

Nachweis von Genveränderungen bei der
Strahlenkarzinogenese von Brustzellen mittels
Array-Painting

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Kristian Unger

München, 24. September 2007

Datum der mündlichen Prüfung: 06. Juni, 2008

Zusammensetzung der Prüfungskommission:

Prof. Johannes Wienberg (Vorsitz)

Prof. Thomas Cremer

Prof. Friederike Eckhardt-Schupp

Prof. Gerhard Wanner (Protokoll)

Prof. Horst Zitzelsberger (Gast)

Bewertung: 1,0 ("magna cum laude")

Erstgutachten: Prof. Dr. Johannes Wienberg

Zweitgutachten: Prof. Dr. Thomas Cremer

für Carolin

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis	X
Abkürzungen	XII
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	7
2.1 Das Zellkultur-Modell B42	7
2.1.1 Zellkultur der B42-Zelllinien	8
2.1.1.1 Material	8
2.1.1.2 Durchführung	9
2.1.2 Metaphasenpräparation	9
2.1.2.1 Material	9
2.1.2.2 Durchführung	10
2.2 Molekularzytogenetische Methoden	IV
2.2.1 Array-basierte vergleichende genomische Hybridisierung (Array-CGH)	10
2.2.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Zelllinien	11
2.2.1.1.1 Material (Teile des Qiagen QiAMP Kits):	11
2.2.1.1.2 Durchführung	12
2.2.1.2 Markierung der Test- und Referenz DNA	12
2.2.1.2.1 Material	13
2.2.1.2.2 Durchführung	13
2.2.1.3 Aufreinigung des Ansatzes	14
2.2.1.4 Array-CGH Hybridisierung von 1Mb BAC Arrays unter Benutzung einer Hybridisierungsstation	14
2.2.1.5 Hybridisierung und Waschen der Arrays	15
2.2.1.6 Scannen des Arrays	17
2.2.1.7 Messung der Fluoreszenzintensitäten und Ausgabe der Rohdaten in einer GPR- Datei	18
2.2.2 Auswertung eines Array-CGH Experimentes mit der Web-basierten Plattform CAPweb	21
2.2.2.1 Generelle Aspekte der Auswertung eines Array-CGH Experiments	21
2.2.2.2 Hintergrundkorrektur	21
2.2.2.3 Normalisierung	22
2.2.2.3.1 Block-für-Block-Normalisierung (Block by Block Normalisation, BBN)	23
2.2.2.3.2 Räumliche Normalisierung	23
2.2.2.4 Segmentierung des Datensatzes	24
2.2.2.5 Parameter zur Qualitätsbeurteilung eines Array-CGH-Experimentes	25
2.3 Durchfluss-zytometrische Isolierung von Markerchromosomen	26

2.3.1	Prinzip der Fluoreszenz-aktivierten Durchfluss-Zytometrie (FACS) von Chromosomen	26
2.3.1.1	Material	29
2.3.1.2	Durchführung	30
2.3.2	Sortierung der Chromosomen	34
2.3.2.1	Durchführung	34
2.3.3	Reverse FISH zur Überprüfung von Durchfluss-sortierten Markerchromosomen	35
2.3.3.1	Digoxigenin-Markierung mittels Nick-Translation	36
2.3.3.2	Hybridisierung der markierten DNA auf normale Metaphasen	36
2.3.3.2.1	Material	36
2.3.3.2.2	Durchführung	37
2.3.3.3	Waschen und Detektion	37
2.3.3.4	Bildaufnahme	38
2.3.3.4.1	Durchführung	38
2.3.4	1Mb-BAC-Array Analyse von Translokationschromosomen (Array-Painting)	39
2.3.4.1	Aufreinigung und Fällung des Ansatzes	40
2.3.4.1.1	Material	40
2.3.4.1.2	Durchführung	40
2.3.5	Feinkartierung der mit Array-Painting identifizierten Bruchpunkte durch Hybridisierung mit Sätzen überlappendender Sonden aus der 32K-BAC-Bibliothek	41
2.3.5.1	Anzucht und Isolation der BAC-Klone im 96er Mikrotiter Format	42
2.3.5.1.1	Material	42
2.3.5.1.2	Durchführung	43
2.3.5.2	Amplifikation der Plasmid-DNA in einer für humane Sequenzen spezifischen DOP-PCR	45
2.3.5.2.1	Material	45
2.3.5.2.2	Durchführung	46
2.3.5.3	Primäre DOP-PCR	46
2.3.5.4	Sekundäre DOP-PCR	48
2.3.5.5	Markierung der DNA mit Biotin oder Digoxigenin durch Nick-Translation	49
2.3.5.6	DNA-Sonden, die für die FISH-Hybridisierungen verwendet wurden	49
2.3.6	Validierung der Veränderung der Kandidatengene Has2, Grid1 und Ret in Mammakarzinomen	51
2.3.6.1	Verwendete Gewebe-Arrays	51
2.3.6.2	Aufnahme der Fluoreszenz in situ hybridisierten Gewebe-Arrays unter Verwendung eines Mikroskops mit strukturierter Beleuchtung	55
2.3.6.3	Verwendete DNA-Sonden	57
2.3.6.4	Anzucht der BAC-Klone	58
2.3.6.4.1	Material	58
2.3.6.4.2	Durchführung	59
2.3.6.5	Isolierung der Plasmid-DNA aus BAC-Klonen	59
2.3.6.5.1	Material	60

2.3.6.5.2	Durchführung	60
2.3.6.6	Markierung der BAC-Plasmide	61
2.3.6.6.1	Material	61
2.3.6.6.2	Durchführung	62
2.3.6.7	Hybridisierung der BAC-Klone auf Gewebe-Arrays	62
2.3.6.8	Waschen der Objektträger	62
2.3.6.9	Detektion der Objektträger	63
2.3.6.9.1	Material	63
2.3.6.9.2	Durchführung	63
2.3.6.10	Aufnahme der Gewebe-Schnitte mit dem Apotom-Mikroskop	64
2.3.6.11	Auswertung der aufgenommenen Bilder	64
Molekularbiologische Methoden		66
2.3.7	Trizol [®] -basierte RNA-Isolation aus kultivierten Zellen	66
2.3.7.1	Material	66
2.3.7.2	Durchführung	67
2.3.8	DNase-Verdau von Gesamt-RNA	68
2.3.8.1	Material	68
2.3.8.2	Durchführung	69
2.3.9	Universelle Umschreibung von RNA in cDNA	69
2.3.9.1	Material	70
2.3.9.2	Durchführung	70
2.3.10	Identifizierung des unbekanntes 5'-Teiles eines Fusions-Gens mit 5'-RACE	71
2.3.10.1	Herstellung der cDNA	72
2.3.10.1.1	Material	72
2.3.10.1.2	Durchführung	72
2.3.10.2	Aufreinigung der cDNA	73
2.3.10.2.1	Material	73
2.3.10.2.2	Durchführung	73
2.3.10.3	RACE-PCR	73
2.3.10.3.1	Material	73
2.3.10.3.2	Durchführung	74
2.3.10.4	TdT Tailing der cDNA	74
2.3.10.5	PCR der "dC-tailed" cDNA	75
2.3.10.6	„Nested“ PCR-Amplifikation	76
2.3.10.7	DNA-Extraktion aus Agarose-Gel	77
2.3.10.7.1	Material	77
2.3.10.7.2	Durchführung	77
2.3.11	Identifizierung des unbekanntes 3'-Teiles eines Fusions-Gens mit 3'-RACE	78
2.3.11.1	Herstellung der cDNA	79
2.3.11.1.1	Material	79
2.3.11.1.2	Durchführung	79

2.3.11.2	„Nested“-PCR-Amplifikation	80
2.3.11.2.1	Material	80
2.3.11.2.2	Durchführung	80
2.3.12	Klonierung von PCR-Fragmenten aus 3’-/ 5’-RACE-Reaktionen mit Hilfe des „TOPO TA Cloning® Kits for Sequencing“	81
2.3.12.1	Material (Bestandteile des verwendeten Kits)	83
2.3.12.2	Durchführung	84
2.3.13	Kolonie-PCR zur Bestimmung der Fragment-Länge TOPO-klonierter Sequenzen	84
2.3.13.1	Material	86
2.3.13.2	Durchführung	86
2.3.14	Sequenzierung der klonierten RACE-Produkte	87
2.3.14.1	Sequenzierungs-PCR	88
2.3.14.1.1	Material	88
2.3.14.1.2	Durchführung	89
2.3.14.2	Aufreinigung der DNA-Fragmente	90
2.3.14.3	Kapillarelektrophorese mit ABI 3730	91
2.3.15	Real Time RT-PCR zur Bestimmung der relativen mRNA-Expression	92
2.3.15.1	Prinzip der Taqman Realtime RT-PCR	92
2.3.15.1.1	Material	94
2.3.15.1.2	Durchführung	95
2.3.15.2	c-Ret-Gen spezifische Assays aus Einzel-Komponenten	95
2.3.15.3	Relative Quantifizierung der RT-PCR-Ergebnisse mit Hilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode	99
2.3.15.4	Semiquantitative Expression	100
2.3.16	Immunhistochemische Bestimmung der relativen Protein-Expression von Kandidatengenen	101
2.3.16.1	Material	101
2.3.16.2	Durchführung	103
3	Ergebnisse	105
3.1	Ergebnisse aus den molekularzytogenetischen Analysen	105
3.1.1	Array-basierte vergleichende genomische Hybridisierung (Array-CGH)	105
3.1.1.1	Genomische Kopienzahlveränderungen der Zelllinie B42-htLG	105
3.1.1.2	Genomische Kopienzahlveränderungen der Zelllinie B42-11	106
3.1.2	Genomische Kopienzahlveränderungen der Zelllinie B42-16	108
3.1.3	Ergebnisse aus Vorarbeiten	112
3.1.3.1	Ergebnisse der spektralen Karyotypisierung der Zelllinien B42-11 und B42-16	112
3.1.4	Reverse FISH zur Vorcharakterisierung von Durchfluss-sortierten Chromosomen	113
3.1.4.1	Ergebnisse der Reversen FISH-Hybridisierung der Sortierungen aus B42-11	114
3.1.4.2	Ergebnisse der Reversen FISH-Hybridisierung der Sortierungen aus B42-16	116
3.1.5	Charakterisierung der chromosomalen Bruchpunkte in den Zelllinien B42-11 und B42-16 durch Array-Painting	120

3.1.5.1	Array-Painting Ergebnisse der Zelllinie B42-11 _____	120
3.1.5.2	Array-Painting Ergebnisse Zelllinie B42-16 _____	122
3.1.6	Feinkartierung der mit Array-Painting identifizierten Bruchpunkte durch FISH-Analyse mit überlappenden BAC-Sonden aus der 32K-BAC-Bibliothek _____	130
3.1.6.1	Klonierung der chromosomalen Bruchpunkte auf Chromosom 12 _____	130
3.1.6.2	Klonierung der chromosomalen Bruchpunkte auf Chromosom 10 _____	134
3.2	Ergebnisse aus den molekularbiologischen Analysen _____	136
3.2.1	Klonierung von Fusions-Transkripten mit Hilfe von „Rapid Amplification of cDNA ends“ (RACE) _____	136
3.2.1.1	Klonierung und Charakterisierung des Fusionstranskriptes von Has2 _____	136
3.2.1.2	Klonierung und Charakterisierung des Fusions-Transkriptes von Grid1 _____	137
3.2.2	Immunhistochemischer Nachweis der Überexpression von Has2 und Grid1 in der Zelllinie B42-16 _____	139
3.2.2.1	Immunhistochemischer Proteinnachweis von Has2 _____	139
3.2.2.2	Immunhistochemischer Proteinnachweis von Grid1 _____	140
3.2.3	Ergebnisse der Real Time RT-PCR Analyse _____	140
3.3	Validierung der gefundenen Genveränderungen _____	140
3.3.1	Untersuchung der Prävalenz von Zelllinien-spezifischen Genveränderungen in Mammakarzinomen _____	140
3.3.1.1	Untersuchung der Umlagerung des Has2-Gens auf Brusttumor-Gewebe-Arrays _____	140
3.3.1.2	Untersuchung der Umlagerung des Grid1-Gens auf Brusttumor-Gewebe-Arrays _____	140
3.3.1.3	Überprüfung der Umlagerung des Ret-Gens auf Brusttumor-Gewebe-Arrays _____	140
4	<i>Diskussion</i> _____	140
4.1.1	Zielsetzung _____	140
4.1.2	Überprüfung der strahlentransformierten Zelllinien auf Expression von bekannten mit der Mammakarzinogenese assoziierten Genen _____	140
4.1.3	Molekularzytogenetische Veränderungen in Mammakarzinomen und im Zellkultur-Modell B42 _____	140
4.1.4	Genomische Rearrangierungen in den B42 Zellkultur Modellen _____	140
4.1.5	Nachweis veränderter Kandidatengene durch Klonierung der chromosomalen Bruchpunkte _____	140
4.1.6	Prävalenz veränderter Gene in Mammakarzinomen _____	140
5	<i>Zusammenfassung</i> _____	140
6	<i>Referenzen</i> _____	140
7	<i>Anhang</i> _____	140
7.1	Verwendete Primer-Sequenzen _____	140

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: BAC-Klone, die für Bruchpunkt 1 auf Chromosom 12 ausgewählt wurden	49
Tab. 2: BAC-Klone, die für Bruchpunkt 2 auf Chromosom 12 ausgewählt wurden	50
Tab. 3: BAC-Klone, die für Bruchpunkt 3 auf Chromosom 12 ausgewählt wurden	50
Tab. 4: BAC-Klone, die für Bruchpunkt 1 auf Chromosom 10 ausgewählt wurden	50
Tab. 5: Auflistung der klinischen Daten für den Gewebe-Array BRC1501 (Pantomics, Inc.)	52
Tab. 6: PCR-Programm Sequenzier-PCR	90
Tab. 7: Häufige Termini, die bei der Realtime RT-PCR Analyse auftauchen	94
Tab. 8: Primer- und Sonden-Sequenzen, optimierte Konzentrationen und Amplifikat-Größen für Ret/PTC1, Ret/PTC3 und c-Ret (Rhoden, et al., 2004)	96
Tab. 9: Pipettierschema für RT-PCR mit Einzel-Komponenten-Sonden	97
Tab. 10: Zusammenfassung der Ergebnisse der Array-CGH-Analysen in B42-11 und -16	111
Tab. 11: Überblick über die Karyotypen der 17 SKY-untersuchten B42-Zelllinien.	113
Tab. 12: Zusammenfassung der zytogenetischen Charakterisierung der Markerchromosomen der Zelllinien B42-11 und B42-16.	129
Tab. 13: Ergebnisse der Feinkartierung der Bruchpunkte von M16-4 und M16-5 mit Klonen der 32K-BAC-Bibliothek	132
Tab. 14: Bruchpunkt-spezifische BAC-Sonden für den Marker M16-5	134
Tab. 15: Bruchpunkt-spezifische BAC-Sonden für den Marker M16-4	135
Tab. 16: Realtime RT-PCR Analyse von Kandidatengen in B42-11 und B42-16	140
Tab. 17: Zusammenfassung der Ergebnisse der Interphase-FISH auf Brusttumor-Gewebe-Arrays	140

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Plasmidkarte des Plasmids pBABE puro	7
Abb. 2: Gescanntes RG-Bild der 1Mb-Array Hybridisierung von B42-16	19
Abb. 3: Spot-Gitter, welches aus dem ‚Array List File‘ generiert wurde	19
Abb. 4: Durchströmungskammer mit hydrodynamischer Fokussierung (Crosland-Taylor, 1953)	28
Abb. 5: Prinzip der Funktionsweise eines Durchfluss-Zytometers (Longobardi, 2001)	28
Abb. 6: Humanes männliches Durchfluss-Karyogramm (Ferguson-Smith, 1997)	29
Abb. 7: Durchfluss-Karyogramm der Zelllinie B42-16	35
Abb. 8: Agarose-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der DOP1 (A), DOP2 (B) und DOP3 (C)-Reaktionen	48
Abb. 9: Gewebe-Array BRC1501 (Pantomics, Inc.)	55
Abb. 10: Prinzipieller Aufbau des Apotom-Mikrokops	56
Abb. 11: Spectrogramm von RNA mit Phenol-Kontamination vor (schwarze Kurve), und nach Trizol-Chloroform-Extraktion	68
Abb. 12: Schema 5'-RACE (Invitrogen)	71
Abb. 13: Prinzip der 3'-RACE	78
Abb. 14: Funktionsweise der im TOPO-Cloning-Kit enthaltenen Topoisomerase	82
Abb. 15: Klonierungs-Vektor PCR4TOPO des TOPO TA Cloning® Kits	85
Abb. 16: Schematische Darstellung des Prinzips von Taqman®-Sonden	93
Abb. 17: Typische RT-PCR Kurve (Applied Biosystems)	93
Abb. 18: Position der Primer und Sonden relativ zu Ret/PTC1, Ret/PTC3 und c-Ret (Rhoden et al., 2004)	95
Abb. 19: Schematische Darstellung der Laufparameter, die verwendet wurden	99
Abb. 20: Array-CGH Profile der Zelllinie B42-htLG	106
Abb. 21: Array-CGH Profile der Zelllinie B42-11	107
Abb. 22: Array-CGH Profile der Zelllinie B42-16	109
Abb. 23: SKY-Karyogramm der Zelllinie B42-16	112
Abb. 24: Marker der Zelllinie B42-11	112
Abb. 25: Marker der Zelllinie B42-16	113
Abb. 26: Reverse FISH-Analyse von Durchfluss-Sortierungen der Zelllinie B42-11	114
Abb. 27: Reverse FISH-Analyse von Durchfluss-Sortierungen der Zelllinie B42-16	117
Abb. 28: Array-Painting Profil des Markerchromosoms M11-1	121
Abb. 29: Array-Painting Profile des Markers M16-1	124
Abb. 30: Array-Painting-Profile des Markers M16-2	124
Abb. 31: Array-Painting Profile des Markers M16-4	125
Abb. 32: Array-Painting Profile des Markers M16-5	126
Abb. 33: Identifizierung von Kandidatengenomen mit Hilfe von Array-Painting und der Genom-Datenbank Ensembl.	128
Abb. 34: Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) zur Klonierung der chromosomalen Bruchpunkte des Chromosoms 12 in der Zelllinie B42-16	133

<i>Abb. 35: Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) zur Klonierung des chromosomalen Bruchpunktes 10p13 auf Chromosom 10</i>	135
<i>Abb. 36: Sequenzierung des Bruchpunktes in Has2 auf Chromosom 8</i>	137
<i>Abb. 37: Kloniertes Fusions-Transkript von Has2</i>	137
<i>Abb. 38: Sequenzierung des Bruchpunktes in Grid1 auf Chromosom 10</i>	138
<i>Abb. 39: Fusions-Transkript von Grid1</i>	138
<i>Abb. 40: Immunhistochemische Untersuchung der Zelllinien B42-htLG und B42-16 mit Has2-spezifischem Antikörper</i>	140
<i>Abb. 41: Immunhistochemische Untersuchung der Zelllinien B42-htLG und B42-16 mit Grid1-spezifischem Antikörper</i>	140
<i>Abb. 42: Realtime RT-PCR Kurven der Sonden Retex10-11 und Retex12-13 mit der Kontroll-Zelllinie SHSY</i>	140
<i>Abb. 43: Semiquantitative Bestimmung der Expression Ret-TK- und -EC-Domäne</i>	140
<i>Abb. 44: Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit genspezifischen Sonden für die Gene Has2, Grid1 und Ret auf Brustkrebs-Gewebe-Arrays mit Paraffin-eingebetteten Geweben von Brusttumoren</i>	140

Abkürzungen

A	Adenin
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CCD	ladungsgekoppelter Bildsensor (charge-coupled device)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CGH	<i>comparative genomic hybridization</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOP	Degenerated oligonucleotide primed
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Etylendiaminotetraacetat
EtOH	Ethanol

FA	Formamid
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GTP	Guanosintriphosphat
kb	Kilobasenpaar
LB	Luria-Bertani
M	Molar
min.	Minute
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PN	Phosphat-Nonidet
PNM	Phosphat-Nonidet-Magermilch
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription

SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
SKY	Spectral Karyotyping
SSC	Standard Saline-Citrat
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris-EDTA
TdT	Terminale-deoxynucleotidyl-Transferase
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxy-)aminomethan
U	unit
UDG	Uracil-DNA-Glycosylase
WCP	Whole Chromosome Painting Probe
YAC	künstliches Hefechromosom (<i>yeast artificial chromosome</i>)

1 Einleitung

Zur Ursachenforschung und Entwicklung neuer Behandlungsstrategien bei Brustkrebs werden weltweit vielfältige Anstrengungen unternommen. Dies ist damit zu begründen, dass Brustkrebs eine der häufigsten malignen Erkrankungen ist. In Deutschland starben laut statistischem Bundesamt im Jahr 2004 insgesamt 17590 Frauen an Brustkrebs. Dies entspricht 4 % aller Todesfälle und bedeutet, dass Brustkrebs die häufigste, zum Tode führende Krebserkrankung bei Frauen ist. Seit 1985, als noch 40 von 100000 Frauen an Brustkrebs erkrankten, hat sich die Rate bis 2004 auf eine Häufigkeit von 37 von 100000 Frauen leicht verringert. Dies kann mit besseren diagnostischen Möglichkeiten und neuen Behandlungsmöglichkeiten erklärt werden. Eine weitere Verbesserung von Diagnose und Therapie beim Mammakarzinom kann durch neue Erkenntnisse von molekularen Mechanismen der Tumorentstehung erreicht werden, weil hierdurch prognostische Marker und molekulare Ansatzpunkte für neue Therapieformen gewonnen werden können.

Die Ätiologie eines Mammakarzinoms ist individuell nur schwer aufzuklären, da eine Vielzahl von Noxen (Chemikalien, physikalische Einflüsse wie z.B. ionisierende Strahlung) und anderen Einflüsse, wie z.B. Lebens- und Ernährungsumstände, zur Tumorentstehung beitragen können. Allerdings ist es möglich, für einzelne Noxen das Risiko bei Exposition für eine Tumorerkrankung oder für die Tumormortalität zu ermitteln, wenn entsprechende Dosis-Wirkungs-Zusammenhänge bekannt sind. So ist es beispielsweise gelungen, nach Exposition durch ionisierende Strahlung ein erhöhtes Tumorrisiko beim Menschen nachzuweisen, indem aufgrund von epidemiologischen Untersuchungen an den Atombombenüberlebenden, an Patienten mit therapeutischer Strahlenexposition und an Personen mit beruflicher Strahlenexposition ein kausaler Zusammenhang dargestellt werden konnte. So konnte bei den Atombombenüberlebenden unter anderem auch ein drastischer Anstieg der Mammakarzinome in den exponierten Gebieten nachgewiesen werden (Preston et al., 2007). Eine erhöhte Inzidenz von Brustkrebs war ebenso nach therapeutischer Strahlenexposition von Tuberkulose- und Mastitis-Patientinnen zu beobachten (Hall, 2000). Beide Patienten-Kohorten wurden fraktioniert mit Gamma-Strahlung und vergleichbaren Gesamtdosen von 2-4 Gy (Tuberkulose-Patientinnen) bzw. 1-6 Gy (Mastitis-Patientinnen) bestrahlt und zeigten im langjährigen (> 14 Jahre) Vergleich zu einer

nicht-exponierten Vergleichskohorte eine um den Faktor 3 bis 4 erhöhte Tumorraten für Mammakarzinome (Hall, 2000). Diese Beispiele zeigen, dass die weibliche Brust ein äußerst strahlenempfindliches Organ darstellt und die Exposition mit ionisierender Strahlung eine wichtige Ursache für die Entstehung von Brustkrebs sein kann. Trotz dieses etablierten Zusammenhangs zwischen Strahlenexposition und Brustkrebsrate können für Expositionen im niedrigen Dosisbereich, wie sie beispielsweise durch natürliche Strahlenexposition oder Mammographie-Untersuchungen auftreten, nur durch Extrapolation aus den o.g. Daten Tumorraten ermittelt werden. Es ist aufgrund gängiger Risikomodelle davon auszugehen, dass auch bei niedrigen Dosen ein gewisser Anteil der beobachteten Mammakarzinome durch ionisierende Strahlung verursacht wird (Prysyazhnyuk et al., 2007).

Es ist bekannt, dass eine neoplastische Zelle schrittweise die Kontrolle über die Proliferation, den programmierten Zelltod (Apoptose), die Angiogenese und die Zellmotilität verliert (Fridlyand et al., 2006, Hanahan und Weinberg, 2000). Dementsprechend ist zu erwarten, dass auch in Mammakarzinomen für alle diese Zellfunktionen veränderte Gene nachgewiesen werden können, die zur Deregulation dieser Prozesse beitragen. Die anerkannten Modelle zur Tumorentstehung gehen allerdings davon aus, dass die Transformation einer normalen Epithelzelle zu einer neoplastischen Zelle schrittweise abläuft (Rhim et al., 1990). So kann eine Zelle durch eine oder mehrere Genveränderungen, die durch exogene Einflüsse ausgelöst wurden, einen Wachstumsvorteil erhalten. Da die Zelle aber dem körpereigenen Immunsystem, welches die veränderten Genprodukte erkennen kann, ausgesetzt ist, muss die Zelle schrittweise weitere Genveränderungen anreichern, die ihr zum einen weitere Wachstumsvorteile verschaffen, aber sie zum anderen der Kontrolle durch das Immunsystem durch Induzierung von Apoptose entziehen (Merlo et al., 2006). Dieser Mechanismus der Krebszellen-Evolution macht es sehr schwierig in ausdifferenzierten Tumoren, welche bereits zahlreiche Genveränderungen angereichert haben, die initialen Genveränderungen im Tumor zu erkennen. Daher ist es wünschenswert, die einzelnen Schritte der Tumorentstehung getrennt voneinander betrachten zu können.

Für diese Fragestellung eignen sich so genannte *in vitro* Zellkultur-Modelle (Rhim, et al., 1990), wobei es sich um epitheliale Zellen handelt, die im ersten Schritt immortalisiert und dann, beispielsweise durch Exposition mit ionisierender Strahlung, trans-

formiert werden. Der Immortalisierungs-Schritt erlaubt die Kultivierung der Zellen über viele Passagen hinweg und schafft die Grundlage für die folgende Zell-Transformation. Nach Transformation werden die Zellen dann hinsichtlich ihres tumorigenen Phänotyps (Verlust der Kontakt-Inhibierung, Wachstum in Weichagar, Tumorbildung in immun-supprimierten Nacktmäusen) selektiert und einzelne Klone als strahlentransformierte Zelllinien weiter kultiviert. Diese Vorgehensweise hat den Vorteil, dass die Schritte der Immortalisierung und der malignen Transformation voneinander getrennt sind, so dass Genveränderungen den einzelnen Entwicklungsstufen zugeordnet und mit der auslösenden Noxe in Verbindung gebracht werden können (Riches et al., 1997, Zitzelsberger et al., 2004).

Ein kritischer Schritt bei der Etablierung solcher Zellkultur-Modelle ist die Immortalisierung, da hierbei bereits Veränderungen im Genom induziert werden können (Zitzelsberger et al., 2001), die den Nachweis von Veränderungen, die während der nachfolgenden Transformation entstehen, erschweren. Dies kann durch die Verwendung von verbesserten Immortalisierungs-Verfahren vermieden werden, in denen die Zellen mit dem Telomerase-Konstrukt hTERT transfiziert werden (Bodnar et al., 1998, Heeg et al., 2006). Die mit hTERT transfizierten Zellen exprimieren die katalytische Domäne des Enzyms Telomerase, welche in normalen epithelialen Zellen ausgeschaltet ist. Durch die Transfektion des Gens wird die Verkürzung der Telomere verhindert und die Begrenzung der Teilungsfähigkeit der Zellen (Hayflick, 1965) aufgehoben. Die derart mittels hTERT immortalisierten Zellen zeigen in der Regel einen normalen, diploiden und stabilen Karyotyp (Piao et al., 2005).

Wenn diese Voraussetzungen nach der Immortalisierung gegeben sind, können chromosomale Veränderungen in den tumorigenen Zellen mit den Vorgängen während der Zelltransformation in Verbindung gebracht werden. Sofern die Zelltransformation durch ionisierende Strahlung ausgelöst wurde, beruhen strukturelle Chromosomenveränderungen auf strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen, die fehlerhaft repariert wurden (Jeggo und Lobrich, 2006). Einen Effekt auf das Zellwachstum haben solche strukturellen Umlagerungen dann, wenn wichtige Tumorgene in den Bruchpunkten lokalisiert sind und dadurch ebenfalls verändert werden.

Eine Genveränderung kann sich entweder aktivierend oder zerstörend auf die Funktionalität des betroffenen Gens auswirken. Im Falle einer Inaktivierung von für die

Zelle lebens-notwendigen Genen, stirbt die Zelle in der Regel ab. Die Deaktivierung von Tumor-Suppressorgenen bzw. die Aktivierung von Proto-Onkogenen stellt den ersten Schritt der malignen Transformation von Zellen dar (Merlo, et al., 2006).

Zur Erforschung der verschiedenen Arten von Genveränderungen stehen jeweils verschiedene Techniken zur Verfügung. Die Wahl der Technik richtet sich dabei häufig auch danach, welches Material zur Untersuchung zur Verfügung steht. In retrospektiven Studien mit humanem klinischem Tumor-Material dienen häufig Formalin-fixierte Gewebeproben als Forschungsgrundlage. Der Nachteil dieses Untersuchungsmaterials liegt in der schlechten DNA-Qualität, die durch die Formalin-Fixierung und der damit verbundenen Quervernetzung und Fragmentierung der DNA verursacht wurde. Allerdings ist es möglich, an diesen Proben Untersuchungen zur Genkopienzahl vorzunehmen (Devries et al., 2005).

Bisher wurden sehr viele Studien zur Untersuchung von Genkopienzahlveränderungen in Mammakarzinomen mit Hilfe von vergleichender genomischer Hybridisierung durchgeführt (van Beers und Nederlof, 2006). In der vergleichenden genomischen Hybridisierung wird unterschiedlich Fluoreszenz-markierte genomische Tumor-DNA und normale Referenz-DNA auf Metaphasen (konventionelle CGH, Kallioniemi et al., 1992) oder auf genomische Arrays (Array-CGH, Pinkel et al., 1998), welche das humane Genom repräsentieren, hybridisiert. Amplifikationen werden dadurch erkannt, dass im Verhältnis mehr DNA der amplifizierten Region als Referenz-DNA auf der Ziel-DNA bindet. Somit überwiegt die Fluoreszenzintensität der Tumor-DNA entweder in der entsprechenden Region des Metaphasen-Chromosoms (konventionelle CGH) oder auf dem entsprechenden Ziel-DNA-Fragment auf dem Array (Array-CGH). Im Falle eines Verlustes verhält es sich genau umgekehrt. Somit lassen sich Regionen genomischer Kopienzahlveränderungen ausmachen und gegebenenfalls Kandidatengene zuordnen. Dabei konnten sehr wichtige Genveränderungen, die eng mit dem klinisch-pathologischen Verlauf von Brusttumoren verknüpft sind, bei der Entstehung von Mammakarzinomen nachgewiesen werden. So zum Beispiel die Amplifikation von Her2/neu und Cyclin-D1 oder der Verlust des Tumorsuppressor-Gens TP53 (Bergamaschi et al., 2006).

Bei all diesen Untersuchungen an Mammakarzinomen wurden allerdings strukturelle Gen-Umlagerungen nicht berücksichtigt, da die an Formalin-fixierten Geweben ver-

fügbaren Techniken wie beispielsweise die vergleichende genomische Hybridisierung (CGH, Kallioniemi et al, 1992, Pinkel et al., 1998) eine Untersuchung dieser Veränderungen nicht erlauben. Hierfür sind Metaphasechromosomen aus den Tumorzellen erforderlich, die sich aus Formalin-fixierten Geweben nicht mehr gewinnen lassen. Dies hat vermutlich dazu geführt, dass bislang bei der Erforschung der molekulargenetischen Veränderungen in Mammakarzinomen fast ausschließlich Gen-Kopienzahl Veränderungen beobachtet wurden, während beispielsweise Translokationen kaum aufgedeckt worden sind. Um diese Klasse von Chromosomen-Veränderungen, die beispielsweise bei Schilddrüsentumoren eine wichtige Rolle spielen (Jhiang, 2000), auch bei der Entstehung von Mammakarzinomen zu untersuchen, muss eine neue Strategie angewendet werden, die darauf beruht, die strukturellen Genveränderungen zunächst in den bereits erwähnten Zellkultur-Modellen zu entdecken und sie dann in Mammakarzinomen nachzuweisen. Hierzu ist es notwendig, in den Zellkultur-Modellen chromosomale Bruchpunkte zu lokalisieren und die entsprechenden Regionen soweit einzugrenzen, dass einzelne Kandidatengene erkannt werden können.

Bei der so genannten Array-Painting Analyse (Fiegler et al., 2003, Gribble et al., 2004) werden veränderte Chromosomen, die in der spektralen Karyotypisierung erkannt worden sind, durchfluss-zytometrisch isoliert und deren DNA auf einen so genannten 1Mb BAC Array hybridisiert. Der BAC-Array ist ein Microarray, auf dem das menschliche Genom durch BAC-Klone im 1Mb-Abstand repräsentiert ist (Fiegler et al., 2003). Durch die Hybridisierung eines Markerchromosoms auf den Array werden die chromosomalen Bruchpunkte eines Markerchromosoms hoch-auflösend nachgewiesen. Die veränderten Bereiche werden dann mit Hilfe von DNA-Sonden in Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen so weit eingegrenzt, dass einzelne Kandidatengene, die von dem chromosomalen Bruch betroffen wurden, unter Verwendung von genomischen Datenbanken ermittelt werden können.

