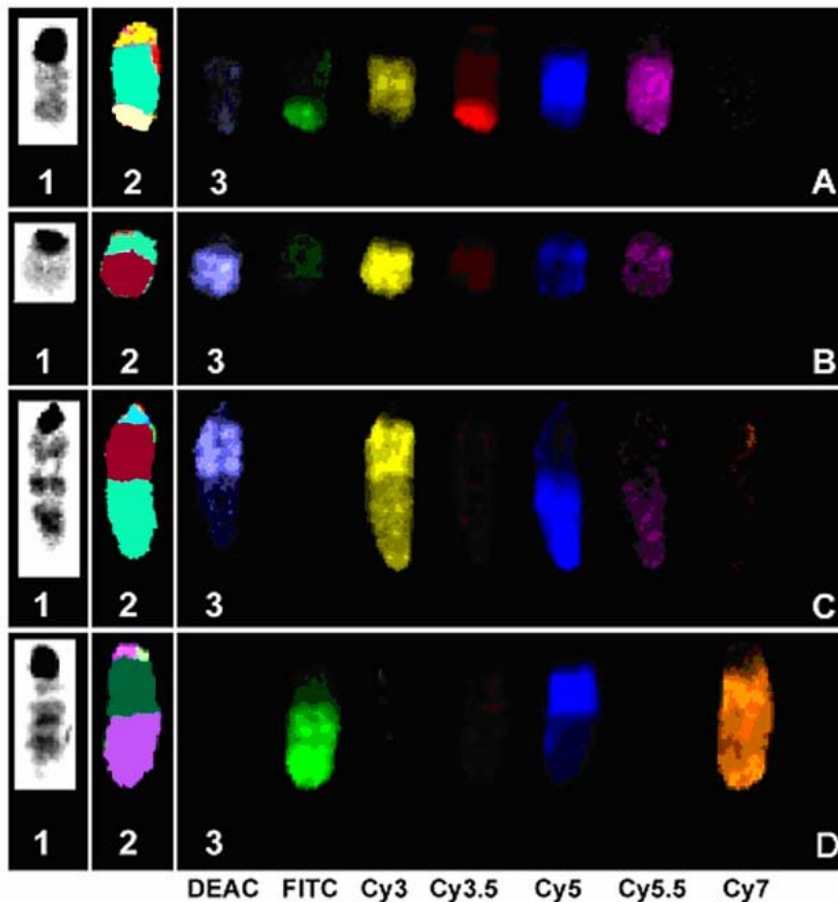


Abbildung 56: Zelllinie AG12.

A) Translokations-Chromosom  $der(4)t(4;13)$ ;

A1) Invertiertes DAPI; A2) Klassifizierungsfarben; A3) Kanäle DEAC, FITC, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7.

B) Translokations-Chromosom  $der(4)(4;10)$ ;

B1) Invertiertes DAPI; B2) Klassifizierungsfarbe; B3) Kanäle DEAC, FITC, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7.

C) Translokations-Chromosom  $der(10)(4;10)$ ;

C1) Invertiertes DAPI; C2) Klassifizierungsfarbe; C3) Kanäle DEAC, FITC, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7.

D) Translokations-Chromosom  $der(17)(15;17)$ ;

D1) Invertiertes DAPI; D2) Klassifizierungsfarbe; D3) Kanäle DEAC, FITC, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7.

Chromosom 4: Cy3, Cy5; Chromosom 13: FITC, Cy3.5

Chromosom 10: DEAC, Cy3; Chromosom 15: FITC, Cy7; Chromosom 17: Cy5, Cy7.

Obige Abbildung sei an Hand des Abbildungsteils A exemplarisch erläutert; B – D ergibt sich daraus entsprechend.

Abbildung 56A zeigt ein derivatives Chromosom 4 mit einem translozierten Teil von Chromosom 13. Das Chromosom wird in A1 in invertiertem DAPI, in A2 in Klassifizierungsfarben und in A3 in den einzelnen Kanälen dargestellt. Der obere Teil des Translokations-Chromosoms, also Chromosom 4, zeigt die Fluorochromkombination Cy3 und Cy5 (siehe Abbildung 48). Der untere Teil des Chromosoms, also das translozierte Chromosom 13 zeigt die Fluorochromkombination FITC und Cy3.5, was charakteristisch für Chromosom 13 ist.

Bei Maus-Tumor-Zelllinien strahlt bei einer intensiven Cy5-Färbung der Cy5-Kanal häufig in den Cy5.5-Kanal hinein (siehe auch obige Abbildung). Dies beeinflusst aber nicht die Klassifizierung über die Software *MCK*.

---

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Allgemeine Strategien der Tumor-Zytogenetik

Die Präparation von Tumor-Metaphasen – sei es von Mensch oder Maus – ist häufig schwierig und anfällig für Artefakte. Eine Alternative ist die CGH (*comparative genomic hybridization*, Kallioniemi et al. 1992, du Manoir et al. 1993). Die CGH ist eine Methode, mit der numerische Veränderungen von Tumorzellen innerhalb des gesamten Genoms kartiert werden können. Hierbei wird Tumor-DNA und normale Referenz-DNA mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert und simultan auf normale Metaphasen-Chromosomen hybridisiert. Regionen mit einem Gewinn oder Verlust von DNA-Material können durch die vergleichende Analyse der Fluoreszenzintensitäten der beiden Fluorochrome identifiziert werden. Man erhält relative Änderungen in der Kopienzahl, die durch Definition von Schwellwerten als Gewinn oder Verlust angezeigt werden. Der Nachteil dieser CGH-Analysen ist, dass aus technischen Gründen bei der DNA-Extraktion tausende von Tumorzellen mit einbezogen werden. Klein und Mitarbeiter (1999) haben dieses Problem reduziert, indem sie ein Protokoll entwickelt haben, mit dem es möglich ist, eine CGH-Analyse an einer einzigen Zelle durchzuführen (*single cell CGH*). Hierbei wird die Tumorzelle aus ihrer natürlichen Umgebung herausgenommen. Dabei gehen aber Informationen über das Genom anderer umgebender Tumorzellen sowie eine Positionierung der Tumorzelle in ihrem ursprünglichen Gewebeverband verloren.

Diese Analysen können nur mittels Interphase-Zytogenetik an Gewebeschnitten realisiert werden. Interphase-FISH bietet die einzigartige Möglichkeit einer direkten Genotyp-Phänotyp-Korrelation, der Erfassung topologischer Effekte, sowie die Option, verschiedene Zellklone in einem heterogenen Gewebe wie einem Tumor zu identifizieren.

Wie bereits erläutert, wurden für das Neuroblastom bislang keine Arbeiten beschrieben, die mittels simultan hybridisierter mehrerer spezifischer Sonden eine Analyse solcher Tumoren vorgenommen haben. Eine simultane Hybridisierung verschiedener Sonden hat den Vorteil, dass gleichzeitig mehrere Regionen ausgewertet werden können und ihre Beziehung zueinander untersucht werden kann. Als Beispiel sei an dieser Stelle erwähnt, dass eine MYCN-Amplifikation mit einem Verlust von 1p36 einhergeht, nicht aber umgekehrt.

Deshalb wurde hier ein SONDENSATZ entwickelt, wobei die eingesetzten Sonden auf Regionen kartieren, von denen bekannt ist, dass sie beim Neuroblastom mit einer hohen Prozentzahl verändert sind.



---

## 4.2 Neuroblastom: Analyse von Zelllinien

### 4.2.1 Allgemeines

Kultivierte Krebszelllinien sind monoklonal, das heißt sie stammen von einer Zelle ab. Krebszelllinien haben zur Entdeckung wichtiger Gene beigetragen und dienen als Modelle für genetische und funktionelle Studien verschiedenster Tumortypen. Zudem stellen Zelllinien ein interessantes Untersuchungsmaterial bei der Einschätzung bestimmter Zellklone dar.

Der Nutzen von Zelllinien wird jedoch immer wieder diskutiert. Zelllinien haben den Vorteil, dass sie eine unlimitierte Anzahl von Zellen mit ähnlichen Genotypen und Phänotypen liefern. Jedoch stellt sich die Frage, ob kultivierte Zellen noch den charakteristischen Phänotyp und Genotyp beinhalten, welcher in der ursprünglichen Zelle, von der sie abstammen, auftritt. Zudem geben Tumorzelllinien nur einen kleinen Einblick in den Tumor: Zellen werden zu einer bestimmten Zeit des Tumorwachstums entnommen. Außerdem stammen diese nur aus einem kleinen Bereich und umfassen möglicherweise nicht die komplexe heteromorphe Charakteristik des Tumors in phänotypischer wie genotypischer Hinsicht. So gibt eine Analyse dieser Zellen nur unzureichend Aufschluss über Verhalten und Verteilung von Tumorzellen im Gewebeverband. Kultivierte Zellen müssen also bezüglich des klinischen Spektrums nicht immer den Tumor repräsentieren.

Viele Tumoren, von denen Zelllinien gewonnen werden, tendieren außerdem dazu, schnell zu wachsen, werden in der Regel während eines späten Tumorstadiums gewonnen und beinhalten eher Veränderungen, die für ein unbegrenztes Wachstum *in vitro* sorgen. Veränderungen, die zu einer Immortalisierung von Zellen führen, sind häufig späte Ereignisse, so dass sich viele Primärtumoren nicht unendlich teilen. So sind nicht sehr viele Zelllinien charakterisiert, die von einem Primärtumor abstammen, welcher gut differenziert ist, wie es zum Beispiel beim Blasen-CA der Fall ist (Knuechel et al. 1999).

Zum Vergleich von Ursprungstumor und kultivierten Zelllinien aus demselben Tumor wurden zahlreiche Studien durchgeführt (zum Beispiel Kallioniemi et al. 1992). Die Untersuchungen von Mamma-CA Zelllinien und Lungen-CA Zelllinien haben ergeben, dass die Zelllinien im Vergleich zu ihren ursprünglichen Tumoren bezüglich genotypischen und phänotypischen Veränderungen lange Zeit stabil bleiben (Wistuba et al. 1998, 1999). Auch Analysen anderer Tumoren und ihrer Zelllinien wie Lymphome oder Leukämien zeigen, dass zum Beispiel Cyklin-abhängige Kinase-Gene und p53 in Tumor und Zelllinie fast immer identisch sind (Drexler et al. 1998, 2000).

Ebenso haben sich in DNA Microarray-Studien stabile Ähnlichkeiten in der Genexpression beim Vergleich des Ursprungstumors und der Zelllinien gezeigt (Ross et al. 2000). Allerdings werden auch phänotypische und genotypische Unterschiede zwischen verschiedenen Untergruppen derselben Zelllinie beschrieben (Hsu et al. 1999). Die Erklärung könnte darin liegen, dass Zellen in Kultur eine klonale Evolution durchlaufen, also diejenigen Zellen weiter wachsen, die am besten angepasst sind und so die besten Überlebenschance haben. Dies beinhaltet nicht nur genotypische Veränderungen in den Zellen, sondern auch mögliche wechselnde Kulturbedingungen.

Im Gegensatz zu normalen Zellen ist es nicht leicht, Krebszellen zu kultivieren und für die Zytogenetik akzeptable Metaphasen zu präparieren (O'Hare 1991). Sogar bei Krebsarten, die relativ leicht wachsen, wie zum Beispiel Melanome, konnten bislang nur die metastasierenden Tumoren als kontinuierlich wachsende Zelllinien etabliert werden (Hsu et al. 1999).

Insgesamt betrachtet sind jedoch Zelllinien nicht zuletzt wegen ihres homogenen Charakters ein wichtiges Werkzeug bei der Entdeckung und Erfassung von zytogenetischen Veränderungen in Tumoren. Mittels Zelllinien ist es – im Gegensatz zum Tumorgewebe auf Grund seiner möglichen heterogenen Struktur – eher möglich, Mutationen zu finden. Im günstigsten Fall führt die Entdeckung solcher Mutationen zu Tumorsuppressor-Genen, welche bei der Frage nach der Ursache des Tumors eine wichtige Rolle spielen können.

#### **4.2.2 Verwendete Zelllinien und Sonden; Vorbehandlung**

Für die Charakterisierung der Zelllinien wurden BACs und YACs für die Regionen 1p36, 2p24, 11q23 und 17q25 eingesetzt. Zusätzlich zu diesen Sonden wurden noch weitere BACs eingesetzt, die als Kontrolle dienten und von denen angenommen wird, dass sie beim Neuroblastom nicht verändert sind. Hierbei handelt es sich um Sonden für die Regionen 1q12, 11p15 und 17q12. Die Sonden wurden alle mit je zwei Fluorochromen markiert. Dies hat den Vorteil, dass ein Signal in zwei verschiedenen Kanälen sichtbar sein muss, womit die Sensitivität erhöht wird.

Die Sonden wurden nach einer Minipräp mit einer DOP-PCR und parallel mit einer Alu-PCR amplifiziert und in einem 1:1-Gemisch aus diesen Amplifikaten in einer Nicktranslation mit Fluorochromen markiert. Es hat sich in zahlreichen Experimenten herausgestellt, dass diese Art der Fluorochrom-Markierung im Vergleich zu einer Markierung ohne Gemisch oder im

Vergleich zur Markierungs-PCR am besten geeignet ist und die intensivsten Hybridisierungs-Signale liefert.

Die Zelllinien wurden von Frank Speleman präpariert und zugeschickt. Aus diesen wurden die Zelllinien Nb90.9, TR-14 und SKN-BE ausgewählt. Die Präparationen der ausgewählten Zelllinien zeigten ein relativ homogenes morphologisches Bild und zum Teil nur sehr wenige Metaphasen. Insgesamt konnte für die Auswertung zum größten Teil nur auf Interphase-Kerne zurückgegriffen werden.

Die Präparate wurden nach Standard FISH Protokoll vorbehandelt (siehe oben). Die hier verwendeten Tumorzelllinien benötigen im Gegensatz zu Lymphozytenpräparaten einen extrem langen Pepsin-Verdau (Erhöhung der Verdau-Zeit um das fünffache), um das überschüssige Cytoplasma zu entfernen. Das Cytoplasma ist häufig sogar so beständig, dass die Zellkerne bereits eine gequollene Struktur aufwiesen, während das Cytoplasma nicht reduziert war.

### **4.2.3 Beurteilung der Ergebnisse**

Die Hybridisierungs-Effizienz der kombinatorisch eingesetzten Sonden wurde durch eine Auswertung von 100 Lymphozyten-Zellkernen (46,XY) überprüft.