Es ist darüber hinaus notwendig, die Gen-Umlagerungen auf molekularer Ebene zu charakterisieren und ihre Auswirkungen auf die Gen-Expression auf Transkriptions- und Proteinebene zu untersuchen.

Schließlich müssen die Befunde auf Tumorproben überprüft werden und die Prävalenz der Genveränderungen in Mammakarzinomen bestimmt werden. Dies kann wiederum an Formalin-fixierten Geweben geschehen.

Diese Vorgehensweise führt letztlich zur Charakterisierung betroffener Signalübertragungswege und ermöglicht es, die vorhandenen Kenntnisse zur Karzinogenese in Brustzellen zu erweitern sowie strahlenspezifische Veränderungen nachzuweisen und neuartige Genveränderungen in Mammakarzinomen auffindig zu machen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, BAC-Array basierte Techniken zu etablieren, die es zum einen erlauben, Kopienzahlveränderungen von Genen in dem beschriebenen Zellkultur-Modell zu untersuchen (Array-CGH) und zum anderen Chromosomen-Veränderungen (Markerchromosomen) in diesem Zellkultur-Modell durch Array-Painting Analysen so zu charakterisieren, dass Kandidatengene, die von chromosomalen Brüchen betroffen waren, ermittelt werden konnten. Als Grundlage der Untersuchungen dienten hierbei immortalisierte und strahlentransformierte Zelllinien, die einen tumorigenen Phänotyp aufwiesen. Für die Array-Painting Analysen mussten die Durchfluss-Sortierung und die Array-basierte Analyse von Markerchromosomen etabliert werden. Die veränderten Kandidatengene sollten durch molekularbiologische Techniken weiter charakterisiert werden, indem die auf genomischer Ebene erhobenen Befunde mit der Expression auf Transkriptions- und Translations-Ebene verglichen wurden. Darüber hinaus war es Ziel, einzelne Gene, die sich in den B42-Zellen auf allen Ebenen verändert zeigten, in einer größeren Zahl von Mammakarzinomen auf so genannten Gewebe-Arrays zu validieren und diese Kandidatengene hinsichtlich ihrer Prävalenz in Tumoren zu überprüfen.

Die vorliegende Arbeit sollte somit ein Zellkultur-Modell zur Untersuchung von strukturellen Genom-Veränderungen im Mammakarzinom etablieren, neue Genveränderungen bei der Karzinogenese von Brustzellen identifizieren, sowie mögliche strahlenspezifische molekulare Veränderungen in diesen Tumoren aufdecken.

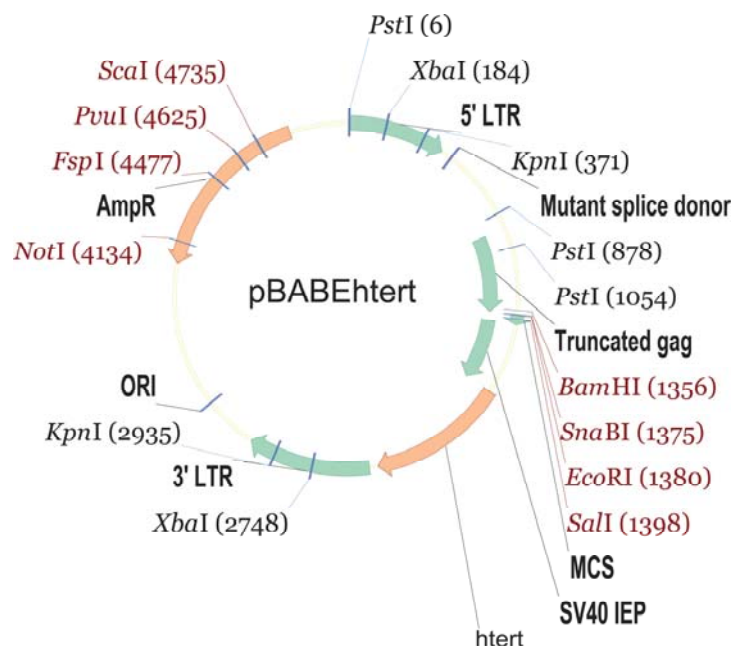
2 Material und Methoden

2.1 Das Zellkultur-Modell B42

Sowohl die immortalisierte Zelllinie, als auch die strahlentransformierten Zelllinien wurden unserem Labor freundlicherweise von Herrn Dr. Andrew Riches (St. Andrews University, St. Andrews, Schottland) zur Verfügung gestellt.

Die Primärzellen wurden dem Gewebe einer Patientin mit Mammakarzinom, welches im Rahmen einer Mastektomie entfernt werden mußte, entnommen. Dabei wurde die Primärkultur aus Zellen gesunden epithelialen Brustgewebes, das sich weit genug vom Tumor entfernt befand, gewonnen. Für eine Langzeit-Kultivierung der Zellen in Kultur war es notwendig, diese zu immortalisieren (Hayflick, 1965). Dafür wurde das Gen, das für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodiert, in den retroviralen Vektor pBABE-puro kloniert, welcher sich in der Träger-Zelllinie Ψ -CRIP befand (Wyllie et al., 2000). Die epithelialen Brustzellen wurden dann mit dem Vektor transfiziert. Aus diesen Zellen wurde die klonierte Zelllinie B42-htLG durch Antibiotika-Selektion auf Puromycin-resistente Zellen etabliert.

Abb. 1: Plasmidkarte des Plasmids pBABE puro



Die immortalisierte Zelllinie wurde fraktioniert mit 20 x 2 Gy γ -Strahlung bestrahlt, wobei zwischen den einzelnen Bestrahlungsschritten die Zellen 72 Stunden regenerieren konnten. Für die Überprüfung eines tumorigenen Phänotyps wurden die Zellen in serum-freiem Weichagar (0,3 %) kultiviert, um sie auf Überwindung der Kontaktinhibition („anchorage independent growth“) zu selektionieren. Aus dem Weichagar wurden vorhandene Kolonien gepickt und als B42-Zelllinien weiterkultiviert. Zwei dieser unabhängig voneinander entstandenen Zelllinien (B42-11 und B42-16) wurden im Rahmen dieser Arbeit mit molekularzytogenetischen und molekular-biologischen Methoden charakterisiert.

In Vorarbeiten wurden sowohl die Ausgangszelllinie (B42htLG) als auch die tumorigenen Zelllinien B42-11 und B42-16 zytogenetisch charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass die Zelllinie B42htLG bis auf ein zusätzliches Isochromosom 8 (Caruso et al., 2001) keine Veränderungen zeigt. Die Zelllinien B42-11 und B42-16 zeigten zahlreiche chromosomale Umlagerungen und genomische Kopienzahlveränderungen (siehe 3.1.3).

2.1.1 Zellkultur der B42-Zelllinien

2.1.1.1 *Material*

Medium:

MEBM® Mammary Epithelium Basal Medium (Clonetics™)

Trypsin-Lösung:

Trypsin-EDTA (1x) in HBSS W/O CA&MG W/EDTA, 4NA (GIBCO™)

Zellkulturflaschen:

50ml / 250ml (Greiner-bioone Cellstar®)

1xPBS

2.1.1.2 Durchführung

Die Zellen wurden bei 37°C und 10 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit konnten die Zellen nach mehreren Tagen für die Isolierung von genomischer DNA oder RNA geerntet werden. Dazu wurde kontrolliert, ob die adhären wachsenden Zellen den Boden der Kulturflasche dicht unter dem Invertmikroskop im Phasenkontrast bedeckten.

Für die Zellernte wurde zuerst das Kulturmedium vom Zellrasen abgesaugt, der dann mit 1x PBS gewaschen und mit 2 ml (50 ml Kulturflaschen) oder 4 ml (250ml Kulturflaschen) Trypsin-EDTA bedeckt wurde. Nach fünfminütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion des Trypsins durch Zugabe von serumhaltigem Medium (RPMI) gestoppt. Danach wurde die Zellmenge in der Zellsuspension mittels eines Coulter-Counters bestimmt. Anschließend wurden die Zellen bei ca. 250 x g für 10 Minuten zentrifugiert, um ein Zellpellet zu erhalten. Das Pellet wurde dann eingefroren oder direkt für die Gewinnung von genomischer DNA oder RNA weiterverarbeitet.

2.1.2 Metaphasenpräparation

2.1.2.1 Material

Colzemid-Lösung (Roche) 5 µg/ml

Hypotone Lösung:

0,075M KCl (Merck) 5,59g

ad 1000ml mit H₂O bidest

Carnoy´s Fixativ

3:1 Methanol (Merck):Eisessig (Merck)

Zellkulturschalen für Objektträger

QuadriPerm® Zellkulturschalen Vivascience™

2.1.2.2 Durchführung

Für die Metaphasenpräparation wurden vier sterile Objektträger in eine QuadriPerm-Schale gelegt und mit jeweils 5 ml Zellsuspension überschichtet. Danach wurden die Schalen bei 37 °C/10 % CO₂ für zwei bis drei Tage inkubiert, bis die gewünschte Zelldichte erreicht war. Um die Zellen dann in der Metaphase zu arretieren, wurden jeweils 25 bis 50 µl Colzemid-Lösung zugegeben und der Ansatz 4-24h bei 37 °C /10 % CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgte die hypotone Behandlung der Zellen, bei der die Objektträger mit KCl-Lösung überschichtet und für 15-20 min bei 37°C inkubiert wurden. Dabei blähten sich die mitotischen Zellen auf und platzten bei Zugabe von Fixativ unter Spreitung der Metaphasenchromosomen. Durch dreimaliges Überschichten mit Carnoy's Fixativ wurden die Chromosomen auf dem Objektträger fixiert. Die erste Fixierung erfolgte auf Eis, die restlichen zwei bei Raumtemperatur.

Die fertigen Präparate wurden an der Luft getrocknet und für ca. eine Woche bei Raumtemperatur gealtert.

2.2 Molekularzytogenetische Methoden

2.2.1 Array-basierte vergleichende genomische Hybridisierung (Array-CGH)

Außer durch strukturelle chromosomale Veränderungen und Punktmutationen können auch Zugewinne und Verluste von genomischem Material zu einer Deregulation von Genen führen. Zum Nachweis dieser numerischen Genom-Kopienzahl-Veränderungen gibt es die Methode der vergleichenden genomischen Hybridisierung oder CGH (Comparative Genomic Hybridization, Kallioniemi, et al., 1992).

Das Prinzip der CGH besteht darin, dass das zu untersuchende Genom hinsichtlich numerischer Unterschiede mit einem Referenzgenom verglichen wird. Als Grundlage dafür dienen die jeweils unterschiedlich Fluoreszenz-markierten DNAs von Test- und Referenzgenom. In der konventionellen oder chromosomalen CGH werden diese auf Metaphasenpräparate eines gesunden Individuums hybridisiert. Danach wird die Fluoreszenz beider Farbstoffe entlang der Chromosomenachsen gemessen. Ein

DNA-Zugewinn (Amplifikation) liegt dann vor, wenn in einer bestimmten chromosomalen Region die Fluoreszenz der Proben DNA höher ist, als die der Referenz DNA. Von einem DNA-Verlust (Deletion) spricht man, wenn die Fluoreszenz der Referenz-DNA überwiegt. Die Auflösung, mit der mit diesem Ansatz genomische Kopienzahlveränderungen gemessen werden können, liegt bei 7-10 Megabasen (Coe et al., 2007).

Diese Technik der konventionellen CGH wurde dadurch weiterentwickelt, dass anstelle von Metaphasenpräparaten so genannte genomische DNA-Arrays verwendet werden. Dabei handelt es sich um Microarrays, auf welchen DNA-Moleküle immobilisiert sind, die in Abhängigkeit von Anzahl und Größe ein ganzes Genom oder Teilgenom mit einer bestimmten Auflösung repräsentieren. In der vorliegenden Arbeit wurden so genannte 1Mb-BAC Arrays verwendet. Dabei handelt es sich um speziell beschichtete Glasobjektträger, auf welchen die Plasmid-DNA von ca. 3400 BAC Klonen (Insert-Größe: ~ 130 kb) aufgetragen wurde. Diese Klon-Sammlung deckt das Genom im Mittel im Abstand von einer Megabase ab, wodurch genomische Kopienzahlveränderungen mit einer Genauigkeit von etwa 1Mb nachweisbar sind (Fiegler, et al., 2003).

2.2.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Zelllinien

Für die Isolierung von genomischer DNA wurde das QIAmp® DNA Mini Kit von Qiagen verwendet. In die Reaktion wurden $2 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ Zellen eingesetzt.

Die Zellen wurden mit Proteinase K verdaut und das DNA-Lysat über Ionentauschersäulchen zentrifugiert. Die durch seine negative Ladung an das Material gebundene DNA wurde anschließend gewaschen und mit Wasser eluiert.

2.2.1.1.1 Material (Teile des Qiagen QiAMP Kits):

Die Puffer und Lösungen sind Bestandteil eines Kits, die genauen Zusammensetzungen wurden vom Hersteller nicht angegeben.

QIAmp-Säulchen

Puffer AL

Puffer ATL

Puffer AW1

Puffer AW2

Puffer AE

Proteinase K

2.2.1.1.2 Durchführung

Die adhären wachsenden Zellen wurden durch Trypsin von der Flaschenoberfläche gelöst, zentrifugiert und das Pellet (maximal 5×10^6 Zellen) zwei Mal mit PBS gewaschen und in 200 μ l PBS resuspendiert. Es wurden 10 μ l Proteinase K-Lösung und 200 μ l Puffer AL zugegeben, gemischt und der Ansatz für 10 min bei 56°C inkubiert. Danach wurden 200 μ l Ethanol (100%) dazu gegeben, die Lösung bei 6000 g durch das Säulchen zentrifugiert und mit 500 μ l Puffer AW1 und 500 μ l Puffer AW2 gewaschen. Nachdem das Säulchen trocken zentrifugiert wurde, wurde die DNA mit 200 μ l Wasser (65°C) eluiert.

Die Konzentration und Reinheit der DNA Lösung wurde durch Messung mit dem NanoDrop Spectrophotometer (NanoDrop Technologies) bestimmt.

2.2.1.2 *Markierung der Test- und Referenz DNA*

Damit Test- und Referenz DNA nach Hybridisierung auf dem Array nachgewiesen werden konnten, mussten diese mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Dafür wurden die Ausgangs-DNAs in einer so genannten ‚Random-Prime-Labeling‘-Reaktion mit Nukleotiden markiert, die mit Cy3-(Test-DNA) oder Cy5-Molekülen (Referenz-DNA) gekoppelt sind.

Für die Markierungs-Reaktion wurde das BioPrime-Kit (Invitrogen) verwendet. Beim Random Prime Labeling wurden Zufalls-Oktamere als ‚Random Primer‘ eingesetzt.

Ausgangs-DNA und Primer wurden denaturiert und auf 37°C abgekühlt, so dass die Primer an der einzelsträngigen DNA binden konnten. Die Primer wurden dann von der so genannten Klenow-Polymerase (DNA Polymerase I ohne Exonukleaseaktivität) am 3'-Ende verlängert. Da diese Polymerase so genannte ‚strand-displacement‘ Eigenschaft besitzt, wird ein bereits neu synthetisierter Doppelstrang wieder aufgeschmolzen sobald die Klenow Polymerase auf das 5' Ende eines bereits neu synthetisierten Doppelstrangs trifft. Da bei der Synthese entweder Cy3- oder Cy5-markiertes dCTP in die neu synthetisierte DNA eingebaut wird, findet zum einen Fluoreszenzmarkierung und zum anderen auch eine DNA-Amplifikation statt.

2.2.1.2.1 Material

Die Puffer und Lösungen sind Bestandteil des BioPrime-Kits.

Random-Primer Lösung

Klenow-Enzym

10 x dNTP Mix (1 mM dCTP, 2 mM dATP, 2 mM dGTP, 2 mM dTTP in H₂O)

1 mM Cy3-dCTP (GE Healthcare)

1 mM Cy5-dCTP (GE Healthcare)

1 M NaCl

2.2.1.2.2 Durchführung

In zwei separaten RGs wurden jeweils 450 ng Test und 450 ng Referenz DNA mit 60 µl Random-Primer-Lösung und 3 µl NaCl gemischt und für 5 min bei 100°C denaturiert. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurden 15 µl 10x dNTP-Mix, 2 µl Cy3-dCTP (Test-DNA) oder 2 µl Cy5-dCTP (Referenz-DNA) und 3 µl Klenow-Fragment zum Ansatz gegeben. Nach kurzem Mischen wurde der Ansatz für 16 bis 20 Stunden (über Nacht) bei 37°C inkubiert. Danach mußte die markierte DNA aufgereinigt werden.

2.2.1.3 Aufreinigung des Ansatzes

Für die Aufreinigung wurden pro Ansatz (150 µl) drei G-50-Sephadex Säulchen (GE Healthcare) verwendet. Dafür wurden die Säulchen zur Durchmischung des Sephadex-50 Gels kurz geschüttelt, die Schutzkappe abgedreht und der Puffer für eine Minute bei 735 x g aus dem Säulchen zentrifugiert und verworfen. Danach wurden jeweils 50 µl an markierter DNA auf drei Säulchen aufgetragen und für 2 min bei 735 x g zentrifugiert. Die Zentrifugate wurden vereinigt und die Konzentration und Cy3-/Cy5-Inkorporationsrate mit Hilfe des NanoDrop-Spectrophotometers (NanoDrop Technologies) bestimmt.

2.2.1.4 Array-CGH Hybridisierung von 1Mb BAC Arrays unter Benutzung einer Hybridisierungsstation

Das Protokoll wurde für die Hybridisierung mit einem 21 mm x 50 mm Hybridisierungsmodul der Hybridisierungsstation HS400 (Tecan) optimiert. Da die Sonde innerhalb der Hybridisierungskammer bewegt wird, wurde ein spezieller Hybridisierungspuffer, der weniger viskos als herkömmlicher Hybridisierungspuffer ist, verwendet.

Der Objektträger wurde durch eine sog. Prä-Hybridisierung mit Prä-Hybridisierungslösung (PHL) vorgepuffert, so dass sich die eigentliche Hybridisierungslösung nach der Injektion in die Hybridisierungskammer gleichmäßig über die Oberfläche verteilen konnte. Dadurch wurde die Entstehung von Hybridisierungsartefakten minimiert.

Die PHL bestand aus 50 µg Heringsperma-DNA (ultraschall fragmentiert; Invitrogen) gelöst in 6 µl Hefe-tRNA (100 µg/µl; Invitrogen) und 68 µl Hybridisierungspuffer.

Die HL bestand aus jeweils 150 µl markierter und gereinigter Referenz- und Proben-DNA (jeweils etwa 25-30 µg) und 135 µg Cot-1-DNA (1 µg/µl; Invitrogen), die in einer Ethanolfällung mit 43,5 µl Natriumacetat (3M, pH 4.3) und 1000 µl Ethanol (abs.) ge-

fällt und in 6 µl Hefe-tRNA und 68 µl Hybridisierungspuffer gelöst wurden. Das Pellet wurde vor dem Lösen einmal mit Ethanol (70 %) gewaschen.

Hybridisierungspuffer (HS400):

Formamid (deionisiert, Sigma)	50 %
Dextransulfat (25%, Sigma)	7 %
Tween 20 (Sigma)	0,1 %
SSC (20 x)	2 x
Tris pH 7.4	10 mM
EDTA pH 8.0	25 mM

Der Hybridisierungspuffer wird bei -20°C gelagert und wird vor Benutzung für fünf Minuten bei 70°C inkubiert, damit sich ausgefallene Bestandteile lösen können und der Puffer besser pipettierbar wird.

2.2.1.5 Hybridisierung und Waschen der Arrays

Die Hybridisierung fand in einer automatisierten Hybridisierungsstation (HS400, Tecan) statt. Dafür mussten Waschlösungen hergestellt werden, um unspezifisch gebundene Sonde vom Array zu waschen. Die Hybridisierungsstation verfügt über sechs Kanäle, an denen Lösungen angeschlossen werden können. Die Belegung der Kanäle war wie folgt:

Kanal 1: 50% Formamid/2 x SSC, pH 7.0

Kanal 2: 40% Formamid/2 x SSC, pH 7.0

Kanal 3: 2 x SSC/0,1 % SDS

Kanal 4: 0,1 x SSC

Kanal 5: leer

Kanal 6: H₂O (DNAse/RNAse-frei; Gibco/Invitrogen)

Das Programm, mit der in der Hybridisierungsstation die Reaktion abläuft, lässt sich mit der Steuerungssoftware (Tecan) erstellen. Das Programm lässt sich beliebig aus folgenden vier verschiedenen Elementen zusammensetzen:

‚Denaturation‘: Es lassen sich die Parameter Temperatur und Dauer einstellen. Das Gerät verfügt über ein Peltier-Element, mit dem sich die Temperatur der Hybridisierungskammer regulieren lässt. Es sind Hitzedenaturierungen bis zu einer Temperatur von 80°C zugelassen.

‚Probe-Injection‘: Mit diesem Element lässt sich der Zeitpunkt der Probeninjektion bestimmen.

‚Wash‘: Es kann der Kanal mit zugehöriger Waschlösung, die verwendet werden soll, gewählt werden, mit welcher Lösung aus welchem Kanal gewaschen werden soll. Dabei sind die Parameter ‚Wash Time‘, ‚Soak Time‘, ‚Temperature‘ und ‚number of repetitions‘ einstellbar. ‚Wash time‘ bestimmt die Dauer, mit der die angewählte Waschlösung über den Objektträger fließt. Da die Sondenkonzentration immer Null ist, ist diese Art zu Waschen stringenter als die herkömmliche Waschung in Glasküvetten. Mit ‚Soak‘ kann bestimmt werden, wie lange die Waschlösung auf dem Objektträger ruht. In der Regel wäscht man mit einer Kombination aus ‚Wash‘ and ‚Soak‘. ‚Number of Repetitions‘ bestimmt wie oft der Zyklus aus ‚Wash‘ and ‚Soak‘ wiederholt wird.

‚Slide Drying‘: Mit der an die Maschine angeschlossenen Stickstoffgas-Zufuhr lässt sich nach dem Waschen der Objektträger durch einen Gasstrom trocknen. Des Weiteren befindet sich nach dem Trocknen der Objektträger in der Schutzatmosphäre des Stickstoffs und ist somit vor der oxidierenden Wirkung des Sauerstoffs und Ozons in der Luft geschützt.

Das Programm, mit dem die Hybridisierung der 1Mb BAC Arrays durchgeführt wurde, hat folgenden Aufbau:

Zeile	Element	Parameter
1	Wash	Temp. °C: 37.0, First: Yes, Ch.: 1, Runs: 1, Wash time: 0:00:15, Soak time: 0:00:00
2	Probe Injection	Temp. °C: 37.0
3	Hybridization	Temp. °C: 37.0, Agitation Frequency: Medium, Time: 0:45:00
4	Probe Injection	Temp. °C: 37.0
5	Hybridization	Temp. °C: 37.0, Agitation Frequency: Medium, Time: 23:00:00
6	Wash	Temp. °C: 37.0, First: Yes, Ch.: 2, Runs: 2, Wash time: 0:01:30, Soak time: 0:01:00
7	Wash	Temp. °C: 37.0, First: Yes, Ch.: 3, Runs: 2, Wash time: 0:01:30, Soak time: 0:01:00
8	Wash	Temp. °C: 37.0, First: Yes, Ch.: 4, Runs: 1, Wash time: 0:00:30, Soak time: 0:00:00
9	Slide Drying	Temp. °C: 30.0, Time: 0:02:00, Final Manifold Cleaning: Yes, Ch.: 6

Nachdem der trockene Objektträger aus dem Gerät entfernt wurde, wurde er so bald wie möglich gescannt.

2.2.1.6 Scannen des Arrays

Die fertig hybridisierten Arrays wurden mit einem Laser-Array Scanner (GenePix Personal 4100A, Axon Laboratories, Molecular Devices Corp, Chicago, USA) gescannt. Dabei handelt es sich um ein Gerät, das ähnlich wie ein Laser-Scanning-Mikroskop die Objektträgeroberfläche mit Lasern der Wellenlänge 550 nm für das Fluorophor Cy3 und 649 nm für Cy5 abtastet. Das emittierte Licht von 570 nm für Cy3 und 670

nm für Cy5 wird mit so genannten Photomultipliern (PMT) detektiert. Der Verstärkungsfaktor des Photomultipliers wird mit dem so genannten PMT-Gain bestimmt, dem ein Wert zwischen 0 und 1000 zugewiesen werden kann. Der Array-Scanner wird mit der Software GenePix pro 6.0 (Axon Laboratories, Molecular Devices Corp, Chicago, USA) gesteuert. Des Weiteren finden Messungen der Fluoreszenzintensitäten und die Ausgabe der entsprechenden Werte mit dieser Software statt.

Im ersten Schritt mußten die PMT-Gain Werte individuell für jeden hybridisierten Array im Cy3- und Cy5-Kanal angepasst werden. Dafür ist in der Software eine Routine implementiert, die mit ‚Set PMT-Gain‘ gestartet werden kann. Dabei wurde der Array mit geringer Laserstärke und verschiedenen PMT-Gains so lange gescannt, bis bei entsprechenden Werten die mittleren Cy3- und Cy5-Fluoreszenzintensitäten etwa gleich sind. Danach wurde nach Auswahl des zu scannenden Bereiches der Array abgerastert. Das Bild wurde als TIF-Datei mit zwei Ebenen, welche jeweils das Graustufenbild der beiden Kanäle enthalten, gespeichert.

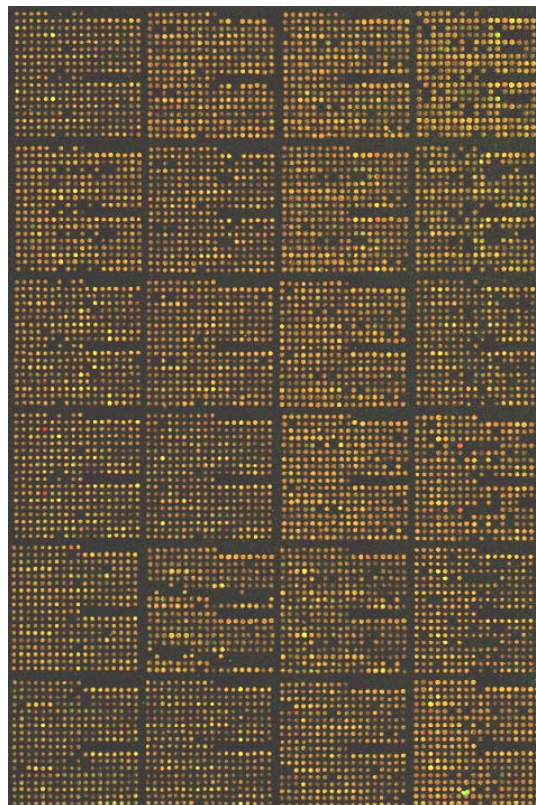
2.2.1.7 Messung der Fluoreszenzintensitäten und Ausgabe der Rohdaten in einer GPR-Datei

Nachdem das Programm das Bild des gescannten Arrays geladen hatte, wurde das so genannte ‚Array List File‘ geladen. Dabei handelt es sich um eine Datei, die dem Programm über den Aufbau des Arrays Auskunft gibt und definiert, welche Ziel-DNA sich in den einzelnen Spots befindet. Mit Hilfe des ‚Array List Files‘ kann das Programm ein Gitter erstellen, das dem theoretischen Muster des Arrays entspricht (Abb. 3). Jeder Kreis entspricht dabei einem so genannten ‚Feature‘. Ein ‚Feature‘ beschreibt alle Pixel innerhalb des Kreises. Da der Median aller Pixel innerhalb eines Features in die Berechnung der Fluoreszenzintensität eines Spots eingeht, ist es wichtig, dass jedes ‚Feature‘ genau deckungsgleich mit dem tatsächlichen Spot ist. Aufgrund von technischen Variabilitäten kommt es bei den Spots zu Abweichungen in Position, Größe und Form. GenepixPro verfügt über eine Routine (‚Find Array, Align Features‘), welche zuverlässig die theoretischen ‚Features‘ auf die tatsächlichen Gegebenheiten anpasst. Nachdem man das Ergebnis dieser Korrektur überprüft hat, kann man durch Aktivieren der ‚Analyze‘-Funktion, die Messung starten. Dabei wer-

den sowohl die Mediane der Vordergrund-Fluoreszenz, als auch die der Hintergrund-Fluoreszenz im Cy3- und Cy5-Kanal für jeden Spot ermittelt. Als Grundlage für die Ermittlung der Hintergrund-Fluoreszenz dient ein ringförmiger Bereich um die Spots herum.

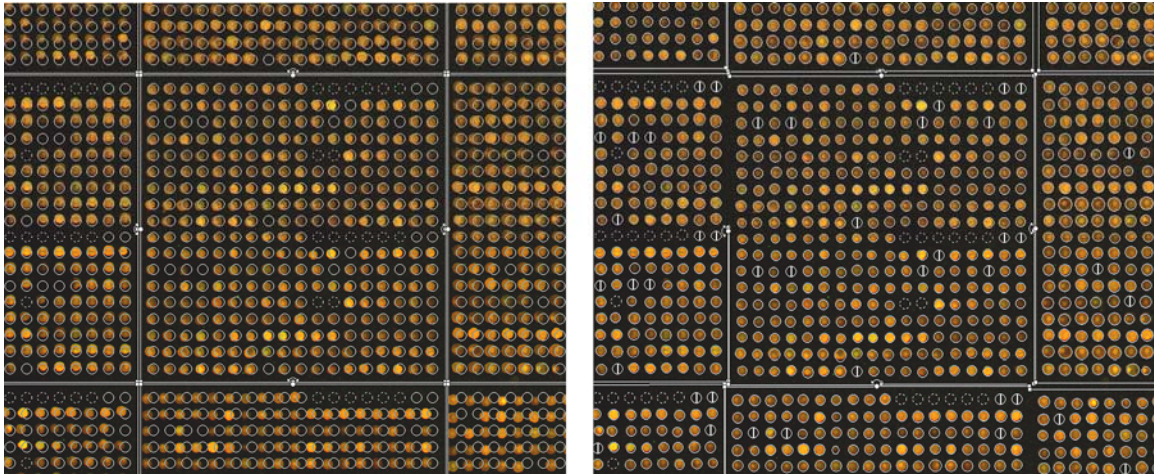
Das Programm schreibt alle Ergebnisse in ein so genanntes GenePix-Result-File (Endung: .gpr). Diese Datei enthält als wichtigste Daten die Vorder- und Hintergrund-Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Spots und die so genannte ‚Flagging‘-Information, welche Auskunft darüber gibt, ob ein Spot zur Auswertung zugelassen ist oder nicht. Es lassen sich bestimmte Parameter definieren, mit denen man festlegen kann, nach welchen Kriterien Spots herausgefiltert werden. Nachdem das Result-File erstellt und gespeichert wurde kann man zum nächsten Schritt, der Auswertung, übergehen.

Abb. 2: Gescanntes RG-Bild der 1Mb-Array Hybridisierung von B42-16



Das Bild zeigt die übereinander projizierten Bilder der Cy3- und Cy5-Fluoreszenz des Arrays. Der Array besteht aus 4 mal 6 Blocks, wobei jeder Block aus 18 mal 18 Zeilen und Reihen besteht.

Abb. 3: Spot-Gitter, welches aus dem ‚Array List File‘ generiert wurde



Das Gitter vor der Anpassung (links) und nach der Anpassung (rechts) mit GenePix Pro

2.2.2 Auswertung eines Array-CGH Experimentes mit der Web-basierten Plattform CAPweb

2.2.2.1 *Generelle Aspekte der Auswertung eines Array-CGH Experiments*

Das Ziel bei der Auswertung eines Array-CGH Experimentes ist die Identifizierung von genomischen Bereichen, die in ihrer Kopienzahl verändert sind. Bei Duplikationen, oder allgemein Amplifikationen (Kopienzahl unbekannt) erhöht sich das Verhältnis von Cy3-Fluoreszenz zu Cy5-Fluoreszenz für BAC Klone, welche die veränderte Region repräsentieren. Im Falle eines Verlustes an genomischem Material erhöht sich das Verhältnis von Cy5-Fluoreszenz zu Cy3-Fluoreszenz. Diese Verhältnisse werden zum Zwecke der Auswertung in Quotienten (Ratios) angegeben. Dabei kann man mit dem linearen oder dem zur Basis 2 logarithmierten Quotienten rechnen. Der Vorteil des logarithmierten Quotienten besteht darin, dass die Nulllinie bei 0 liegt und dass logarithmierte Quotienten in vielen Berechnungen praktischer zu handhaben sind. Im Falle einer Amplifikation ist der lineare ‚Ratio‘ größer eins und der logarithmische größer 0, während der lineare ‚Ratio‘ bei einer Deletion kleiner 1 und der logarithmische ‚Ratio‘ kleiner 0 ist. Da die Werte ‚normaler‘ BAC Klone selten genau Null sind, sondern vielmehr, abhängig vom experimentellen Rauschen, mehr oder weniger um den Nullwert streuen, ist es unerlässlich einen Grenzwert zu setzen, der im Falle einer Deletion unter- und im Falle einer Amplifikation überschritten werden muß. Für die Berechnung von Grenzwerten gibt es vielfache Möglichkeiten, wobei die Wahl der Methode mit den experimentellen Gegebenheiten genau abgestimmt sein muß. Liegt der Auswertung ein ‚ruhiger‘ Datensatz zu Grunde, lassen sich einfach feste Schwellenwerte setzen, während bei sehr ‚unruhigen‘ Datensätzen, wie sie beispielsweise bei der Untersuchung Formalin-fixierter Gewebe vorkommen, komplexe statistische Algorithmen benutzt werden müssen, um die Grenzwerte zu bestimmen.

2.2.2.2 *Hintergrundkorrektur*

Bei jedem Hybridisierungsexperiment erhält man Proben-Ziel-DNA-Hybride, die spezifisch oder aber unspezifisch sind. Bei den unspezifischen Hybriden handelt es sich um kleine Proben-DNA-Fragmente, die über schwache Bindungen an anderen, als

den gewünschten Regionen auf der Ziel-DNA binden. Durch Waschen der immobilisierten Ziel-DNA mit Waschpuffern bestimmter, auf das Experiment abgestimmter Stringenz lassen sich die Bindungen unspezifischer Hybride wieder lösen.

Neben diesen unspezifischen Proben-Ziel-DNA Hybriden gibt es auch unspezifische Bindung von Proben-DNA auf Bereichen der Objektträgeroberfläche jenseits der Ziel-DNA-Reaktionsflächen. Diese ebenfalls unspezifischen Bindungen sind kovalente Bindungen zwischen der Oberfläche des Objektträgers und der Proben-DNA. Die daraus resultierende Hintergrund-Fluoreszenz vermischt sich mit der Vordergrund-Fluoreszenz. Dies stellt bei der Auswertung einen Störfaktor dar, weil die Hintergrund-Fluoreszenz in der Regel nicht gleichmäßig über den Objektträger verteilt ist. Somit werden in Bereichen hoher Hintergrund-Fluoreszenz die tatsächlichen Fluoreszenz-Verhältnisse verzerrt, was dazu führt dass Klone falsch positiv oder negativ ausgewertet werden können.

2.2.2.3 Normalisierung

Datensätze von Array-CGH-Experimenten müssen zum Zwecke der Segmentierung und der Vergleichbarkeit mit anderen Datensätzen normalisiert werden. Im Allgemeinen versteht man unter Normalisierung die Skalierung eines Wertebereichs auf einen bestimmten Bereich, der üblicherweise bei 0 oder 1 liegt. Da in dieser Arbeit mit logarithmierten Quotienten der Fluoreszenzintensitäten, kurz Log_2 -Ratios, gerechnet wurde, wurden die Wertebereiche auf den Bereich um die Nulllinie normalisiert. Abweichungen von diesem Wertebereich lassen sich durch zwei Faktoren begründen: Unterschiedliche Markierungs- und Amplifikations-Effizienz der eingesetzten Test- und Referenz-DNA und lokale Artefakte.

Es ist technisch nicht möglich, die Markierungsreaktion so zu steuern, dass man für Test- und Referenz-DNA die exakt gleichen Einbau- und Amplifikationsraten bekommt. Dies hat zur Folge, dass das Mittel der Log_2 -Ratios des Datensatzes immer entweder in positive oder in negative Richtung von der Nulllinie abweicht. Diese Art der Abweichung betrifft den ganzen Datensatz gleichermaßen.

Weitere Quellen für die Abweichung von der Nulllinie sind lokale, nur auf bestimmte Bereiche des Arrays begrenzte Artefakte. Solche Artefakte können z.B. lokale Erhöhungen und Erniedrigungen der Background-Intensität eines oder beider Farbstoffe sein. Des Weiteren können veränderte äußere Faktoren wie Luftfeuchte oder Temperatur während der Herstellung eines Arrays sich auf die Morphologie der Spots, die während der veränderten Bedingungen entstanden sind, auswirken. Außerdem teilen alle Spots eines Blocks, die von einer Drucknadel (Pin) produziert wurden, gleiche Eigenschaften hinsichtlich ihrer Morphologie (Ausdehnung, DNA-Gehalt und Form).

Hier wurden zwei Arten der Normalisierung verwendet, die Block-für-Block- und die Räumliche Normalisierung.

2.2.2.3.1 Block-für-Block-Normalisierung (Block by Block Normalisation, BBN)

Die Grundannahme bei der BBN (Yang et al., 2002) ist, dass alle Spots, die von demselben Pin produziert wurden, ähnliche Eigenschaften besitzen und damit eine zum Zweck der Normalisierung geschlossene Wertemenge bilden. Somit werden bei der BBN alle Log_2 Ratios eines Blocks (16 Blöcke für Sanger-Array und 24 Blöcke für PathCam-Array) genommen und davon der Median gebildet. Mit diesem Wert teilt man alle Einzelwerte (Log_2 -Ratios) des Datensatzes und erhält einen normierten Datensatz, dessen Werte im Mittel um den Nullwert schwanken.

2.2.2.3.2 Räumliche Normalisierung

Bei der räumlichen Normalisierung werden lokale Änderungen der mittleren Fluoreszenzintensität auf dem Array identifiziert, die entsprechenden Bereiche eingegrenzt und die Werte innerhalb der Eingrenzung als Wertemenge, die normalisiert wird, herangezogen. Als Annahme dient bei dieser Art der Normalisierung, dass die Ziel-DNA-Fragmente sich in zufälliger Reihenfolge auf dem Array befinden. Das bedeutet, dass eine Erhöhung oder Erniedrigung der Fluoreszenzintensität eines Farbstoffes innerhalb eines bestimmten Bereiches keine biologische Ursache in Form von amplifizierten oder deletierten genomischen Bereichen, haben kann. Diese Art der Normalisierung ist bezüglich der Berechnung und den verwandten Algorithmen wesentlich

aufwendiger als die BBN. Dafür ist die räumliche Normalisierung genauer, weil in die Berechnung die Eigenschaften jeder individuellen Hybridisierung eingehen.

Für die Berechnung der räumlichen Normalisierung wurde das R-Paket MANOR (Neuvial et al., 2006), welches für die Statistikplattform R programmiert wurde, verwendet.

Der Algorithmus arbeitet in drei Schritten:

Schritt 1: Abschätzung eines örtlichen Trends auf dem Array.

Schritt 2: Segmentierung des Arrays in Bereiche mit ähnlichen Trend-Werten.

Schritt 3: Identifizierung von Bereichen, die bezüglich ihrer mittleren Log_2 -Ratios in die eine oder andere Richtung verzerrt sind.

2.2.2.4 Segmentierung des Datensatzes

Nachdem ein normalisierter Datensatz eines Array-CGH-Experimentes vorliegt, schließt sich als nächster Schritt die so genannte Segmentierung an. Darunter versteht man die Einteilung des Datensatzes in Segmente, wobei die Segmente entweder nicht-veränderte, deletierte oder amplifizierte Regionen repräsentieren. Besonders interessant sind die die jeweiligen Grenzen eines Segments, weil diese die chromosomalen Bruchpunkte der amplifizierten oder deletierten chromosomalen Bereiche repräsentieren.

In dieser Arbeit wurde für die Berechnung solcher Segmente das R-Paket GLAD (Hupe et al., 2004) verwendet. Das Prinzip der Berechnung mit GLAD beruht auf dem so genannten Adaptive Weights Smoothing (AWS). Dabei wird für jeden Wert eines Ziel-DNA-Fragments in Abhängigkeit zu den Werten der auf dem Genom benachbarten Ziel-DNA-Fragmente geprüft, ob dieser Wert dem Segment (in GLAD: MSHR Maximum Spanning Homogenous Region) des vorangegangenen Wertes oder des nächsten Wertes zugeordnet werden soll. Der Algorithmus berechnet dabei eine so genannte „Smoothing Line“, mit dessen Hilfe auch Datensätze anschaulich

segmentiert werden können, die ein relativ hohes Hintergrund-Rauschen aufweisen (z.B. Array-CGH-Daten von Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Geweben).

2.2.2.5 Parameter zur Qualitätsbeurteilung eines Array-CGH-Experimentes

Die Qualität eines Array-CGH-Experimentes kann abhängig von mehreren Faktoren, schwanken. Aus diesem Grund ist es notwendig abzuschätzen, ob die Daten, die aus einem solchen Experiment gewonnen wurden, für die Auswertung einsetzbar sind oder verworfen werden müssen.

Eine Kenngröße für die Beurteilung eines Array-CGH-Experiments ist der prozentuale Anteil an Klonen, der in die Auswertung eingeht. Dieser Anteil sollte bei mehr als 90 % liegen. Ist der Anteil niedriger, kann man davon ausgehen, dass entweder der Array oder die DNA, welche in die Hybridisierung eingesetzt wurde, nicht intakt war. Eine weitere Kenngröße ist die Standardabweichung des Experiments. Diese berechnet sich aus allen \log_2 -Ratios eines Arrays und gibt das Ausmaß des Rauschens des Datensatzes wider. Generell sind die Standardabweichungen von Experimenten mit frischer DNA wesentlich niedriger als die mit DNA aus Formalin-fixiertem Gewebe.

Datensätze von Array-CGH-Experimenten mit weniger als 90 % auswertbaren Klonen oder mehr als 0,4 Standardabweichung wurden verworfen.

2.3 Durchfluss-zytometrische Isolierung von Markerchromosomen

2.3.1 Prinzip der Fluoreszenz-aktivierten Durchfluss-Zytometrie (FACS) von Chromosomen

Chromosomen in Reinform können durch eine spezialisierte Form der Durchflusszytometrie, der Chromosomen-Durchfluss-Sortierung gewonnen werden (Fusco et al. 1989). Im Vergleich zu anderen Methoden („Chromosome Scratching“, Chromosomen-Laser-Mikrodissektion) besteht der Vorteil dieser Methode zum einen in der Reinheit der Präparation und zum anderen in der hohen Zahl an Chromosomen (> 500), die in kurzer Zeit gewonnen werden können. Dies erlaubt eine relativ hohe Ausbeute an DNA aus den isolierten Chromosomen, welche in nachfolgende Reaktionen eingesetzt werden kann.

Für die Durchfluss-Sortierung müssen die Zellen, die sich in Kultur befinden, in der Metaphase arretiert werden. Nach der Zellernte werden die Chromosomen über eine sog. hypotone Behandlung aus den Zellen entlassen und in einem speziellen Puffer suspendiert. Die Chromosomen-Suspension wird im Zytometer über eine sog. hydrodynamische Fokussierung (Crosland-Taylor, 1953) in die Mitte des Flüssigkeitsstroms zentriert (Abb. 4) und tritt als dünner Flüssigkeitsstrahl aus der Düse („Nozzle“) aus. Damit sich einzelne Partikel (hier Chromosomen) voneinander trennen lassen, müssen sich diese in einzelnen Tropfen befinden.

An der Düse befindet sich ein sog. Piezzo-Element, welches, elektronisch gesteuert, die Düse mit definierter Amplitude und Frequenz in Schwingung versetzen kann. Dadurch entstehen in dem System stehende Wellen, die eine definierte Tröpfchenbildung verursachen (Watson, 1999). Das Gerät wird dabei so eingestellt, dass die Tröpfchen genau so groß sind, dass statistisch jeder Tropfen einen Partikel (hier Chromosom) enthält. Durch die Frequenz, mit der die „Nozzle“ schwingt, lässt sich auch der Abrißpunkt („break-off point, Abb. 5) genau einstellen. Der Abrißpunkt bleibt dabei in seiner Lage stabil.

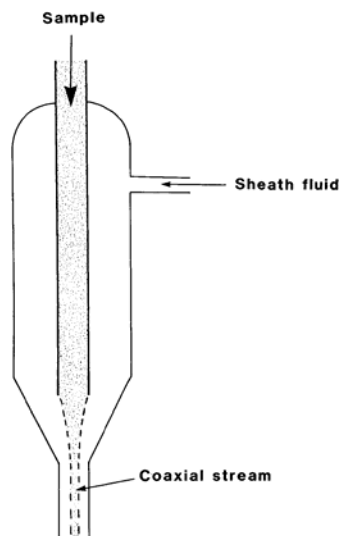
Der Flüssigkeitsstrahl, der die Düse verläßt, wird mit zwei Lasern, die senkrecht zur Strahlachse stehen, beleuchtet. Die beiden Laserstrahlen werden auf einen Punkt („analyses point“) der sich senkrecht zum Strahl, kurz nach dessen Austritt aus der „Nozzle“, befindet (Abb. 5), ausgerichtet. Die Laser besitzen Wellenlängen von 457

nm und 350 nm für die Anregung der Fluoreszenz-Farbstoffe Chromomycin A3 (CA3) bzw. Hoechst 33258 (HO). Die beiden Farbstoffe färben AT-reiche (HO) und GC-reiche (CA3) Sequenzen in der DNA an. Die Laser regen im „Analysis Point“ Fluoreszenz an, und das Emissionslicht wird über ein Spiegel- und Linsensystem (sog. Optische Bank) zu sog. Photovervielfacherröhren („Photomultiplier tube“, PMT) gelenkt. Die PMT verstärken das Signal und leiten es zur Messung an den angeschlossenen Computer weiter. Die Meßdaten werden von der Software CellQuest (BectonDickinson) verrechnet und in einem zweidimensionalen Durchfluss-Karyogramm („Flow-Karyogramm“, Abb. 6) wiedergegeben. Mit Hilfe des Durchfluss-Karyogramms lassen sich neben den normalen Chromosomen strukturell veränderte Chromosomen identifizieren. Markerchromosomen, die aufgrund von Translokationen, größeren Amplifikationen oder Deletionen in ihrer Struktur und Größe verändert sind, unterscheiden sich von den normalen Chromosomen und sind somit im Durchfluss-Karyogramm als separate Punktwolken erkennbar (Abb. 7).

Welche Chromosomen aus der Suspension isoliert werden sollen, wird in der Software mit der Definition von sog. „Gates“ (Abb. 7) festgelegt. Dabei handelt es sich um Kreise, Quadrate oder Polygone, die um einen bestimmten Bereich im Durchfluss-Karyogramm gezogen werden. Wird von der Software ein Chromosom detektiert, dessen Werte-Kombination innerhalb der definierten Region liegt, so sendet der Computer das Signal zur Ladung der Ablenk-Kondensator-Platten. Bei dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Durchfluss-Zytometer (FACS Vantage, Becton Dickinson) war es möglich simultan zwei „Gates“ zu definieren und dadurch in zwei separate sterile Gefäße zu sortieren.

Zum Separieren der Chromosomen in den einzelnen Tröpfchen werden diese beim Durchgang durch die Düse elektrisch geladen („drop charging“, Abb. 5). Die Software kann mit Hilfe des Abstandes zwischen Düse und Abrißpunkt, dem sog. „drop“- oder „charge-delay“ (Abb. 5), die zeitliche Verzögerung, die ein Tropfen von Messpunkt zu den Ablenkplatten („deflection plates“, Abb. 5) benötigt, berechnen. Damit kann der Computer genau dann einen elektrischen Impuls zu den Ablenkplatten senden, wenn sich ein Tropfen mit verändertem Chromosom auf deren Höhe befindet. Je nachdem, ob der Tropfen nach rechts oder links abgelenkt werden soll, wird ein Impuls positiver oder negativer Ladung an die Ablenkplatten gesendet.

Abb. 4: Durchströmungskammer mit hydrodynamischer Fokussierung (Crosland-Taylor, 1953)



In der Durchströmungskammer befinden sich die zwei Flüssigkeitsströme des „Sheath fluid“ und der Probe („Sample“). Die „Sheath-Fluid“ wird mit hohem Druck in die Kammer gepreßt, wobei die Geschwindigkeit der Teilchen an der Verengung der Düse (Nozzle) zunimmt. In diesen beschleunigten „Sheath fluid“-Strom läuft der Strom der Probenflüssigkeit, der dann vom „Sheath fluid“-Strom ummantelt wird und schließlich in die Mitte der Düse fokussiert wird („Coaxial stream“). Dadurch entsteht ein sehr dünner, exakt in die Mitte fokussierter Flüssigkeitsstrom (Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung), der als Strahl aus der „Nozzle“ austritt.

Abb. 5: Prinzip der Funktionsweise eines Durchfluss-Zytometers (Longobardi, 2001)

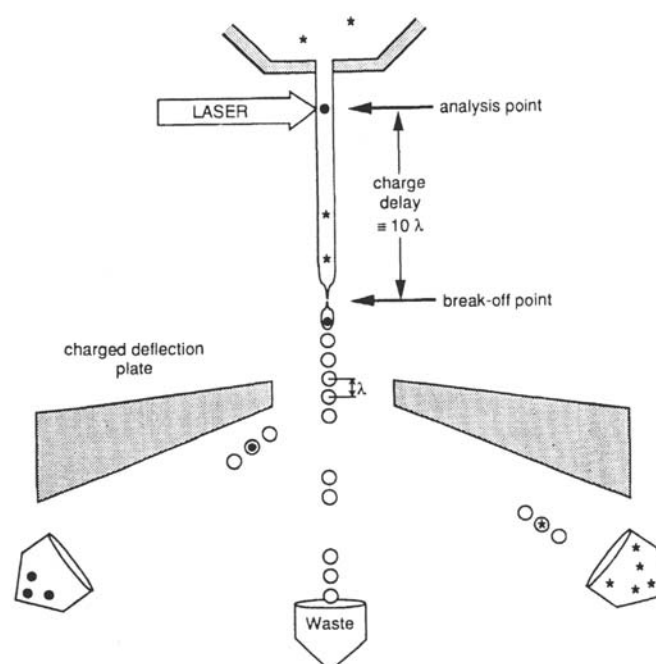
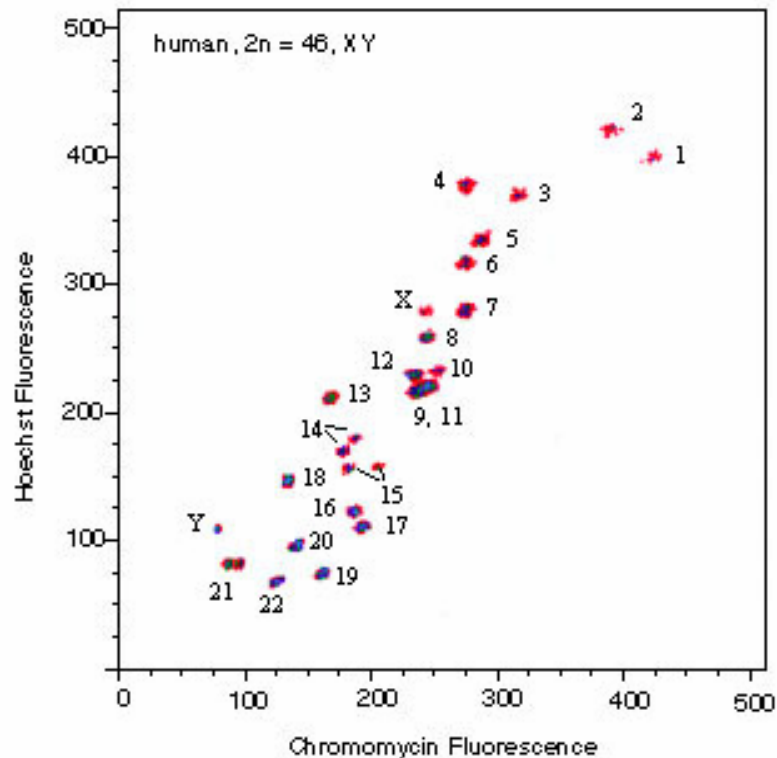


Abb. 6: Humanes männliches Durchfluss-Karyogramm (Ferguson-Smith, 1997)



Jedes Chromosom hat eine für sich spezifische Kombination von Werten aus Chromomycin- und Hoechst-Fluoreszenz (X- und Y-Achse). Je größer die Chromosomen, desto größer die Fluoreszenzintensitäten. Das Karyogramm zeigt die Chromosomen 1-22, X und Y. Die Chromosomen 9, 10 und 11 bilden in der Regel eine Punktwolke („9 bis 11-Gruppe“), in denen die Punktwolken der einzelnen Chromosomen nicht erkennbar sind. Die Chromosomen 14 und 15 bilden aufgrund der unterschiedlichen Mengen an Satelliten-DNA häufig zwei Punktwolken ab.

2.3.1.1 Material

Propidiumiodid (Sigma-Aldrich)

Colcemid (Roche) 10 µg/ml

Kaliumchlorid (Merck)

Magnesiumsulfat (Merck)

Spermin (Fluka)

Spermidin (Fluka)

Tris (Trizma Base, Sigma)

Ethylenediaminetetraacetic-Acid, EDTA (Sigma)

Ethyleneglycoltetraacetic-Acid, EGTA (Sigma)

Dithiothreitol (Sigma)

Triton-X-100 Detergenz (BioRad)

Cell-Strainer 40 µm (BD Falcon)

Natriumcitrat (Sigma)

Natriumsulfit (Sigma)

Sterilfilter, 0,22 µm (Single Syringe filter, Sartorius)

Mediumfilter, „SteriCup“, 0,45 µm, 500 ml (Millipore)

Zellkultur-Flaschen, „Cellstar“, 175 cm² (Greiner Bio-One)

Zellkulturmedium MEBM („Mammary Epithelial Breast Medium“), serumfrei mit Medium-Zusatz MEGM, CC-4136, „Single-Qots“ (Clonetics)

Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich)

Chromomycin A3 (Sigma-Aldrich)

2.3.1.2 Durchführung

Herstellung Chromomycin A3-Färbelösung (2 mg/ml)

Chromomycin A3	200 mg
----------------	--------

Nuklease-freies Wasser	add 1 ml
------------------------	----------

Herstellung Hoechst 33258-Färbelösung (0,1 mg/ml)

Hoechst 33258	100 mg
---------------	--------

Nuklease-freies Wasser	add 100 ml
------------------------	------------

Die Lösung 1 µg/ml mit 10-fachem Volumen Wasser auf 0,1 µg/ml bringen.

Herstellung Kaliumchlorid-Stammlösung (800 mM)

Kaliumchlorid	2,98 g
Nuklease-freies Wasser	add 50 ml

Herstellung Magnesiumsulfat-Lösung (1M)

Magnesiumchlorid	12,04 g
Nuklease-freies Wasser	add 100 ml

Herstellung Spermin-Lösung (0,4 M)

Spermin	139 mg
Nuklease-freies Wasser	add 1ml

Herstellung Propidium-Iodid-Lösung (PI, 50 µg/ml)

Propidiumiodid	500 mg
Nuklease-freies Wasser	add 100 ml

1 ml der 5 mg/ml konzentrierten Lösung mit Wasser auf 100 ml und 50 µg/ml bringen.

Herstellung Spermidin-Lösung (1 M)

Spermidin	254 mg
Nuklease-freies Wasser	add 1ml

Lagerung bei -20 °C.

Herstellung des Chromosomen-Isolationspuffers

Die Stammlösungen für den Chromosomen-Isolationspuffer sollten nicht älter als 3 Wochen sein und wurden im Kühlschrank gelagert. Der Chromosomen-Isolationspuffer wurde vor jeder Chromosomenpräparation frisch hergestellt.

Stammlösung 1

Trizma Base (150 mM)	2,36 g
EDTA (20 mM)	0,76 g
KCl (800mM)	5,96 g
Dithiothreitol (30 mM)	0,46 g

Stammlösung 2

EGTA (5 mM)	0,19 g
Nuklease-freies Wasser	add 90 ml
pH 8.0	
Nuklease-freies Wasser	add 100 ml

Chromosomen-Isolationspuffer

Zu 30 ml Wasser wurden 25 µl Spermin und 25 µl Spermidin (beides frisch aufgetaut), 125 µl Triton-X-100, 5 ml Stammlösung 1 und 5 ml Stammlösung 2 gegeben und gemischt. Danach wurde der pH auf 7,5 eingestellt, der Ansatz auf 50 ml aufgefüllt und durch einen 0,22 µm-Sterilfilter steril filtriert. Bis zur Benutzung wurde der Puffer auf Eis gestellt.

Herstellung der hypotonen Lösung

Zu 40 ml Wasser wurden 123,24 mg Magnesiumsulfat, 4,7 ml KCl-Stammlösung (800 mM) und je 25 µl Spermidin und Spermin (beides frisch aufgetaut) gegeben und vermischt. Der pH wurde auf 8 eingestellt, der Ansatz auf 50 ml aufgefüllt und durch einen 0,22 µm-Sterilfilter steril filtriert.

Vorbereitung der Zellkultur für die Chromosomen-Isolation

Da die Ausbeute an Metaphasen-Chromosomen aus den Zellkulturen relativ niedrig war, wurden pro Zelllinie vier 175 cm² Kulturflaschen adhärent wachsender Zellen angelegt. Pro Flasche wurden 25 ml MEM-Medium (Clonetics) verwendet. Die Zellen wurden im sub-konfluenten Stadium geerntet. Zur Reinigung von toten Zellen und Zell-Debris wurde von den Flaschen das Medium abgenommen und durch den 0,45 µm Filter filtriert. Die Zellen wurden zweimal mit 5 ml PBS (37 °C) gewaschen und danach das gereinigte Medium wieder zugegeben. Für die Arretierung der Zellen in der Metaphase wurden 250 µl (0,1 µg/ml Endkonzentration) Colcemid zugegeben. Danach wurden die Zellen über Nacht bis maximal 24 h bei 37 °C bis zur Zellernte kultiviert.

Zellernte und Herstellung der Chromosomen-Suspension

Zunächst wurde dreimal mit einem Stück Styropor gegen die Zellkulturflaschen geschlagen. Dadurch lösten sich hauptsächlich die Zellen vom Flaschenboden, die sich in Metaphase befanden. Somit erreichte man eine Anreicherung an Metaphase-Zellen im Überstand. Die Zellen wurden sukzessive in 50 ml-Zentrifugen-Röhrchen bei 289 x g zentrifugiert, so dass man von vier Flaschen ein Pellet erhielt.

Das Pellet wurde in 5 ml hypotoner Lösung aufgenommen und für 10 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde bei RT und 289 x g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 2 ml Chromosomen-Isolationspuffer (eiskalt) aufgenommen und für 20 s kräftig geschüttelt („Vortexer“) und für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Suspension für 2 min bei 201 x g zentrifugiert um intakte Zellen (Pellet) von den freien Chromosomen (Überstand) zu trennen. Der Überstand wurde durch einen 0,4 µm „Cell Strainer“ steril filtriert.

Die Chromosomen wurden mit 10 µl Magnesiumsulfat, 30 µl Hoechst und 50 µl Chromomycin pro ml Chromosomen-Suspension über Nacht gefärbt. Die Chromosomen-Suspension wurde auf Eis oder im Kühlschrank gekühlt.

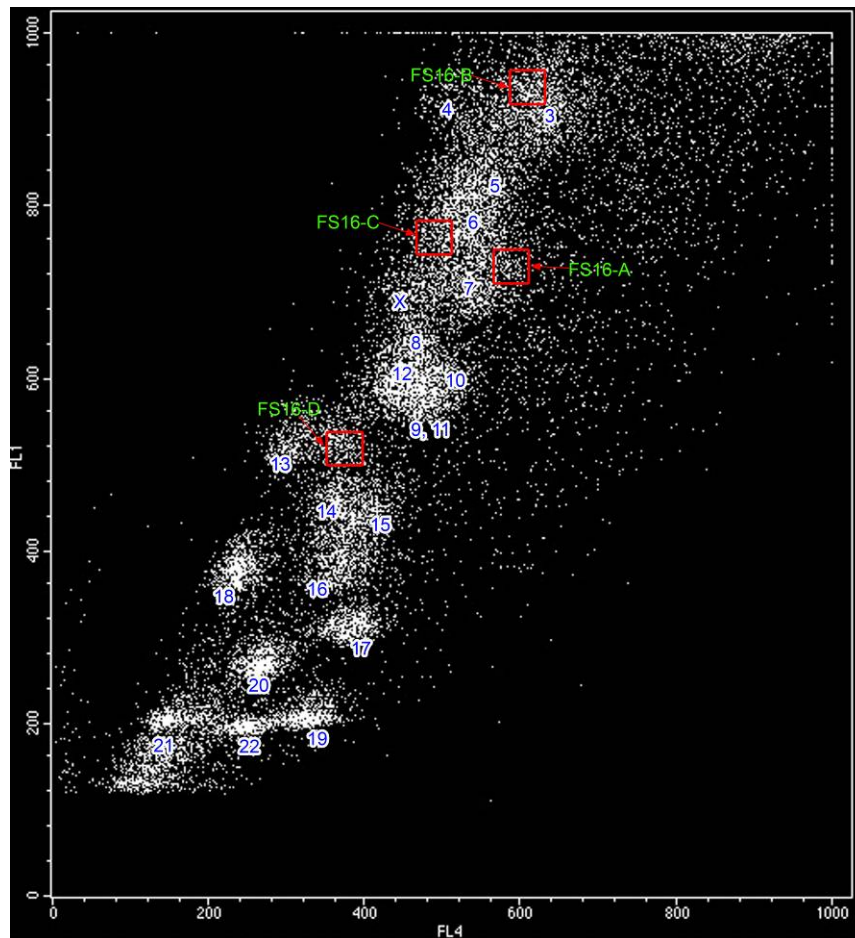
2.3.2 Sortierung der Chromosomen

Die Sortierung der Chromosomen fand in Zusammenarbeit mit der Firma Chrombios GmbH in Raubling statt.

2.3.2.1 Durchführung

Die Sortierung der Chromosomen erfolgte in einem FACS Vantage (Becton Dickinson) Durchfluss-Zytometer. Das Gerät war mit zwei wassergekühlten Lasern (Innova 300 und Innova 70, Coherent) ausgestattet, wobei diese für die Fluoreszenzanregung der Farbstoffe Hoechst 33258 und Chromomycin-A3 auf die Wellenlängen 330-360 nm bzw. 457 nm eingestellt waren. Für die Sortierung der Chromosomen wurde eine 70 µm Düse („Nozzle“) verwendet. Sortierungs-Geschwindigkeit lag damit bei etwa 10 Chromosomen pro Sekunde. Ein Beispiel für die Sortierung der Markerchromosomen aus der Zelllinie B42-16 gibt Abb. 7.

Abb. 7: Durchfluss-Karyogramm der Zelllinie B42-16



Zu Abb. 7: Das Bild zeigt ein partielles Durchfluss-Karyogramm der Zelllinie B42-16 (Chromosom 3 bis X). Die Chromosomen 1 und 2 liegen außerhalb des Bildausschnittes. Die roten Rahmen symbolisieren die Bereiche („Gates“), aus denen die Markerchromosomen sortiert worden sind.

2.3.3 Reverse FISH zur Überprüfung von Durchfluss-sortierten Markerchromosomen

Nach der Durchfluss-Sortierung von Markerchromosomen war es notwendig vor der eigentlichen Array-Painting-Hybridisierung zu überprüfen, ob sich das gesuchte Chromosom in der Sortierung befand. Da die Hybridisierung mit amplifizierter DNA durchgeführt wird, wurde dabei gleichzeitig überprüft, ob der WGA- oder DOP-Amplifikationsschritt erfolgreich war und sich die DNA für Array-Painting eignet.

Die amplifizierte DNA wurde hierfür in einer Nick-Translations-Reaktion mit Digoxigenin markiert und zusammen mit humaner Cot-1 DNA auf normale Metaphasenpräparationen hybridisiert.

2.3.3.1 Digoxigenin-Markierung mittels Nick-Translation

Es wurde ein Mikrogramm amplifizierter DNA mittels Nick-Translation mit Digoxigenin markiert. Für Material und Durchführung der Markierung siehe 2.3.6.6.

2.3.3.2 Hybridisierung der markierten DNA auf normale Metaphasen

2.3.3.2.1 Material

Metaphasen-Präparate (CGH Metaphase Target Slides, Vysis)

Humane Cot-1 DNA 1 µg/µl

Heringsperma-DNA 10 µg/µl

Natriumacetat pH 4,3 3M

Formamid, deionisiert (Sigma)

Nuklease-freies Wasser (Gibco)

Ethanol 70%, 100 %

Mastermix 1.0

70% Formamid / 2xSSC

Formamid, deionisiert (Sigma-Aldrich) 70ml

20 x SSC 10ml

ad 100ml mit H₂O bidest

Aufsteigende Ethanolreihe

Ethanol p.a. 70%

Ethanol p.a. 90%

Ethanol p.a. 100%

2.3.3.2.2 Durchführung

Zum Nick-Translations-Ansatz (18 µl) wurden 18 µl Cot-1-DNA, 1µl Heringsperma-DNA, 13 µl Wasser und 5 µl Natriumacetat pipettiert und gemischt. Dann wurde der Ansatz mit 110 µl 100 %-Ethanol für 30 min bei -80 °C gefällt und für 15 min bei 16000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 %-Ethanol gewaschen, danach trocknen zentrifugiert und in 3 µl Wasser und 7 µl Mastermix 1.0 gelöst. Anschließend wurde die fertige FISH-Sonde für 7 min bei 76 °C denaturiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit wurden die Metaphasen-Präparate für 2 min bei 72 °C in 70 %-Formamid/2 x SSC denaturiert, danach für jeweils 2 min in 70 %-, 90 %- und 100 %-Ethanol (aufsteigende Ethanolreihe) dehydriert und danach bei 37 °C auf die Heizplatte gelegt. Die Denaturierung und Dehydrierung der Objektträger wurde zeitlich so abgestimmt, dass die denaturierte und vorhybridisierte Sonde ohne große Verzögerung auf die frisch denaturierten Objektträger aufgetragen werden konnte.

Die Sonde wurde auf dem Objektträger aufgetragen, mit einem Deckglas abgedeckt und mit Montagekleber versiegelt. Nachdem der Kleber getrocknet war, wurde der Objektträger für zwei bis drei Tage bei 37 °C in der feuchten Kammer inkubiert.

2.3.3.3 *Waschen und Detektion*

Danach wurde der Montagekleber vom Objektträger gelöst und das Deckglas in 2 x SSC vom Objektträger abgelöst. Danach wurde das Präparat gewaschen und detektiert wie unter 2.2.7.8/ 2.2.7.9 beschrieben.