Je Zelllinie wurden ebenfalls 100 Zellkerne aufgenommen und ihre Hybridisierungs-Signale ausgewertet. Neben Lymphozyten-Zellkernen wurden auch Metaphasen ausgewertet. Eine Analyse von Metaphasen kann im Vergleich zu Interphase-Kernen Informationen über die strukturelle Zusammensetzung der beteiligten Chromosomen liefern (siehe zum Beispiel Abbildungen 23-29 sowie Erklärungen an den entsprechenden Stellen).

Zudem wird aus den Ergebnissen ersichtlich, dass auch mit Hilfe der Kontroll-Sonden nicht immer auf die Ploidie geschlossen werden kann. Wie zum Beispiel in Abbildung 28 zu sehen ist, handelt es sich bei der SKN-BE um eine diploide Zelllinie. Trotzdem ergibt die Auswertung der Metaphasen, dass die Kontrollsonde 1q12 dreimal vorhanden ist (Abbildung 29). Dieser Wert korreliert auch mit dem Ergebnis der statistischen Auswertung der Zellkerne (siehe Tabelle 40, Mittelwert 1q12: 2,94). Die Ploidie könnte somit durch eine reine Zellkernanalyse falsch interpretiert werden. Um dieses Problem zu umgehen, könnte man in einem parallelen Versuch einen Centromer-Sondenmix hybridisieren. Da die Centromere nach aktuellem Wissensstand keine Aussage über Veränderungen beim Neuroblastom geben, sind diese Sonden für die Beurteilung der Ploidie gut geeignet.

Insgesamt konnten die Veränderungen in den Zelllinien mit Hilfe des kombinatorischen Neuroblastom-Pools eindeutig identifiziert und ausgewertet werden.

## **4.3 Neuroblastom: Analyse von Gewebeschnitten**

### **4.3.1 Allgemeines**

Für die Analyse von Gewebeschnitten eignen sich Gefrierschnitte oder Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete Gewebeschnitte.

Gefrierschnitte (Kryoschnitte) haben den Vorteil, dass es sich hierbei um unfixiertes und leicht hybridisierbares Material handelt. Jedoch werden diese Schnitte von den Pathologen für weitere Studien ungern aus der Hand gegeben, da sie häufig nur in geringen Mengen vorhanden sind. Als günstiger für die Anfertigung zahlreicher Parallelschnitte haben sich daher Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete Gewebeschnitte erwiesen. Durch die gute Archivierungsmöglichkeit und Stabilität bei der Aufbewahrung kann der klinische Verlauf der Erkrankung eines Patienten sehr genau dokumentiert werden. Wichtig bei der Verwendung von Paraffin-Gewebeschnitten ist eine Fixierung der Schnitte in gepuffertem Formalin. Bei ungepuffertem Formalin konnten bislang keine zufrieden stellenden Hybridisierungs-Ergebnisse gezeigt werden, da die DNA auf Grund zahlreicher Interaktionen mit anderer DNA und Proteinen nur schwer hybridisiert werden kann.

Bisher wurde in der Literatur keine simultane Hybridisierung mehrerer Sonden auf Neuroblastom-Gewebeschnitte beschrieben. Es wurden Hybridisierungen einzelner Sonden wie MYCN auf Gewebeschnitte publiziert (Hachitanda et al. 1997). Auch bei anderen Tumoren wurden bislang bis auf Ausnahmen (Maierhofer et al. 2003) lediglich ein oder zwei spezifische Sonden hybridisiert. Die Kombination bestimmter Regionen-spezifischer Veränderungen kann aber eine wichtige Rolle bei der zytogenetischen Einteilung und Charakterisierung spielen (siehe Einleitung).

Des Weiteren galt es bisher als schwierig beziehungsweise unmöglich, kleine Sonden wie BACs und YACs auf Gewebe zu hybridisieren und ihre Signale nachweisen zu können. Deshalb wurden Studien hauptsächlich mit Centromer-Sonden durchgeführt. Diese zeichnen sich durch ihre gute Hybridisierbarkeit und durch große Signale aus, so dass diese leicht nachzuweisen sind. Beim Neuroblastom sind Centromer-Sonden jedoch ungeeignet, da die bislang nachgewiesenen Veränderungen eher telomernah sind.

In dieser Arbeit wurden Centromer-Sonden für das Austesten einer generellen Hybridisierbarkeit sowie zur Ermittlung der Zellkerndicke verwendet.

Molekularzytogenetische Untersuchungen beschränken sich bisher vor allem auf sehr dünne Schnitte unter 6  $\mu\text{m}$ , auf isolierte Zellen aus Gewebe (Paternoster et al. 2002) oder nach einer Zellkernvereinzellung sowie auf kultivierte Zelllinien.

#### **4.3.2 Problematik der Autofluoreszenz**

Beim Neuroblastom besteht auf Grund seiner neuronalen Herkunft das Problem der Autofluoreszenz. Diese Autofluoreszenz hat zur Folge, dass ohne eine aggressive Vorbehandlung Fluoreszenzsignale unterdrückt werden können. Deshalb war es notwendig ein Protokoll zu entwickeln, welches die Autofluoreszenz so weit reduziert, dass eine eindeutige Analyse der Fluoreszenzsignale ermöglicht wird.

Die Gewebedicke hat einen bedeutenden Einfluss auf eine Reduzierung der Autofluoreszenz. Je dicker der Schnitt, umso intensiver und stabiler die Autofluoreszenz. Zu Beginn wurde mit Schnitten von 20  $\mu\text{m}$  und 30  $\mu\text{m}$  experimentiert; hierbei war es nicht möglich, die Autofluoreszenz hinreichend zu reduzieren. Wie im Ergebnisteil gezeigt werden konnte, reicht bei den untersuchten Neuroblastomen eine Dicke von 10  $\mu\text{m}$  aus, um möglichst viele Zellen in unversehrtem Zustand zu erhalten und so eine vollständige Analyse der Zellkerne durchführen zu können. Eine weitere Reduzierung der Dicke, wie sie zum Beispiel mit 6  $\mu\text{m}$  für Versuche und Diagnostik häufig angewendet werden, erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass einzelne Zellkerne angeschnitten werden und sie so nur unvollständige Signalinformationen liefern. Thompson und Mitarbeiter haben 1994 gezeigt, dass dünne Gewebeschnitte mit 6  $\mu\text{m}$  im Vergleich zu dickeren Schnitten mit 20  $\mu\text{m}$  keine intakte Zellschicht mehr besitzen (Thompson et al. 1994). Entsprechend zeigten Aubele und Mitarbeiter (1997), dass verschiedene Gewebeschnitt-Dicken unterschiedliche FISH-Ergebnisse liefern (Aubele et al. 1997). Bei ihren Untersuchungen am Prostatakarzinom konnte gezeigt werden, dass die in dickeren Schnitten (15  $\mu\text{m}$ ) auftretenden Amplifikationen bei dünneren Schnitten (5  $\mu\text{m}$ ) übersehen wurden.

Als nächstes konnte mit einer Mischung aus Glycin und BSA sowie einer starken Vorbehandlung durch Pepsin zur Verringerung des die Zellkerne umgebenden Cytoplasmas eine Reduzierung der Autofluoreszenz erreicht werden. Glycin soll Aldehydgruppen in den Gewebesträngen - welche ihren Teil zur Autofluoreszenz beitragen sollen - absättigen.

Inwiefern Glycin-BSA sowie eine starke Vorbehandlung mit Pepsin auch für die Verminderung der Autofluoreszenz anderer neuronal entstandener Gewebe mit normalem oder kanzerogenem Charakter geeignet ist, konnte noch nicht gezeigt werden.

Ferner hat sich herausgestellt, dass bei einer Reduzierung auch die Wahl der Dextransulfat-Konzentration, die bei der Vorbehandlung der BACs und YACs eingesetzt wird, eine wichtige Rolle spielt. In zahlreichen Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass zwar bei hoher Dextransulfat-Konzentration die Vernetzung auf dem Hybridisierungsfeld erhöht wird und so die Sonden leichter an ihre spezifische Stelle auf dem Schnitt gelangen, jedoch eine hohe Dextransulfat-Konzentration auch die Autofluoreszenz steigert.

Je geringer also die Dextransulfat-Konzentration, desto stringenter werden die Bedingungen der Hybridisierung, und desto schwächer werden die Signale; gleichzeitig verringert sich aber auch die Autofluoreszenz. Deshalb ist es wichtig, ein Mittelmaß zwischen akzeptabler Signalintensität und möglichst geringer Autofluoreszenz zu finden.

Abbildung 30 zeigt mit BACs und YACs hybridisierte Zellkerne aus einem 10 µm Gewebeschnitt in verschiedenen Fluoreszenzkanälen. Der Schnitt wurde zunächst nicht vorbehandelt und dann mit den beschriebenen Agenzien behandelt. Das Ergebnis stellt also dar, dass durch eine geeignete Kombination aus angemessener Gewebeschnitt-Dicke, Vorbehandlung mit Glycin-BSA, aggressiver Pepsin-Vorbehandlung (siehe unten) sowie einer geeigneten Wahl der Dextransulfat-Konzentration die Intensität der Autofluoreszenz erheblich reduziert werden kann.

### **4.3.3 Gewebeschnitte und Vorbehandlung**

Bei Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten ist im Vergleich zu Lymphozyten-Präparaten eine sehr intensive Vorbehandlung mit extrem hohem Pepsin-Konzentrationen nötig (30 µl Pepsin auf 1000 µl ddH<sub>2</sub>O im Vergleich zu 15 µl Pepsin auf 50 ml ddH<sub>2</sub>O, dies entspricht einer Erhöhung um das 100-fache). Auch die Zeit der Inkubation wurde bei der Vorbehandlung der Schnitte um das 60-fache erhöht, wobei jedoch der Verdau in bestimmten Abständen unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und etwa alle 20 Minuten eine frische Pepsinlösung zubereitet werden sollte, um eine gleich bleibende Enzymaktivität gewährleisten zu können. Dies zusammen macht eine Schnitt-Vorbehandlung sehr zeitaufwändig und kann zudem nicht pauschal auf weitere Schnitte übertragen werden. Jeder neue Tumor muss individuell auf eine neue Pepsin-Zeit eingestellt werden.

Die unterschiedlichen Vorbehandlungszeiten könnten darauf beruhen, dass neben der individuellen Beschaffenheit jedes Tumors auch die unterschiedlichen und häufig nicht dokumentierten Fixierungszeiten der Gewebeschnitte mittels Formalin beitragen.

Als zusätzliches Problem bezüglich der Pepsin-Vorbehandlung haben sich normale nicht veränderte Zellen, wie sie zum Beispiel als abgegrenzter Bereich bei Patientin TJ vorkamen, herausgestellt. Die Hybridisierungs-Signale waren insgesamt schwächer und schwieriger auszuwerten, als es bei den Tumorzellen desselben Schnittes der Fall war. Man könnte daraus schließen, dass die Kernmembran normaler Zellen andere Charakteristika aufweisen.

Eine solche Stabilität macht die Zellen weniger empfänglich für chemische und mechanische Einflüsse, was eine Penetration der Sonden erschweren könnte.

Neben der intensiven Pepsin-Vorbehandlung hat sich eine Inkubation mit Triton-X 100 als günstig erwiesen. Durch Triton-X 100 als lipophiles Detergenz wird die Zellpermeabilität erhöht. In Experimenten hat sich gezeigt, dass mit einer Triton-X 100 -Vorbehandlung die Signale intensiver werden.

Eine nächste Erweiterung des Protokolls beinhaltet eine bis zu zweistündige Inkubation der Schnitte in 70% Formamid bei Raumtemperatur. Dieser Schritt ist bei dickeren Geweben nötig, um die DNA im Gewebe ausreichend zu denaturieren und so den Sonden zu ermöglichen, an ihre entsprechenden Bindungsstellen im Gewebe zu hybridisieren. Eine solche zusätzliche Formamid-Inkubation wird bei Hybridisierungen auf einzelnen Zellen nicht durchgeführt. Zudem ist die Inkubationszeit der Schnitte in Formamid bei 73°C im Gegensatz zur Denaturierung einzelner Zellen um den Faktor 7,5 erhöht.

#### **4.3.4 Wahl der Sonden**

In dieser Arbeit wurden drei Gewebe verschiedener Patientinnen mit Neuroblastom untersucht. Bei den untersuchten Tumoren handelte es sich um Neuroblastome von Patientin TJ mit einem Tumor in Stadium 4 (Hughes Grad 2) sowie um Patientin HV mit einem Tumor im klinischen Stadium 3 (Hughes Grad 2) und einem Lokal-Rezidiv HV-R derselben Patientin im Sinne eines Stadiums 3.

Für die Analyse obiger Gewebeschnitte wurden an Hand von CGH-Daten (Vandosempele et al. 1998, 2001; Plantaz et al. 2001) und nach persönlicher Rücksprache mit Frank Speleman vier Sonden ausgewählt, die auf Regionen kartieren, welche bei der Beschreibung der Stadien eine wichtige Rolle spielen. Hierbei handelt es sich um Sonden für die Regionen 1p36, 2p24, 11q23 und 17q25.

Neben den ausgewählten Sonden werden in der Literatur noch weitere Regionen beschrieben, die beim Neuroblastom häufig verändert sind; allerdings treten diese Veränderungen zu einem geringeren Prozentsatz auf als die in dieser Arbeit beschriebenen Sonden, zum Beispiel 14q32, 14q23, 3pter und 16q22 (siehe Einleitung).

Generell sollte es möglich sein, bei einem momentan zur Verfügung stehenden 8-Filter-Rad des Mikroskops die Zahl der eingesetzten Sonden bei Einzelmarkierung bis auf sieben (zuzüglich DAPI) zu erhöhen. Allerdings ist die oben beschriebene Autofluoreszenz nicht in allen Kanälen optimal reduziert, so dass bislang noch nicht alle Kanäle zur Verfügung stehen können: starke Autofluoreszenz zeigte sich nach oben beschriebener Reduktion immer noch im DEAC-Kanal (Anregungsmaximum 426 nm, Emissionsmaximum 480 nm). Des Weiteren stellt Cy7 (Anregungsmaximum 755 nm, Emissionsmaximum 778 nm) ebenfalls nicht den Kanal erster Wahl dar, weil sich die Hybridisierungs-Signale in diesem Kanal im Vergleich zu anderen meist als relativ schwach herausstellten und nicht in jedem Versuch intensive Ergebnisse lieferten.

Auch für diese Experimente wurden die Sonden in einer Nicktranslation mit Fluorochromen markiert. Wie bei der Hybridisierung auf Zelllinien erwies sich der Einsatz der Ausgangs-DNA in einem 1:1 Verhältnis aus Alu-PCR und DOP-PCR als am besten, da diese Mischung die intensivsten Ergebnisse lieferte.