2.3.3.4 *Bildaufnahme*

Die Aufnahme der Metaphasen erfolgte an einer Aufnahmestation, bestehend aus einem Epifluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Carl Zeiss) mit einer Interferometer-CCD-Kamera-Kombination (SpectraCube, Applied Spectral Imaging, Israel) und nachgeschaltetem Rechner mit Auswertesoftware FISHView (Applied Spectral Imaging, Israel).

Das Mikroskop war mit einem DAPI-Filtersatz (Carl Zeiss) und Cy3- und FITC-Filtersätzen (Chroma Technology) ausgerüstet. Die Anregung von DAPI-Farbstoff, Cy3 und FITC erfolgte mit dem gefilterten Licht einer HBO103 Quecksilberdampflampe.

Die Suche nach geeigneten Metaphasen erfolgte durch ein 40x Plan-Neofluar-Ölimmersionsobjektiv, die Aufnahme durch ein 100x Plan-Apochromat-Ölimmersionsobjektiv.

2.3.3.4.1 Durchführung

Es wurden geeignete, möglichst komplette Metaphasen gesucht und zuerst im DAPI-Kanal aufgenommen. Das Bild der DAPI-Gegenfärbung wurde durch die Software in ein G-Bänderungsähnliches Bild umgewandelt. Im nächsten Schritt wurde das gleiche Bild im Cy3 und/oder FITC-Kanal aufgenommen. Die Software legte alle drei Bilder übereinander, so dass man ein Mischbild aus DAPI-Gegenfärbung und Fluoreszenzsignalen erhielt. Des Weiteren erlaubte die Software eine Zuordnung der einzelnen Chromosomen in einem Karyogramm.

2.3.4 1Mb-BAC-Array Analyse von Translokationschromosomen (Array-Painting)

Zur weiteren Charakterisierung der isolierten Markerchromosomen wurden diese einer sog. Array-Painting Analyse unterzogen. Dabei wird die aus den Durchflusssortierten Chromosomen gewonnene und amplifizierte DNA Fluoreszenz-markiert und anschließend auf 1Mb-BAC-Arrays hybridisiert (Fiegler, et al., 2003). Ziel dieser Analyse ist es, Gene zu identifizieren, die in den chromosomalen Bruchpunkten der Markerchromosomen liegen. Solche Kandidatengene können durch den Chromosomen-Bruch und durch eine fehlerhafte Reparatur strukturell so verändert sein, dass sie das Tumorwachstum begünstigen (Collier und Largaespada, 2006).

Nachdem die Markerchromosomen einer Tumor-Primärkultur oder einer Zelllinie im Durchfluss sortiert wurden und deren DNA isoliert und amplifiziert wurde, wird sie und eine Referenz-DNA mit Fluoreszenz-Farbstoffen markiert. Die mit Cy3-dCTP markierte DNA aus Markerchromosomen wurde zusammen mit Cy3- und Cy5-dCTP markierter Referenz-DNA auf einen BAC-Array hybridisiert. Dadurch können Array-Painting-Experimente mit Software ausgewertet werden, die eigentlich für die Auswertung von Array-CGH-Experimenten entwickelt wurde. Die beiden unterschiedlich markierten Referenz-DNAs ergeben in der Array-CGH ein normales Profil, das keine Veränderungen zeigt. Zusammen mit der markierten DNA eines Markerchromosoms, die zusätzlich im Überschuß in die Reaktion eingesetzt wird, erscheinen die chromosomalen Regionen aus denen das Markerchromosom zusammengesetzt ist, im Array-CGH-Profil als amplifizierte Bereiche (Abb. 28). Dadurch lassen sich Translokations-Chromosomen und deren chromosomale Bruchpunkte mit einer Genauigkeit von etwa 1 Mb charakterisieren. In einer Region, die 1 Mb umfasst, können ein oder mehrere Gene liegen. Im Falle von mehreren Genen muß zusätzlich zur Array-Painting Analyse eine weitere Eingrenzung des Bereichs mit Hilfe von BAC-FISH Hybridisierungen folgen. Dabei werden „Contigs“, also Folgen von überlappenden BAC-Klonen, ausgesucht, die den weiter zu charakterisierenden Bereich abdecken.

2.3.4.1 *Aufreinigung und Fällung des Ansatzes*

2.3.4.1.1 Material

Sephadex-Säulchen G50 (GE Healthcare)

Natriumacetat, 3M, pH 4,2

Humane Cot-1 DNA (Roche) 1 µg/µl

Hybridisierungspuffer (HS400)

Hefe-t-RNA (Yeast t-RNA, Invitrogen) 100 µg/µl

Ethanol 100 %

Ethanol 70 %

2.3.4.1.2 Durchführung

Für die Aufreinigung der Referenzen wurden pro Ansatz (150 µl) drei G-50-Sephadex Säulchen (GE Healthcare), und für die markierte DNA aus Markerchromosomen (50 µl) ein Säulchen verwendet. Dafür wurden die Säulchen zur Durchmischung des Sephadex-50-Gels kurz geschüttelt, die Schutzkappe abgedreht und der Puffer für eine Minute bei 735 x g aus dem Säulchen zentrifugiert und verworfen. Danach wurden jeweils 50 µl an markierter DNA auf die Säulchen aufgetragen und für 2 min bei 735 x g zentrifugiert. Die Zentrifugate wurden vereinigt und die Konzentration und Cy3-/ Cy5-Inkorporationsrate mit Hilfe des NanoDrop-Spectrophotometers (NanoDrop Technologies) bestimmt.

Die gereinigten DNA-Lösungen wurden in einem RG vereinigt (350 µl), 160 µl Cot-1-DNA (160 µg), 51 µl Natriumacetat zugegeben und gemischt. Danach wurde der Ansatz durch Zugabe von 1050 µl Ethanol (100 %, -20 °C) für 30 min bei -80 °C gefällt und für 15 min bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde durch Zugabe von 500 µl Ethanol (70 %) gewaschen und danach trocken zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 6 µl Hefe-t-RNA und 68 µl Hybridisierungspuffer (HS400) gelöst.

Wie unter 2.2.1 und 2.2.2 beschrieben, wurde der Array nach Hybridisierung der markierten DNAs und der eigentlichen Hybridisierungslösung gescannt und ausgewertet.

2.3.5 Feinkartierung der mit Array-Painting identifizierten Bruchpunkte durch Hybridisierung mit Sätzen überlappendender Sonden aus der 32K-BAC-Bibliothek

Alle Array-basierten Analysen wurden mit so genannten 1Mb-BAC-Arrays, deren DNA die 1Mb-BAC-Bibliothek enthält (Fiegler et al., 2003) durchgeführt. Mit Hilfe dieser Arrays war es möglich Kopienzahlveränderungen (Array-CGH) oder chromosomale Bruchpunkte (Array-Painting) mit einer Genauigkeit von 1Mb zu charakterisieren. Häufig befinden sich in einem solchen Bereich eine hohe Anzahl von Genen, so dass es für die effektive Identifizierung von Genen, die durch die Kopienzahl- oder strukturelle Aberration, verändert wurden („Kandidatengene“), notwendig ist, diese Bereiche weiter einzugrenzen. Eine Möglichkeit dafür bietet die Methode der BAC-Klon-basierten positionellen Klonierung von Kandidatengen. (Zitzelsberger, et al., 2004). Dabei wird mit so genannten „Contigs“ gearbeitet, bei denen es sich um BAC-Klone handelt, welche einen Bereich, der näher charakterisiert werden soll, überlappend abdecken. Solche BAC-Klone können Bestandteil verschiedener Bibliotheken sein; im Labor stand die so genannte „Human 32K BAC Re-Array“ (Krzywinski et al., 2004) zur Verfügung. Diese Bibliothek besteht aus ca. 32000 BAC-Klonen, die das gesamte menschliche Genom überlappend („tiling resolution“) zu 99 % abdecken und somit eine ideale Quelle für die Bildung von BAC-Contigs zur positionellen Klonierung bilden.

Die Klon-Contigs wurden mit Hilfe der allgemein zugänglichen genomischen Datenbank Ensembl (<http://www.ensembl.org>) so ausgewählt, dass sie die veränderten Bereiche aus der Array-Painting Analyse abdeckten.

Die BAC-Klone befanden sich zur Aufbewahrung in 384er-Mikrotiterplatten bei -80 °C in LB/Glycerin-Lösung. Da für die positionellen Klonierungs-Analysen sehr viele BAC-Klone benötigt wurden, wurden diese in 96er Mikrotiter-Platten angezüchtet und

mit einem Kit, welches die direkte Plasmid-Isolation aus 96er Mikrotiterplatten erlaubte, präpariert. Hierbei waren geringe DNA-Ausbeuten aus den BAC-Klonen ausreichend, da sie für den Einsatz in Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen mit Hilfe von DOP-PCR Reaktionen (Fiegler, et al., 2003) amplifiziert werden konnten. Nach der Amplifikation wurden die Klone in Nick-Translations-Reaktionen entweder mit Digoxigenin oder Biotin markiert. Anschließend wurden paarweise jeweils ein Digoxigenin- und ein Biotin-markierter Klon auf Metaphasen-Objektträger der betreffenden Zelllinien hybridisiert. Die markierte DNA der BAC-Klone wurde nach der Hybridisierung im Fall von Biotin mit FITC (grün) und im Fall von Digoxigenin mit Cy3 (rot) nachgewiesen. Die paarweise Hybridisierung der BAC-Klone in zwei Farben hatte den Vorteil, dass zum einen weniger Metaphasen-Präparate benötigt wurden, und zum anderen häufig die Interpretation der Hybridisierungsmuster erleichtert wurde.

2.3.5.1 Anzucht und Isolation der BAC-Klone im 96er Mikrotiter Format

2.3.5.1.1 Material

„Human 32K Re-Array BAC“-Sammlung

LB-Medium

Chloramphenicol (10 µg/ µl)

Chloramphenicol (Sigma-Aldrich) 20 mg/ Ampulle

Chloramphenicol in 2ml absolutem Ethanol lösen

Plasmid Isolationskit für 96er Mikrotiterplatten(Wizard® SV 96 Plasmid DNA Purification System, Promega)

Bestandteile des Kit:

2ml-96er Mikrotiterplatten

Binding-Plates

DNA Elution Plates

Wizard[®] SV 96 Lysate Clearing Plates

Wizard[®] SV 96 Cell Resuspension Solution

Wizard[®] SV 96 Cell Lysis Solution

Wizard[®] SV 96 Neutralization Solution

Wizard[®] SV 96 Wash Solution

Vac-Man[®] 96 Vaccum Manifold

Alkaline Protease Solution

Nuklease-freies Wasser

Gas-permeable Platten-Abdichtungsfolien (Eppendorf)

Aluminium-Platten-Abdichtungsfolien (Eppendorf)

2.3.5.1.2 Durchführung

Im ersten Schritt wurden pro Platte 200 ml LB-Medium mit Chloramphenicol (25 µg/ml) angesetzt. Dafür wurden 200 ml LB mit 450 µl Chloramphenicol (10 µg/µl) vermischt. Von dem LB-Medium wurde dann mit einer Dispersionspipette jeweils 2 ml in jede Vertiefung der 2ml-96er Mikrotiterplatten gegeben. Währenddessen wurden die benötigten 384er-Mikrotiterplatten der 32K-Bibliothek unter dem Sterilabzug geöffnet und zügig die Aluminiumfolie abgezogen. Dabei war es wichtig, dass dies geschah, solange die Folie eine Temperatur unterhalb des Gefrierpunktes besaß, weil dadurch die Wahrscheinlichkeit von Kreuzkontaminationen innerhalb der Platte verringert wurde. Aus den entsprechenden Vertiefungen wurden dann jeweils 2 µl der LB/Glycerin-Kulturen in das LB-Medium der Anzucht-Platten pipettiert. Nachdem die Anzucht-Platte fertig angeimpft war, wurde sie mit einer sterilen gas-permeablen Abdeckfolie abgedeckt und für 14 bis 16 Stunden unter Schütteln (230 RPM) bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die Platten der 32K-Bibliothek wurden so schnell wie möglich wieder steril verschlossen und bei -80 °C eingefroren.

Nach der Inkubationszeit wurden die Platten bei 4°C in der Platten-Zentrifuge bei 1000 x g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde aus den Vertiefungen mit einer sterilen Absaugvorrichtung entfernt und die Sedimente in je 250 µl Resuspensions-Lösung aufgenommen. Danach wurden je Vertiefung 250 µl Lysepuffer zugegeben und der Ansatz durch Klopfen der Platte gemischt und für 3 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurde die Vorrichtung, in welche die Platte zur Reinigung des Lysats montiert wurde, entsprechend eingerichtet. Dafür befand sich eine Filterplatte („Lysate Clearing Plate“) direkt über der „DNA Binding Plate“, die in jeder Vertiefung ein Ionentauscher-Säulchen enthält, welches die DNA des Lysats binden kann. Diese beiden Platten wurden in dem „Vacuum Manifold“ befestigt und an die Vakuumpumpe angeschlossen. Anschließend wurden 350 µl Neutralisations-Puffer zum Ansatz pipettiert, wodurch es zum Ausfällen von SDS zusammen mit genomischer DNA und Zell-Debris kam. Dieser Ansatz wurde mit einer Mehrkanalpipette auf die Lysat-Reinigungs-Platte übertragen und die Vakuumpumpe eingeschaltet. Dadurch wurde das Lysat durch den Filter und die gereinigte Lösung durch die Säulchen der DNA-Bindungs-Platte gesogen. Der Durchfluss wurde verworfen. Danach wurde die Lysat-Reinigungs-Platte abgenommen, und in jede Vertiefung der DNA-Bindungs-Platte 500 µl Neutralisations-Puffer gegeben und im Vakuum durch die Platte gesaugt. Danach wurden die Säulchen zweimal mit jeweils 1 ml Waschpuffer gewaschen und danach das Vakuum für weitere zehn Minuten beibehalten, um die Säulchen zu trocknen. Dann wurde die Konfiguration der Vakuum-Vorrichtung geändert, so dass sich die DNA-Bindungs-Platte direkt über einer DNA-Elutionsplatte (sterile 96er Mikrotiterplatte) befand. Für die Elution wurden jeweils 100 µl Nuklease-freies Wasser (60 °C) in die Vertiefungen der Elutionsplatte gegeben, für 1 min inkubiert und dann das Vakuum angelegt, so dass die gereinigte Plasmid-DNA in die Elutionsplatten gesaugt wurde. Die DNA-Konzentrationen und Reinheit der DNA-Lösungen wurde stichprobenartig durch Messung mit dem NanoDrop-Spectrophotometer bestimmt. Dabei lagen die Konzentrationen im Bereich von 2- 20 ng/µl. Danach wurden die Platten steril mit Aluminium-Abdeckfolien verschlossen und bei -20 °C archiviert.

2.3.5.2 *Amplifikation der Plasmid-DNA in einer für humane Sequenzen spezifischen DOP-PCR*

Da BAC-Klone so genannte „single-copy“ Plasmide darstellen und die Bakterienzellen somit nur eine Kopie des Plasmids enthalten, war die Ausbeute an Plasmid-DNA nach der Isolation sehr gering. Aus diesem Grund mußte diese, um eine ausreichende Menge an DNA für FISH-Reaktionen zu erhalten, amplifiziert werden. Dafür wurde ein abgewandertes Protokoll (Fiegler, et al., 2003) der DOP-PCR (Telenius et al., 1992) verwendet. Die Besonderheit des Protokolls besteht darin, dass drei verschiedene DOP-Primer verwendet werden, die besonders häufig auf humanen Sequenzen und besonders selten auf E. coli-Sequenzen binden. Dadurch kommt es in der PCR zu einer Anreicherung von humanen Sequenzen, was die Effizienz der FISH-Hybridisierung erheblich erhöht.

In den so genannten Primär-Reaktionen wurden drei separate PCR-Reaktionen mit den Primern DOP1, DOP2 und DOP3 angesetzt. Es wurde mit drei verschiedenen Primern amplifiziert, weil mit jedem der drei Primer unterschiedliche Regionen des human Genoms vorzugsweise amplifiziert werden. Um einem Ungleichgewicht („Amplification Bias“) in der Repräsentierung der amplifizierten Sequenzen entgegen zu wirken, wurden die drei Amplifikate gemischt, wobei das Gemisch in der Sekundär-Reaktion dem DOP4-Primer als Matrize diente. Das DOP4-Amplifikat wurde in 96er Mikrotiterplatten aufgereinigt, die DNA-Konzentrationen bestimmt und in Nick-Translations-Reaktionen zur Markierung der DNA mit Biotin oder Digoxigenin eingesetzt.

2.3.5.2.1 Material

5 x PCR-Puffer (Flexi-Buffer, Promega)

Magnesiumchlorid 25 mM

dNTP-Mix 2,5 mM

DOP-Primer

DOP1 (siehe 7.1)

DOP2 (siehe 7.1)

DOP3 (siehe 7.1)

DOP4 (siehe 7.1)

PCR-Aufreinigungsplatten (PCR 96 Manu, Millipore)

2.3.5.2.2 Durchführung

2.3.5.3 *Primäre DOP-PCR*

Pipettierschemata für 1 Probe und für eine 96er Mikrotiter-PCR-Platte:

1x Ansatz (50µl)

template	2	µl
FlexiBuffer(5x)	10	µl
MgCl ₂ (25mM)	7	µl
dNTPs (2,5mM)	5	µl
DOP-Primer1-3 (20µM)	5	µl
GoTaq (5U/µl)	0.5	µl
H ₂ O	20.5	µl
	<hr/>	
	50	µl

98xAnsatz

(1Platte, je 30 μ l pro
Kavität)

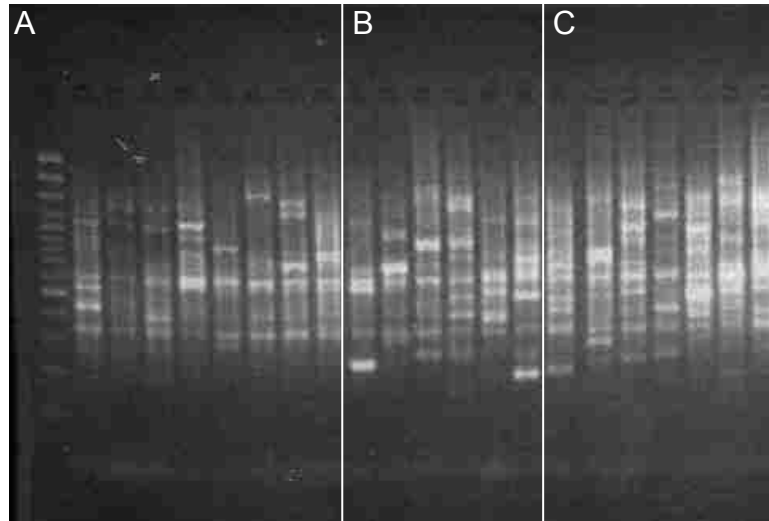
template (1,2 μ l/well)	117.6	μ l
FlexiBuffer(5x)	588	μ l
MgCl ₂ (25mM)	411.6	μ l
dNTPs (2,5mM)	294	μ l
DOP-Primer1-3 (20 μ M)	294	μ l
GoTaq (5U/ μ l)	29.4	μ l
H ₂ O	1205.4	μ l
	<hr/>	
	2940	μ l

PCR-Programm für die Primäre DOP-PCR-Amplifikation:

Schritt 1	94°C für 3 min
Schritt 2	94°C für 30 s
Schritt 3	30°C für 1 s
Schritt 4	“Ramping” bei 0.1 °C /s auf 72°C
Schritt 5	72°C für 3 min
Schritt 6	Gehe zu Schritt 2 für 30 weitere Zyklen
Schritt 7	72°C für 7 min
Schritt 8	4 °C ∞

Es wurden stichprobenartig von jedem der drei Ansätze 5 µl entnommen mit 1 µl Auftragspuffer und 100 bp DNA-Standard auf ein 2 % Agarose aufgetragen (Abb. 8).

Abb. 8: Agarose-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der DOP1 (A), DOP2 (B) und DOP3 (C)-Reaktionen



Es zeigte sich ein Schmier von 200 – 800 bp, in dem sich diskrete Banden befinden.

Die DOP-Amplifikate wurden vereinigt (90 µl) und als Matrize für die Sekundär-Amplifikation verwendet.

2.3.5.4 Sekundäre DOP-PCR

1x Ansatz (50µl)

FlexiBuffer(5x)	10	µl
MgCl ₂ (25mM)	7	µl
dNTPs (2,5mM)	5	µl
DOP4-Primer (20µM)	5	µl
GoTaq (5U/µl)	0.5	µl
H ₂ O	30.5	µl

98 x Ansatz (50µl)

FlexiBuffer(5x)	980	µl
MgCl ₂ (25mM)	686	µl
dNTPs (2,5mM)	490	µl
DOP4-Primer (20µM)	490	µl
GoTaq (5U/µl)	49	µl
H ₂ O	2009	µl

Die Proben wurden mit 150 µl Nuklease-freiem Wasser gemischt, auf die Aufreinigungsplatten (Millipore) aufgetragen und im Vakuum durch die Filter gezogen. Auf den Filtern blieb die DNA liegen, welche in 40 µl Wasser aufgenommen wurde. Der Durchfluss wurde verworfen. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration und Reinheit wurden die Proben stichprobenartig mit dem NanoDrop-Spectrophotometer gemessen. Die Platten mit den DNA-Lösungen wurden bei -20 °C gelagert.

2.3.5.5 Markierung der DNA mit Biotin oder Digoxigenin durch Nick-Translation

Siehe Nick-Translation 2.2.4.1

2.3.5.6 DNA-Sonden, die für die FISH-Hybridisierungen verwendet wurden

Tab. 1: BAC-Klone, die für Bruchpunkt 1 auf Chromosom 12 ausgewählt wurden

Name	32k Re-Array	Name	32k Re-Array	Name	32k Re-Array
RP11-492I16	Chr12-RP-2F19	RP11-738B15	Chr12-RP-3O12	RP11-204C20	Chr12-RP-1N21
RP11-37N21	Chr12-RP-1M13	CTD-2013G01	Chr12-CT-1A21	RP11-373E24	Chr12-RP-2K19
RP11-758P19	Chr12-RP-3F9	RP11-72L16	Chr12-RP-1A16	RP11-156P16	Chr12-RP-1F23
RP11-424H10	Chr12-RP-2E8	RP11-378E16	Chr12-RP-2M3	RP11-777H07	Chr12-RP-3H17
RP11-77L19	Chr12-RP-1C18	RP11-464D05	Chr12-RP-2B9	RP11-676A05	Chr12-RP-3M19
RP11-487L22	Chr12-RP-2F9	RP11-648F12	Chr12-RP-3G13	RP11-626A16	Chr12-RP-2N20
RP11-352M15	Chr12-RP-2I1	RP11-375L15	Chr12-RP-2M19	RP11-66M13	Chr12-RP-1C6
RP11-19E18	Chr12-RP-1G9	RP11-805N11	Chr12-RP-3B8	RP11-437A15	Chr12-RP-2I4
RP11-798F20	Chr12-RP-3P7	RP11-291I07	Chr12-RP-1J16	RP11-815E02	Chr12-RP-4K3
RP11-145H24	Chr12-RP-1D5	RP11-650J13	Chr12-RP-3G3	RP11-680O10	Chr12-RP-3O9
RP11-659M15	Chr12-RP-3I13	RP11-805I19	Chr12-RP-3B2	RP11-682L10	Chr12-RP-3A4
RP11-781E14	Chr12-RP-4I9	RP11-414I11	Chr12-RP-2C20	CTD-2325B08	Chr12-CT-1G19
RP11-755G20	Chr12-RP-3B13	RP11-437L21	Chr12-RP-2I12		

Tab. 2: BAC-Klone, die für Bruchpunkt 2 auf Chromosom 12 ausgewählt wurden

Name	32k Re-Array	Name	32k Re-Array
CTD-2305I15	Chr12-CT-1I5	RP11-204P07	Chr12-RP-3H18
RP11-44D17	Chr12-RP-1M15	RP11-584J05	Chr12-RP-4C5
RP11-679J04	Chr12-RP-3O13	RP11-324P09	Chr12-RP-3L6
RP11-104O18	Chr12-RP-1I18	RP11-426B12	Chr12-RP-4G10
RP11-81H14	Chr12-RP-1E18	RP11-663D20	Chr12-RP-3K11
RP11-185H13	Chr12-RP-1N17	RP11-607D03	Chr12-RP-2H16
RP11-392J17	Chr12-RP-3N10	RP11-15L03	Chr12-RP-1G5
RP11-797C20	Chr12-RP-4L3	RP11-428C23	Chr12-RP-2G18
RP11-675P21	Chr12-RP-3M15	RP11-611E13	Chr12-RP-2J24

Tab. 3: BAC-Klone, die für Bruchpunkt 3 auf Chromosom 12 ausgewählt wurden

Name	32k Re-Array	Name	32k Re-Array
RP11-353K02	Chr12-RP-2I5	CTD-2220E20	Chr12-CT-1G11
RP11-121M17	Chr12-RP-1M12	CTD-2280A16	Chr12-CT-1G5
RP11-180C08	Chr12-RP-1L1	RP11-666G06	Chr12-RP-3K17
RP11-662M17	Chr12-RP-3I21	RP11-749J02	Chr12-RP-3O22
RP11-672E06	Chr12-RP-3M3	RP11-540B21	Chr12-RP-2N1
RP11-793M16	Chr12-RP-3J19	RP11-330B24	Chr12-RP-2C1
RP11-709L11	Chr12-RP-3G8	CTD-2055G11	Chr12-CT-1C5
RP11-155B05	Chr12-RP-1D19	RP11-789P17	Chr12-RP-3L3
RP11-554N09	Chr12-RP-2B6	RP11-636B16	Chr12-RP-3A11
RP11-561P15	Chr12-RP-2P19	RP11-33I06	Chr12-RP-1K19
RP11-675O11	Chr12-RP-3M13	RP11-296E16	Chr12-RP-1J24
RP11-195K16	Chr12-RP-1N9	RP11-351J12	Chr12-RP-2G11
RP11-100O19	Chr12-RP-1I2	RP11-25E02	Chr12-RP-1I11

Tab. 4: BAC-Klone, die für Bruchpunkt 1 auf Chromosom 10 ausgewählt wurden

Name	32k Re-Array
RP11-2K17	Chr10-RP-1A3
RP11-129M19	Chr10-RP-4C7
RP11-450F13	Chr10-RP-2H5
RP11-186C04	Chr10-RP-1H4
RP11-710L05	Chr10-RP-3M2
RP11-93B07	Chr10-RP-1K14
RP11-657A09	Chr10-RP-3C24
RP11-479M17	Chr10-RP-2B12
RP11-467B17	Chr10-RP-2N21
RP11-468A06	Chr10-RP-2P17
RP11-136J13	Chr10-RP-1J5
RP11-629M21	Chr10-RP-3K3
RP11-347C08	Chr10-RP-2C2
RP11-387J20	Chr10-RP-2K24
RP11-609G23	Chr10-RP-3E13

Nach der Markierung und Fällung wurden die DNA-Sonden auf Metaphasen-Präparate der Zelllinie B42-16 hybridisiert und mikroskopisch analysiert.

2.3.6 Validierung der Veränderung der Kandidatengene Has2, Grid1 und Ret in Mammakarzinomen

Für die Validierung der Ergebnisse aus den Array-Painting Analysen, wurden sogenannte Gewebe-Arrays mit drei, für die Kandidatengene Has2, Grid1 und Ret, translokations-spezifischen DNA-Sonden hybridisiert. Dabei sollte überprüft werden, ob o.g. Kandidatengene ebenso in Mammakarzinomen Veränderungen zeigen.

2.3.6.1 *Verwendete Gewebe-Arrays*

Bei den verwendeten Gewebe- oder Tissue-Arrays handelt es sich um Objektträger, auf welche 4 µm dicke Stanzen (1,1 mm Durchmesser) Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Brusttumor-Geweben im 10 x 15 Format aufgebracht wurden (Abb. 9). Die Gewebearrays (BRC1501, Pantomics Inc.) enthielten insgesamt 70 Mammakarzinome und 5 Kontrollgewebe (Tab. 5), wobei von jedem Gewebe zwei Schnitte verschiedener Ebenen auf dem Array aufgebracht wurden.

Tab. 5: Auflistung der klinischen Daten für den Gewebe-Array BRC1501 (Pantomics, Inc.)

Array Position	Alter	Geschlecht	Histologie	Grad	Stadium (TNM)	AR	ER	PR	HER2
A1,B1	40	F	Normal/Hyperplasia			++, 5%	++, 5%	++, 2%	-
A2,B2	30	F	Normal/Hyperplasia			++, 1%	++, 2%	++, 2%	-
A3,B3	46	F	Normal/Hyperplasia			-	-	-	-
A4,B4	16	F	Fibroadenom			-	++~+++ 60%	+++ 50%	-
A5,B5	39	F	Fibroadenom			-	-	-	-
A6,B6	28	F	Duktales <i>in situ</i> Karzinom	I	TisN0M0	-	-	-	+++
A7,B7	63	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T4N2M0	-	-	-	-
A8,B8	43	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T2N1M0	-	-	-	-
A9,B9	52	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T2N0M0	-	++~+++ 50%	++~+++ 10%	++
A10,B10	38	F	Invasives duktales Karzinom	III	T4N0M0	-	-	-	-
A11,B11	74	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T2N0M0	+, 5%	+++ 60%	+, 5%	-
A12,B12	49	F	Invasives duktales Karzinom	II	T2N0M0	-	-	-	+++
A13,B13	67	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T4N0M0	-	+, 30%	-	-
A14,B14	60	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T4N2M0	-	-	-	-
A15,B15	53	F	Invasives duktales Karzinom	III	T3N0M0	-	++, 50%	+, 5%	+~+++
C1,D1	47	F	Invasives duktales Karzinom	II	T3N3M0	-	++, 30%	++, 10%	++~+++
C2,D2	49	F	Invasives duktales Karzinom	II	T2N0M0	++, 5%	+++ 60%	+++ 90%	+~+++
C3,D3	55	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T4N2M0	+, 5%	++, 80%	+++ 80%	-
C4,D4	34	F	Invasives duktales Karzinom	III	T3N2M0	-	-	-	-
C5,D5	55	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T1N0M0	++, 10%	+++ 80%	+++ 80%	-
C6,D6	51	F	Paget-Karzinom		TisN0M0	-	-	-	+++
C7,D7	41	F	Duktales <i>in situ</i> Karzinom	I	TisN0M0	++, 15%	++, 60%	+++ 80%	++

Fortsetzung Tab. 5

C8,D8	43	F	Invasives duktales Karzinom	II	T2N0M0	+, 2%	-	-	+++
C9,D9	58	F	Invasives duktales Karzinom	III	T2N2M0	+, 2%	-	-	+++
C10,D10	41	F	Invasives duktales Karzinom	II	T2N0M0	+, 5%	+++ 80%	+++ 80%	+~+++
C11,D11	44	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T2N0M0	-	++, 60%	++, 10%	+
C12,D12	50	F	Invasives duktales Karzinom	I~II	T2N0M0	-	-	-	+++
C13,D13	62	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T4N3M0	+, 5%	++, 50%	+~+++ 15%	++
C14,D14	54	F	Invasive lobular carcinoma	III	T2N0M0	-	-	-	-
C15,D15	43	F	Invasives duktales Karzinom	I~II	T2N2M0	-	-	-	+++
E1,F1	48	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T2N2M0	-	-	+++ 50%	-
E2,F2	40	F	Invasives duktales Karzinom	III	T2N0M0	-	-	-	++
E3,F3	50	F	Invasives duktales Karzinom	II	T2N0M0	-	-	-	-
E4,F4	35	F	Invasives duktales Karzinom	II	T2N0M0	++, 2%	+, 5%	++, 50%	-
E5,F5	92	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T2N0M0	-	-	-	+~+++
E6,F6	41	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T2N0M0	-	+, 20%	-	+++~++++
E7,F7	58	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T2N0M0	-	-	++, 15%	-
E8,F8	28	F	Invasives duktales Karzinom	I~II	T2N0M0	-	++, 50%	-	-
E9,F9	42	F	Invasives duktales Karzinom	III	T2N0M0	-	-	-	+++~++++
E10,F10	50	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T4N3MX	++, 10%	-	-	++
E11,F11	68	F	Invasive lobular carcinoma	II~III	T3N1M0	-	++, 20%	-	-
E12,F12	64	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T2N0M0	++, 15%	+, 10%	-	+++
E13,F13	62	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T2N0M0	++, 20%	+, 10%	-	+++
E14,F14	50	F	Invasives duktales Karzinom	II	T1N0M0	-	-	-	+++
E15,F15	50	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T4N3M1	-	-	-	-
G1,H1	65	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T2N0M0	-	-	-	-
G2,H2	47	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T3N2M0	++, 20%	+++~++++ 30%	++, 5%	+

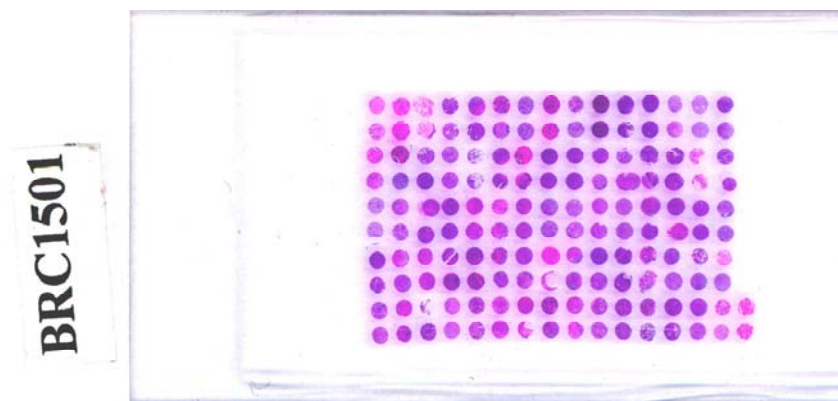
Fortsetzung Tab. 5

G3,H3	53	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T2N1M0	+, 10%	-	-	+++
G4,H4	51	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T4N2M1	++, 50%	+++, 100%	-	-
G5,H5	51	F	Invasives duktales Karzinom	I~II	T2N2M0	-	-	-	+++
G6,H6	33	F	Invasives duktales Karzinom	III	T2N0M0	++, 5%	-	-	+++
G7,H7	42	F	Invasives duktales Karzinom	II	T2N0M0	+, 10%	++, 50%	+++~++++, 15%	+~+++
G8,H8	48	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T2N0M0	-	++, 50%	+++, 20%	+
G9,H9	61	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T2N0M0	-	-	-	+++
G10,H10	49	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T2N0M0	+~+++, 10%	-	-	+++
G11,H11	37	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T2N0M0	-	-	-	-
G12,H12	44	F	Invasives duktales Karzinom	I	T2N0M0	-	+, 10%	-	+++
G13,H13	31	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T2N2M0	+, 2%	+, 10%	++, 5%	+++~++++
G14,H14	36	F	Invasives duktales Karzinom	II	T2N0M0	+, 2%	++, 60%	-	+
G15,H15	57	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T2N0M0	++, 30%	+++, 50%	-	-
I1,J1	52	F	Invasives duktales Karzinom	II	T3N3M0	-	-	-	-
I2,J2	55	F	Invasives duktales Karzinom	II	T3N0M0	-	+, 20%	+++~++++, 20%	+
I3,J3	37	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T3N1M1	+, 10%	+, 20%	+, 20%	+
I4,J4	54	F	Invasives duktales Karzinom	II	T2N0M0	-	++, 10%	+, 2%	-
I5,J5	43	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T3N1M0	++, 20%	-	-	+~+++
I6,J6	54	F	Invasive lobular carcinoma	III	T2N0M0	-	-	-	+++
I7,J7	58	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T3N1M0	-	-	-	-
I8,J8	40	F	Invasive lobular carcinoma	III	T2N0M0	-	++, 50%	++, 15%	-
I9,J9	66	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T3N0M0	-	-	-	+++
I10,J10	29	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T3N1M0	-	-	-	-
I11,J11	46	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T2N1M0	+, 5%	+, 10%	-	+++
I12,J12	40	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T3N0M0	++, 5%	+, 15%	+, 5%	-

Fortsetzung Tab. 5

I13,J13	46	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T2N0M0	+++~++++, 50%	++, 30%	+++ 80%	+++
I14,J14	35	F	Invasives duktales Karzinom	I~II	T4N2M1	++, 5%	+++~++++, 60%	+, 5%	+
I15,J15	35	F	Invasives duktales Karzinom	II~III	T2N0M0	-	-	-	+

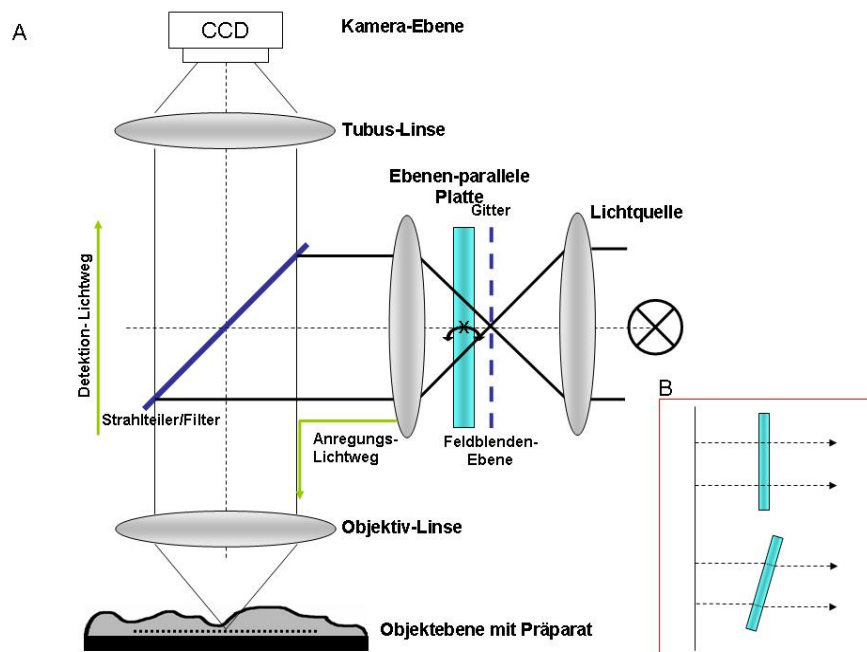
Abb. 9: Gewebe-Array BRC1501 (Pantomics, Inc.)