Generell ist hinzuzufügen, dass die Signalintensität von BACs und YACs – nicht zuletzt wegen ihrer geringen Größe – im Gegensatz zu Centromer-Sonden nicht sehr hoch ist und es so vieler Vorversuche bei einer Hybridisierung auf Gewebeschnitte bedarf, um ein für eine Auswertung geeignetes Hybridisierungs-Ergebnis zu erlangen.

Bei der Hybridisierung der Sonden auf den Schnitt wurde die doppelte Menge des somit üblichen Hybridisierungs-Ansatzes verwendet, um zu gewährleisten, dass der Schnitt ausreichend mit der Sondenlösung bedeckt ist. Wie im Ergebnisteil gezeigt werden konnte, lag die Hybridisierungs-Effizienz mit diesen beschriebenen Methoden selbst bei der Hybridisierung von BACs und YACs um 90%.

#### **4.3.5 Aufnahme und Dekonvolution**

Die Aufnahme der Zellen in ihrem Gewebeverband erfolgte an Hand von dreidimensionalen Bildstapeln. Ab einer gewissen Dicke ist eine zweidimensionale Aufnahme nicht mehr ausreichend, da Signale außerhalb der Fokusebene auftreten können. Dreidimensionale Bildstapel erfassen die Zellen im Gewebeverband im Ganzen.



Bei Präparaten mit Lymphozyten oder Zelllinien beispielsweise reicht eine zweidimensionale Aufnahme aus, da diese Zellen sehr flach auf dem Objektträger aufliegen und eine Dicke von 5  $\mu\text{m}$  in der Regel nicht überschreiten. Zellen eines dickeren Schnittes sind von ihrem Gewebeverband umgeben, der durch eine zweidimensionale Inspektion nicht mehr analysiert werden kann. Das hat zur Folge, dass die Grenzen der einzelnen Zellkerne nicht eindeutig festgelegt werden können.

Darüber hinaus können auch Signale darunter liegender Zellen in die gewählte fokale Ebene hineinstrahlen und eine eindeutige Untersuchung der eigentlichen zugehörigen Signale unterbinden.

Mittels einer dreidimensionalen Aufnahme von etwa 50 – 70 Bildstapeln im Abstand von 250 nm in Z-Richtung erhält man auch bei dickeren Schnitten eine ausreichende Information über Grenzen sowie über Struktur und Signalverteilung der Zellkerne.

Jeder Bildstapel beinhaltet Informationen der eingesetzten Fluorochrome, die in zweidimensionalen Graustufenbildern dargestellt werden. Diesen wird anschließend eine jeweils andere frei wählbare Pseudo-Farbe zugeordnet. Durch Automatisierung des Aufnahmevorgangs am Zeiss-Mikroskop mittels der Software *Axiovision* (Zeiss) ist es möglich, solche Stapelaufnahmen in etwa 10 bis 12 Minuten durchzuführen.

Die Aufnahme von Bildstapeln über ein Epifluoreszenz-Mikroskop mit anschließender Dekonvolution bietet gegenüber den häufig eingesetzten konfokalen Mikroskopen bedeutende Vorteile. Ein großer Nachteil von konfokalen Mikroskopen ist der hohe Bedarf des Anregungs-Lichtes, das benötigt wird, um ein konfokales Bild zu erzeugen. Dieser hohe Bedarf kann zu einem schnellen Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe führen. Eine normale Ausstattung eines konfokalen Mikroskops ermöglicht über einen Laser die Aufnahme von drei Fluorochromen, normalerweise FITC, Cy3 und Cy5. Für eine Gegenfärbung von Zellen mit DAPI müsste ein weiterer Laser verwendet werden, so dass in der Regel auf eine Färbung mit BRdU zurückgegriffen wird, was aber einen der oben genannten Kanäle benötigt und dieser somit für Sonden ausfällt. Eine Erweiterung des Systems auf weitere Kanäle für den Nachweis einer großen Anzahl verschiedener Fluorochrome, die vom UV bis zum Infrarot-Bereich reichen, ist zudem sehr kostspielig. Insgesamt sind konfokale Systeme im Vergleich zu Epifluoreszenz-Mikroskopen sehr teuer. Aus diesem Grund hat sich die Epifluoreszenz-Mikroskopie mit anschließender Dekonvolution als geeignete Alternative erwiesen (Carrington et al. 1995). Neben der kostengünstigeren Anschaffung ist die dreidimensionale Aufnahme der Bildstapel sehr schnell durchzuführen, so dass die Problematik des Ausbleichens umgangen wird. Außerdem kann auf ein breites Spektrum an Fluorochromen vom UV bis zum Infrarot-Bereich zurückgegriffen werden.

Ein momentaner Nachteil der zurzeit verfügbaren Dekonvolutions-Software stellt die relativ lange Berechnungszeit dar. Je nach Bildgröße beträgt die Berechnung zwei bis sechs Stunden (PC: Pentium 4 1,5GHz, 768MB RAM). Diese Berechnungszeit kann jedoch durch leistungsstärkere Computer erheblich reduziert werden.

Nach der Aufnahme einzelner Bildstapel werden die Zellkerne einer Dekonvolution unterzogen. Die meisten Aufnahmen in einem Bildstapel enthalten auch so genannte „out of focus“ Informationen, die ihren Ursprung außerhalb der fokalen Ebene haben. Dadurch wird eine dreidimensionale Darstellung erschwert (McNally et al. 1999). Durch eine Dekonvolution mittels einer „maximum likelihood image restoration“ Algorithmus (Schaefer et al. 2001) wird durch Rückrechnung und folgender Reduzierung dieser „out of focus“-Information eine eindeutige Zuordnung der Fluoreszenzsignale in den zuvor aufgenommenen Bildstapeln und eine Rekonstruktion der Schichten zu einem ganzen Zellkern ermöglicht. Der Zellkern erscheint nach der Dekonvolution in allen Ebenen scharf und abgegrenzt, die Signale weisen einen stärkeren Kontrast zum Hintergrund auf, und der Hintergrund wird reduziert (siehe zum Beispiel Abbildung 34).

Nach der Dekonvolution ist es mittels der Software *Axiovision 3.1* möglich, eine 3D-Rekonstruktion der Zellkerne vorzunehmen. Durch diese Rekonstruktion können die Zellkerne mit verschiedenen Oberflächen beziehungsweise mit unterschiedlichen „Materialeigenschaften“ ausgestattet werden.

Die für diese Arbeit relevanten Oberflächen waren die Darstellungsformen „Surface“ und „Maximum“. Mittels der Darstellung „Surface“ war es möglich, eine mögliche Rekonstruktion der ursprünglichen Zellkernoberfläche zu erhalten, indem der Zellkern von einer rekonstruierten Außenhaut umgeben wird. Dies half bei der Beurteilung, ob der Zellkern vollständig oder angeschnitten war. Ein angeschnittener Zellkern hätte eine nur unvollständige Analyse der Fluoreszenzsignale bedeutet und so die Ergebnisse verfälscht.

Wie im Ergebnisteil dargestellt wurde, ergab zum Beispiel die Analyse von Zellkernen von TJ aus einem Areal mit normalen Zellen für jede Sonde zwei Signale, was einem normalen Hybridisierungsmuster entspricht. Daraus kann man schließen, dass diese Zellkerne, die mittels der Darstellung „Surface“ vollständig gezeigt werden, tatsächlich nicht angeschnitten sind (siehe Abbildungen 35 bis 37).

In den Abbildungen 35 und 40 sind Zellkerne von verschiedenen Seiten (Drehung in Y-Richtung) gezeigt. Auf der Rückseite der Zellkerne sehen diese eingedellt aus, jedoch entsprechen sie in ihrer Oberflächenstruktur den anderen Seiten.

Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die Zellkerne mit dieser Seite dem Objektträger aufliegen und sie so in eine entsprechende Form gepresst werden könnten.

Die Darstellung „Maximum“ zeigt die DAPI-Färbung des Zellkerns in einer transparenten Ansicht, wodurch die Ausdehnung und Lage der Signale im Zellkern betrachtet werden kann. Den Signalen können frei wählbare Farben zugeordnet werden. Zudem kann gewählt werden, ob die Signale mit oder ohne DAPI-Maske abgebildet werden sollen.

Diese Darstellungsform hat sich zum Beispiel bei der Beurteilung der HSR-Amplifikationen des Primär-Tumors von Patientin HV und dem Lokal-Rezidiv HV-R als nützlich erwiesen. Bei zweidimensionaler Inspektion erschien die Ausdehnung der Amplifikation bei weitem nicht so groß wie sie sich nach dreidimensionaler Betrachtung der Zellkerne in der Darstellung „Maximum“ sowie nach Drehung in verschiedenen Richtungen tatsächlich erwies: die Amplifikationen reichten häufig bis in die Zellkernmitte hinein.

Ein Problem bei Tumorzellen stellt die Heterogenität bei der Morphologie dar. Tumorzellen tendieren häufig dazu, sich im Gegensatz zu normalen nicht veränderten Zellen morphologisch voneinander zu unterscheiden. Zellkerngrenzen können bei hoher Zelldichte oft schlecht bestimmt werden. Dies erschwert bei der dreidimensionalen Inspektion eine eindeutige Zuordnung der Grenzen. In solchen Fällen mussten mittels visueller Inspektion die Ebenen in Z-Richtung einzeln ausgewertet werden. War eine Zuordnung der Grenzen auch dann nicht eindeutig möglich, mussten diese Zellen von einer Beurteilung ausgeschlossen werden, um die Ergebnisse nicht zu verfälschen.

#### **4.3.6 Beurteilung der Ergebnisse**

Insgesamt lieferte die dreidimensionale Aufnahme aller Bildstapel mit anschließender Dekonvolution und Analyse sehr gute und reproduzierbare Ergebnisse. Die Anwendbarkeit der entwickelten Protokolle wurde an Hand der Aufnahme und Auswertung von über 800 Zellkernen getestet.

Für die Schnitte wurden von jedem Zelltyp je 100 Zellkerne analysiert. Die Signale der 100 Zellkerne wurden für die einzelnen Kanal gezählt und statistisch ausgewertet. Die Auswertung hat ergeben, dass 100 Zellkerne statistisch signifikant sind und so eventuell mögliche Fehler durch die visuelle Inspektion vernachlässigt werden können.

---

Bei der Analyse des Rezidivs HV-R fiel auf, dass im Gewebeschnitt sowohl Tumorzellen mit einer Amplifikation in Form von HSRs (MYCN) sowie 17q25-Amplifikationen vorhanden waren, daneben aber Zellen zu beobachten waren, die keine HSR-Amplifikationen zeigten. In diesen Zellen waren außerdem auch die anderen Sonden mehr oder weniger unverändert, wie es bei normalen Zellen zu erwarten wäre. Das Verhältnis Tumorzellen zu normalen nicht veränderten Zellen wurde auf 85:15 geschätzt (ohne Abbildung).

Es stellt sich hierbei die Frage, ob es sich bei diesen „normalen“ Zellen zum Beispiel um eingewanderte Lymphozyten handelt, die durch spezifische Immunabwehr den Tumor bekämpfen. Es könnte sich auch um normale Stromazellen handeln, wie sie in der Shimada-Klassifikation (Shimada et al. 1999) genannt werden, oder um einen Tumorklon, der noch nicht die sonst üblichen zytogenetischen Veränderungen zeigt.

Man könnte diese Fragestellung klären, indem man die Gewebeschnitte in zukünftigen Experimenten mit zusätzlichen Neuroblastom-spezifischen Oberflächenmarkern oder in diesem speziellen Fall mit Lymphozyten-spezifischen Oberflächenmarkern analysiert. Für Neuroblastom-spezifische Oberflächenmarker wurde bislang der Anti-G(D2)-Antikörper ch14.18 beschrieben. G(D2) ist ein Gangliosid, welches sowohl auf ruhenden als auch auf proliferierenden Neuroblastomzellen exprimiert wird. Allerdings scheint dieser Antikörper nicht für Paraffinschnitte geeignet zu sein (persönliche Mitteilung Peter Ambros, Wien). Ein weiterer Marker MAB2052 wird von der Firma *Chemicon* angeboten. Dieser wurde jedoch nur bei Gefrierschnitten angewendet; für Paraffinschnitte liegen bislang aber keine Erfahrungswerte vor (persönliche Mitteilung der Firma *Chemicon*).

Oberflächenmarker reichern sich auf der Zelloberfläche an. Deshalb stellt sich die Frage, inwieweit diese nach der beschriebenen aggressiven Vorbehandlung noch nachweisbar sind.

Falls diese nachweisbar wären, ist nicht klar, ob eine simultane Hybridisierung von Oberflächenmarkern und Sonden möglich ist.

Eine Strategie wäre die Hybridisierung der Oberflächenmarker auf den Gewebeschnitt mit einer anschließenden automatisierten Zellkernsuche mit der Software „*Metafer*“ der Firma Metasystems. Diese Software erlaubt eine automatisierte Suche von mittels Oberflächenmarkern gefärbten Zellkernen und gleichzeitiger Dokumentation der Koordinaten. Es ist aber nicht abzuschätzen, inwieweit die durch die unbehandelten Schnitte auftretende Autofluoreszenz die Zellkern-Suche beeinflusst und ob überhaupt die Oberflächenmarker, die ja auch an Fluoreszenzfarbstoffe gebunden sind, die Autofluoreszenz überstrahlen.

Nach dieser automatischen Dokumentation müsste der Schnitt der oben beschriebenen intensiven Vorbehandlung unterzogen und die Sonden hybridisiert werden.

Die zuvor gespeicherten Koordinaten würden bei anschließender Mikroskopaufnahme das Wiederfinden der gesuchten Zellkerne ermöglichen. Hierbei ist nicht klar, ob die Zellkerne durch die Vorbehandlung ihre Struktur so verändert haben, dass eine Wiedererkennung noch möglich ist, da ja davon auszugehen ist, dass die zuvor hybridisierten Oberflächenmarker nicht mehr vorhanden sind und so nicht mehr zum Wiederfinden der Zellkerne beitragen können.

Hinsichtlich der Veränderungen der einzelnen untersuchten Tumoren fielen einige Besonderheiten auf. MYCN-Amplifikationen treten wie in der Einleitung beschrieben in Form von double minute Chromosomen (dmin) oder homogenous staining regions (HSRs) auf. HSRs werden in Form von großen gefärbten Bereichen im Zellkern sichtbar, die an Zellkerndomänen erinnern (Cremer et al. 1996, Solovei et al. 2000). Um beide Formen der Amplifikation zu bestätigen, könnte man mittels aus demselben Tumor extrahierter DNA eine CGH durchführen. Beim Neuroblastom wurden in anderen Zusammenhängen in zahlreichen Veröffentlichungen CGHs durchgeführt und deren Anwendbarkeit dargestellt (zum Beispiel Brinkschmidt et al. 2001, Vetterranta et al. 2001, Iehara et al. 2002).