2.3.6.2 Aufnahme der Fluoreszenz *in situ* hybridisierten Gewebe-Arrays unter Verwendung eines Mikroskops mit strukturierter Beleuchtung

Bei Geweben handelt es sich um mehrschichtige Strukturen, in denen sich die Zellen und damit auch die Fluoreszenz-Signale von mehreren Zellen überlagern können. Dies stellt ein Problem dar, weil nach der Aufnahme die Signale den entsprechenden Zellen nur schwer zugeordnet werden können. In den letzten Jahren wurden technische Lösungen wie die 3D-Konvolution, Laser-Scanning-Mikroskopie und Mikroskope mit strukturierter Beleuchtung entwickelt.

Abb. 10: Prinzipieller Aufbau des Apotom-Mikroskops



A: Prinzipieller Strahlengang des Mikroskops. Das wesentliche Element des Apotom-Mikroskop ist die Ebenen-parallele Platte mit vorgeschaltetem Projektionsgitter. Die Ebenen-parallele Platte dient der Ablenkung des Anregungslichts und damit des Projektions-Gitters. B: Prinzip der Funktionsweise der Ablenkplatte. Das eintreffende Licht geht durch die Platte und wird durch Brechung abgelenkt (unten).

In dieser Arbeit wurde ein Mikroskop (Axiovert 200M, Zeiss) verwendet, das mit so genannter strukturierter Beleuchtung ausgestattet ist. In Abb. 10 ist das Prinzip des Aufbaus des Mikroskops dargestellt. Es handelt sich um ein konventionelles Epifluoreszenz-Mikroskop, das zum Zwecke der strukturierten Beleuchtung ein zusätzliches Bauteil (Apotom, Zeiss) enthält. Dieses Bauteil besteht im Prinzip aus einem Gitter („Grid“), das sich im Strahlengang des Mikroskops zwischen Beleuchtung und halbdurchlässigen Ablenkspiegel, welcher das Anregungslicht auf das Objekt ablenkt, befindet. Über ein Linsensystem wird dieses Gitter exakt in die Fokusebene des Objektes projiziert. Wäre dieses projizierte Gitter statisch, wäre immer nur ein Teil des Objektes ausgeleuchtet. Um dies zu umgehen, befindet sich direkt hinter dem Gitter eine Glasscheibe („plane-parallel plate“), die sich kippen lässt. Da durch das Kippen der Weg, den das Licht durch die Scheibe überwinden muss, länger wird, finden eine stärkere Brechung und damit eine Ablenkung des Lichtes statt. Somit sind die Positi-

on des Gitters, und damit die Bereiche auf dem Objekt, die beleuchtet werden variabel.

Im Objekt wird nur dort Fluoreszenz angeregt, wo das projizierte Gitter keinen Schatten wirft. Da das Gitter genau in die Fokusebene projiziert wird, entsteht nur in einem engen Bereich ein im Kontrast scharfes Gitter. Je weiter man sich von der Fokusebene weg bewegt, desto unschärfer wird der Kontrast zwischen hellen (Fluoreszenz angeregt) und dunklen (keine Fluoreszenz angeregt) Streifen.

Das Emissionslicht wird mit einer CCD-Kamera aufgenommen und live über den angeschlossenen Computer an die Aufnahme-Software (Axiovision 4.2, Zeiss) übermittelt. Für die Aufnahme einer Ebene werden immer die Aufnahmen mindestens dreier Gitter-Positionen miteinander verrechnet. Bei der Verrechnung werden Signale, die von unter- oder oberhalb der eigentlichen Fokusebene kommen heraus gefiltert. Somit entsteht ein so genannter optischer Schnitt, der nur die Fluoreszenz eines engen Bereichs um die Fokusebene wiedergibt.

Von einem Gewebeschnitt können Serien optischer Schnitte gemacht werden. Das heißt, es werden in z-Richtung durch das Objekt Ebenen in definierten Abstand zueinander aufgenommen. Diese Ebenen werden in einem Stapel (z-stack) zusammengefasst, durch welchen man sich mit der Software visuell bewegen kann. Dadurch bekommt man einen dreidimensionalen Eindruck vom Objekt und kann die Fluoreszenzsignale eindeutig den entsprechenden Zellen zuordnen (Abb. 44).

2.3.6.3 *Verwendete DNA-Sonden*

In diesem Ansatz wurden drei DNA-Sonden verwendet, die Bruchpunkt-flankierend und spezifisch an den in dieser Arbeit identifizierten Kandidatengenomen binden. Die Regionen der chromosomalen Bruchpunkte wurden zunächst mit Hilfe der Array-Painting Analyse auf ungefähr eine Megabase eingrenzt und dieser Bereich dann durch FISH-Analysen mit „Contigs“ von BAC-Sonden weiter eingegrenzt. Für die Herstellung der Sonden wurden solche Klone ausgewählt, die den Bruchpunkt so eng wie möglich flankieren und gleichzeitig spezifisch, d.h. ohne Kreuzhybridisierung, binden.

Die eingesetzten BAC-Klone (Abb. 44) wurden durch Recherche der genomischen Datenbank Ensembl ermittelt. Dabei wurden Klone ausgewählt, die Teil der 1Mb-BAC- oder 32K Re-Array-Bibliotheken sind, welche in dieser Arbeit zur Verfügung standen.

2.3.6.4 Anzucht der BAC-Klone

2.3.6.4.1 Material

BAC-Klone

Klone der human BAC 32K-Rearray-Bibliothek (BACPAC Resources) und der Sanger 1Mb-Bibliothek

Chloramphenicol (10mg/ml)

Chloramphenicol (Sigma-Aldrich) 20mg

Ad 2ml mit Ethanol p.a. absolut

LB-Flüssigmedium/Chloramphenicol (25 µg/µl)

Bacto-Trypton (DIFCO) 10 g

Bacto-Yeast (DIFCO) 5 g

NaCl (Merck) 10 g

Ad 800ml mit H₂O bidest

Auf pH 7,0 mit 10M NaOH einstellen;

Ad 1000ml mit H₂O bidest;

Autoklavieren;

2500 µl Chloramphenicol zugeben;

LB-Agar/Chloramphenicol (25 µg/ml)

LB-Flüssigmedium	1 l
Bacto-Agar´(DIFCO)	15 g

Autoklavieren;

Medium auf 50°C abkühlen lassen; 2500 µl

Chloramphenicol zugeben und mischen;

Medium in Petrischalen gießen, abkühlen lassen

und über Nacht stehen lassen;

2.3.6.4.2 Durchführung

Die BAC-Klone, die in Glycerin-LB-Medium in 384- bzw. 96-Well-Platten bei -80 °C gelagert werden, bringt man mit einer sterilen Impföse durch Verdünnungsausstrich auf LB-Agar/Chloramphenicol-Platten. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht im Brutschrank werden pro Klon 80 µl LB/Chloramphenicol mit einer Einzelkolonie angeimpft. Die Kultur wird für 14-16 h bei 37°C inkubiert und das Wachstum möglichst vor Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase gestoppt.

Die Kultur wird für die Isolation von Plasmid-DNA aus den Bakterienzellen verwendet.

2.3.6.5 *Isolierung der Plasmid-DNA aus BAC-Klonen*

Für die Isolierung der Plasmid-DNA aus BAC-Klonen wurde das Nucleobond PC 100 Plasmid Purification-Kit (Macherey-Nagel) verwendet. Das Kit funktioniert auf Basis der so genannten DNA-Isolierung mit alkalischer Lyse .

2.3.6.5.1 Material

Buffer S1 (Resuspensions-Puffer)

Buffer S2 (Lyse-Puffer)

Buffer S3 (Neutralisations-Puffer)

Buffer N2 (Equilibrierungs-Puffer)

Buffer N3 (Wasch-Puffer)

Buffer N5 (Elutions-Puffer)

RNase A

NucleoBond[®] AX 100 columns

2.3.6.5.2 Durchführung

Die 80 ml LB-Kultur wurden für 15 min bei 6000 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 8 ml Puffer S1 mit RNase A resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 8 ml Puffer S2 lysiert und für 5 min bei RT inkubiert. Zur Fällung des Lysats wurden 8 ml Puffer S3 zugegeben und für 5 min bei 0 °C inkubiert, wobei die chromosomale DNA zusammen mit den lysierten Zellbestandteilen ausfällt. Um das Lysat vom Niederschlag zu reinigen, wurde der Ansatz bei 20000 x g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Während dessen wurden die Säulchen (NucleoBond AX 100) mit 2,5 ml Puffer N2 equilibriert. Das gereinigte Lysat wurde dann über 0,4 µm Zell-Filter (Cell Strainer, Becton Dickinson) auf die equilibrierten Säulchen gegeben. Nachdem das Lysat das Säulchen passiert hatte, wurde es mit 12 ml Puffer N3 gewaschen und die an das Säulchen gebundene DNA mit 5 ml Puffer N5 (50 °C) eluiert. Das die DNA enthaltende Eluat wurde durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol und Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur gefällt und der Ansatz für 30 min bei 20000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 2 ml 70 %-Ethanol gewaschen und getrocknet. Nachdem das Pellet mit 200 µl Wasser gelöst wurde, konnte die DNA-Konzentration und Qualität photometrisch bestimmt werden.

2.3.6.6 Markierung der BAC-Plasmide

Die Nick-Translation dient der indirekten Markierung von DNA zur Herstellung von FISH-Sonden. Dabei werden von der DNaseI, einer Endonuklease, so genannte „Nicks“ eingeführt. Das bedeutet, dass zufällig in bestimmten Abständen Phosphodiester-Bindungen des DNA-„Rückgrats“ gespalten werden, was zur Erzeugung von Einzelstrangbrüchen („Nicks“) führt. „Nicks“ weisen auf der einen Seite eine reaktive 3'-OH-Gruppe und auf der anderen eine freie 5'-Phosphatgruppe auf. Die DNA-Einzelstränge werden von den 5'-Ende der „Nicks“ ausgehend in 3'-Richtung abgebaut, während DNA-Polymerase I in Richtung 3' die abgebauten Nukleotide ersetzt. Da dem Nick Translations (NT)-Mix neben den nativen Nukleotiden eine bestimmte Menge an markierten Nukleotiden (biotinyliertes oder digoxigeniertes-dUTP) beigemischt ist, wird die DNA so mit Biotin oder Digoxigenin markiert. Da die Reaktion an beiden DNA-Strängen stattfindet, bricht die DNA an den Stellen, an denen zwei „Nicks“ aufeinander treffen. Somit entstehen markierte DNA-Fragmente, die im Laufe der Reaktion immer kleiner werden.

2.3.6.6.1 Material

Nick-Translations-Mix für Biotin oder Digoxigenin Markierung:

Biotin/DIG-Nick Translation Mix (Roche, Mannheim)

Inhalt des Reaktionsmixes

- Reaktionspuffer
- DNaseI
- Polymerase I
- 0,25mM dATP, 0,25mM dCTP, 0,25mM dGTP, 0,17mM dTTP,
- 0,08mM Biotin-16-dUTP oder 0,08mM DIG-11-dUTP

100 bp-DNA-Längenstandard

GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Hanover, USA)

2.3.6.6.2 Durchführung

Ein Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 20ml) besteht aus 4 µl NT-Mix und 1 µg Proben-DNA (in 16 µl), welcher für 90 min bei 15°C im Thermocycler inkubiert und anschließend auf Eis gestellt wurde. Die Fragmentgrößen wurden dadurch kontrolliert, dass 2 µl der Lösung gleichzeitig mit einem 100 bp-Längenstandard auf ein 1%-Agarosegel aufgetragen und die Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Für ein FISH-Experiment liegen die optimalen Fragmentgrößen zwischen 200 bp und 500 bp. Waren die Fragmente im Mittel deutlich kleiner als 200 bp, so musste der Ansatz verworfen werden, weil zu kleine Fragmente bei der FISH unspezifisch binden und unspezifische Signale erzeugen. Bei korrekten Fragmentgrößen wurde die DNaseI durch Inkubation des Reaktionsansatzes für 20 Minuten bei 65°C im Thermocycler inaktiviert.

2.3.6.7 *Hybridisierung der BAC-Klone auf Gewebe-Arrays*

In ein FISH-Experiment wurden jeweils der Nick-Translations-Ansatz von 2 µg Ausgangs-DNA, 80 µg Cot-1 DNA (Roche), 100 µg Heringsperma-DNA (Invitrogen) eingesetzt. Diese wurden in einer Ethanol-fällung präzipitiert, einmal mit 70%-Ethanol gewaschen und in 6 µl Wasser und 14 µl Mastermix 1.0 für 30 Minuten bei 55°C gelöst. Anschließend wurde die Sondenlösung (20 µl) auf den Gewebe-Array aufgebracht, mit einem 24 mm x 30 mm Deckglas abgedeckt und mit Montagekleber abgedichtet. Nachdem der Kleber getrocknet war, wurden die Chromosomen in den Zellen der Gewebe und die Sondenlösung für 5 Minuten bei 72 °C co-denaturiert und anschließend für 36-48 Stunden zur Hybridisierung bei 37 °C inkubiert.

2.3.6.8 *Waschen der Objektträger*

Nach der Hybridisierung wurden die Arrays aus dem Inkubator genommen und der Kleber vorsichtig von Objektträger und Deckglas gelöst. Für die einfachere Entfernung des Deckglases wurde der Objektträger bei RT in 2 x SSC gestellt. Danach wurde überschüssige und unspezifisch gebundene Sonde für 7 min bei 73 °C in 0,4 x SSC/ 0,3% NP-40 vom Objektträger gewaschen und bis zur Detektion in PN-Puffer gestellt.

2.3.6.9 *Detektion der Objektträger*

2.3.6.9.1 Material

1. Antikörperschicht:

Streptavidin-FITC (Jackson ImmunoResearch)	5 µl
Anti-Dioxidigenin-Cy3 (Jackson ImmunoResearch)	2 µl
PNM Puffer	493 µl

2. Antikörperschicht:

Biotinyliertes Anti-Streptavidin (Vector)	5 µl
Ratte-Anti-Maus-Cy3 (Jackson ImmunoResearch)	10 µl
PNM Puffer	485 µl

3. Antikörperschicht:

Streptavidin-FITC (Jackson ImmunoResearch)	5 µl
Maus-Anti-Ratte-Cy3 (Jackson ImmunoResearch)	10 µl
PNM Puffer	485 µl

„Antifading“-Lösung (DAPI/Vectashield)

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

2.3.6.9.2 Durchführung

Nachdem der Objektträger gewaschen wurde, werden 80 µl PNM-Puffer aufgetragen die Reaktionsfläche mit Paraffin-Film abgedeckt und für 30 min bei 37 °C.

Danach wurden jeweils 100 µl Antikörper-Lösung für 20 min auf den OT inkubiert, dann für 2 mal 2 min mit PN gewaschen. Dann wurde die nächste Antikörperschicht aufgetragen.

Nach dem letzten Antikörper, wurde der OT mit 37 µl „Antifading“-Reagenz unter einem 24 x 50 mm Deckglas abgedeckt.

2.3.6.10 Aufnahme der Gewebe-Schnitte mit dem Apotom-Mikroskop

Die hybridisierten Gewebe-Schnitte wurden mit dem Axiovert 200M (Zeiss) mit Apotom (strukturierte Beleuchtung) aufgenommen. Dafür wurden die Belichtungszeiten für die drei benötigten Filter (DAPI, CY3 und FITC) individuell für jedes Experiment eingestellt. Da die Stenzen des Arrays eine Dicke von etwa 4 μm besaßen, wurden insgesamt 8 optische Schnitte eines Gesichtsfeldes, die einen Abstand von 0,5 μm zueinander hatten, aufgenommen. Dafür wurde über das Okular zunächst in die Mitte eines Schnittes fokussiert, und diese Fokusebene in der Software AxioVision (Zeiss) als ‚Center‘ definiert. Die ‚Center‘-Ebene bildet bei dieser Art der Aufnahme die Mitte des Ebenenstapels. Die anderen optischen Schnitte wurden dann ausgehend von dieser Ebene aufgenommen. Es wurden von jedem Gewebe des Arrays die Ebenenstapel dreier Gesichtsfelder von mindestens einer Stanze des entsprechenden Gewebes aufgenommen. Die Auswahl der aufgenommenen Gesichtsfelder richtete sich dabei nach den histologischen Gegebenheiten, wobei nur solche Bereiche ausgewählt wurden, die ausschließlich Tumorzellen enthielten. Die Histologie der Gewebe wurde von einem erfahrenen Pathologen nach Sichtung der Hematoxilin-gefärbten Gewebe-Arrays beurteilt.

2.3.6.11 Auswertung der aufgenommenen Bilder

Nach der Aufnahme lagen von jedem Gewebe mindestens drei Ebenenstapel vor. Bevor diese hinsichtlich ihrer zytogenetischen Veränderung beurteilt werden konnten, wurden die Fluoreszenzintensitäten der Stapel normalisiert und die Helligkeits- und Kontrasteinstellungen so gewählt, dass die Signale zum einen gut sichtbar und zum anderen gut von der Hintergrund-Fluoreszenz unterscheidbar waren. Es wurden nur solche Zellen für die Auswertung herangezogen, die einen intakten Kern (DAPI-Gegenfärbung) aufwiesen. Des Weiteren mussten die Zellen, mit Ausnahme von Zellen mit Amplifikation des entsprechenden Gens, gleiche Anzahl von grünen und roten Signalen aufweisen. Eine Translokation wurde dann als solche gewertet, wenn der Zellkern die besagten Bedingungen erfüllte und ein oder mehrere gespaltene rote und grüne Signale zeigte (Abb. 44 a).

Im Falle der Translokationssonde, die für das Gen Has2 spezifisch war, ergab sich hinsichtlich der Auswertung eine Besonderheit. Die beiden BAC-Klone, die in die Hybridisierung eingesetzt wurden, weisen einen Abstand von etwa 600 kb auf. Dieser Abstand beträgt bei völlig dekondensierter DNA etwa 0,1 μm (Lemke et al., 2002). Um auszuschließen, dass Zellen, die eine Lücke zwischen rotem und grünem Signal aufwiesen, falsch positiv gewertet wurden, wurde ein Grenzwert von 1 μm gesetzt, der überschritten werden musste, um die Zelle hinsichtlich der Translokation als positiv zu werten. Die Abstände der Signale zueinander wurde mit der ‚Length-Measure‘-Funktion in AxioVison (Zeiss) durchgeführt.

Neben gespaltenen Signalen als Folge von Translokationen wurden auch Signalmuster von Amplifikationen erkannt. Dabei waren entweder rote und grüne Signale zusammen in hoher Anzahl vorhanden, oder nur eins der beiden (Abb. 44 b). Um Amplifikationen von Polyploidien zu unterscheiden wurden die Signalmuster verschiedener DNA-Sonden im entsprechenden Gewebe miteinander verglichen. Zeigten die jeweils anderen Sonden eine geringere Kopienzahl, so konnte bei höherer Signal-Anzahl von einer Amplifikation ausgegangen werden.

Es wurden grundsätzlich drei Gesichtsfelder in einem Gewebe aufgenommen. Wurden in einem oder mehreren dieser Felder Translokationen oder Amplifikationen erkannt, wurden weitere Gesichtsfelder aufgenommen, um für jedes Gewebe mindestens 100 auswertbare Zellen zu erhalten.

Die Anzahl an veränderten Zellen wurde ins Verhältnis zur Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen angegeben und die prozentualen Häufigkeiten ermittelt.

Molekularbiologische Methoden

2.3.7 Trizol[®]-basierte RNA-Isolation aus kultivierten Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA (mRNA, rRNA, miRNA) aus Zellen mit dem kommerziellen Reagenz Trizol ist ein schnelles Verfahren mit hoher Ausbeute an RNA. Das Protokoll basiert auf der von Chomczynski und Sacchi (1987) beschriebenen Methode der RNA-Isolierung in einem Schritt. Bei dieser ‚klassischen‘ Methode werden die beiden Reagentien Guanidium-Thiocyanat und Phenol-Chloroform verwendet. Bei der Isolierung mit Trizol wird ein mono-phasisches Gemisch aus den beiden Chemikalien verwendet. In die Reaktion können sowohl kleine als auch große Zellzahlen (10^7) eingesetzt werden, ohne dass es dabei zu großen Verlusten in der RNA-Ausbeute kommt. Während die Zellen und damit die RNA sich in Kontakt mit Trizol befinden, ist die RNA vor dem Verdau durch RNasen geschützt. Trizol zerstört die Zellmembran und alle Membranen der Zell-Kompartimente. Dadurch wird ein Lysat frei, das intakte Proteine, DNA und RNA enthält. Zur Herstellung des Lysats sind keine weiteren Schritte, wie beispielsweise ein Proteinase K-Verdau nötig. Durch die Kombination verschiedener Fällungs- und Ausschüttlungs-Schritte lassen sich sequenziell RNA, DNA und Proteine aus einer einzigen Lyse-Reaktion gewinnen. Für die Gewinnung von RNA und DNA wird das Lysat mit Chloroform ausgeschüttelt. Die wässrige Phase im Überstand enthält RNA, die Interphase DNA und die organische Phase Proteine. Die Total-RNA wird durch Fällung der wässrigen Phase mit Isopropanol gewonnen.

Die gewonnene RNA lässt sich für vielfältige Reaktionen, wie mRNA-Expressionsanalysen oder Klonierungs- und RT-PCR-Reaktionen verwenden.

2.3.7.1 *Material*

Trizol-Reagenz (Invitrogen)

Chloroform (Sigma)

RNase-freies Wasser (Gibco)

Isopropanol (Sigma)

Trypsin/EDTA (Gibco)

0,5 %

2.3.7.2 Durchführung

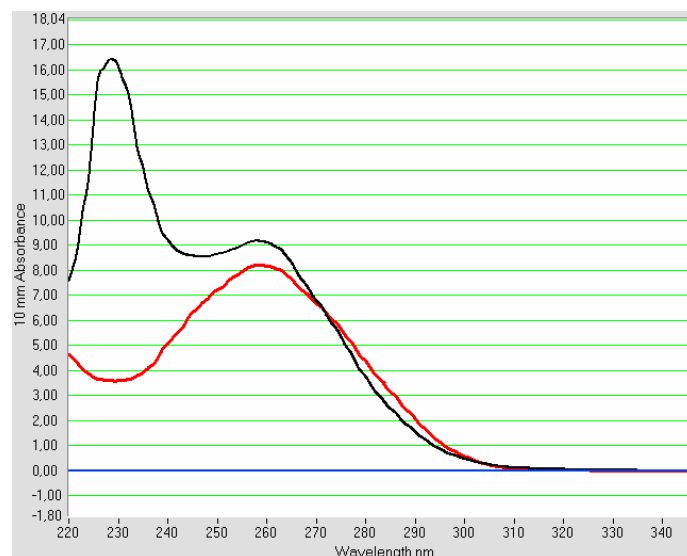
Zur Isolierung von RNA aus frischen Zellen, die sich in Kultur befanden, wurden die Zellen durch Trypsin-Verdau (0,005 % End-Konzentration, 5 min 37°C) von der Kulturflasche gelöst, die Zellzahl bestimmt, zweimal mit PBS gewaschen und bei 400 x g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde bis zur Präparation auf Eis gekühlt.

Wurde die RNA aus Zellen isoliert, die in flüssigem Stickstoff gelagert waren, wurde das Zellpellet entnommen und direkt durch Zugabe von Trizol verarbeitet.

Pro RG wurden maximal $0,5 \times 10^7$ Zellen verarbeitet. Dafür wurden auf das Pellet 750 µl Trizol pipettiert. Durch Auf- und Ab-Pipettieren wurde die Lyse beschleunigt. Es war aber auch möglich, den Ansatz über Nacht bei RT zu inkubieren.

Nachdem die Zellen vollständig lysiert waren, wurden 175 µl Chloroform auf den Ansatz gegeben und mehrmals invertiert. Die entstandene Suspension wurde drei Mal in fünfminütigen Abständen heftig gemischt und anschließend bei 16000 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Danach wurde die obere, wässrige Phase, möglichst ohne die Interphase zu berühren, abgenommen und in ein neues RG überführt. Zur Fällung der RNA wurden 600 µl Isopropanol zum Ansatz pipettiert und für mindestens 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Niederschlag durch Zentrifugation bei 16000 x g für 15 min pelletiert. Das Pellet wurde zwei Mal mit 75 % Ethanol (RNase frei, 4°C) gewaschen und bei 5400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet getrocknet und in Wasser (RNase-frei) gelöst. Die RNA-Konzentration und Reinheit wurde durch Messung mit einem Spectrophotometer (NanoDrop, NanoDrop Technologies) bestimmt. Ergab sich bei der Messung in der Spektralkurve neben dem für RNA spezifischen Peak bei 260 nm ein weiterer bei 230 nm (Abb. 11), wurde Phenol verschleppt. Da Phenol nachfolgende Reaktionen stören kann, wurde der Ansatz zur Aufreinigung ein weiteres Mal mit 750 µl Trizol gemischt und mit 175 µl Chloroform ausgeschüttelt. Danach folgte die Fällung wie oben beschrieben.

Abb. 11: Spectrogramm von RNA mit Phenol-Kontamination vor (schwarze Kurve), und nach Trizol-Chloroform-Extraktion



Vor der Aufreinigung zeigt die Probe neben dem für RNA spezifischen Absorptions-Peak bei 260 nm einen weiteren Peak bei 230 nm (schwarze Kurve). Nach der Ausschüttung mit Trizol/Chloroform und weiterer Fällung ist der 230 nm-Peak verschwunden (rote Kurve).

2.3.8 DNase-Verdau von Gesamt-RNA

Für Reaktionen, in denen reine cDNA benötigt wurde und keine verschleppte genomische DNA aus der Gesamt-RNA-Isolierung im Ansatz vorhanden sein darf, war eine DNase-Behandlung notwendig. Zur Entfernung von DNA-Verunreinigungen wurde das „Turbo DNA free“-Kit (Ambion) verwendet.

Das Kit arbeitet mit einer DNase in Kombination mit einem unlöslichen Inaktivierungs-Reagenz, das nach Zugabe einen Komplex mit der DNase eingeht. Dadurch lässt sich der Ansatz nach der Reaktion, ohne Fällung, von der DNase reinigen.

2.3.8.1 Material

Turbo DNase (Kit)	2 U/μl
Turbo DNase Reaktionspuffer (Kit)	10 x

DNase Inaktivierungs-Reagenz (Kit)

Nuklease-freies Wasser

2.3.8.2 Durchführung

Zu 10 µg Gesamt-RNA (in maximal 44 µl Wasser) wurden 5 µl Reaktionspuffer und 1 µl DNase gegeben. Der Ansatz wurde für 30 min inkubiert und weitere 1 µl DNase zum Ansatz gegeben. Anschließend wurden 10 µl frisch aufgeschütteltes Inaktivierungs-Reagenz zugegeben, für 3 min inkubiert und der Ansatz immer wieder gemischt, so dass bereits abgesunkenes Inaktivierungs-Reagenz wieder resuspendiert wurde. Um den Komplex aus DNase und Inaktivierungs-Reagenz vom Überstand zu trennen, wurde der Ansatz für 1,5 min bei 10000 x g zentrifugiert, und die DNA-freie RNA in ein neues PCR-RG überführt.

2.3.9 Universelle Umschreibung von RNA in cDNA

Für die RT-PCR wird man sog. „complementary DNA“ (cDNA) benötigt. Diese wird in einer sog. reversen Transkription, in der einzelsträngige RNA in ein doppelsträngiges DNA-RNA-Hybrid umgeschrieben wird, gewonnen. Das zentrale Element bei dieser Reaktion ist die, ursprünglich aus Retroviren hergestellte, reverse Transkriptase. Diese kann einen DNA-Primer, der an der RNA gebunden hat, in 3'-Richtung verlängern, so dass die RNA-Matrize kopiert wird. Nach dieser Reaktion wird das Hybrid denaturiert und die RNA mit RNase verdaut. Danach bleibt die einzelsträngige cDNA übrig, welche direkt in nachfolgende Reaktionen eingesetzt werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das „Superscript II Kit“ (Invitrogen) verwendet. Dieses Kit arbeitet mit Zufalls-Hexameren, die statistisch verteilt an der RNA-Matrize binden. Dadurch erreicht man eine gleichmäßige, universelle Umschreibung von RNA in cDNA.

2.3.9.1 *Material*

10X Reverse Transcription Buffer (Kit)

dNTP-Mix (MBI)	10 mM
Zufalls-Hexamere (Promega)	50 ng/ μ l
“First-Strand” Reaktionspuffer (Kit)	5 x
DTT (Dithiotreitol, Kit)	0,1 M
RNase-Inhibitor RNaseOUT (Kit)	40 U/ μ l
RNaseH-Mix (Invitrogen)	4 U/ μ l

2.3.9.2 *Durchführung*

In eine Reaktion wurden 5 μ g Gesamt-RNA in einem Volumen von 7 μ l eingesetzt. Die reverse Transkription wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

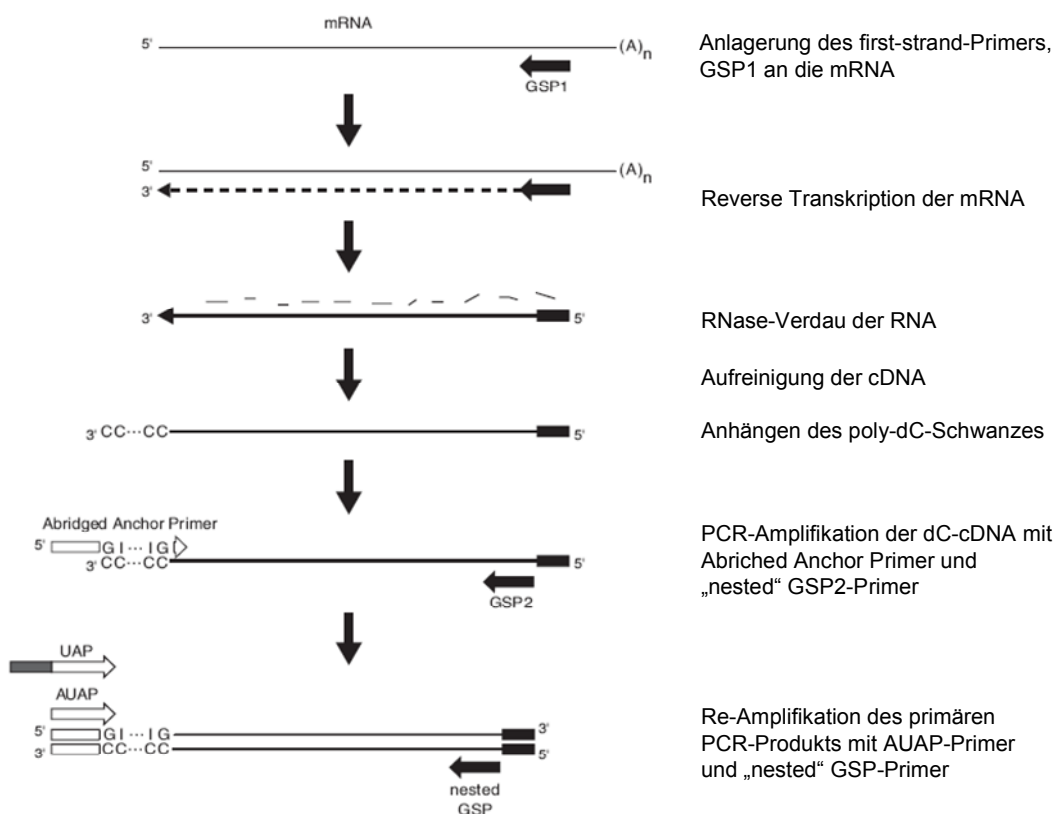
Komponente	Menge
Zufalls-Hexamere	4 μ l
dNTP-Mix	1 μ l
10X Random Primers	10 μ l
Gesamt-RNA	7 μ l
Gesamt-Volumen	12 μ l

Die Reaktion wurde bei 65 °C für fünf Minuten erhitzt und sofort auf Eis gestellt. Danach wurden 4 μ l „First-Strand“-Buffer, 2 μ l DTT und 1 μ l RNaseOUT dazu pipettiert. Der Ansatz wurde für 2 min bei 25 °C inkubiert, 1 μ l Reverse Transkriptase zugegeben und für 50 min bei 42 °C inkubiert. Zum Schluss wurde die Reaktion für 10 min bei 70 °C gestoppt und die restliche RNA durch Zugabe von 1 μ l RNaseH und Inkubation bei 37 °C für eine Stunde verdaut.

2.3.10 Identifizierung des unbekanntes 5'-Teiles eines Fusions-Gens mit 5'-RACE

Mit Hilfe der 5'-RACE (Abb. 12) kann vom bekannten Teil eines Fusions-Gens ausgehend der unbekanntes 5' gelegene Teil der cDNA amplifiziert und über Sequenzierung charakterisiert werden. Für die cDNA-Synthese wird ein genspezifischer Primer (GSP1), der auf dem bekannten Teil des Gens bindet, eingesetzt. An das entstandene Produkt wird mit Hilfe der Terminalen-Deoxynucleotidyl-Transferase (TdT) am 3'-Ende ein poly-C-Schwanz gehängt. Die cDNA wird dann mit einem universellen Primer (Abridged Anchor Primer, AAP), der eine poly-G-Sequenz beinhaltet und weiteren „nested Primern“ (GSP2, GSP3, ...), die weiter in Richtung 5' des bekannten Bereiches des Fusions-Gens binden, in PCR-Reaktionen amplifiziert. Das Amplifikationsprodukt wird dann in einen Plasmid-Vektor kloniert, und nach Transfektion und Vermehrung in *E. coli* Zellen durch Sequenzierung charakterisiert.

Abb. 12: Schema 5'-RACE (Invitrogen)



2.3.10.1 Herstellung der cDNA

Siehe 2.4.10

2.3.10.1.1 Material

Gesamt-RNA

10 x PCR buffer

MgCl₂ (25 mM)

10 mM – dNTP-Mix

DTT (0.1 M)

SuperScript-II Reverse Transkriptase

2.3.10.1.2 Durchführung

In eine Reaktion wurden 2-5 µg Gesamt-RNA (in maximal 13 µl H₂O) der zu untersuchenden Zellen und 2,5 µl GSP1-Primer eingesetzt. Der Ansatz (15,5 µl) wurde gemischt, für 10 min bei 70 °C denaturiert und danach auf Eis gekühlt. Danach wurden dem Ansatz zusätzliche Komponenten nach folgendem Pipettierschema zugefügt:

Komponente	Menge
10X PCR buffer	2,5 µl
25 mM MgCl ₂	2,5 µl
10 mM dNTP-Mix	1 µl
0.1 M DTT	2,5 µl
Gesamt-Volumen	8,5 µl

Der Ansatz (24 µl Gesamt-Volumen) wurde für eine Minute bei 42 °C inkubiert, 1µl SuperScript-II Reverse Transkriptase dazu pipettiert und 50 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 15 minütige Inkubation bei 70 °C gestoppt und anschlie-

ßend ein RNA-Verdau durch Zugabe von 1 µl RNase-Mix und Inkubation für 30 min bei 37°C durchgeführt.

2.3.10.2 *Aufreinigung der cDNA*

2.3.10.2.1 Material

DNA-clean & concentrator kit

DNA Binding-Buffer

DNA Wash-Buffer

Zymo-Spin™ -25-Säulchen

Nuklease-freies Wasser (Gibco)

2.3.10.2.2 Durchführung

Die cDNA wurde mit dem siebenfachen Volumen „DNA Binding-Buffer“ gemischt und bei 16000 x g für 30 s durch ein Zymo-Spin-Säulchen zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen. Die an das Säulchen gebundene DNA wurde durch zweimalige Zentrifugation bei 16000 x g für 30 s mit 200 µl „DNA Wash-Buffer“ gewaschen. Die DNA wurde mit 50 µl Wasser (60°C) vom Säulchen eluiert. Damit die Konzentration an cDNA für den Einsatz in die nachfolgende Reaktion möglichst groß war, wurde der Ansatz in der Vakuum-Zentrifuge auf 10 µl reduziert.

2.3.10.3 *RACE-PCR*

2.3.10.3.1 Material

Soweit nicht anders vermerkt, sind alle aufgeführten Lösungen Bestandteile des „5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0“-Kits (Invitrogen).

PCR Gold Buffer (Applied Biosystems)	10 x
MgCl ₂ (Applied Biosystems)	25 mM
dNTP-Mix (MBI)	10 mM
RNAse mix	

Tailing Puffer	5x
Tris-HCl, pH 8,4	50 mM
KCl	125 mM
MgCl ₂	7,5 mM
dCTP	2 mM
Terminale-deoxynucleotidyl-Transferase (TdT)	
Primer (10 µM) (siehe Anhang 7.1)	
AAP (5´RACE Abridged Anchor Primer)	
AUAP (Abridged Universal Amplification Primer)	

Für die Klonierung des Grid1-Fusions-Gens (Primer nicht im Kit enthalten, siehe Anhang 7.1):

GS1grid1B

GS1grid1A

GS2Grid1A

GS3grid1

Für die Klonierung des Ret-Fusions-Gens (Primer nicht im Kit enthalten, siehe Anhang 7.1):

RETSP2

RETSP3

2.3.10.3.2 Durchführung

2.3.10.4 *TdT Tailing der cDNA*

Das „TdT-Tailing“ der cDNA mit einem poly-dC-Schwanz wurde nach folgendem Pipettierschema durchgeführt:

Komponente	Menge
Wasser	6,5 μ l
5 x Tailing Buffer	5 μ l
2mM dCTP	2,5 μ l
cDNA	10 μ l
Gesamt-Volumen	19 μ l

Der Ansatz wurde für 3 min bei 94°C inkubiert und danach auf Eis gestellt. Dazu wurde 1 μ l TdT dazu pipettiert und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Es folgt Hitze-Inaktivierung der TdT bei 65°C für 10 min.

2.3.10.5 PCR der "dC-tailed" cDNA

Der PCR-Reaktion lag folgendes Pipettierschema zugrunde:

Komponente	Menge
Wasser	31,5 μ l
10x PCR Gold Buffer	5 μ l
MgCl ₂	3 μ l
dNTPs	1 μ l
Primer 1: (RETSP2)	2 μ l
Primer 2: (AAP)	2 μ l
Template (dC-tailed cDNA)	5 μ l
Taq (Amplitaq-Gold, 5U/ μ l)	0,5 μ l
Gesamt-Volumen	50 μ l

Die PCR-Reaktion lief nach folgenden Parametern ab:

96°C	9 min	1x
94°C	30 sek.	
T _a °C	1 min	40x
72°C	1 min	
72°C	10 min	1x
4°C	∞	

2.3.10.6 „Nested“ PCR-Amplifikation

Da in der Regel eine PCR-Reaktion nicht ausreicht, um genügend spezifisches Produkt zu amplifizieren, wird das Produkt der ersten PCR-Reaktion im Rahmen einer „nested“ PCR nochmals amplifiziert. Dieser PCR-Reaktion lag folgendes Pipettierschema zugrunde:

Komponente	Menge
Wasser	35,5 µl
10x Puffer	5 µl
MgCl ₂	3 µl
dNTPs	1 µl
Primer 1: (RETSP3)	2 µl
Primer 2: (AUAP)	2 µl
Template (1:50 Verdünnung des primären PCR-Produkts)	1 µl
Taq (Amplitaq-Gold, 5U/µl)	0,5 µl
Gesamt-Volumen	50 µl

Die PCR-Reaktionen liefen nach den Parametern der ersten PCR-Reaktion ab.

Die PCR mit dem letzten „nested Primer“ wurde in drei separaten Reaktionen á 50 µl angesetzt, um ausreichend Produkt für die Klonierung zu erhalten. Die Produkte wurden vollständig auf ein 2,5 %-Agarose-Gel aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Fragmente wurden die Banden mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und daraus die DNA extrahiert.

2.3.10.7 DNA-Extraktion aus Agarose-Gel

Dafür wurde das Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) verwendet. Die dafür verwendeten Komponenten sind Teil des Kits.

2.3.10.7.1 Material

Membrane-Binding-Solution

Membrane-Wash-Solution

SV-Mini-Columns

2.3.10.7.2 Durchführung

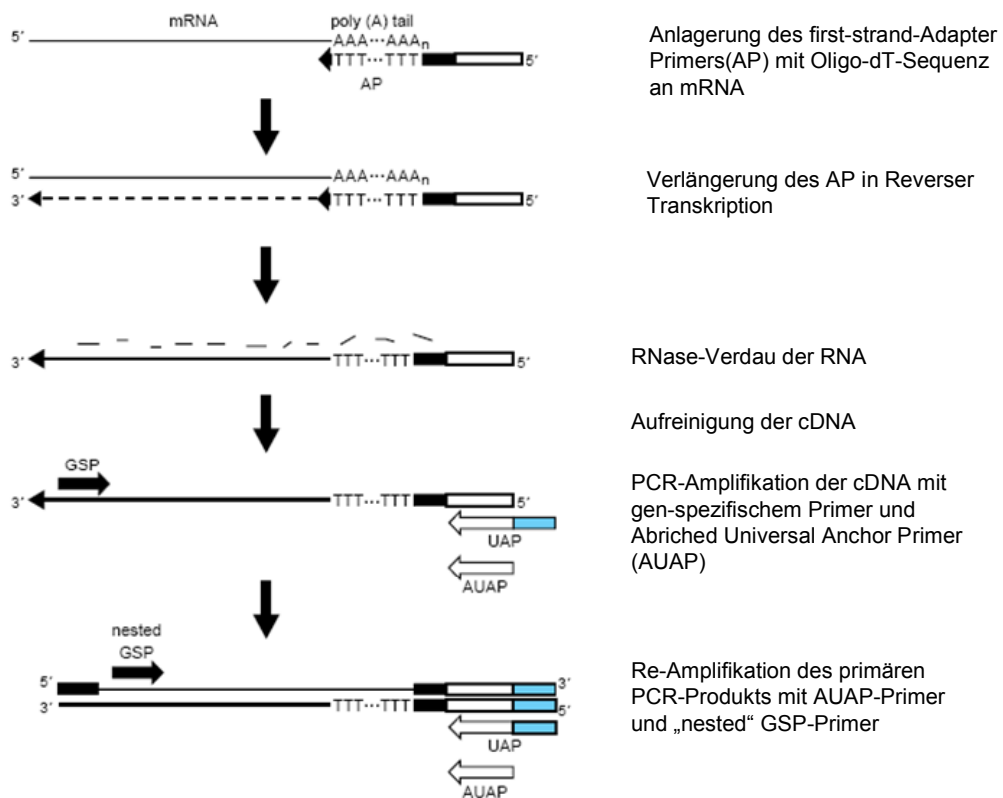
Bevor die Banden aus dem Gel ausgeschnitten wurden, wurde ein 2 ml-RG gewogen, so dass man die Masse der ausgeschnittenen Bande im RG bestimmen konnte. Es wurden pro 10 mg ausgeschnittenen Gels 10 µl Membrane-Binding-Solution zum Ansatz gegeben und bei 55 °C unter Schütteln solange inkubiert, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte. Mit dieser Lösung wurde das Säulchen beladen und für 1 min bei 16000 x g zentrifugiert. Da maximal 800 µl auf das Säulchen aufgetragen werden konnten, mußte die Lösung, bei einem Volumen von mehr als 800 µl, in mehreren Schritten durch das Säulchen zentrifugiert werden. Anschließend wurde die an das Säulchen gebundene DNA einmal mit 800 µl und einmal mit 500 µl für 1 min bei 16000 x g durch Zentrifugation mit „Membrane-Wash-Solution“ gewaschen. Zum Trocknen wurde das Säulchen für 1 min bei 16000 x g leer zentrifugiert. Zur Elution wurden 50 µl nuklease-freies Wasser (65° C) auf das Säulchen aufgetragen, eine min inkubiert und 1 min bei 16000 x g zentrifugiert.

Der Ansatz wurde für den Einsatz in die Klonierungs-Reaktion in der Vakuumentrifuge auf die Hälfte seines Volumens (25 µl) reduziert.

2.3.11 Identifizierung des unbekannten 3'-Teiles eines Fusions-Gens mit 3'-RACE

Zur Identifizierung des unbekannten 3'-Teiles eines Gens wird die so genannte 3'-RACE angewandt. Dafür wird die RNA der zu untersuchenden Zellen mit Hilfe eines Adapter-Primers, der eine Oligo-(dT)-Sequenz besitzt, in einer Reversen Transkription in cDNA umgewandelt. Diese wird dann mit genspezifischen Primern (GSP) und dem so genannten „Abriched Universal Anchor Primer“ in „nested“ PCR-Reaktionen amplifiziert. Die aufgereinigten Produkte wurden kloniert, amplifiziert und durch Sequenzierung charakterisiert.

Abb. 13: Prinzip der 3'-RACE



2.3.11.1 Herstellung der cDNA

Siehe Material und Methoden 2.3.9

2.3.11.1.1 Material

Gesamt-RNA

10 x PCR buffer

MgCl₂ (25 mM)

10 mM – dNTP-Mix

DTT (0.1 M)

SuperScript-II Reverse Transkriptase

RNase-Mix

Adapter-Primer AP (10 µM)

2.3.11.1.2 Durchführung

Im ersten Schritt wurden 5 µg Gesamt-RNA in 11 µl mit 1 µl Adaptor-Primer (AP) gemischt, der Ansatz für 10 min bei 70 °C denaturiert und zur Abkühlung auf Eis gestellt. Anschließend werden weitere Komponenten nach folgendem Pipettier-Schema zur Reaktion pipettiert:

Komponente	Menge
10X PCR buffer	2 µl
25 mM MgCl ₂	2 µl
10 mM dNTP-Mix	1 µl
0.1 M DTT	2 µl
Gesamt-Volumen	7 µl

Der Ansatz wurde gemischt, für 2 min bei 42 °C inkubiert, 1 µl SuperScriptII-reverse Transkriptase dazu pipettiert und für 50 min bei 42 °C inkubiert. Die Reaktion wurde

durch Inkubation für 50 min bei 70 °C gestoppt und anschließend auf Eis abgekühlt. Es wurde 1 µl RNase-Mix dazu gegeben und für 20 min bei 37 °C inkubiert.

2.3.11.2 „Nested“-PCR-Amplifikation

2.3.11.2.1 Material

10 x PCR-Gold-Buffer (Applied Biosystems)

MgCl₂ 25 mM

dNTP-Mix 10 mM

genspezifische Primer (GSP) 10 µM

„Abridged-Universal-Amplification-Primer“ (AUAP) für 3'-RACE 10 µM

Taq (Amplitaq-Gold) 5 U/µl

Für die Klonierung des Has2-Fusionsproduktes (Primer nicht im Kit enthalten, siehe Anhang 7.1):

Has2_3P_E1_GSP1

Has2_3P_E1_GSP2

Has2_3P_E2_GSP3

Has2_3P_E2_GSP4

2.3.11.2.2 Durchführung

Komponente	Menge
Wasser	36,5 µl
10x PCR Gold Buffer	5 µl
MgCl ₂	3 µl

dNTPs	1 μ l
Primer 1: (RETSP2)	1 μ l
Primer 2: (AAP)	1 μ l
Template (dC-tailed cDNA)	2 μ l
Taq (Amplitaq-Gold, 5U/ μ l)	0,5 μ l
<hr/>	
Gesamt-Volumen	50 μ l

Die Komponenten wurden zusammen gemischt und die Reaktion im Thermocycler nach folgendem Schema gestartet:

96°C	9 min	1x
<hr/>		
94°C	30 sek.	
T _a °C	1 min	40x
72°C	1 min	
<hr/>		
72°C	10 min	1x
<hr/>		
4°C	8	
<hr/>		

Die letzte „nested“-Amplifikation wurde in drei separaten Reaktionen angesetzt, und das ganze Amplifikat auf ein 1,5 %-Agarose-Gel aufgetragen. Die Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten. Es folgte die DNA-Extraktion und – Konzentrationsbestimmung wie unter 2.1.3 beschrieben.

2.3.12 Klonierung von PCR-Fragmenten aus 3’-/ 5’-RACE-Reaktionen mit Hilfe des „TOPO TA Cloning[®] Kits for Sequencing“

Nachdem mit Hilfe der 3’- oder 5’-RACE das Fusions-Transkript amplifiziert wurde, musste dieses durch Sequenzierung weiter charakterisiert werden. Da es sich bei RACE um ein PCR-basiertes Verfahren handelt, muss man davon ausgehen, dass die aus dem Agarose-Gel extrahierten Fragmente nicht in Reinform vorliegen, sondern ein Gemisch aus Fragmenten verschiedener Längen darstellen. Für verlässliche

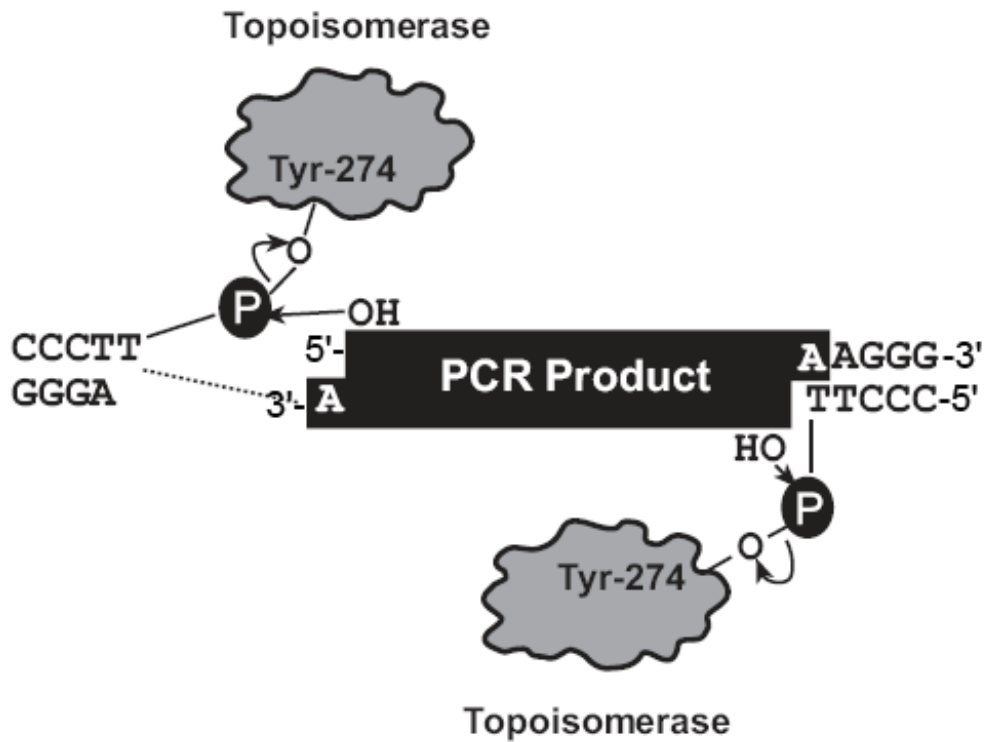
Sequenzier-Ergebnisse war es aber notwendig, dass die untersuchten Fragmente in Reinform vorliegen. Dies konnte durch Klonierung der Fragmente in ein Vektorsystem, das einen Wirtsorganismus transfiziert und dadurch vermehrt wird, erreicht werden. Danach wurde der Vektor durch DNA-Extraktion isoliert, so dass das klonierte und somit aufgereinigte PCR-Fragment sequenziert werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde das so genannte TOPO-Cloning Kit als Klonierungssystem verwendet. Das Prinzip der Klonierung basiert bei diesem Kit auf der Verwendung einer Topoisomerase in Kombination mit dem Plasmid-Vektor pCR4[®]-TOPO[®].

Der im Kit enthaltene Vektor ist bereits „aktiviert“ und trägt die Topoisomerase an beiden Seiten der Insertions-Stelle, indem sie über einen Tyrosin-Rest an die 3'-Hydroxylgruppe kovalent gebunden wurde. Die kovalente Bindung kommt dadurch zustande, dass die Topoisomerase spezifisch doppelsträngige DNA-Sequenzen nach der Sequenz 5'-CCCTT-3' spaltet, und dann über einen Tyrosin-Rest an die freie Hydroxyl-Gruppe des Phosphat-„Rückgrats“ bindet. Den Vektor mit der gebundenen Topoisomerase bezeichnet man als „aktiviert“.

In den PCR-Reaktionen wurde eine Taq-Polymerase verwendet, welche eine so genannte Template-unabhängige terminale Transferase-Aktivität besitzt. Das bedeutet, dass die Taq-Polymerase an die 3'-Enden von PCR-Amplifikaten einen zusätzlichen Adenin-Überhang synthetisiert. Die Phospho-Tyrosyl-Bindung wird von der freien Hydroxyl-Gruppe des PCR-Fragments angegriffen, wobei die 3'-OH-Gruppe des Vektors wieder frei wird und eine Phosphodiester-Bindung mit der 5'-Phosphat-Gruppe des Fragments eingeht (Abb. 14). Diese Reaktion findet sowohl am 5', als auch am 3'-Ende des PCR-Fragments statt, so dass nach Abschluß der Reaktionen ein zirkuläres Plasmid mit einkloniertem PCR-Fragment vorliegt. Nach chemischer Transfektion des Plasmids in kompetente *E. coli*-Zellen, werden die Zellen kultiviert und die Plasmid-DNA zur nachfolgenden Sequenzierung isoliert.

Abb. 14: Funktionsweise der im TOPO-Cloning-Kit enthaltenen Topoisomerase



2.3.12.1 Material (Bestandteile des verwendeten Kits)

10 x PCR Buffer

dNTP-Mix 12,5 mM

Salt Solution 1,2 M NaCl/ 0,06 M MgCl₂

M13 forward/reverse Primer

(siehe Anhang 7.1) 10 μM

pCR[®]4-TOPO[®] Plasmid

DNA (in Glycerin-Puffer) 10 ng/μl

S.O.C. Medium

Kompetente Zellen (One Shot[®] Mach1[™]-T1[®])

LB-Agar-Platten, (100 μg/ml Ampicillin)

2.3.12.2 Durchführung

In die Klonierungs-Reaktion wurde die aufgereinigte und konzentrierte DNA aus den 5'/3'-RACE-Reaktionen (Material und Methoden 2.3.10 und 2.3.11) eingesetzt.

Dafür wurden 4 µl DNA, 1 µl Salt-Solution und 1 µl Vektor auf Eis zusammenpipettiert und für 15 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend auf Eis gestellt oder bei Bedarf über Nacht bei -20 °C eingefroren.

Pro Reaktion wurde ein RG mit kompetenten E. coli Zellen auf Eis aufgetaut, 2 µl der Klonierungs-Reaktion zur Zell-Suspension pipettiert, vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für 30 s in ein Wasserbad mit 42 °C gehalten und danach sofort wieder auf Eis gestellt (Hitzeschock). Zu den jetzt transfizierten Zellen wurden 250 µl S.O.C.-Medium gegeben, der Ansatz gemischt und für 1 h bei 37 °C unter Schütteln im Brutschrank inkubiert. Danach wurden jeweils 20 µl, 50 µl und 100 µl auf LB-Agar-Platten (100 µg/ml Ampicillin) mit einem Drigalsky-Spatel ausgestrichen und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Zur Sub-Klonierung wurden einzelne Klone (ca. 20) auf neue Platten ausgestrichen und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert.

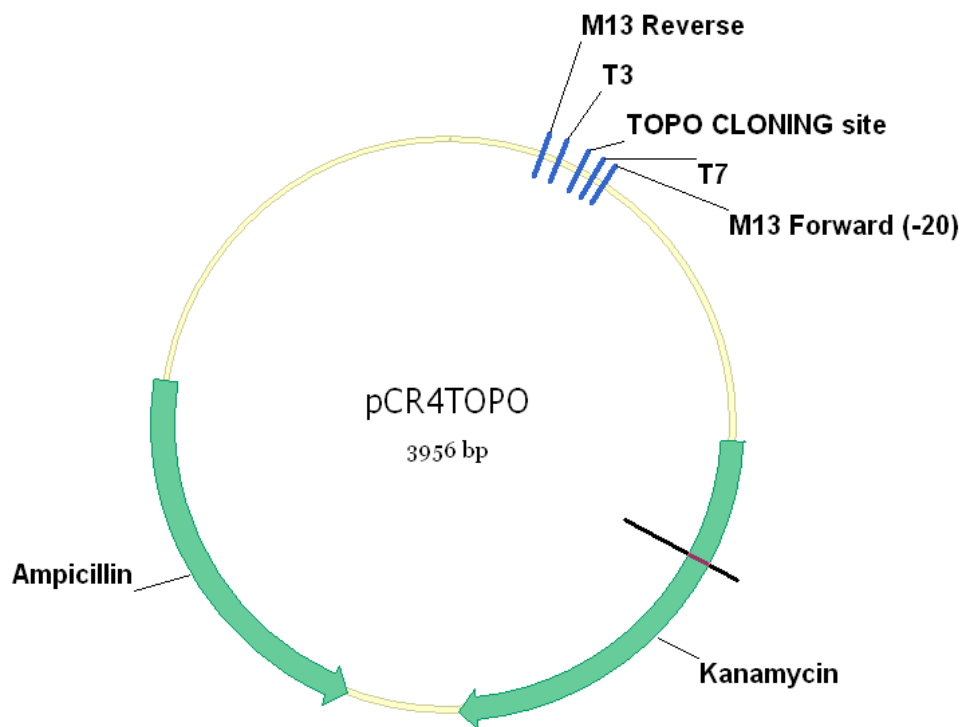
Die Platten wurden durchnummeriert und im nächsten Schritt in eine „Kolonie“-PCR eingesetzt, in der überprüft wurde ob die gewachsenen Klone das PCR-Fragment mit der richtigen Größe integriert hatten.

2.3.13 Kolonie-PCR zur Bestimmung der Fragment-Länge TOPO-klonierter Sequenzen

Nach Klonierung der aus RACE-PCR gewonnenen Fragmente wurde überprüft, ob sich die richtigen Sequenzen im Vektor befanden. Da die Fragmentlängen der klonierten Fragmente bekannt waren, wurde über PCR-Primer, die im Vektor außerhalb des Fragments binden, festgestellt, ob die richtige Fragmentgröße kloniert wurde. Der verwendete Vektor (Abb. 15) verfügt über M13- und T3/7-Primer-Bindungsstellen, über die eine Amplifikation des „Inserts“ erfolgen kann. In dieser Arbeit wurden die M13-Primer-Bindungsstellen verwendet, welche die „TOPO Cloning site“ (Abb. 15) in einem Abstand von 134 bp flankieren. Das Amplifikat war somit 134 bp größer als das ursprünglich klonierte Fragment.

In die Kolonie-PCR wurden Einzel-Kolonien der sub-klonierten Bakterien-Klone eingesetzt. Bei der initialen Denaturierung der PCR-Reaktion kommt es zur Denaturierung der Zellmembranen der Bakterien-Zellen, wodurch Plasmid-DNA frei wird, die dann als DNA-Matrize für die PCR dient.

Abb. 15: Klonierungs-Vektor PCR4TOPO des TOPO TA Cloning® Kits



2.3.13.1 Material

10 x PCR Gold Buffer (Applied Biosystems)

25 mM MgCl₂ (Applied Biosystems)

10 mM dNTP-Mix (MBI)

Amplitaq-Gold DNA Polymerase (5 U/μl, Applied Biosystems)

2.3.13.2 Durchführung

Für die PCR-Reaktion wurde ein Master-Mix hergestellt, der bis auf die DNA-Matrize alle Komponenten enthielt. Es wurde eine so genannte „hotstart“-DNA-Polymerase verwendet, die erst nach zehnminütiger Denaturierung bei 96 °C aktiv wird.

Für eine PCR-Reaktion (50 μl) wurden die Komponenten nach folgendem Schema pipettiert:

Komponente	Menge
Wasser	31,5 μl
10x PCR Gold Buffer	5 μl
MgCl ₂	3 μl
dNTPs	1 μl
M13-forward (10 μM)	1 μl
M13-reverse (10 μM)	1 μl
Template (dC-tailed cDNA)	5 μl
Taq (Amplitaq-Gold, 5U/μl)	0,5 μl
Gesamt-Volumen	48 μl

Anschließend wurden zehn kleine Einzel-Kolonien (~ 2 μl) mit einer sterilen Impföse von der LB-Agar-Platte in das PCR-RG überführt.

Die PCR-Reaktion lief nach folgendem Schema ab:

96°C	9 min	1x
94°C	30 sek.	
50°C	1 min	30x
72°C	1 min	
72°C	10 min	1x
4°C	∞	

Es wurden 10 µl der Reaktion zusammen mit 2 µl Auftragspuffer (6 x) auf ein 2 %-Agarose-Gel aufgetragen und anschließend die Fragmentgrößen analysiert.

2.3.14 Sequenzierung der klonierten RACE-Produkte

Zum Zwecke der weiteren Charakterisierung wurden die klonierten Fragmente mit der so genannten „Dye-Terminator“-Sequenzier Methode sequenziert.

Dafür wird die in den im Vektor (pCR4-TOPO) einklonierte Template-DNA im ersten Schritt in zwei separaten PCR-Reaktionen unter Benutzung der M13-Primerbindungsstellen amplifiziert. Dafür werden in die PCR neben M13-Vorwärts- oder Rückwärts-Primern und normalen Nukleotiden sogenannte „Dye-Terminatoren“ (DT) eingesetzt, wobei es sich um Nukleotide handelt, die keine freie Hydroxyl-Gruppe besitzen und demnach durch die Taq-Polymerase nicht verlängert werden können. Zusätzlich sind die Nukleotide mit Fluoreszenz-Farbstoffen versehen, wobei jedes Nukleotid (A, T, G und C) einen spezifischen Fluoreszenz-Farbstoff gebunden hat.

Während der PCR kommt es zur Verlängerung des Primers, wobei die Elongation stoppt, sobald ein „Dye-Terminator“ eingebaut wurde. Die Häufigkeit, mit der ein DT in den neu synthetisierten Strang eingebaut wird, ist statistisch verteilt, wodurch eine Mischung von Fragmenten aller möglichen Größen entsteht. Ein Fragment unterscheidet sich von dem Fragment nächster Größe immer um eine Base. Da alle

Fragmente am 3'-Ende mit einem basen-spezifischen Fluoreszenz-Farbstoff markiert sind, lässt sich nach elektrophoretischer Auftrennung die Sequenz der Template-DNA ableiten.

Die Sequenzier-PCR findet in einem konventionellen Thermocycler statt und die elektrophoretische Auftrennung in einem Kapillarelektrophorese-Gerät (ABI 3730, Applied Biosystems).