In diesem Fall könnte die CGH nicht nur einen Gewinn von MYCN nachweisen, sondern auch Amplifikationen oder Verluste anderer Regionen-spezifischer Veränderungen aufzeigen. Dies hätte den Vorteil, dass in einer nachfolgenden Analyse auf individuelle numerische Veränderungen jedes Tumors eingegangen werden könnte.

Als weitere neuere molekularzytogenetische Strategien zum Nachweis von Über-/ oder Unterrepräsentierungen wären zum Beispiel Microarray-Analysen mit isolierter DNA (→ Veränderungen der DNA-Kopienzahl) oder RNA (→ Veränderungen der Expressionsmuster der Gene) möglich. Diese zeichnen sich durch ein hohes Auflösungsvermögen aus. Bei einer Microarray-Analyse wird anstatt auf Metaphase-Chromosomen, wie sie bei einer CGH verwendet wird, auf zahlreiche kartierte DNA-Sequenzen, die auf einen Objektträger aufgebracht sind, hybridisiert (Solinas-Toldo et al. 1997, Pinkel et al. 1998).

Alternativ wäre zum Beispiel auch eine CESH (*comparative expressed sequence hybridization*, Lu et al. 2001) -Analyse denkbar. Die CESH gibt einen genomweiten Überblick relativer Expressionsmuster eines bestimmten Gewebes; die Expressionsverteilungen werden mittels eines normalen Hybridisierungs-Verfahrens auf Chromosomen nachgewiesen und ausgewertet. Dadurch kann die Über-/ oder Unterexpression von Genen gezeigt werden, ohne die Sequenzen der entsprechenden Gene kennen zu müssen. Das Auflösungsvermögen von CESH ist ähnlich wie bei der CGH.

HV-R ist ein Rezidiv des Primär-Tumors von Patientin HV. Vergleicht man die Ergebnisse der beiden Tumoren miteinander, fällt auf, dass bei HV im Gegensatz zu HV-R keine Zellen mit einem einer normalen Zelle entsprechenden Hybridisierungsmuster beobachtet werden konnten. Wie bereits beschrieben, kann ohne weitere Experimente nicht festgelegt werden, um welchen Zelltyp es sich bei den nicht veränderten Zellen von HV-R handelt.

Zum anderen fällt auf, dass HV im Gegensatz zu HV-R viel mehr 17q25-Amplifikationen hat: der Mittelwert der 17q-Signale liegt bei HV bei 4,96 und bei HV-R bei 3,83.

Des Weiteren ist es nicht leicht, an Hand von Interphase-Zytogenetik den Ploidiegrad der Tumoren zu beurteilen; die Beurteilung der Veränderungen wie Amplifikationen und Deletionen hängt jedoch stark von der Ploidie ab (siehe Kapitel 4.3.7).

Mit Einsatz der ausgewählten vier Neuroblastom-spezifischen Sonden konnten wichtige Veränderungen der verschiedenen Tumoren eindeutig nachgewiesen werden. Die in dieser Arbeit beschriebene Methode zur Hybridisierung von BACs und YACs auf Gewebeschnitte stellt so eine neue und reproduzierbare Methode zur Charakterisierung von Tumoren für retrospektive und prospektive Studien dar.

#### **4.3.7 Korrelation von Zytogenetik und klinischen Daten**

Auf den folgenden Seiten wird ein Überblick über die zytogenetischen Ergebnisse im Vergleich zu den klinischen Befunden gegeben. Obwohl die zytogenetischen Ergebnisse auf einer Analyse von nur 100 Zellkernen basieren, zeigen die zytogenetischen und klinischen Befunde sehr gute Übereinstimmungen.

Beim Neuroblastom der Patientin TJ (INSS Stadium 4, Hughes Grad 2) kann auf Grund des Vergleichs der Auswertung nicht veränderter Zellen und Tumorzellen davon ausgegangen werden, dass die Tumorzellen mit hoher Wahrscheinlichkeit diploid sind. Unter Berücksichtigung der Tabellen 51 und 52 resultiert daraus ein Verlust von 1p36 in Assoziation mit einer Amplifikation von 2p24 (MYCN), keine Veränderung von 17q25 sowie ebenfalls keine Veränderung von 11q23.

Der Tumor von TJ lässt sich nicht in eine der drei zytogenetischen Typen nach Brodeur einteilen (siehe Tabelle 2), da diese Kombination der genetischen Veränderungen nicht vorgesehen ist. Am ehesten entspricht das Ergebnis einem Typ 3 Tumor und stimmt dann mit dem klinisch festgelegten INSS Stadium 4 überein.

Bei HV wurden ein Primärtumor und ein Lokal-Rezidiv (HV-R) zytogenetisch untersucht. Aus der folgenden Tabelle und unter Berücksichtigung des klinisch festgelegten Stadiums 3 (keine Fernmetastasen) sowie der zytogenetischen Einteilung (Tabelle 2) des Neuroblastoms wird ersichtlich, dass es sich beim Primärtumor von HV entweder um einen diploiden oder um einen tetraploiden Tumor handeln muss. Es kann sich nicht um einen triploiden Tumor handeln, da dieser nur bei Tumoren in Stadium 1, 2 und 4s auftritt.

Tabelle 60 zeigt die Konsequenzen von zwei verschiedenen angenommenen Ploidien und stellt eine Zusammenfassung von Tabelle 53 im Ergebnisteil dar (Ergebnis von 100 ausgewerteten Tumorzellen).

spezifische Regionen	Annahme: Diploidie	Annahme: Tetraploidie
1p36	Verlust: 19% ≤ 1 Keine Veränderung: 65% Gewinn: 16% ≥ 3	Verlust: 100% ≤ 3
17q25	Verlust: 1% Keine Veränderung: 6% Gewinn: 93% ≥ 3	Verlust: 16% ≤ 3 Keine Veränderung: 22% Gewinn: 62% ≥ 5
2p24 (MYCN) HSR	kein HSR 5%, 1 HSR 55%, 2 HSR 23%, 3 HSR 4%	kein HSR 5%, 1 HSR 55%, 2 HSR 23%, 3 HSR 4%
2p24 (MYCN) zusätzliche Signale	Keine zusätzliche Signale in 13%, 1 in 42%, 2 in 30%, 3 in 11%, 4 in 4%	Keine zusätzliche Signale in 13%, 1 in 42%, 2 in 30%, 3 in 11%, 4 in 4%
11q23	Verlust: 9% ≤ 1 Keine Veränderung: 21% Gewinn: 70% ≥ 3	Verlust: 89% ≤ 3 Keine Veränderung: 10% Gewinn: 1% ≥ 5

Tabelle 60: Signalverteilung bei HV bei angenommener Diploidie und Tetraploidie.

Bei Annahme eines diploiden Tumors besteht bei 1p36 in 65% keine Veränderung. MYCN ist in Form von HSRs amplifiziert, und 17q25 zeigt in 93% einen Gewinn. Da eine MYCN-Amplifikation meist mit einem Verlust von 1p36 einhergeht, ist hier eine Diploidie wohl eher unwahrscheinlich.

Von Tetraploidie ausgehend, ergibt sich daraus in 100% der ausgewerteten Zellen ein Verlust von 1p36, assoziiert mit einer MYCN-Amplifikation in Form von HSRs und in 62% ein Gewinn von 17q25.

Wie in der Einleitung in den Kapiteln 1.1.4 und 1.1.5 ausführlich erläutert wurde, bedeutet ein Gewinn von 17q sowie eine Assoziation von 1p Verlust, MYCN-Amplifikation und Gewinn von 17q eine ungünstige Prognose. Auf der anderen Seite kann allein an Hand des BACs für 17q25 nicht auf einen Gewinn von Chromosomenteilen geschlossen werden, da die Sonde ja nur einen kleinen Bereich des Chromosoms abdeckt. Um dies zu klären, könnte man zum Beispiel zusätzlich eine Kontrollsonde, wie sie bei den Zelllinien verwendet wurde (17p12), hybridisieren. Als anderer Ansatz wäre eine CGH denkbar.

Bei diesem Tumor kommt in 89% noch ein Verlust von 11q23 hinzu, was laut Literatur als unabhängiger ungünstiger prognostischer Faktor gilt (siehe Einleitung) und so den klinisch ungünstigen Verlauf an Hand der zytogenetischen Daten bestätigen könnte.

Der klinische Befund der Patientin HV (INSS Stadium 3, Hughes Grad 2) hat nach protokollgemäßer Behandlung mit Chemotherapie (GPOH Protokoll NB97) eine fraglich komplette Remission ergeben: in der Bildgebung war noch ein kleiner verkalkter Geweberest zu erkennen. Passend zur ungünstigen Prognose bei MYCN-Amplifikationen im Stadium 3 traten 1 Jahr nach Erstdiagnose ein erstes und inzwischen ein zweites und drittes Lokal-Rezidiv auf.

Vergleicht man die Ergebnisse in Kapitel 3.2.6 mit der zytogenetischen Einteilung des Neuroblastoms durch Brodeur (Tabelle 2), kann man bei kombinierter 1p Deletion, MYCN-Amplifikation und 17q Gewinn auf einen Typ 3 Tumor schließen, was dem INSS Stadium 4 entspricht. Klinisch wurde der Tumor wegen fehlender Fernmetastasen auf ein Stadium 3 festgelegt. Bei INSS Stadium 3 sollte es sich nach der Aufteilung von Brodeur um ein Typ 2 Neuroblastom handeln mit einer 1p Deletion, aber keiner MYCN-Amplifikation sowie keiner Veränderung von 17q. Somit besteht eine Diskrepanz zwischen klinischer- und zytogenetischer Dateneinteilung.



Bei der Probe HV-R handelt es sich um ein Lokal-Rezidiv des Primärtumors von HV im Sinne eines Stadiums 3 (Hughes Grad 3). Aus den Daten dieser Arbeit und unter Berücksichtigung des Stadiums sowie der zytogenetischen Einteilung (siehe Tabelle 2) des Neuroblastoms wird ersichtlich, dass bei diesem Tumor Diploidie oder Tetraploidie möglich ist. Es kann sich auch hierbei nicht um Triploidie handeln, da diese nur bei Tumoren in Stadium 1, 2 und 4s auftritt.

Die folgende Tabelle zeigt einen Vergleich zwischen angenommener Diploidie und angenommener Tetraploidie und stellt eine Zusammenfassung von Tabelle 56 im Ergebnisteil dar (Ergebnis von 100 ausgewerteten Tumorzellen).

spezifische Regionen	Annahme: Diploidie	Annahme: Tetraploidie
1p36	Verlust: 11% ≤ 1 Keine Veränderung: 85% Gewinn: 4% ≥ 3	Verlust: 100% ≤ 3
17q25	Verlust: 3% ≤ 1 Keine Veränderung: 4% Gewinn: 93% ≥ 3	Verlust: 18% ≤ 3 Keine Veränderung: 72% Gewinn: 10% ≥ 5
2p24 (MYCN) HSR	In 64% 1 HSR, 35% 2 HSR, 1% 3 HSR	In 64% 1 HSR, 35% 2 HSR, 1% 3 HSR
2p24 (MYCN) zusätzliche Signale	In 33% kein zusätzliches Signal, 31% 1 Signal, 38% 2 Signale, 8% 3 Signale	In 33% kein zusätzliches Signal, 31% 1 Signal, 38% 2 Signale, 8% 3 Signale
11q23	Verlust: 3% ≤ 1 Keine Veränderung: 16% Gewinn: 81% ≥ 3	Verlust: 94% ≤ 3 Keine Veränderung: 4%

Tabelle 61: Signalverteilung von HV-R bei angenommener Diploidie und Tetraploidie.

Wie aus obiger Tabelle ersichtlich wird, ist bei einer angenommenen Diploidie 1p36 in 85% nicht verändert, MYCN ist in Form von HSRs amplifiziert, und in 93% besteht ein Gewinn von 17q25. Da jedoch, wie in der Einleitung erläutert wurde, eine MYCN-Amplifikation meist mit einem 1p Verlust assoziiert ist, ist auch bei dem Rezidiv Diploidie wohl eher unwahrscheinlich. Bei einem tetraploiden Tumor ist in 100% der ausgewerteten Zellen assoziiert mit einem Verlust von 1p36, einer Amplifikation von 2p24 in Form von HSRs und in 10% einem Gewinn von 17q25.

Da bei angenommener Tetraploidie in 72% keine Veränderung von 17q25 vorkommt, könnte man an Hand der Literaturdaten (siehe Einleitung) daraus schließen, dass bei einem nicht veränderten 17q von einer eher günstigeren Prognose ausgegangen werden kann. Jedoch ist bei angenommener Tetraploidie in 94% ein Verlust von 11q23 zu beobachten. Hierbei diskutiert man einen Verlust in 11q23 als einen ungünstigen prognostischen Faktor, der unabhängig von einer MYCN-Amplifikation ist (siehe Kapitel 1.1.4.2). Somit könnte man allein auf Grund eines 11q23 Verlustes wieder auf eine eher ungünstigere Prognose schließen.

Bislang wurde die Patientin operativ sowie mit Chemotherapie und externer Radiotherapie behandelt. Ein drittes Rezidiv ist aktuell in partieller Remission.

### 4.3.8 Prognostische Modelle

Versuche, prognostische Modelle für das Neuroblastom zu finden, gibt es viele. Zum Beispiel schlagen Lastowska und Mitarbeiter (Lastowska et al. 2001) ein Modell vor, das spezifische genetische Veränderungen mit morphologischen und klinischen Erkenntnissen vereint. Durch Analyse von 96 Tumoren werden Neuroblastome in 4 verschiedene Gruppen eingeteilt, wobei sie annehmen, dass es sich bei einem Gewinn in 17q möglicherweise um den stärksten prognostischen Faktor handelt. Diese Einteilung ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

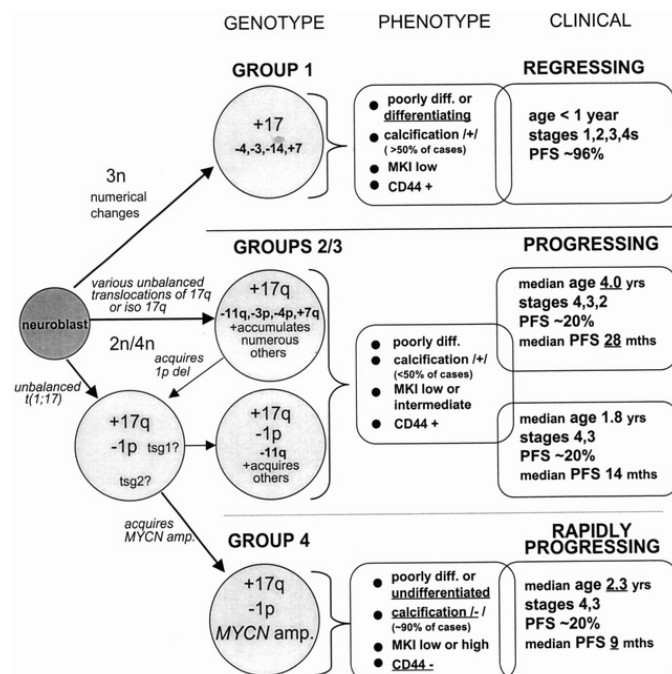


Abbildung 57: Charakteristika von Neuroblastomen nach genetischen, morphologischen und klinischen Gesichtspunkten (Lastowska et al. 2001).

Zusammenfassend geht aus obiger Abbildung hervor, dass Tumoren der Gruppe 1 neben numerischen Veränderungen inklusive einem Gewinn von Chromosom 17 durch Triploidie und klinische Merkmale, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll, charakterisiert sind (entspricht INSS Stadien 1, 2, 4s beziehungsweise Typ1 nach Brodeur; günstiger Verlauf).

Gruppe 2/3 ist gekennzeichnet durch eine große Anzahl von strukturellen Veränderungen, wobei bei Gruppe 3 ein Gewinn von 17q assoziiert ist mit einem Verlust in 1p sowie einem häufigen Verlust von 11q. Beide Gruppen entsprechen einem Typ 2 Neuroblastom nach Brodeur (Gruppe 2 entspricht INSS Stadium 2,3 und 4, Gruppe 3 entspricht INSS Stadium 3 und 4; schlechte Prognose).

Gruppe 4 (entspricht Brodeurs Typ 3 Neuroblastom) ist charakterisiert durch das Fehlen einer 11q Deletion, einer Kombination aus MYCN-Amplifikation, 1p Verlust und 17q Gewinn (entspricht INSS Stadien 3 und 4, schlechte Prognose). Auch hier soll nicht näher auf die morphologischen Veränderungen eingegangen werden.

In obiges Modell kann das Neuroblastom von TJ nicht eingeteilt werden, da die Kombination 1p Verlust, MYCN-Amplifikation und eine fehlende 17q Überrepräsentierung nicht vorgesehen ist. Auch Brodeur bezieht einen Gewinn von 17q in seine Einteilungen mit ein.

Die Diskrepanz zwischen zytogenetischer und klinischer Einteilung bei HV legt nahe, dass die derzeit verwendeten Einteilungsverfahren ihre Limitierungen haben. Ein Ansatz, der – wie hier beschrieben – auf Einzelzellanalysen beruht, kann bei größeren Patientenzahlen vielleicht zu einer Verbesserung der Einteilung führen. Deshalb wäre es wichtig und zukünftig wünschenswert, noch zusätzliche Neuroblastom-Gewebeschnitte mit Interphase-FISH zu untersuchen und mit den klinischen Daten zu vergleichen. Mit weiteren Daten wird es möglich sein, zytogenetische Einteilungen, wie sie hier vorgestellt wurden, zu verfeinern und so eine bessere Klassifizierung der Tumoren vornehmen zu können.

## 4.4 Maus 7 Fluorochrom M-FISH

### 4.4.1 Allgemeines

Wie zu Beginn dieser Arbeit erläutert wurde, ähneln sich die 40 Maus-Chromosomen in ihrer Morphologie und Struktur. Dies erschwert die Identifizierung der einzelnen Chromosomen und erfordert ein geschultes Personal, um mit Hilfe der G-Banden-Technik Veränderungen zu erkennen.

M-FISH erlaubt eine einfache, schnelle und objektive Identifizierung chromosomaler Veränderungen. Mit Maus M-FISH ist es möglich, 21 chromosomenspezifische DNA-Bibliotheken simultan auf Maus-Chromosomen zu hybridisieren und alle Maus-Chromosomen zu karyotypisieren. Der Vorteil von M-FISH liegt in dem geringen zeitlichen Aufwand, der eindeutigen Ergebnisse und der breiten Anwendungsmöglichkeit, welche auch von einem weniger geschulten Personal durchgeführt werden kann.

Eine erfolgreiche M-FISH Hybridisierung ist von mehreren Faktoren wie dem Grad der Chromosomen-Kondensation, der Qualität der DNA-Sonden und der Zusammensetzung der Fluorochrome der einzelnen Chromosomen abhängig. Der Einfluss des Kondensationsgrades auf die Identifizierung kleiner struktureller Aberrationen wurde im Labor intensiv an menschlichen Chromosomen getestet (Uhrig et al. 1999). Zudem kann auch die Wahl der Fluorochrome unter Umständen zu nicht eindeutigen Ergebnissen führen; ein Chromosom kann in den einzelnen Kanälen je nach Fluorochrom unterschiedlich groß erscheinen. Das liegt daran, dass bei einem indirekten Nachweis über Antikörper mehr Fluorochrome binden, als sie bei direkt verwendeten Fluorochromen eingebaut werden. Aus diesem Grund strahlen indirekt markierte Sonden intensiver und wirken etwas größer. Generell haben Fluorochrome die physikalische Eigenschaft, über ihren eigenen Zielbereich und somit auch in einen Nachbarbereich auszustrahlen. Dies könnte daran liegen, dass bei der Denaturierung der Chromosomenpräparate DNA-Loops gelockert werden. Dadurch können Artefakte an den Rändern der Chromosomen und an den Bruchpunkten zwischen translozierten Chromosomen entstehen.

Betrachtet man die im Ergebnisteil vorgestellten Karyotypen, fällt auf, dass die Centromere häufig unterschiedliche Farben erhalten, welche nicht der Klassifizierungsfarbe des restlichen Chromosoms entsprechen. Centromere bestehen aus repetitiven Sequenzen (Satelliten-DNA; Boyle et al. 1990, Garagna et al. 2002), die bei der Hybridisierung durch Zugabe von Cot-1 DNA supprimiert werden.

In einer persönlichen Mitteilung von Nigel Carter heißt es, dass *durch die Wahl des 6A1 DOP-Primers* (im Vergleich zum konventionell verwendeten 6MW-Primer) *die Anzahl der Kreuzhybridisierungen gesenkt wird*. Durch den 6A1-Primer könnte die Amplifikation der repetitiven Sequenzen gesenkt werden. Durch die Supprimierung der Centromer-spezifischen Sequenzen weisen die Centromere keine Hybridisierungs-Signale auf. Die Centromere liegen innerhalb der DAPI-Segmentierungsmaske, und die Software MCK versucht jedem Pixel innerhalb dieser Segmentierungsmaske eine Farbe zuzuordnen. Auf Grund der schwachen Fluoreszenzintensitäten im Centromerbereich ist das Resultat eine eher „zufällige“ Klassifikation. Dies könnte verhindert werden, wenn im Bildverarbeitungsprozess ein Schwellwert definiert wird.

#### 4.4.2 Auflösungsvermögen von 7 Fluorochrom M-FISH

In dieser Arbeit wurde die Zahl der für M-FISH eingesetzten Fluorochrome von fünf auf sieben erhöht. Durch die Erhöhung der Fluorochrome erhält jedes Chromosom die gleiche Anzahl an Fluorochromen, in diesem Fall je zwei.

Die folgende Abbildung zeigt einen Vergleich zwischen den beiden Klassifizierungsschemen für 5 Fluorochrom M-FISH und 7 Fluorochrom M-FISH der Maus. Hieraus wird ersichtlich, dass die Chromosomen bei 7 Fluorochrom M-FISH alle mit je zwei Fluorochromen kombinatorisch markiert sind und somit Chromosomen, die mit nur einem oder drei Chromosomen markiert sind, wegfallen.

Name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	X	Y	
Colour																						
SpectrumGr			X			X		X			X	X	X		X				X	X		
Cy3	X	X		X					X		X	X				X				X		X
Cy3.5		X				X	X	X	X	X	X		X						X			
Cy5	X				X					X		X					X				X	X
Cy5.5	X	X				X	X							X	X	X	X					

**A**

Name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	X	Y	
Colour																						
SC8			X		X					X	X			X						X		X
FITC			X					X					X		X					X	X	
Cy3				X					X	X		X				X				X		
Cy3.5	X	X				X						X	X									X
Cy5	X			X	X												X	X			X	
Cy5.5						X	X	X	X		X							X				
Cy7		X					X							X	X	X	X					

**B**

Abbildung 58: Vergleich zwischen 5 Fluorochrom M-FISH (A) und 7 Fluorochrom M-FISH (B) der Maus. SpectrumGr = FITC, SC8 = DEAC.

Durch Erhöhung der Fluorochromzahl auf sieben wird die Probenkomplexität gesenkt und gleichzeitig die Reproduzierbarkeit erhöht. Dies hat zum einen den Vorteil, dass auch eine schlechtere Metaphasenqualität noch auswertbare Hybridisierungs-Ergebnisse liefert.

Zum anderen wird durch Verringerung der Probenkomplexität im Vergleich zu 5 Fluorochrom M-FISH die Gefahr der Artefaktbildung vermindert.

Zudem hat der Einsatz von mehr Fluorochromen zur Folge, dass bei einer auftretenden einfachen Translokation sich die beiden involvierten Chromosomen stets in mindestens einem Fluorochrom voneinander unterscheiden.

Wie die folgende Abbildung zeigt, entfällt bei 7 Fluorochrom M-FISH die Situation, dass eine kleinere Translokation eventuell übersehen wird, wenn das involvierte Chromosom mit einem gleichen Chromosom markiert ist wie das translozierte Segment (Typ 3 Farbkombination; siehe auch Einleitung Kapitel 1.3).





A	B	Signalerkennung		Frequenz (%)	
		visuell	auto	5f	7f
				12,6	0

Abbildung 59: Typ 3 Farbkombination.

„visuell“ = Erkennung der Veränderungen mittels visueller Inspektion.

„auto“ = Automatische Klassifizierung mittels der Klassifizierungs-Software.

Wie in der Einleitung beschrieben, liegt das Auflösungsvermögen von 7 Fluorochrom M-FISH beim Menschen zwischen 320 kb und 2,6 Mb (PAR1: Xp22.3, Größe: 2,6 Mb; PAR2: Xq28, Größe 320 kb).

Analysen von Perry und Mitarbeiter (2001) nehmen an, dass die erste pseudoautosomale Region der Maus eine Größe zwischen 700 und 720 kb haben muss und somit weitaus kleiner ist als die erste pseudoautosomale Region des Menschen (Perry et al. 2001). Da diese pseudoautosomale Region bei der hier vorgestellten Analyse der Maus-Metaphasen nie gesehen wurde, kann man in Kombination mit der angenommenen Auflösung von 7 Fluorochrom M-FISH des Menschen daraus schließen, dass das Auflösungsvermögen von Maus 7 Fluorochrom M-FISH zwischen 700 kb und 2,6 Mb liegen muss.

In dieser Arbeit konnte der eindeutige Nachweis mehrerer nicht-reziproker Translokationen sowie einige im Auflösungsvermögen von M-FISH liegende Deletionen bei zwei Mamma-CA Zelllinien der Maus gezeigt werden. Da es sich bei den Translokationen um Bruchstücke handelt, die eine Größe von 700 kb bis 2,6 Mb sicherlich überschreiten, ist es schwierig, mit absoluter Sicherheit zu sagen, dass das angenommene Auflösungsvermögen tatsächlich in diesem Bereich liegt. Leider konnte bislang mit 7 Fluorochrom M-FISH keine zusätzliche Translokation nachgewiesen werden, die mittels 5 Fluorochrom M-FISH nicht entdeckt worden war.

Es sollte in dieser Arbeit auch vielmehr Aufgabe sein, ein Maus 7 Fluorochrom M-FISH-System zu entwickeln, welches sich durch eine stabile und eindeutige Hybridisierbarkeit auszeichnet, so dass es für zahlreiche zukünftige Anwendungen zur Verfügung steht.

Mit 5 Fluorochrom M-FISH wurde mittels Blindstudien bereits gezeigt, dass Translokationen nachgewiesen werden konnten, welche mit der G-Banden Technik übersehen worden waren (Jentsch et al. 2001). Durch Erhöhung der Fluorochromzahl von fünf auf sieben kann es nun möglich sein, die Probenkomplexität zu senken und so die Auflösung zu erhöhen. Dies kann in Zukunft eine noch genauere Analyse chromosomaler Veränderungen zur Folge haben.

5 Fluorochrom M-FISH wird zur Zeit von der Firma Metasystems auf seine Kommerzialisierbarkeit getestet und soll in naher Zukunft auf die hier beschriebenen sieben Fluorochrome erweitert werden. Hinzuzufügen sei in diesem Zusammenhang, dass bei vergangenen Hybridisierungen mit 5 Fluorochrom M-FISH manchmal eine Fehlklassifizierung auf Grund nicht eindeutiger Fluoreszenzsignale vorkam. Diese mussten dann per Hand „nachsortiert“ werden.

Mittels 7 Fluorochrom M-FISH hingegen wurden die Chromsomen *aller* bislang untersuchten Metaphasen stets eindeutig und ohne Fehler mit dem Klassifizierungsprogramm *MCK* karyotypisiert.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In dieser Arbeit wurden neue molekularzytogenetische Verfahren für die Tumordiagnostik entwickelt.

Für die Untersuchung von Neuroblastom-Zelllinien wurde ein kombinatorisch markierter und aus mehreren spezifischen Sonden zusammengesetzter Pool entwickelt. Für die Analysen wurden BAC-/ und YAC-Sonden für die Regionen 1p36, 2p24 MYCN, 11q23 und 17q25 sowie für die Regionen 1q12, 11p15 und 17p12 als Kontrolle ausgewählt. Diese Sonden wurden kombinatorisch mit je zwei Fluorochromen markiert (Digoxigenin-FITC, Cy3, Biotin-Cy3.5, Cy5, DNP-Cy5.5). Durch diese Markierung entstand ein 7-Farben-Ansatz, welcher zunächst zur Überprüfung der Hybridisierungs-Effizienz auf 46,XY-Lymphozyten hybridisiert wurde, wobei hierfür die einzelnen Fluoreszenz-Kanäle von 100 Zellkernen ausgewertet wurden. Des Weiteren standen die Neuroblastom-Zelllinien Nb90.9, TR-14 und SKN-BE zur Verfügung; von diesen wurden ebenfalls je 100 Zellkerne aufgenommen und analysiert.

In anderen Experimenten wurden spezifische BACs und YACs für die Regionen 1p36, 2p24 MYCN, 11q23 und 17q25 auf Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete Gewebeschnitte von Neuroblastom-Patientinnen hybridisiert, wobei hier die Sonden mit jeweils einem Fluorochrom markiert (Digoxigenin-FITC, Cy3, Texas Red, Biotin-Cy5) wurden.