Im Unterschied zur herkömmlichen, horizontalen- oder vertikalen Gel-Elektrophorese, befindet sich das Auftrennungs-Gel in einer Kapillare.

Die Kapillare taucht mit einem Ende in die zu analysierende Sequenzier-Reaktion. An dieser Lösung liegt eine Kathode an. Das andere Ende der Kapillare befindet sich in einem Puffer, in dem sich die Anode befindet. Sobald an die Elektroden Spannung angelegt wird, werden durch das Ladungsgefälle innerhalb des Auftrennungs-Gels die negativ geladenen DNA-Fragmente durch die Kapillare in Richtung Anode gezogen. Die Fragmente verlassen nacheinander das Anoden-Ende der Kapillare in Abhängigkeit von ihrer Größe. Je kleiner das Fragment, desto eher erreicht es das Anoden-Ende. An diesem Ende befindet sich ein Fluoreszenz-Detektor, der die vier verschiedenen, an die Fragmente gekoppelten Fluoreszenz-Farbstoffe detektieren kann. Die Folge an Fluoreszenz-Farbstoffen gibt direkt die Sequenz der analysierten Template-DNA wieder. Die Aufzeichnungen des Detektors werden gespeichert und in einem so genannten Elektropherogramm (Abb. 36) dargestellt.

2.3.14.1 Sequenzierungs-PCR

Für die Sequenzierungs-PCR der klonierten RACE-Produkte wurde das BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit verwendet.

2.3.14.1.1 Material

2.5 x Ready Reaction Premix (Kit)

BigDye Sequencing Buffer (Kit)

M13 fwd/rev 1 μ M (siehe Anhang 7.1)

EDTA 125mM

70%, 100% Ethanol

H₂O (mindestens „chromatography grade“)

Thermo-Fast 96 Detection Plate (Applied Biosystems)

2.3.14.1.2 Durchführung

In eine Reaktion wurden 200 ng Template-Plasmid-DNA eingesetzt. Die Reaktionen wurden in einer 96er Mikrotiter-Platte auf Eis zusammen pipettiert. Jede Reaktion wurde zweimal angesetzt, einmal mit M13-fwd und einmal mit M13-rev-Primer. Da das Kapillar-Elektrophoresegerät Fragmente bis zu einer Länge von maximal 800 bp auslesen kann, läßt sich durch Kombination der vor- und rückwärtigen Amplifikation mit den M13-Primern diese Länge auf etwa 1600 bp erweitern.

Die Reaktionen wurden nach folgendem Pipettierschema pipettiert:

Reagenz	Konzentration	Volumen
Ready Reaction Premix	2,5 x	4 µl
BigDye Sequencing Buffer	5 x	2 µl
Primer	1 µM	3,2 µl
Template DNA	x ng / µl	$V = 200 \text{ ng} / (x \text{ ng} / \mu\text{l})$
Wasser		auf 20 µl auffüllen
End-Volumen	1 x	20 µl

Die Platte wurde mit einer sterilen Silikon-Matte abgedeckt und in den Thermocycler (9700, Applied Bioystems) gestellt. Für die PCR wurde folgendes Programm verwendet:

Tab. 6: PCR-Programm Sequenzier-PCR

Schritt 1	96°C für 1 min
Schritt 2	96°C für 10 s
Schritt 3	50°C für 5 s
Schritt 4	60°C für 4 min
Schritt 5	Gehe zu 2 für weitere 24 Zyklen
Schritt 6	4 °C ∞

Danach wurde die Platte zur kurzfristigen Aufbewahrung in Alu-Folie gewickelt und in den Kühlschrank gestellt. Zur längeren Aufbewahrung (maximal eine Woche) konnte die Platte bei -20 °C eingefroren werden.

2.3.14.2 Aufreinigung der DNA-Fragmente

Für die Fragmentanalyse mussten die DNA-Amplifikate aufgereinigt werden. Dafür wurde der Ansatz einer EDTA/Ethanol-Fällung nach folgendem Ablauf unterzogen:

Mit einer Mehrkanalpipette (Matrix Inc.) wurden 5 µl EDTA in jedes Well pipettiert und mit der PCR-Reaktion gemischt. Danach wurden 60 µl 100 %-Ethanol zum Ansatz pipettiert, die Platte mit der Silikon-Matte abgedichtet und viermal invertiert. Danach wurde die Platte im Dunklen bei RT für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation der Platte in der Platten-Zentrifuge bei 3000 x g für 30 min präzipitiert. Danach wurde der Überstand auf ein Papiertuch geklopft, 60 µl 70 %-Ethanol in die Kavitäten pipettiert und die Platte für 15 min bei 1650 x g zentrifugiert. Um den Überstand vollständig aus den Kavitäten zu entfernen wurde die Platte kopf-über auf einem Papiertuch für 10 s bei 200 x g trocken zentrifugiert.

Die nun trockenen DNA-Präzipitate wurden in 30 µl Wasser gelöst. Da das Kapillar-Elektrophorese-Gerät nur komplette Platten analysieren kann, muss sich in jeder Ka-

vität 30 ml Wasser befinden. Damit die Kapillaren keine Luft ansaugten, wurden Luftbläschen durch kurze Zentrifugation der Platten entfernt.

2.3.14.3 Kapillarelektrophorese mit ABI 3730

Für die Fragment-Analyse der Amplifikate aus der Sequenzier-PCR stand im Rahmen dieser Arbeit ein ABI 3730 „Sequencer“ des GSF-GAC (Genom Analyse Zentrum) zur Verfügung. Das Gerät wurde vom entsprechenden Service-Personal bedient. Der „Sequencer“ verfügt über 48 Kapillaren, wodurch die Analyse einer kompletten Platte unter Benutzung des „Rapid Sequencing“-Protokolls (ca. 30 min) etwa eine Stunde benötigte.

2.3.15 Real Time RT-PCR zur Bestimmung der relativen mRNA-Expression

2.3.15.1 Prinzip der Taqman Realtime RT-PCR

Die Real Time RT-PCR dient der Messung der relativen mRNA-Kopienzahl von Genen in Geweben und Zelllinien. Dabei handelt es sich um ein PCR-Verfahren, das sich von der herkömmlichen PCR im Wesentlichen dadurch unterscheidet, dass die Menge an gebildetem Amplifikat entweder während, oder am Ende eines jeden PCR-Zyklus gemessen wird.

Für die Bestimmung der Menge an Amplifikat gibt es verschiedene Ansätze, wobei sich die Messung über Fluoreszenz durchgesetzt hat.

In der vorliegenden Arbeit wurde das kommerzielle Taqman[®] (Applied Biosystems) - System verwendet. Bei diesem System wird mit so genannten „Double-Dye-Oligo“-Sonden gearbeitet. Dabei handelt es sich um kurze DNA-Sonden, welche auf einer Seite ein Reporter-Fluorophor, und auf der anderen ein „Quencher“-Fluorophor besitzen (Abb. 16). Dabei wird der so genannte „Förster Resonance Energy Transfer“ (FRET), ausgenutzt, bei dem das Reporter-Fluorophor als Donor wirkt, und einen Teil seiner Fluoreszenz-Energie an den „Quencher“, abgibt, der als Akzeptor der abgegebenen Energie dient. Solange sich Reporter und „Quencher“ in räumlicher Nähe befinden, ist somit keine Fluoreszenz messbar. Die Sonde bindet zwischen den Bindungsstellen der beiden Primer, die sich in zwei verschiedenen Exons des zu untersuchenden Gens befinden. Bei Verlängerung des Primers durch die Taq-Polymerase, kommt es durch ihre Exonuklease-Aktivität zum Abbau der Sonde. Dabei werden „Quencher“ und Reporter abgespalten, wodurch sie sich räumlich voneinander entfernen. Der FRET-Effekt nimmt ab und die Reporter-Fluoreszenz wird meßbar.

Zur internen Normalisierung befindet sich in den PCR-Reaktionen immer die gleiche Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes ROX (Passive Referenz, siehe Tab 1). Die Reaktionen wurden in einem ABI7300 Real Time-Thermocycler (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Steuerung des Gerätes und Quantifizierung der Experimente wurde mit der Software SDS (Applied Biosystems) durchgeführt.

Abb. 16: Schematische Darstellung des Prinzips von Taqman[®]-Sonden

Die „Double-Dye-Oligo“-Sonde bindet auf einer Sequenz zwischen den Primer-Bindungsstellen. Der Forward-Primer wird verlängert, die Taq-Polymerase spaltet die Sonde, wodurch Reporter und „Quencher“ frei werden und Fluoreszenz vom Reporter gemessen werden kann.

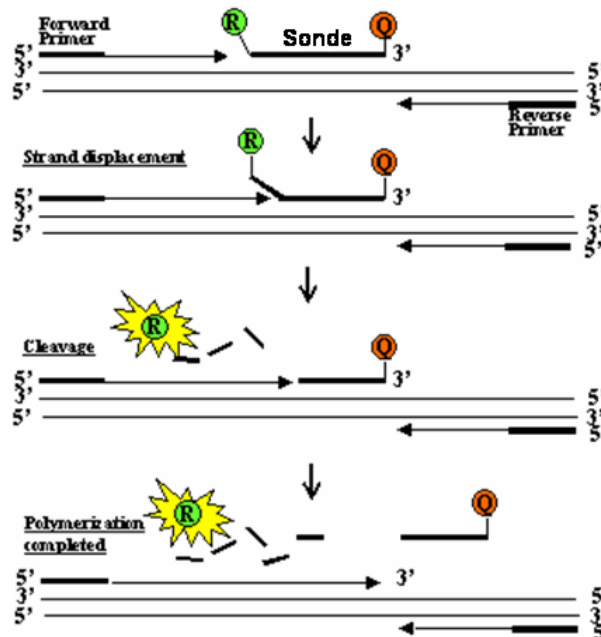
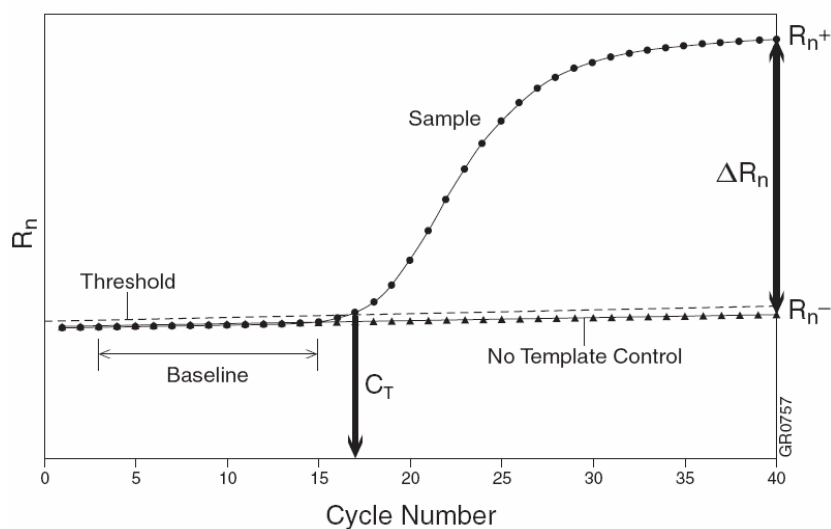


Abb. 17: Typische RT-PCR Kurve (Applied Biosystems)



Tab. 7: Häufige Termini, die bei der Realtime RT-PCR Analyse auftauchen

Begriff	Definition
Baseline	Bezeichnet die initialen Zyklen, bei denen sich nur sehr wenig am Fluoreszenz-Signal ändert.
Threshold	Grenzwert innerhalb ΔR_n , der entweder automatisch von der SDS-Software, oder manuell gesetzt wird. Der Wert sollte so gewählt sein, dass er über der „Baseline“ und innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase der Kurve liegt.
Threshold cycle (C_T)	Die ganzzahlige Zyklusanzahl bei der das Fluoreszenz-Signal den „Threshold“ übersteigt.
Passive Referenz	Ein Fluoreszenz-Farbstoff, über dessen Signal das Reporter-Signal in der Daten-Analyse normalisiert werden kann.
Reporter dye	Reporter-Farbstoff, der an das 5'-Ende von Taqman [®] -Sonden gebunden ist.
Normalized reporter (R_n)	Der Quotient aus Emissions-Fluoreszenz-Signal des Reporters und der Passiven Referenz.
Delta R_n (ΔR_n)	Gibt die Höhe des Signalbereichs wieder ($\Delta R_n = R_n - \text{Baseline}$); siehe Abb. 17

2.3.15.1.1 Material

Taqman[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) 2 x

Wasser (Gibco)

Für fertige Assays:

Taqman Assays (“Assay on Demand”, „_m1“ = exon-übergreifend; Applied Biosystems)

Pipettierschema für 10 x Ret-Gen spezifische Assays aus Einzel-Komponenten:

Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems)

Thermo-Fast 96 Detection Plate (Applied Biosystems)

2.3.15.1.2 Durchführung

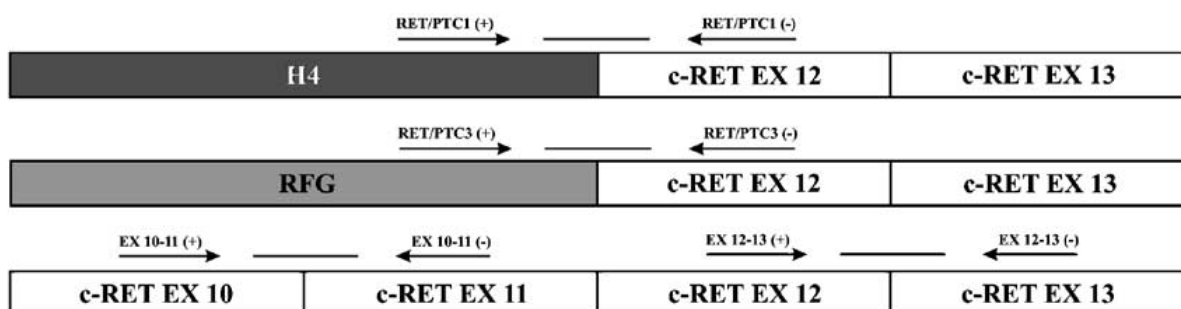
Bei Realtime RT-PCR Experimenten ist es sehr wichtig, dass alle Pipettier-Schritte so exakt wie möglich ausgeführt werden. Kleinste Pipettier-Fehler oder Unregelmäßigkeiten wirken sich ungünstig auf die Quantifizierung aus.

Alle Reaktionen werden in 96er Mikrotiter-PCR-Platten durchgeführt. Jede Reaktion wurde für eine exaktere Quantifizierung in Duplikaten oder Triplikaten angesetzt. Dafür wurden für alle Reaktionen Master-Mixe hergestellt, die in den 96er Mikrotiter-Platten auf Eis vorgelegt wurden. Danach wurde die Template-cDNA dazu pipettiert. Die Platten wurden mit sogenannten „Optical Adhesive Cover“-Folien, welche glasklar sind und die Messung des Fluoreszenz-Signals nicht behindern, versiegelt, geschüttelt und kurz bei 200 x g zentrifugiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zum einen so genannte fertige „Assay on Demand“ (AoD)-Sonden, die fertig zu Mastermix und Template gegeben werden können, als auch Einzel-Komponenten-Sonden verwendet. AoD und Einzel-Komponenten-Assays unterscheiden sich im Pipettier-Schema.

2.3.15.2 c-Ret-Gen spezifische Assays aus Einzel-Komponenten

Abb. 18: Position der Primer und Sonden relativ zu Ret/PTC1, Ret/PTC3 und c-Ret (Rhoden et al., 2004)



Tab. 8: Primer- und Sonden-Sequenzen, optimierte Konzentrationen und Amplifikat-Größen für Ret/PTC1, Ret/PTC3 und c-Ret (Rhoden, et al., 2004)

Gen	Größe des Amplifikats	Vorwärts-Primer 5' → 3'	Konzentration	Rückwärts-Primer 5' → 3'	Konzentration	Sonden-Sequenz 5' → 3'	Konzentration
Ret/PTC1	66 bp	CGCGACCTGCGC AAA	250 nM	CAAGTTCTTCCG AGGGAATTCC	250 nM	6FAM- CAAGCGTAA CCATCGAGGATC CAAAGT-TAMRA	100 nM
Ret/PTC3	81 bp	CCCCAGGACTGG CTTACCC	200 nM	CAAGTTCTTCCG AGGGAATTCC	200 nM	6FAM- AAAGCAGAC CTTGGAGAACAG TCAGGAGG- TAMRA	50 nM
c-Ret Exons 10- 11	62 bp	TGCTTCTGCGAG CCCG	200 nM	ATCACCGTGCGG CACAG	200 nM	6FAM- CATCCAGGA TCCACTGTGCGA CGA-TAMRA	100 nM
c-Ret Exons 12- 13	64 bp	CGGTGGCCGTGA AGATG	200 nM	TCTGACAGCAGG TCTCGAAGC	200 nM	6FAM- TGAAAGAGA ACGCCTCCCCGA GTG-TAMRA	100 nM
β-Actin	115 bp	AGCCTCGCCTTT GCCGA	250 nM	CTGGTGCCTGGG GCG	250 nM	VIC-CCGGCTTCG CGGGCGAC- TAMRA	100 nM

VIC/FAM = Carboxyfluorescein (Reporter) ; TAMRA = 5-carboxytetramethylrhodamine (Quencher)

Tab. 9: Pipettierschema für RT-PCR mit Einzel-Komponenten-Sonden

Ret/PTC1 / β -Actin	
	Volumen [μ l]
Vorwärts- /Rückwärts-Primer	je 0,125
Sonde	0,05
2 x Taqman Universal PCR Mastermix	12,5
Wasser	9,7
Template	2,5

Ret/PTC3	
	Volumen [μ l]
Vorwärts- /Rückwärts-Primer	je 0,1
Sonde	0,025
2 x Taqman Universal PCR Mastermix	12,5
Wasser	9,775
Template	2,5

c-Retex 10-11 / c-Retex 12-13	
	Volumen [μ l]
Vorwärts- /Rückwärts-Primer	je 0,1
Sonde	0,05
2 x Taqman Universal PCR Mastermix	12,5
Wasser	9,75
Template	2,5

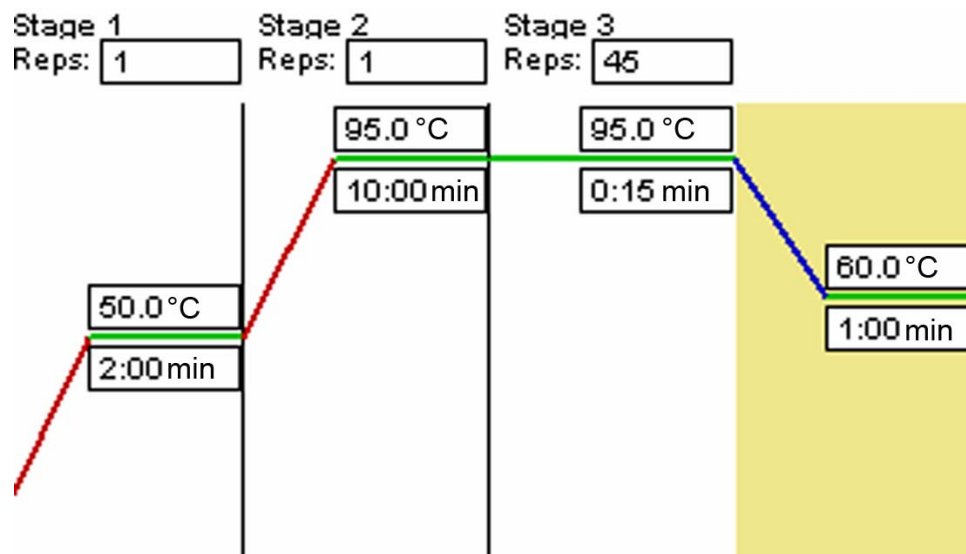
Fortsetzung Tab.3

Komponente	Volumen [μ l]
2 x Taqman Universal PCR Mastermix	12,5
20 x Assay on Demand – Mix	1,25
Wasser	8,25
Template cDNA	2,5

Nachdem die Komponenten zusammen pipettiert wurden, wurde die 96er Mikrotiter-Platte mit der "Optical Adhesive Cover"-Folie möglichst Blasen- und Falten-frei abgedichtet und in die PCR-Reaktion eingesetzt.

Der Thermocycler wurde über die Software SDS (Applied Biosystems) gesteuert. Des Weiteren erlaubte die Software die Generierung des Platten-Designs. Pro Assay mussten zusätzlich zu den Proben Leerproben und so genannte „Genomic Controls“ (GC) aufgetragen werden. Dabei wurde als Template-DNA genomische DNA verwendet. Da die Assays Exon-übergreifende Primer-Bindungsstellen haben, sollten die GC kein Amplifikat zeigen. Die Laufparameter sind in Abb. 19 aufgeführt.

Abb. 19: Schematische Darstellung der Laufparameter, die verwendet wurden



„Stage 1“: Aktivierungsschritt für das Enzym UNG (Uracil-N-Glykosylase), zur Entfernung von Deoxyuridin (das Enzym ist im Mastermix nicht enthalten). „Stage 2“: Aktivierungsschritt für die Hotstart-Taq-Polymerase. „Stage 3“: Denaturierung der DNA. „Stage 4“: Annealing- und Elongations-Schritt.

Die Messung der Fluoreszenzintensitäten fand in „Stage 3“, also während der Denaturierungs-Phase statt.

2.3.15.3 Relative Quantifizierung der RT-PCR-Ergebnisse mit Hilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode

Es gibt mehrere Möglichkeiten der Auswertung eines RT-PCR Experiments. Da für die realtime RT-PCR nur Sonden verwendet wurden, die eine Effizienz von über 90 % zeigten, konnte die so genannte $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001) verwendet werden. Die Effizienz ist ein Maß für die inter-experimentelle Reproduzierbarkeit in einem Experiment und wird in der Regel über die quadratische Regression einer Eichkurve wiedergegeben. Die Bestimmung der Effizienz war für die kommerziellen Taqman-Sonden nicht nötig, weil bei diesen eine Effizienz von über 90 % garantiert ist. Für die Sonden, die aus Einzelkomponenten zusammen pipettiert wurden, wurden Eichkurven angelegt, wobei bestätigt werden konnte, dass auch hier die Effizienz über 90 % liegt.

Bei der $\Delta\Delta C_T$ -Methode wird im Gegensatz zur relativen Quantifizierung über Eichkurven die relative Expression eines Zielgens in einer Zelllinie gegenüber dessen Expression in einer Referenz-Zelllinie gemessen, wobei die jeweiligen C_T -Werte, die die Höhe der Expression wiedergeben durch interne Kontrollen (Referenzgen β -Aktin) normalisiert werden.

Dafür werden im ersten Schritt die Duplikate oder Triplikate der C_T -Werte des Ziel- und des Referenz-Gens eines Kalibrators und der Probe gemittelt. Dabei ist es wichtig dass die Werte nicht um mehr als 5 Hunderstel voneinander abweichen. Bei höheren Abweichungen muss das Experiment wiederholt werden. Dann wird der sogenannte ΔC_T -Wert für die Probe und die Referenz berechnet:

$$\Delta C_T(\text{Probe}) = C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{Referenz-Gen})$$

$$\Delta C_T(\text{Kalibrator}) = C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{Referenz-Gen})$$

Aus diesen Werten wird durch Subtraktion der so genannte $\Delta\Delta C_T$ -Wert gebildet:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{Probe}) - \Delta C_T(\text{Kalibrator})$$

Wenn man diesen Wert in die Gleichung $R_E = 2^{-\Delta\Delta C_T}$ einsetzt, bekommt man direkt den Ausdruck der relativen Expression des Zielgens in der Probe relativ zu dessen Expression im Kalibrator.

Da die zu untersuchenden Genveränderungen in den Zelllinien B42-11 und B42-16 immer im Vergleich zur Ausgangs-Zelllinie betrachtet wurden, wurde als Kalibrator die Ausgangszelllinie B42-htLG und als interne Referenz eine Taqman-Sonde für β -Aktin eingesetzt.

2.3.15.4 *Semiquantitative Expression*

Bei einigen Taqman-Sonden war die Bestimmung der Expression von Genen relativ zu deren Expression in der Ausgangszelllinie nicht möglich, weil das entsprechende Gen in der Ausgangszelllinie nicht exprimiert wurde. In diesem Fall wurden die normalisierten C_T -Werte ($C_T(\text{Zielgen}) / C_T(\beta\text{-Aktin})$) gegenübergestellt. Dadurch war nur noch eine semiquantitative Aussage (positiv/negativ) möglich.

2.3.16 Immunhistochemische Bestimmung der relativen Protein-Expression von Kandidatengen

Eine Möglichkeit zur Untersuchung der Protein-Expression in Geweben und Zellen ist die Immunhistochemie. Bei dieser Technik werden Antikörper eingesetzt, die spezifisch an kleine Bereiche (Epitope) eines Proteins binden. Für die Detektion der Antikörper gibt es mehrere Möglichkeiten. In dieser Arbeit wurde die sog. Avidin-Biotin-Komplex-(ABC)-Peroxidase-Technik (Hsu et al., 1981) angewandt. Diese Technik arbeitet in drei aufeinander folgenden Schritten – der Bindung des Epitops mit einem Primärantikörper, welcher wiederum von einem Biotin-gekoppelten sekundären Antikörper unter Bildung eines Avidin-Biotin-Peroxidase Komplexes gebunden wird. Der unmarkierte Primär-Antikörper bindet spezifisch an ein Epitop des Ziel-Proteins. Der biotinylierte sekundäre Antikörper, der gegen die Herkunft-Spezies des Primärantikörpers gerichtet ist, bindet an den Primärantikörper. Als Adapter-Molekül wird das ursprünglich aus dem Dotter von Hühnereiern gewonnene Protein Avidin eingesetzt. Ein Avidin-Molekül besitzt vier Bindungsstellen für Biotin. Dadurch kann das Protein drei Moleküle biotinylierte Meerrettich-Peroxidase H binden. Diesen Komplex aus Primär- und Sekundär-Antikörper, Avidin und biotinylierter Peroxidase bezeichnet man als ABC-Komplex. Um im Präparat die ABC-Komplexe lokalisieren zu können wird noch ein sog. Chromogen in die Reaktion eingesetzt, welches nach Oxidation durch die Peroxidase eine bestimmte Farbe annimmt. In dieser Arbeit wurde das Chromogen Diaminobenzidin (DAB) verwendet, welches sich braun färbt (Abb. 40).

2.3.16.1 *Material*

ABC-Kit (Vector Laboratories)

Lösung A (Bestandteil des Kits)

Lösung B (Bestandteil des Kits)

Ethanol absolut p.a. (Merck)

96% Ethanol

70% Ethanol

Nuklease-freies Wasser

Natriumthiocyanat, 1 M

Natriumthiocyanat (Sigma-Aldrich) 40,53 g

Ad 500 ml $H_2O_{\text{bidest.}}$, ak

PBS

Citratpuffer 10 mM

Stammlösung A:

Citronensäure 0,1 M (Merck) 19,2 g

ad 1 l mit $H_2O_{\text{bidest.}}$

Stammlösung B:

Natriumcitratdihydrat 0,1 M (Sigma) 29,4g

ad 1 l mit $H_2O_{\text{bidest.}}$

18 ml Stammlösung A mit 82 ml Stammlösung B mischen

ad 500 ml mit $H_2O_{\text{bidest.}}$

pH 6,0 mit 1 N NaOH

Xylol (Merck)

Wasserstoffperoxidlösung (0,5 %)

180 ml Methanol (Sigma-Aldrich) mit 30 % H_2O_2 (Merck) mischen.

TBS-Puffer

0,2M Tris 50ml

5M NaCl 30ml

Nuklease-freies Wasser add 1000 ml

Auf pH 7,5 einstellen.

Antikörper-Diluent (Serotec)

Primäre Antikörper:

Has2-Antikörper polyklonal, Antikörper aus Kaninchen – wurde freundlicherweise von Frau Paraskevi Heldin, Uppsala, Schweden bereitgestellt.

Grid1-Antikörper, polyklonal, aus Maus, (H00002894-M01, Abnova)

Sekundärer Antikörper:

Biotin-konjugierter- α -Maus (Rockland)

Biotin-konjugierter- α -Kaninchen (Rockland)

Diaminobenzidin (DAB, Neolab)

Eukit (Kindler)

2.3.16.2 Durchführung

Die Schnitte wurden vor der Entparaffinierung für 20 min bei 70 °C gebacken und danach für 10 min in eine Küvette mit Xylol gestellt. Danach wurden die Schnitte für jeweils 2 min in 100 %- und 96 %-Ethanol gegeben und getrocknet. Zur Entfärbung von Erythrozyten in den Gewebeschnitten wurden die Objektträger für 20 min in Wasserstoffperoxid (0,5 %) gegeben. Danach wurden die Schnitte in einer absteigenden Ethanolreihe (100 %-, 96 %-, 70 %-Ethanol) für 2 min pro Küvette rehydriert. Für eine bessere Zugänglichkeit zu den Antigenen wurden diese durch eine Citratpuffer-Behandlung demaskiert. Dafür wurden die Schnitte in Citratpuffer für 30 min in einem Mikrowellen-Schnellkochtopf geköchelt und anschließend in TBS-Puffer gestellt.

Um unspezifische Bindungsstellen abzublocken, wurde auf die Objektträger 100 μ l Ziegenserum pipettiert und der Ansatz für 20 min in der feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden 100 μ l an primären Antikörper auf die Schnitte aufgetragen und über Nacht in der feuchten Kammer bei RT inkubiert. Danach wurden pro Schnitt 100 μ l Sekundär-Antikörper aufgetragen und der Ansatz für 20 min bei RT in der feuchten Kammer inkubiert. Die verwendeten Antikörper wurden in der Maus, bzw. Kaninchen hergestellt und wurden mit gegen Maus bzw. Kaninchen-gerichteten Sekundär-Antikörpern aus der Ziege im ersten Schritt gebunden. Während dieser Inkubations-

zeit wurden die Reagentien zur Bildung des ABC-Komplexes vorbereitet. Dafür wurden jeweils 2 µl von Lösung A und 2 µl von Lösung B mit 200 µl TBS-Puffer gemischt. Von der fertigen Lösung wurden nach kurzem Spülen des Objektträgers mit TBS-Puffer 100 µl aufgetragen und der Ansatz für 30 min bei RT in der feuchten Kammer inkubiert.

Zur Detektion der Antikörper wurden eine „goldene“ und eine „silberne“ DAB-Tablette durch starkes Schütteln in 1000 µl Wasser gelöst. Nach kurzem Spülen in TBS-Puffer wurden 100 µl der DAB-Lösung auf den Objektträger aufgetragen und für 6 min inkubiert. Während dieser Zeit sollte sich auf dem Objektträger Braunfärbung einstellen. Anschließend wurde der Objektträger kurz unter fließendem Leitungswasser und kurz in einer Küvette mit destilliertem Wasser gespült. Für die Zellkern-Gegenfärbung wurde das Präparat für eine Minute in Hämalaun-Lösung gestellt und danach überschüssige Lösung in der Küvette unter fließendem Wasser abgespült.

Zur Dehydrierung wurde der Objektträger für jeweils 2 min in 70 %-, 96 %- und 100 %-Ethanol gestellt. Der Alkohol wurde in einer Küvette mit Xylol abgewaschen und das Präparat unter einem 24 x 50 mm Deckglas mit Eukit eingedeckt.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse aus den molekularzytogenetischen Analysen

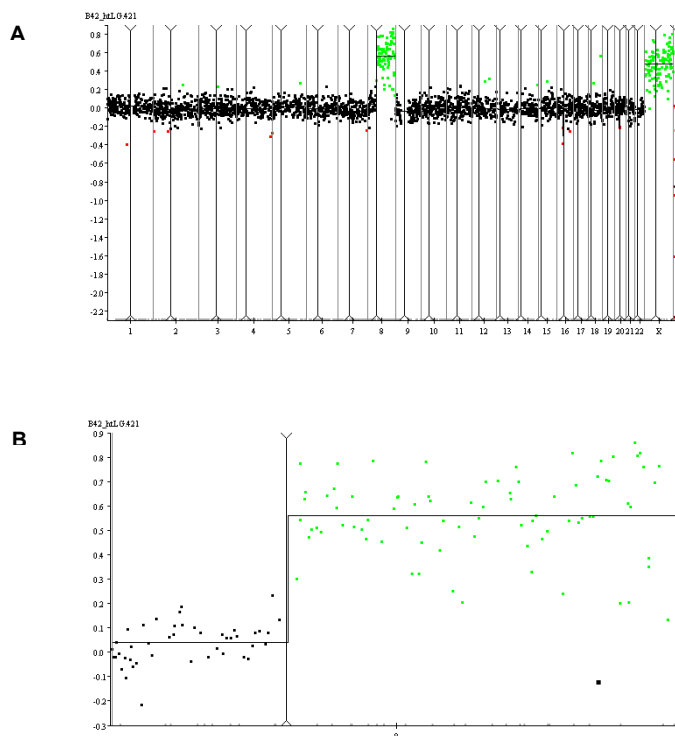
3.1.1 Array-basierte vergleichende genomische Hybridisierung (Array-CGH)

Die Zelllinien B42-htLG, B42-11 und B42-16 wurden mit Hilfe von Array-CGH hinsichtlich genomischer Kopienzahlveränderungen mit einer Auflösung von 1Mb untersucht. Die Veränderungen in den drei Zelllinien sind in Tab. 10 zusammengefaßt.

3.1.1.1 Genomische Kopienzahlveränderungen der Zelllinie B42-htLG

Das Array-CGH-Profil (Abb. 20A) der immortalisierten, nicht strahlentransformierten Zelllinie B42-htLG zeigt mit Ausnahme einer Amplifikation von Chromosom 8q (Abb. 20B) keine weitere Veränderungen auf. Die Amplifikation spiegelt das zusätzliche Isochromosom 8q der Zelllinie B42-htLG wider, welches bereits in der SKY-Analyse (Ergebnisse aus Vorarbeiten) identifiziert werden konnte.