Außerdem wurde ein Sondensatz aus Centromer-spezifischen Sonden für die Centromere 8, 11, 17 und 18 zusammengestellt, um sowohl die generelle Hybridisierbarkeit der Gewebeschnitte zu überprüfen, als auch zu klären, ob die in den Experimenten verwendete Schnittdicke von 10 µm für eine Analyse vollständiger (nicht angeschnittener) Zellkerne ausreicht.

Des Weiteren wurde ein spezielles Protokoll entwickelt, um die für Neuroblastom-Gewebeschnitte typische Autofluoreszenz, welche eine Auswertbarkeit von Fluoreszenzsignalen erheblich beeinträchtigen kann, zu reduzieren.

Nach Hybridisierung und Aufnahme von 50-70 Bildstapeln wurden die aufgenommenen Zellkerne zur Verbesserung der Bildqualität und zur Reduzierung der außerhalb der Fokusebene liegenden Informationen einer Dekonvolution unterzogen. Je Schnitt und Zelltyp wurden jeweils 100 Zellkerne ausgewertet und auf ihre Korrelierung mit den klinischen Daten überprüft.



Es konnte gezeigt werden, dass bei den Analysen der Gewebeschnitte die zytogenetischen Ergebnisse eine sehr gute Ergänzung zu den klinischen Daten darstellen, so dass sie auch in Zukunft für eine Erweiterung der klinischen Befunde geeignet sein könnten.

Bezüglich weiterer Analysen von Neuroblastom-Patienten wäre es also wünschenswert, neben konventioneller Neuroblastom-Diagnostik, wie sie zum Beispiel mittels Untersuchung von Katecholamin-Metaboliten in Serum und Urin, NSE, LDH, Ferritin und Southern Blot-Analysen von MYCN in der Klinik eingesetzt wird, auch die in dieser Arbeit vorgestellte kombinatorische Hybridisierung spezifischer Sonden für prospektive und retrospektive Sonden mit einbeziehen zu können. So wäre zum Beispiel ein besserer Einblick in Behandlungsstrategie und Versorgung des Patienten denkbar.

Demnächst soll sowohl für die Hybridisierung auf Neuroblastom-Zelllinien als auch auf Neuroblastom-Gewebeschnitte die Probenanzahl durch weitere Neuroblastom-spezifische Sonden (zum Beispiel für die Regionen 14q23-qter, 14q32, 3pter, 16q22-q24) erhöht werden, um einen noch exakteren Einblick in Charakteristik und Veränderung von Neuroblastomen zu erlangen. An Strategien, den Sondensatz mit weiteren Neuroblastom-spezifischen Sonden (siehe Einleitung) zu erhöhen, wird derzeit gearbeitet.

Zudem könnte es sinnvoll sein, die Schnittdicke der Gewebe zu erhöhen, um eine noch komplexere Struktur des Tumors aufrechterhalten zu können.

Ebenso wird eine kombinatorische Markierung von Neuroblastom-spezifischen Sonden und spezifischen Oberflächenmarkern sinnvoll sein. Dies wird ermöglichen, Neuroblastom-Zellen von normalen nicht entarteten Zellen eindeutig zu unterscheiden. Als Weiteres wäre eine gleichzeitige zytogenetische Untersuchung mittels CGH denkbar, um Amplifikationen und Deletionen parallel zu oben beschriebenen FISH-Analysen nachweisen zu können.

Eine der zukünftigen Herausforderungen wird es sicherlich auch sein, Ergebnisse der Genexpression mit dem vorhandenen Wissen genetischer Veränderungen in Zelllinien zu vergleichen und zu interpretieren. Hierfür kann ein noch exakteres Wissen über die Art von chromosomalen Veränderungen nötig sein, welche zu Verlusten oder Gewinnen beziehungsweise Amplifikationen bestimmter chromosomaler Regionen führt. Ansätze für solche Erkenntnisse wurden zum Beispiel von Van Roy und Mitarbeitern 2001 in Form von kombinierten M-FISH und CGH-Analysen durchgeführt (Van Roy et al. 2001).

Zuletzt wurde ein 7 Fluorochrom Multiplex-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungssystem für Maus-Chromosom entwickelt, welches ermöglicht, simultan alle 40 Maus-Chromosomen mit jeweils der gleichen Anzahl von Fluorochromen anzufärben und so das Auflösungsvermögen im Vergleich zu 5 Fluorochrom M-FISH zu verbessern.

Durch Amplifikation und kombinatorischer Markierung „gepoolter“ Chromosomen-spezifischer Maus DNA-Bibliotheken mit DEAC, FITC, Cy3, Texas Red, Cy5, Biotin-Cy5.5 und Digoxigenin-Cy7 entstand ein 21 Farben-Ansatz. Hierbei erhielt jedes Chromosom zwei verschiedene Fluorochrome.

Durch Hybridisierung dieses kombinatorischen Ansatzes auf normale Maus-Metaphasen (in diesem Fall wurde die Hybridisierung an präparierten Metaphasen aus der Milz einer weiblichen Maus durchgeführt) konnte gezeigt werden, dass jedes Maus-Chromosom seine individuelle spektrale Signatur erhält und dadurch eindeutig identifiziert werden kann.

Um die Anwendbarkeit von Maus 7 Fluorochrom M-FISH zu überprüfen, standen Präparate von zwei verschiedenen Mamma-CA Zelllinien zur Verfügung.

Die einzelnen Fluorochrom-Kanäle wurden mit einem Epifluoreszenz-Mikroskop über eine gekühlte CCD-Kamera aufgenommen und über eine bildverarbeitende Software ausgewertet. Von jeder Zelllinie wurden mehrere Karyogramme erstellt. Die resultierenden Veränderungen in beiden ausgewerteten Zelllinien ähneln einander sehr: in jeder Metaphase waren charakteristische Veränderungen auszumachen.

Ziel wird es zukünftig sicherlich sein, Maus 7 Fluorochrom M-FISH in einem breiten wissenschaftlichen Gebiet für zahlreiche Analysen verschiedenster Herkunft einzusetzen, so dass in der Maus-Zytogenetik neben konventionellen G-Banden Analysen auch M-FISH zu den zytogenetischen Standardmethoden zählen wird.

---

## 6 ANHANG

### 6.1 Verwendete Reagenzien

100 Basenpaar-Leiter	4 µl 100 bp Leiter (Stocklösung) für 4 µl Gellaufpuffer, 32 µl ddH <sub>2</sub> O
Antifade: 15 ml	50 mg p-Phenylendiamin-dihydrochlorid in 5 ml 1x PBS (9 mM Endkonzentration) pH 8, 45 ml Glycerol Steril filtrieren
BSA, 1%	0,05 mg BSA in 5 ml 4x SSC/ 0,2% Tween-20
BSA, 3%	0,15 mg BSA in 5 ml 4x SSC/ 0,2% Tween-20
DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol 2 HCl)	DAPI-Stammlösung: 2 mg/ ml ddH <sub>2</sub> O Gebrauchslösung: 0,5 µl Stammlösung in 15 ml 4x SSC/ 0,2% Tween-20
DNase I Stocklösung, 1 mg/ ml	1 mg DNase, 0,5 ml 0,3 M NaCl, 0,5 ml Glycerol bei -20 °C aufbewahren
70% Formamid in 2x SSC	35 ml Formamid reinst, 15 ml 2x SSC pH 7,0 (1 M HCl)
Gellaufpuffer	0,25% Bromphenolblau (Bande läuft bei 300 bp) 0,25% Xylenyanol (Bande läuft bei 4 kb) 30% Glycerol
Glycin-BSA	1,13 g Glycin, 3 g BSA, 100 ml ddH <sub>2</sub> O pH 7,2. Steril filtrieren

---

HCl, 1 N	86,2 ml HCl konz. auf 1 l ddH <sub>2</sub> O
Hybridisierungs-Mix für Centromer-Sonden	65% Formamid, 0,5% Dextransulfat in 2x SSC
LB-Medium	10 g Bactotrypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl auf 1 l ddH <sub>2</sub> O. Autoklavieren
Nicktranslationspuffer, 10x	0,5 M Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM MgCl <sub>2</sub> 0,5 mg/ ml BSA
PBS, 10x	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O, 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
SSC, 20x	3M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat x 2H <sub>2</sub> O pH 7,0
4x SSC/ 0,2% Tween-20	200 ml 20x SSC, 2 ml Tween 20, 798 ml ddH <sub>2</sub> O pH 7,0
TAE-Puffer, 10x	0,4 M Tris-Cl, 0,05 M Natriumacetat, 10 mM EDTA pH 8,0

## 6.2 Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest./ bidest.	Einfach/ zweifach destilliertes Wasser
Av	Avidin
A	Adenin
Bio	Biotin
BSA	Bovine serum albumin
bp	Basenpaar
C	Cytosin
CA	Carcinom
CCD	Charge coupled device
Cen	Centromer
CESH	Comparative expressed sequence hybridization
CGH	Comparative genomic hybridization
CIN	Chromosomale Instabilität
CISS	Chromosome <i>in situ</i> suppression
dH <sub>2</sub> O	Einfach destilliertes Wasser
ddH <sub>2</sub> O	Zweifach destilliertes Wasser, entspricht AMPUWA
Dig	Digoxigenin
dmin	Double minute chromosomes
DNA	Desoxyribonucleic acid
DOP	Degenerate oligonucleotide primed
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
F	Fluorochrom
FCS	Fetal calf serum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
G	Guanin
g	Gramm
GPOH	Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie
HCl	Salzsäure
HNPCC	Hereditary non-polyposis colorectal cancer
HSR(s)	Homogenously staining regions
IgM	Immunglobulin M
INSS	International Neuroblastoma Staging System
kb	Kilo Basenpaar
kD	Kilodalton
konz.	Konzentriert
LDH	Lactatdehydrogenase
LM	Lichtmikroskop
LOH	Loss of Heterozygosity
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar (Mikromol/ Liter)
µm	Mikrometer
M	Mol/l
M-FISH	Multiplex Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
min	Minute/n
MIN	Mikrosatelliteninstabilität
ml	Milliliter
µl	Mikroliter

---

mM	Millimolar
MMR	Mismatch repair
NaOH	Natronlauge
Nb	Neuroblastom
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
Nr.	Nummer
NSE	Neuronspezifische $\gamma$ -Enolase
PAR	Pseudoautosomale Region
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Ketten Reaktion)
PSF	Point spread function
sec	Sekunden
UpM	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SSC	Sodium saline citrat
T	Thymin
UV	Ultraviolette Strahlung
Vol	Volumen
WCP	Whole chromosome painting probe

## LITERATURVERZEICHNIS

- Adler ID, Kliesch U, Jentsch I, Speicher MR (2002)  
Induction of chromosomal aberrations by dacarbazine in somatic and germinal cells of mice  
Mutagenesis 17 (5): 383-389
- Agard DA, Hiraoka Y, Shaw P, Sedat JW (1989)  
Fluorescence microscopy in three dimensions  
Methods Cell Biol 30: 353-377
- Altura RA, Maris JM, Li H, Boyett JM, Brodeur GM, Look AT (1997)  
Novel regions of chromosomal loss in familial neuroblastoma by comparative genomic hybridization  
Genes, Chromosomes & Cancer 19: 176-184
- Ambros PF, Brodeur GM (2000)  
Concept of tumorigenesis and regression  
Neuroblastoma: 21-32
- Aubele M, Zitzelsberger H, Szücs S, Werner M, Braselmann H, Hutzler P, Rodenacker K, Lehmann L, Minkus G, Höfler H (1997)  
Comparative FISH analysis of numerical chromosome 7 abnormalities in 5 µm and 15 µm paraffin-embedded tissue sections from prostatic carcinoma  
Histochemistry and Cell Biology 107(2): 121-126
- Azofeifa J, Fauth C, Kraus J, Maierhofer C, Langer S, Bolzer A, Reichman J, Schuffenhauer S, Speicher MR (2000)  
An optimized probe set for the detection of small interchromosomal aberrations by use of 24-color FISH  
Am J Hum Genet 66(5): 1684-1688

- Bardi G, Parada LA, Bomme L, Pandis N, Willen R, Johansson B, Jeppsson B, Beroukas K, Heim S, Mitelman F (1997)  
Cytogenetic comparisons of synchronous carcinomas and polyps in patients with colorectal cancer  
Br J Cancer 76: 765-769
- Bolande RP, Mayer DC (1990, a)  
The cytolysis of human neuroblastoma cells by a natural IgM antibody-complement system in pregnancy serum  
Cancer Invest 8: 603-611
- Bolande RP (1990, b)  
Spontaneous regression of neuroblastoma: an experimental approach  
Pediatr Pathol 10: 195-206
- Bown N, Cotterill SJ, Lastowska M, O'Neill S, Pearson ADJ, Plantaz D et al. (1999)  
Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in neuroblastoma  
N Engl J Med 340: 1954-1961
- Boyle A., Ballard SG, Ward DC (1990)  
Differential distribution of long and short interspersed element sequences in the mouse genome: Chromosome karyotyping by fluorescence in situ hybridisation  
Proc Natl Acad Sci USA 87: 7757-7761
- Breit S, Ashman K, Wilting J, Rossler J, Hatzi E, Fotsis T, Schweigerer L (2000)  
The n-myc oncogene in human neuroblastoma cells: down-regulation of an angiogenesis inhibitor identified as activin A  
Cancer Res 15;60(16): 4596-4601
- Breneman JW, Ramsey MJ, Lee DA, Eveleth GG, Minkler JL, Tucker JD (1993)  
The development of chromosome-specific composite DNA probes for the mouse and their application to chromosome painting  
Chromosoma 102: 591-598



- Brinkschmidt C, Christiansen H, Terpe HJ, Simon R, Lampert F, Boecker W, Dockhorn-Dworniczak B (2001)  
Distal chromosome 17 gains in neuroblastomas detected by comparative genomic hybridization (CGH) are associated with a poor clinical outcome  
Med Pediatr Onkol 36(1): 11-30
- Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg F, et al. (1993)  
Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment  
J Clin Oncol 11(8): 1466-1477
- Brodeur GM (1995)  
Molecular basis for heterogeneity in human neuroblastomas  
Eur J Cancer 31A(4): 505-510
- Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JKV, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B (1998)  
Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers  
Nature 392: 300-303
- Castleberry RP, Pritchard J, Ambros P, Berthold F, Brodeur GM, Castel V, Cohn SL, De Bernardi B, Dicks-Mireaux C, Frappaz D, Haase GM, Haber M, Jones DR, Joshi VV, Kaneko M, Kemshead JT, Kogner P, Lee RE, Matthay KK, Michon JM, Monclair R, Roald BR, Seeger RC, Shaw PJ, Shuster JJ, et al. (1997)  
The international neuroblastoma risk groups (INRG): a preliminary report  
Eur J Cancer 33(12): 2113-2316
- Caron H, van Sluis P, van Hove M, de Kraker J, Bras J, Slater R, Mannens M, Voute PA, Westerveld A, Versteeg R. (1993)  
Allelic loss of chromosome 1p36 in neuroblastoma is of preferential maternal origin and correlates with n-myc amplification  
Nat Genet 4(2): 187-190

- Caron H, van Sluis P, van Roy N, de Kraker J, Speleman F, Voute PA, Westerveld A, Slater R, Versteeg R (1994)  
Recurrent 1;17 translocations in human neuroblastoma reveal nonhomologous mitotic recombination during the S/G2 phase as a novel mechanism for loss of heterozygosity  
*Am J Hum Genet* 55(2): 341-347
- Caron H, Peter M, van Sluis P, Speleman F, de Kraker J, Laureys G, Michon J, Brugieres L, Voute PA, Westerveld A, et al. (1995)  
Evidence for two tumour suppressor loci on chromosomal bands 1p35-36 involved in neuroblastoma: one probably imprinted, another associated with n-myc amplification  
*Hum Mol Genet* 4(4): 535-539
- Carrington WA, Lynch RM, Moore ED, Isenberg G, Fogarty KE, Fay FS (1995)  
Superresolution three-dimensional images of fluorescence in cells with minimal light exposure  
*Science* 268: 1483-1487
- Caspersson T, de la Chapelle S, Foley GE, Kudynowsky J, Modest EJ, Simonsson E, Wagh V, Zech L (1968)  
Chemical differentiation along metaphase chromosomes  
*Exp Cell Res* 49: 219
- Cheng NC, Van Roy N, Chan A, Beitsma M, Westerveld A, Speleman F, Versteeg R. (1995)  
Deletion mapping in neuroblastoma cell lines suggests two distinct tumor suppressor genes in the 1p35-36 region, only one of which is associated with n-myc amplification  
*Oncogene* 1995 10(2): 291-297
- Cho KR, Vogelstein B (1992)  
Genetic alterations in the adenoma-carcinoma sequence  
*Cancer* 70 (6 Suppl): 1727-1731

- Coleman A, Schröck E, Weaver Z, duManoir S, Yang F, Ferguson-Smith MA, Ried T, Janz S (1997)  
Previously hidden chromosome aberrations in T(12;15)-positive BALB/c plasmacytomas uncovered by multicolor spectral karyotyping  
Cancer Research 57: 4585-4592
- Craig J, Bickmore WA (1997)  
Chromosome bands: patterns in the genome  
Springer Verlag
- Cremer T, Lichter P, Borden J, Ward DC, Manuelidis L (1988)  
Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome specific library probes  
Human Genetics 80: 235-246
- Cremer C, Muenkel C, Granzow M, Jauch A, Dietzel S, Eils R, Guan XY, Meltzer PS, Trent JM, Langowsky J, Cremer T (1996)  
Nuclear architecture and the induction of chromosomal aberrations  
Mutat Res 366: 97-116
- David K, Ollert MW, Vollmert C, Heiligtag S, Eickhoff B, Erttmann R, Bredehorst R, Vogel CW (1999)  
Human natural immunoglobulin M antibodies induce apoptosis of human neuroblastoma cells by binding to a Mr 260,000 antigen  
Cancer Res 59: 3768-3775
- Delattre O, Zucman J, Melot T, Garau XS, Zucker JM, Lenoir GM, Ambros PF, Sheer D, Turc-Carel C, Triche TJ, et al. (1994)  
The Ewing family of tumors - a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts  
N Engl J Med 4;331(5):294-299

- DePinho RA (2000)  
The age of cancer  
Nature 409: 248-254
- Drexler HG (1998)  
Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4 family genes p15, p16, p18 and p19 in human leukemia-lymphoma cells.  
Leukemia 12(6): 845-859
- Drexler HG, Fombonne S, Matsuo Y, Hu ZB, Hamaguchi H, Uphoff CC (2000)  
p53 alterations in human leukemia-lymphoma cell lines: in vitro artifact or prerequisite for cell immortalization?  
Leukemia 14(1): 198-206
- Duesberg P, Rausch C, Rasnik D, Hehlmann R (1998)  
Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy  
Proc Natl Acad Sci USA 95: 13692-13697
- du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schrock E, Popp S, Dohner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P, Cremer T (1993)  
Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization  
Hum Genet 90(6): 590-610
- Eggan K, Rode A, Jentsch I, Samuel C, Hennek T, Tintrup H, Zevnik B, Erwin J, Loring J, Jackson-Grusby L, Speicher MR, Kuehn R, Jaenisch R. (2002)  
Male and female mice derived from the same embryonic stem cell clone by tetraploid embryo complementation  
Nat Biotechnol 20(5): 455-459
- Eils R, Uhrig S, Saracoglu K, Sätzler K, Bolzer A, Petersen I, Chassery JM, Speicher MR (1998)  
An optimized, fully automated system for fast and accurate identification of chromosomal rearrangements by multiplex-FISH (M-FISH)  
Cytogenet Cell Genet 82: 160-171

- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S (1998)  
A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD  
*Nature* 1;391(6662): 43-50
- Fauth C, Speicher MR (2001)  
Classifying by colors: FISH-based genome analysis  
*Cytogenet Cell Genet* 93: 1-10
- Fong CT, Brodeur GM (1989)  
Molecular biology and genetics of human neuroblastoma  
*Cancer Genet Cytogenet* 41(2): 153-174
- Garagna S, Zuccotti M, Capanna E, Redi CA (2002)  
High resolution organization of mouse telomeric and pericentromeric DNA  
*Cytogenet Genome Res* 96: 125-129
- Gilbert F, Feder M, Balaban G, Brangman D, Lurie DK, Podolsky R, Rinaldt V, Vinikoor N, Weisband J (1984)  
Human neuroblastomas and abnormalities of chromosomes 1 and 17  
*Cancer Res* 44(11): 5444-5449
- Hachitanda Y, Saito M, Mori T, Hamazaki M (1997)  
Application of fluorescence in situ hybridization to detect n-myc (MYCN) gene amplification on paraffin-embedded tissue sections of neuroblastomas  
*Medical and Pediatric Oncology* 29: 135-138
- Halenbeck R, MacDonald H, Roulston A, Chen TT, Conroy L, Williams LT (1998)  
CPAN, a human nuclease regulated by the caspase-sensitive inhibitor DFF45  
*Curr Biol* 23;8(9): 537-540
- Hsu MY, Elder DA, Herlyn M (1999)  
*Cancer Cell Lines 1, Human cell culture* 1: 259-274

- Hatzi E, Breit S, Zoepfel A, Ashman K, Tontsch U, Ahorn H, Murphy C, Schweigerer L, Fotsis T (2000)  
MYCN oncogene and angiogenesis: down-regulation of endothelial growth inhibitors in human neuroblastoma cells. Purification, structural, and functional characterization  
Adv Exp Med Biol 476: 239-248
- Hopman AH, van Hooren E, van de Kaa CA, Vooijs PG, Ramaekers FC (1991)  
Detection of numerical chromosome aberrations using in situ hybridization in paraffin sections of routinely processed bladder cancers  
Mod Pathol 4(4): 503-513
- Hughes M, Marsden HB, Palmer MK (1974)  
Histologic patterns of neuroblastoma related to prognosis and clinical staging  
Cancer 34: 1706-1711
- Hsu MY, Elder DA, Herlyn M (1999)  
Human cell culture 1, Cancer cell lines part 1: 259-274
- Iehara T, Hamazaki M, Sawada T (2002)  
Cytogenetic analysis of infantile neuroblastomas by comparative genomic hybridization  
Cancer Lett 8; 178(1): 83-89
- ISCN-Nomenklatur (1995)  
An international system for human cytogenetic nomenclature; Author: Felix Mitelman.  
Verlag Karger
- Islam A, Kageyama H, Takada N, Kawamoto T, Takayasu H, Isogai E, Ohira M, Hashizume K, Kobayashi H, Kaneko Y, Nakagawara A (2000)  
High expression of survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma  
Oncogene 3;19(5): 617-623
- Jentsch I, Adler ID, Carter NP, Speicher MR. (2001)  
Karyotyping mouse chromosomes by multiplex-FISH (M-FISH)  
Chromosome Res 9(3): 211-214

- Judson H, van Roy N, Strain L, Vandesompele J, Van Gele M, Speleman F, Bonthron DT (2000)  
Structure and mutation analysis of the gene encoding DNA fragmentation factor 40 (caspase-activated nuclease), a candidate neuroblastoma tumour suppressor gene  
Hum Genet 106(4): 406-413
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992)  
Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors.  
Science 30; 258(5083): 818-821
- Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D (1997)  
Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers  
Cell 22;90(4): 809-819
- Kaneku Y, Cohn SL (2000)  
Ploidy and cytogenetics of neuroblastoma  
Neuroblastoma: 41-56
- Kim GJ, Park SY, Kim H, Chun YH, Park SH (2001)  
Chromosomal aberrations in neuroblastoma cell lines identified by cross species color banding and chromosome painting  
Cancer Genet and Cytogenet 129: 10-16
- Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmüller G (1999)  
Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity and DNA sequence analysis of single cells  
Proc Natl Acad Sci USA 96: 4494-4499
- Knudson A (1971)  
Mutation and cancer, statistical study of retinoblastoma  
Proc Natl Acad Sci USA 68: 820-823

- Knudson AG Jr, Strong LC (1972)  
Mutation and cancer: neuroblastoma and pheochromocytoma  
Am J Hum Genet., 24(5): 514-532
- Knuechel R, Masters JRW (1999)  
Human Cell Culture 1, Cancer cell lines 1, 213-230
- Kovalev S, Marchenko N, Swendeman S, LaQuaglia M, Moll UM (1998)  
Expression level, allelic origin, and mutation analysis of the p73 gene in neuroblastoma tumors and cell lines  
Cell Growth Differ. 9(11): 897-903
- Kushner BH, Gilbert F, Helson L. (1986)  
Familial neuroblastoma. Case reports, literature review, and etiologic considerations  
Cancer 1;57(9): 1887-1893
- Lastowska M, Roberts P, Pearson ADJ et al (1997)  
Gain of chromosome arm 17q predicts unfavourable outcome in neuroblastoma patients  
Eur J Cancer 33: 1627-1633
- Lengauer C, Green ED, Cremer T (1992)  
Fluorescence in situ hybridization of YAC clones after Alu-PCR amplification  
Genomics 13(3): 826-828
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1997)  
Genetic instabilities in colorectal cancers  
Nature 386: 623-627
- Lengauer C, Kinzler KW und Vogelstein B (1998)  
Genetic instabilities in human cancers  
Nature 396: 643-649



- Liyanage M, Coleman A, du Manoir S, Veldman T, McCormack S, Dickson RB, Barlow C, Wynshaw-Boris A, Janz S, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Schröck E, Ried T (1996)  
Multicolor spectral karyotyping of mouse chromosomes  
Nat Genet 14: 312-315
- Lichter P, Cremer T, Tang CJC., Watkins PC, Manuelidis L, Ward DC (1988)  
Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries  
Hum Genet 80: 224-234
- Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X (1997)  
DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis  
Cell 18;89(2): 175-184
- Loeb LA (1991)  
Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis  
Cancer Res 51: 3075-3079
- Lu YJ, Williamson D, Clark J, Wang R, Tiffin N, Skelton L, Gordon T, Williams R, Allan B, Jackman A, Cooper C, Pritchard-Jones K, Shipley J (2001)  
Comparative expressed sequence hybridization to chromosomes for tumor classification and identification of genomic regions of differential gene expression  
Proc Natl Acad Sci USA 98(16): 9197-9202
- McNally JG, Karpova T, Cooper J, Conchello JA (1999)  
Three-dimensional imaging by deconvolution microscopy  
Methods 19: 373-385
- Macville M, Veldman T, Padilla-Nash H, Wangsa D, O'Brien P, Schröck E, Ried T (1997)  
Spectral karyotyping, a 24-colour FISH technique for the identification of chromosomal rearrangements  
Histochem Cell Biol 108: 299-305

- Maierhofer C, Gangnus R, Diebold J, Speicher MR (2003)  
Multicolor deconvolution microscopy of thick biological specimens  
Am J Pathol, 162(2): 373-379
- Mukae N, Enari M, Sakahira H, Fukuda Y, Inazawa J, Toh H, Nagata S (1998)  
Molecular cloning and characterization of human caspase-activated DNase  
Proc Natl Acad Sci USA 4;95(16): 9123-9128
- Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie  
Neuroblastomstudie NB 97: Kooperative multizentrische Therapieoptimierungsstudie für die Behandlung von Säuglingen, Kindern und Jugendlichen mit Neuroblastom.  
Studienprotokoll  
Endgültige Fassung vom 30.09.1998
- Ollert MW, David K, Schmitt C, Hauenschild A, Bredehorst R, Erttmann R, Vogel CW (1996)  
Normal human serum contains a natural IgM antibody cytotoxic for human neuroblastoma cells  
Proc Natl Acad Sci USA 93: 4498-4503
- O'Hare MJ (1991)  
Human cancer in primary culture: 271-286
- O'Neill S, Ekstrom L, Lastowska M, Roberts P, Brodeur GM, Kees UR, Schwab M, Bown N (2001)  
MYCN amplification and 17q in neuroblastoma: evidence for structural association  
Genes, Chromosomes & Cancer 30: 87-90
- Paternoster SF, Brockman SR, McClure RF, Remstein ED, Kurtin PJ, Dewald GW (2002)  
A new method to extract nuclei from paraffin-embedded tissue to study lymphomas using interphase fluorescence in situ hybridization  
Am J Pathol 160(6), 1967-1972

- Perry J, Palmer S, Gabriel A, Ashworth A (2001)  
A short pseudoautosomal region in laboratory mice  
Genome Research 11: 1826-1832
- Pinkel D, Se Graves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WI, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG (1998)  
High resolution analysis of DNA copy-number variation using comparative genomic hybridization to microarrays  
Nat Genet 20: 207-211
- Plantaz D, Vandesompele J, Van Roy N, Lastowska M, Bown N, Combaret V, Favrot MC, Delattre O, Michon J, Benard J, Hartmann O, Nicholson JC, Ross FM, Brinkschmidt C, Laureys G, Caron H, Matthay KK, Feuerstein BG, Speleman F (2001)  
Comparative genomic hybridization (CGH) analysis of stage 4 neuroblastoma reveals high frequency of 11q deletion in tumors lacking MYCN amplification  
Int J Cancer 1;91(5): 680-686
- Pritchard J, Hickman JA (1994)  
Why does stage 4s neuroblastoma regress spontaneously?  
Lancet 24;344(8926): 869-870
- Rabbitts P, Impey H, Heppell-Parton A, Langford C, Tease C, Lowe N, Bailey D, Ferguson-Smith M, Carter N (1995)  
Chromosome specific paints from a high resolution flow karyotype of the mouse  
Nat Genet 9: 369-375
- Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, Iyer V, Jeffrey SS, Van de Rijn M, Waltham M, Pergamenschikov A, Lee JC, Lashkari D, Shalon D, Myers TG, Weinstein JN, Botstein D, Brown PO (2000)  
Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines  
Nat Genet 24(3): 227-235

- Rovero S, Amici A, Carlo ED, Bei R, Nanni P, Quaglino E, Porcedda P, Boggio K, Smorlesi A, Lollini PL, Landuzzi L, Colombo MP, Giovarelli M, Musiani P, Forni G (2000)  
DNA vaccination against rat Her-2/Neu p185 more effectively inhibits carcinogenesis than transplantable carcinomas in transgenic BALB/c mice  
J Immunol. 1;165(9): 5133-5142
- Sakahira H, Enari M, Nagata S (1998)  
Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis  
Nature 1;391(6662): 96-99
- Savelyeva L, Corvi R, Schwab M (1994)  
Translocation involving 1p and 17q is a recurrent genetic alteration of human neuroblastoma cells  
Am J Hum Genet 55(2): 334-340
- Schaefer LH, Schuster D, Herz H (2001)  
Generalized approach for accelerated maximum likelihood based image restoration applied to three-dimensional fluorescence microscopy  
J Microsc 204(Pt 2): 99-107
- Schleiermacher G, Peter M, Michon J, Hugot JP, Vielh P, Zucker JM, Magdelenat H, Thomas G, Delattre O (1994)  
Two distinct deleted regions on the short arm of chromosome 1 in neuroblastoma  
Genes Chromosomes Cancer 10(4): 275-81
- Schlessinger D. (1990)  
Yeast artificial chromosomes: tools for mapping and analysis of complex genomes  
Trends Genet 6(8):248: 255-258
- Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Freguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T (1996)  
Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes  
Science 273 (5274): 494-497

- Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, Hammond D. (1985)  
Association of multiple copies of the n-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas  
N Engl J Med 31;313(18): 1111-1116
- Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B, Stram DO, Gerbing RB, Lukens JN, Matthay KK, Castleberry RP (1999)  
The international neuroblastoma pathology classification (the Shimada System)  
Cancer 86:364-372
- Shizuya H., Birren B., Kim u.-J., Mancino V., Slepak T., Tachiivi Y., Simon M. (1992)  
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 USA 15, 89(18): 8794-8797
- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, Cremer T, Lichter P (1997)  
Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances  
Genes Chromosomes Cancer 20(4): 399-407
- Solovei I, Kienle D, Little G, Eils R, Savelyeva L, Schwab M, Jäger W, Cremer C, Cremer T (2000)  
Topology of double minute chromosomes (dmns) and homogeneously staining regions (HSRs) in nuclei of human neuroblastoma cell lines  
Genes, Chromosomes Cancer 29: 297-308
- Speicher MR, Ballard SG, Ward DC (1996)  
Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH  
Nat Genetics 12: 368-375
- Srivatsan ES, Ying KL, Seeger RC (1993)  
Deletion of chromosome 11 and of 14q sequences in neuroblastoma  
Genes Chromosomes Cancer 7(1): 32-37

- Strachan T, Read AP (1996)  
Molekulare Humangenetik  
Spektrum akademischer Verlag GmbH Heidelberg
- Teitz T, Lahti JM, Kidd VJ (2001)  
Aggressive childhood neuroblastomas do not express caspase-8: an important component of programmed cell death  
J Mol Med 79(8): 428-436
- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjöld M, Ponder BAJ, Tunnacliffe A (1992,a)  
Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes  
Genes, Chromosomes and Cancer 4: 257-263
- Telenius H, Pelmeur A, Tunnacliffe A, Carter NP, Behmel A, Ferguson-Smith MA, Nordenskjöld M, Pfragner R, Ponder BAJ (1992,b)  
Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerated primer  
Genomics 13: 718-725
- Thompson CT, LeBoit PE, Nederlof PM, Gray JW (1994)  
Thick-section fluorescence in situ hybridization on formalin-fixed paraffin-embedded archival tissue provides a cytogenetic profile  
Am J Pathol 144(2): 237-243
- Tomlinson IP, Novelli MR, Modmer WR (1996)  
The mutation rate and cancer  
Proc Natl Acad Sci USA 93: 14800-14803
- Uhrig S, Bolzer A, Cleve B, Speicher M.R (1997)  
Einsatz von Vielfarben-FISH Techniken in der klinischen Diagnostik  
Med Genetik 9: 563-569

- Uhrig S, Schuffenhauer S, Fauth C, Wirtz A, Daumer-Haas C, Apacik C, Cohen V, Müller-Navia J, Cremer T, Speicher MR (1999)  
Multiplex FISH (M-FISH) for pre- and postnatal applications  
Am J Human Genet 65: 448-462
- Van der Voort HT, Brakenhoff GJ, Baarslag MW (1989)  
Three-dimensional visualization methods for confocal microscopy  
J Microsc 153 (Pt 2): 123-132
- Vandosempele J, Van Roy N, Van Gele M, Laureys G, Ambros P, Heimann P, Declack C, Schuurin E, Brock P, Otten J, gyselinc J, De Paepe A, Speleman F (1998)  
Genetic heterogeneity of neuroblastoma studied by comparative genomic hybridization  
Genes, Chromosomes & Cancer 23: 141-152
- Vandosempele J, Speleman F, Van Roy N, Laureys G, Brinkschmidt C, Christiansen H, Lampert F, Lastowska M, Bown N, Pearson A, Nicholson JG, Ross F, Combaret V, Delattre O, Feuerstein BG, Plantaz D (2001)  
Multicentre analysis of patterns of DNA gains and losses in 204 neuroblastoma tumors: how many subgroups are there?  
Med Pediatr Oncol 36: 5-10
- Van Roy N, Laureys G, Cheng NC, Willem P, Opdenakker G, Versteeg R, Speleman F (1994)  
1;17 translocations and other chromosome 17 rearrangements in human primary neuroblastoma tumors and cell lines  
Genes Chromosomes Cancer 10(2): 103-114
- Van Roy N, Van Limbergen H, Vandosempele J, Van Gele M, Poppe B, Salwen H, Lyureys G, Manoel N, De Paepe A, Speleman F (2001)  
Combined M-FISH and CGH Analyses allows comprehensive description of genetic alterations in neuroblastoma cell lines  
Genes, Chromosomes & Cancer 32: 126-135

- Vettenranta K, Aalto Y, Wikstrom S, Knuutila S, Saarinen-Pihkala U (2001)  
Comparative genomic hybridization reveals changes in DNA-copy number in poor-risk neuroblastoma  
Cancer Genet Cytogenet 125(2): 125-130
- Virchow R (1964)  
Hyperplasie der Zirbel und der Nebennieren  
Die krankhaften Geschwulste 11, Berlin, August Hirschwald, 1865: 149-150
- Vogelstein B, Fearson ER, Hamilton SR, Hern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988)  
Genetic alterations during colorectal-tumor development  
N Engl J Med 319: 525-532
- Weaver ZA, McCormack SJ, Liyanage M, du Manoir S, Coleman A, Schröck E, Dickson RB, Ried T (1999)  
A recurring pattern of chromosomal aberrations in mammary gland tumors of MMTV-cmyc transgenic mice  
Genes Chromosomes Cancer 25(3): 251-260
- Wistuba II, Behrens C, Milchgrub S, Syed S, Ahmadian M, Virmani AK, Kurvari V, Cunningham TH, Ashfaq R, Minna JD, Gazdar AF (1998)  
Comparison of features of human breast cancer cell lines and their corresponding tumors  
Clin Cancer Res 4(12): 2931-2938
- Wistuba II, Bryant D, Behrens C, Milchgrub S, Virmani AK, Ashfaq R, Minna JD, Gazdar AF (1999)  
Comparison of features of human lung cancer cell lines and their corresponding tumors  
Clin Cancer Res 5(5): 991-1000



## PUBLIKATIONEN

- Speicher MR, Petersen S, Uhrig S, **Jentsch I**, Fauth C, Eils R, Petersen I. (2000)  
Analysis of chromosomal alterations in non-small cell lung cancer by multiplex-FISH, comparative genomic hybridization, and multicolor bar coding  
Lab Invest 80(7): 1031-1041
- **Jentsch I**, Adler ID, Carter NP, Speicher MR (2001)  
Karyotyping mouse chromosomes by multiplex-FISH (M-FISH)  
Chromosome Res 9(3):211-214
- Langer S, **Jentsch I**, Gangnus R, Yan H, Lengauer C, Speicher MR (2001)  
Facilitating haplotype analysis by fully automated analysis of all chromosomes in human-mouse hybrid cell lines  
Cytogenet Cell Genet 93(1-2): 11-5
- Stover C, Gradl G, **Jentsch I**, Speicher MR, Wieser R, Schwaeble W (2001)  
cDNA cloning, chromosome assignment, and genomic structure of a human gene encoding a novel member of the RBM family  
Cytogenet Cell Genet 92(3-4): 225-30
- Adler ID, Kliesch U, **Jentsch I**, Speicher MR (2002)  
Induction of chromosomal aberrations by dacarbazine in somatic and germinal cells of mice  
Mutagenesis 17 (5): 383-389
- Eggan K, Rode A, **Jentsch I**, Samuel C, Hennek T, Tintrup H, Zevnik B, Erwin J, Loring J, Jackson-Grusby L, Speicher MR, Kuehn R, Jaenisch R. (2002)  
Male and female mice derived from the same embryonic stem cell clone by tetraploid embryo complementation  
Nat Biotechnol 20(5): 455-9

- Maierhofer C, **Jentsch I**, Lederer G, Fauth C, Speicher MR (2002)  
Multicolor FISH in two and three dimensions for clastogenic analyses  
Mutagenesis 17(6): 523-527

## DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Michael Speicher für die Bereitstellung des Themas sowie vor allem für die wunderbare Zusammenarbeit in den letzten Jahren. Meinen Dank möchte ich ihm außerdem für die stetige Unterstützung sowie für die zahlreichen Anregungen bei der Durchführung der Experimente aussprechen.

Frau Dr. Uta Behrends danke ich für die schöne Zusammenarbeit, für die Korrektur des Klinik-Teils dieser Arbeit sowie für die freundliche Bereitstellung der Neuroblastom-Gewebeschnitte. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei den mit Uta Behrends kooperierenden Pathologen bedanken, die unseren Sonderwünschen stets entgegenkamen.

Herrn Dr. Jochen Geigl danke ich für die freundliche Bereitstellung der Maus-Zelllinien sowie für die stetige Anteilnahme an meinen Projekten.

Frank Speleman danke ich für die Bereitstellung der Neuroblastom-Zelllinien sowie der BACs.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die schöne Zusammenarbeit in den letzten Jahren bedanken, aber vor allem bei Corinna Keri und Melanie Odenigbo für frischen Wind im Labor und die vielen abwechslungsreichen Kaffeepausen; meiner „Padavan-Schülerin“ Simone Barwisch für den Ganesha, der meine Versuche „bewachte“; Burgis Cleve aus unserem „alten“ Labor für ihre liebe Anteilnahme an meiner Arbeit; Sabine Langer, Christine Maierhofer, Katrin Pfleghaar, Cora Beier und Rainer Gangnus für die kurzweilige Zusammenarbeit im „Balkon-Labor“; sowie Doris Sollacher und Gaby Lederer für die freundliche Unterstützung bei der Erstellung von Metaphase-Präparaten sowie für die zahlreichen Gummibärchen, die meine Arbeit versüßten.

---

## LEBENS LAUF

### Personalien

Vor- und Zuname	Isabell Jentsch Dipl. biol. (univ.)
Geburtsstag	03.12.1973
Geburtsort	München
Familienstand	ledig

### Schulische Ausbildung

September 1980 – Juli 1984	Grundschule, Ismaning bei München
September 1984 – Juli 1993	Oskar-von-Miller-Gymnasium, München
Schulabschluss im Juli 1993	Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

### Studium und Fortbildung

November 1993 – Juni 1999	Biologie-Studium an der LMU München
September 1997 – Juli 1998	Mithilfe am Forschungsprojekt am Institut für Anthropologie und Humangenetik der LMU München, Labor PD Dr. Speicher
Juli 1998 – August 1998	Diplom-Prüfung in folgenden Fächern: Hauptfach Humangenetik, Nebenfächer Immunologie, Pharmakologie/ Toxikologie und Molekularbiologie
September 1998 – Juni 1999	Diplomarbeit Institut für Anthropologie und Humangenetik der LMU, Labor PD Dr. Speicher Thema: „Entwicklung eines Multiplex-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs- (M-FISH) Systems und anderer Vielfarben-FISH-Ansätze für Maus-Chromosomen“
Seit Juli 1999	Promotionsstudiengang Abteilung für klinische Genetik der LMU München; Vorstand Prof. Murken; Betreuung PD Dr. Speicher Thema: „Entwicklung neuer molekularzytogenetischer Verfahren für die Tumordiagnostik“
Februar 2002	Zulassungsprüfung zum Promotionsstudium zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades Dr.rer.biol.hum. (Promotionsvorprüfung)

## ANLAGE

Der Original-Arbeit ist auf der hinteren inneren Umschlagseite eine CD beigefügt. Auf dieser CD befinden sich Animationen (Filmformat: \*.avi) von Zellkernen aus Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten 10 µm Gewebeschnitten nach Dekonvolution und 3D-Rekonstruktion.

Der Inhalt der Filme ist wie folgt:

Nr.	Tumor	Nr.	Ausschnitt	Darstellung	Besonderheiten
1	TJ	A	Tumorareal	Maximum, mit DAPI	
		B	Tumorareal	Maximum, ohne DAPI	
		C	Tumorareal	Surface	
		D	Tumorareal	Surface, mit Maßstab	
2	HV-R	A	Tumorareal	Maximum	Veränderte und nicht-veränderte Zellen
		B	Tumorareal	Surface	Veränderte und nicht veränderte Zellen
		C	Einzelner Zellkern, nicht verändert	Maximum	
		D	Einzelner Zellkern, nicht verändert	Surface	
		E	Einzelner Zellkern, Tumor	Maximum	
		F	Einzelner Zellkern, Tumor	Surface	
3	HV	A	Tumorareal	Maximum	
		B	Einzelner Zellkern, Tumor	Maximum	
		C	Einzelner Zellkern, Tumor	Surface	