Abb. 20: Array-CGH Profile der Zelllinie B42-htLG



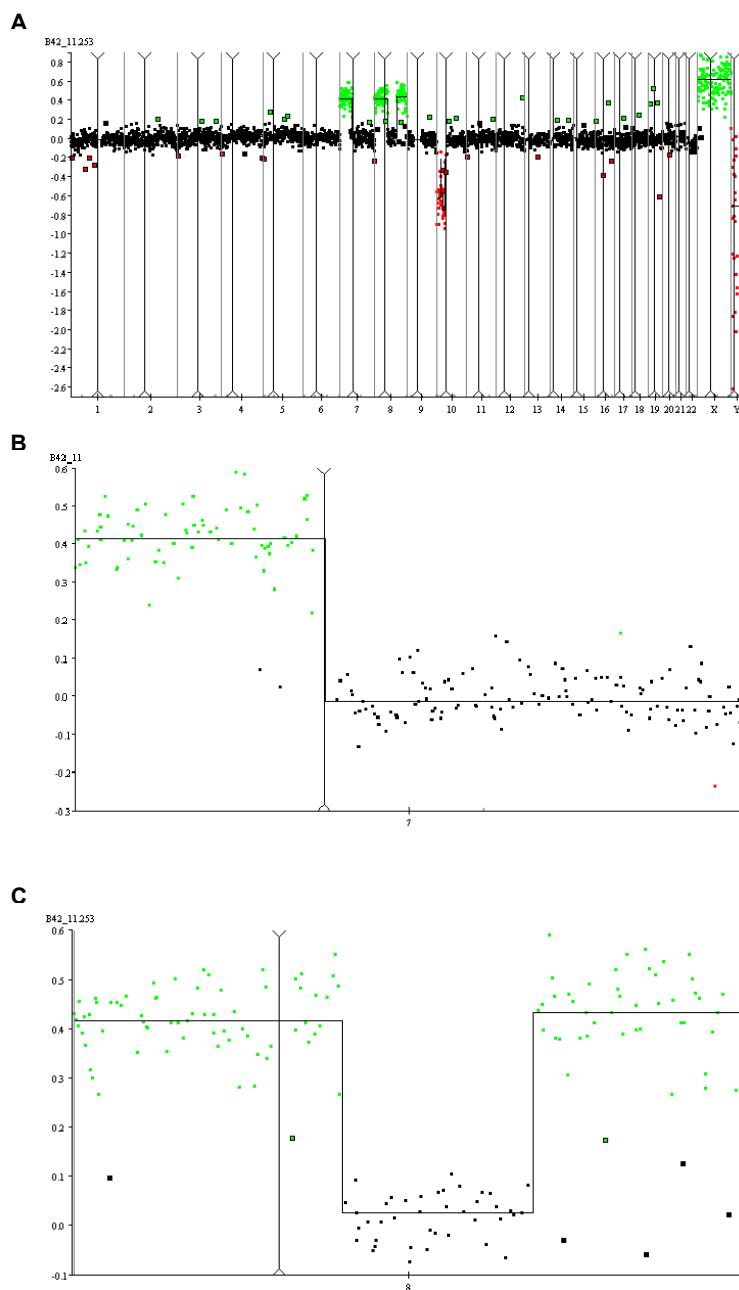
Das Gesamt-genomische Profil (A) gibt auf der X-Achse die Chromosomennummer (1-23, X, Y) und die physikalische Position eines jeden BAC-Klons wieder. Auf der Y-Achse sind die logarithmischen Werte der Intensitäts-Quotienten aus Cy3- und Cy5-Intensität pro BAC-Klon aufgetragen. Der untere Abschnitt (B) zeigt den Ausschnitt für Chromosom 8. BAC-Klone, die keinen veränderten Bereich repräsentieren, sind durch schwarze Punkte gekennzeichnet, BAC-Klone von amplifizierten Bereichen sind durch grüne und solche von deletierten Bereichen durch rote Punkte gekennzeichnet. Die schwarze Linie ist die so genannte „Smoothing-Line“, deren Höhe dem Mittelwert der Werte des ihm zugehörigen Segmentes entspricht. Da die Hybridisierungen immer „sex-mismatched“ (weibliche Test-DNA gegen männliche Referenz-DNA und umgekehrt) durchgeführt wurde, erscheint hier (weibliche Test-DNA) das X-Chromosom im Profil als amplifiziert (grün) und das Y-Chromosom als deletiert (rot).

3.1.1.2 Genomische Kopienzahlveränderungen der Zelllinie B42-11

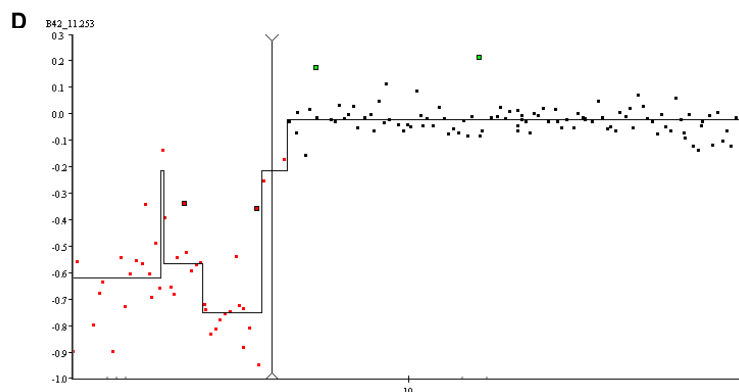
Das Array-CGH-Profil der Zelllinie B42-11 (Abb. 21A) zeigt insgesamt drei amplifizierte und einen deletierten Bereich. Die amplifizierte Region auf Chromosom 7 (7pter bis 7cen, Abb. 21B) umfasst 63,1 Mb. Von den zwei Amplifikationen auf Chromosom 8 befindet sich eine auf dem p- und die andere auf dem q-Arm des Chromosoms (Abb. 21C). Der Verlust des p-Arms auf Chromosom 10 (Abb. 21D) steht im Zusammenhang mit der bereits in der SKY-Analyse nachgewiesenen Translokation t(7;10),

bei der ein zusätzlicher p-Arm von Chromosom 7 mit Chromosom 10, dessen p-Arm verloren gegangen ist, fusioniert wurde.

Abb. 21: Array-CGH Profile der Zelllinie B42-11



Fortsetzung Abb. 21

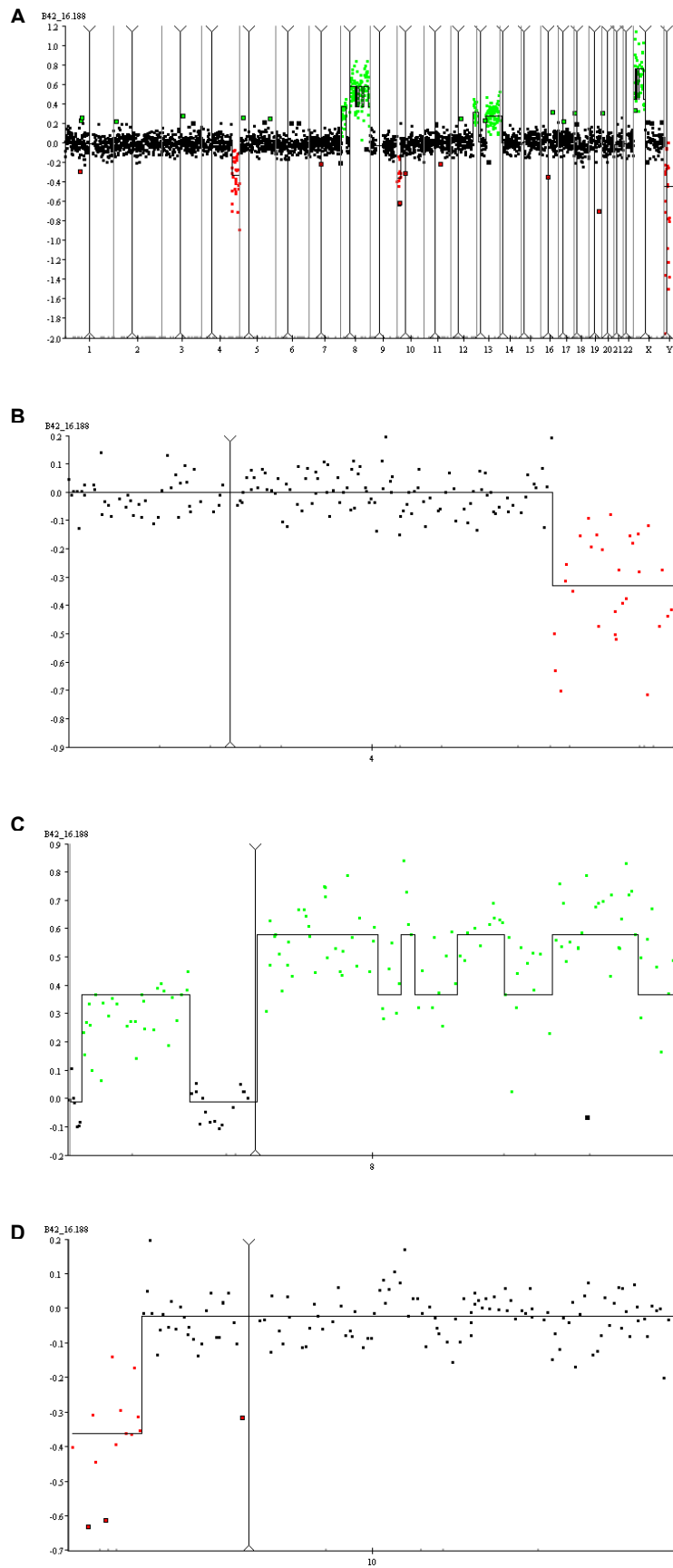


Das Gesamt-genomische Profil (A) gibt auf der X-Achse die Chromosomnummer (1-23, X, Y) und die physikalische Position eines jeden BAC-Klons wieder. Auf der Y-Achse sind die logarithmischen Werte der Intensitäts-Quotienten aus Cy3- und Cy5-Intensität pro BAC-Klon aufgetragen. B, C, D: Profil-Ausschnitte für Chromosom 7, 8 und 10. BAC-Klone, die keinen veränderten Bereich repräsentieren, sind durch schwarze Punkte gekennzeichnet, BAC-Klone von amplifizierten Bereichen sind durch grüne und solche von deletierten Bereichen durch rote Punkte gekennzeichnet. Die schwarze Linie ist die so genannte „Smoothing-Line“, deren Höhe dem Mittelwert der Werte des ihm zugehörigen Segmentes entspricht.

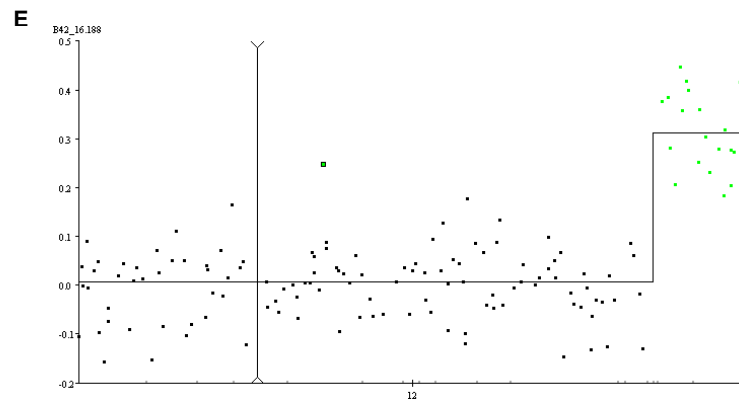
3.1.2 Genomische Kopienzahlveränderungen der Zelllinie B42-16

In der Zelllinie B42-16 zeigten sich in den Array-CGH-Profilen neben der Amplifikation des q-Arm von Chromosom 8, die das zusätzliche Isochromosom 8 widerspiegelt, Amplifikationen auf dem p-Arm von Chromosom 8, dem q-Arm von Chromosom 12 und dem q-Arm von Chromosom 13. Deletierte Bereiche waren auf den Chromosomen 4q, 10p und dem q-Arm von Chromosom X festzustellen.

Abb. 22: Array-CGH Profile der Zelllinie B42-16



Fortsetzung Abb. 22



Das Gesamt-genomische Profil (A) gibt auf der X-Achse die Chromosomnummer (1-23, X, Y) und die physikalische Position eines jeden BAC-Klons wieder. Auf der Y-Achse sind die logarithmischen Werte der Intensitäts-Quotienten aus Cy3- und Cy5-Intensität pro BAC-Klon aufgetragen. B, C, D, E: Profil-Ausschnitte für Chromosom 4, 8, 10 und 12. BAC-Klone, die keinen veränderten Bereich repräsentieren, sind durch schwarze Punkte gekennzeichnet, BAC-Klone von amplifizierten Bereichen sind durch grüne und solche von deletierten Bereichen durch rote Punkte gekennzeichnet. Die schwarze Linie ist die so genannte „Smoothing-Line“, deren Höhe dem Mittelwert der Werte des ihm zugehörigen Segmentes entspricht.

Tab. 10: Zusammenfassung der Ergebnisse der Array-CGH-Analysen in B42-11 und -16

B42-11							
Chromosom	Region Start [clone name]	Region Ende [clone name]	Region Start [bp]	Region Ende [bp]	Region Start [zytogenetische Bande]	Region Ende [zytogenetische Bande]	Größe [Mb]
<i>Amplifikationen</i>							
7	CTB-164D18	RP5-905H7	178219	63235611	7p22.3	7q11.2	63,1
8	RP11-338B22	RP11-513O17	467644	58388511	8p23.3	8q12.1	57,9
8	RP11-10G10	RP5-1056B24	101269091	146167102	8q22.2	8q24.3	44,9
<i>Deletionen</i>							
10	CTC-306F7	RP11-124O11	249607	42829196	10p15	10q11.2	42,6
B42-16							
<i>Amplifikationen</i>							
8	RP11-45M12	RP11-263C6	3889636	29104558	8p23	8p12	25,2
8	RP11-350F16	CTC-489D14	47816618	146028921	8p11.1	8q24.3	98,2
12	RP11-438N16	CTC-221K18	112653797	132282931	12q24.1	12q24.3	19,6
13	RP11-264F20	RP11-245B11	46538919	113940806	13q14	13q34	67,4
<i>Deletionen</i>							
4	RP11-164P12	CTC-963K6	191030215	191076731	4q31.3	4q35.2	38,3
10	CTC-306F7	RP11-37P5	249607	16206799	10p15	10p13	16
X	cen	qter	62268206	154713754	Xcen	Xqter	92,4

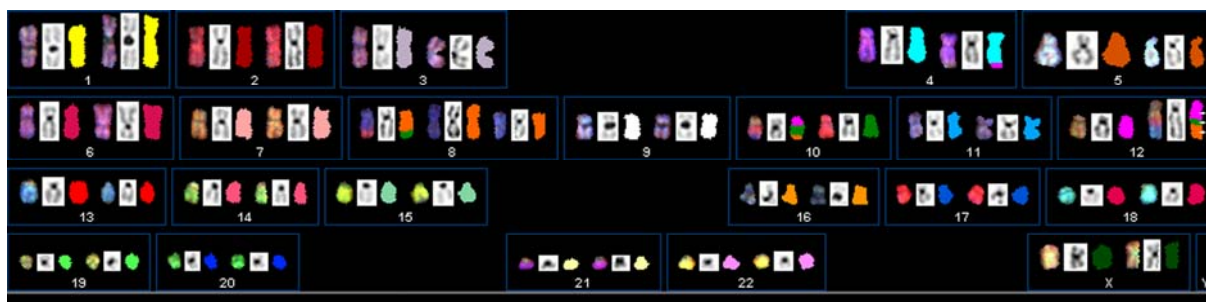
3.1.3 Ergebnisse aus Vorarbeiten

Im Rahmen einer Diplomarbeit „Klonierung chromosomaler Bruchpunkte bei der Strahlenkarzinogenese von Brust- und Schilddrüsenzellen“, die am GSF-Institut für Molekulare Strahlenbiologie, Arbeitsgruppe Zytogenetik, angefertigt wurde, wurden Vorarbeiten zur zytogenetischen Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien geleistet.

Im Folgenden sind Ergebnisse aus dieser Arbeit, auf die in der vorgelegten Doktorarbeit Bezug genommen wurde, dargestellt.

3.1.3.1 Ergebnisse der spektralen Karyotypisierung der Zelllinien B42-11 und B42-16

Abb. 23: SKY-Karyogramm der Zelllinie B42-16



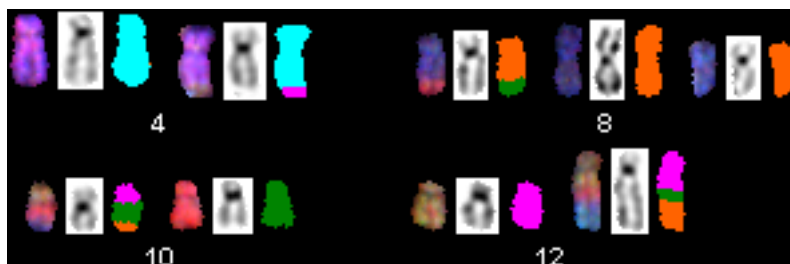
Von links nach rechts ist für jedes Chromosom das spektrale Bild, das G-bänderungs-ähnliche Bild und die Falschfarbe zu sehen; Aufgrund von Farbsprüngen, wie z.B. bei Chromosom 12 (von oben nach unten: lila, grün, orange; Pfeile), lassen sich Markerchromosomen nachweisen, die durch Translokationen entstanden sind;

Abb. 24: Marker der Zelllinie B42-11



Spektrale Karyotypisierung von B42-11 mit Marker M11-11 (zweites Chromosom von rechts).

Abb. 25: Marker der Zelllinie B42-16



Spektrale Karyotypisierung von B42-16 mit Markerchromosomen M16-1 (oben, zweites von links), M16-2 (oben, drittes von rechts), M16-3 (oben, zweites von rechts), M16-4 (unten, erstes von links) und M16-5 (unten, erstes von rechts).

Tab. 11: Überblick über die Karyotypen der 17 SKY-untersuchten B42-Zelllinien

Zelllinie	Karyotyp
B42-11	47,XX,8(i)(q10),t(7;10)(q32;p11.2),del(7)(q32->qter)
B42-16	47,XX,8(i)(q10),der(12)(12pter->q21::10q22->q22::8q22->qter),der(8)(8pter->8q22::10p11.2->pter),del(8)(q24->qter),der(10)(12qter->q21::10p11.2->q22::8q24->qter)

Die Karyotypen sind nach ISCN-Nomenklatur (ISCN 2005) angegeben

3.1.4 Reverse FISH zur Vorcharakterisierung von Durchfluss-sortierten Chromosomen

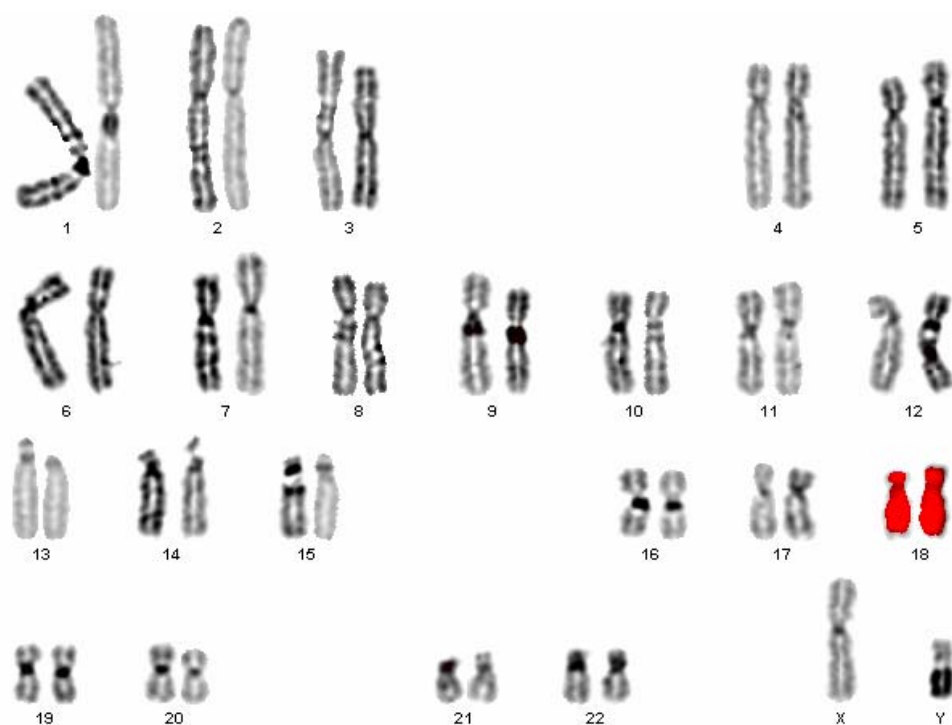
Nachdem es gelungen war alle Markerchromosomen (Tab. 12) aus den Zelllinien B42-11 und B42-16 zu isolieren, wurde die DNA dieser Chromosomen nach Amplifikation und Markierung zunächst auf normale Metaphasen hybridisiert und hinsichtlich ihrer Spezifität getestet. Dabei konnten die Sortierungen identifiziert werden, welche die gesuchten Markerchromosomen enthielten.

3.1.4.1 Ergebnisse der Reversen FISH-Hybridisierung der Sortierungen aus B42-11

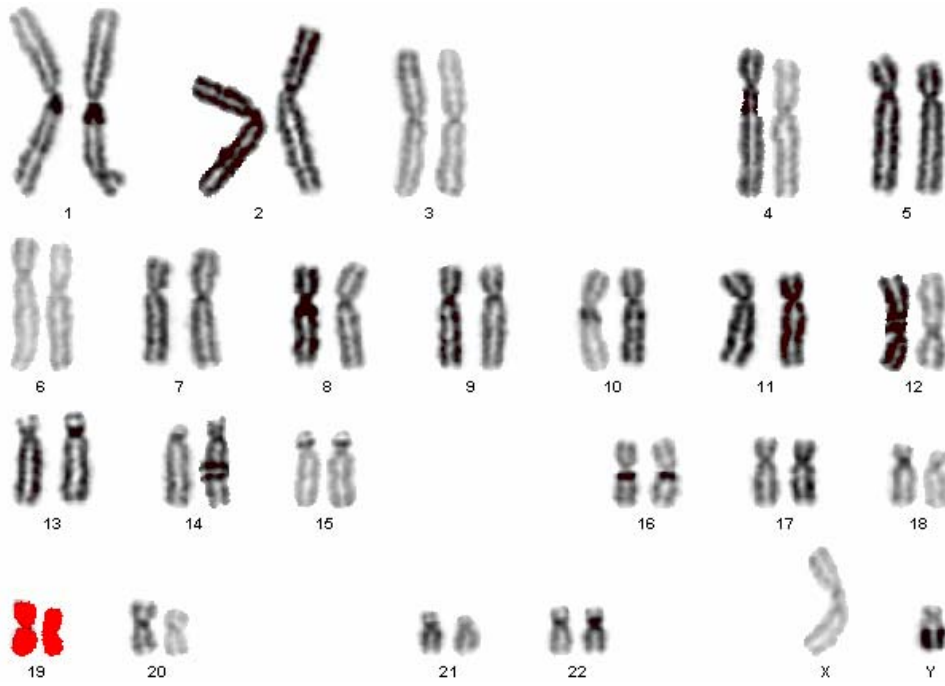
In Abb. 26 sind die reversen FISH-Analysen mit amplifizierter DNA der Durchfluss-Sortierungen FS11-A, FS11-B, FS11-C und FS11-D gezeigt. Alle vier Sortierungen enthielten Chromosomen, deren DNA erfolgreich amplifiziert und markiert werden konnte. Die Sortierungen FS11-A, -B und -C (Abb. 26, A-C) enthielten die normalen Chromosomen 18, 19 und den p-Arm von Chromosom X. In FS11-D waren der kurze Arm von Chromosom 7 und der von Chromosom 10 enthalten (Abb. 26, D). Wie aus den SKY-Daten ersichtlich, entspricht diese Zusammensetzung genau der des Markerchromosoms M11-1. Die Sortierung FS11-D enthielt somit das gesuchte Markerchromosom und konnte in die nachfolgende Array-Painting Analyse eingesetzt werden.

Abb. 26: Reverse FISH-Analyse von Durchfluss-Sortierungen der Zelllinie B42-11

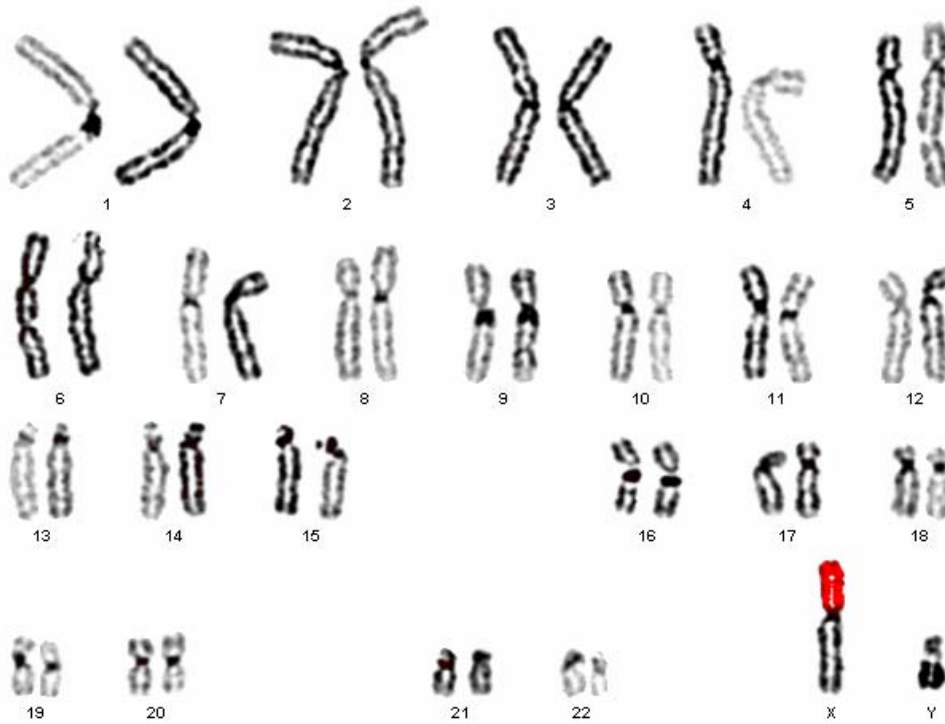
A

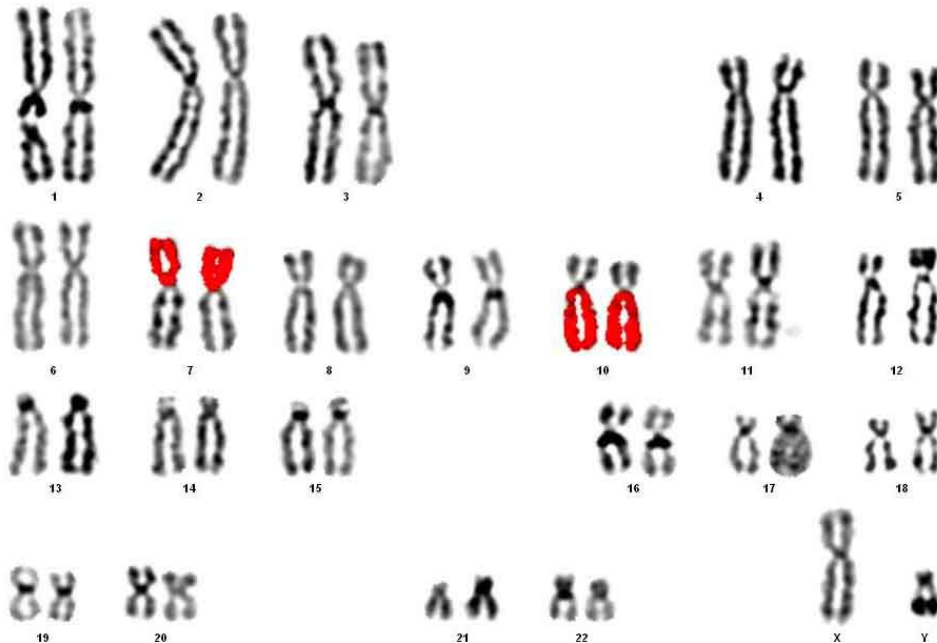


B



C



D

Die Abbildung zeigt die Karyogramme (A bis D) reversen FISH-Analyse der amplifizierten und Cy3-markierten (rot) DNA aus vier Sortierungen aus der Zelllinie B42-11. Die hybridisierten Regionen sind in der Falschfarbe rot wiedergegeben. Abb. 7 zeigt aus welchen Bereichen im Durchfluss-Diagramm die Chromosomen sortiert worden sind. Das in A gezeigte Karyogramm zeigt eine Markierung von Chromosom 18, das in B von Chromosom 19, das in C den p-Arm von Chromosom X und (D) Markierung des p-Arms von Chromosom 7 und des q-Arms von Chromosom 10.

3.1.4.2 Ergebnisse der Reversen FISH-Hybridisierung der Sortierungen aus B42-16

In Sortierung 16-A waren neben dem normalen Chromosom 7, Fragmente von Chromosom 8 und Chromosom 10 enthalten (Abb. 27A). Dieser Zusammensetzung ließ sich der Marker M16-2 (Tab. 12) durch Vergleich mit den SKY-Daten zuordnen.

Bei FS16-B (Abb. 27B) wurden die ganzen Chromosomen 3, 8, 13 und 18 hybridisiert, was darauf schließen ließ, dass sich in dieser Sortierung die normalen Chromosomen 3, 8, 13 und 18 befanden. Des Weiteren konnte eine Hybridisierung von Teilen des p-Arms von Chromosom 10 und des q-Arms von Chromosom 12 detektiert werden. Wie aus der SKY-Analyse (Abb. 23) ersichtlich ist, gibt es in der Zelllinie B42-16 nur das Markerchromosom M16-5, welches Anteile von Chromosom 10p und von 12p und Teilen von 12q enthält. Dieses Markerchromosom enthält der SKY-

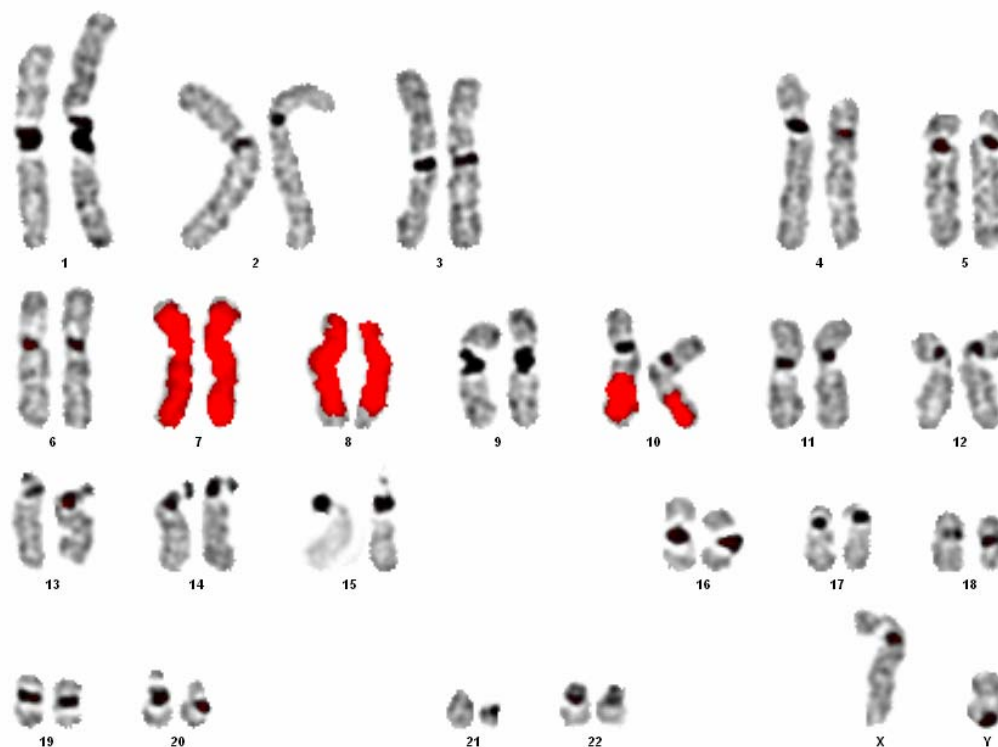
Analyse zufolge auch ein großes Fragment von Chromosom 8. Dies war aus der reversen FISH-Analyse möglicherweise deshalb nicht ersichtlich, weil sich in der Sortierung auch das normale Chromosom 8 befand, und damit die teilweise die Hybridisierung des Fragments maskiert wurde.

Die Durchfluss-Sortierung FS16-C (Abb. 27C) zeigte in der reversen FISH neben dem normalen Chromosom 6 Fragmente der Chromosomen 4 und 12. Diese Zusammensetzung ließ sich dem Marker M16-1 zurodnen.

In der reversen FISH von der Durchfluss-Sortierung B4216-D (Abb. 27D) waren ein q-terminales Fragment von Chromosom 8, eines von Chromosom 10q und eines von Chromosom 12q sichtbar. Im Fall von Chromosom 12 konnte aus der reversen FISH nicht eindeutig geschlossen werden, ob in der Sortierung neben dem q-terminalen Fragment von Chromosom 12 auch noch eines aus dem mittleren Bereich des q-Arms von Chromosom 12 enthalten war.

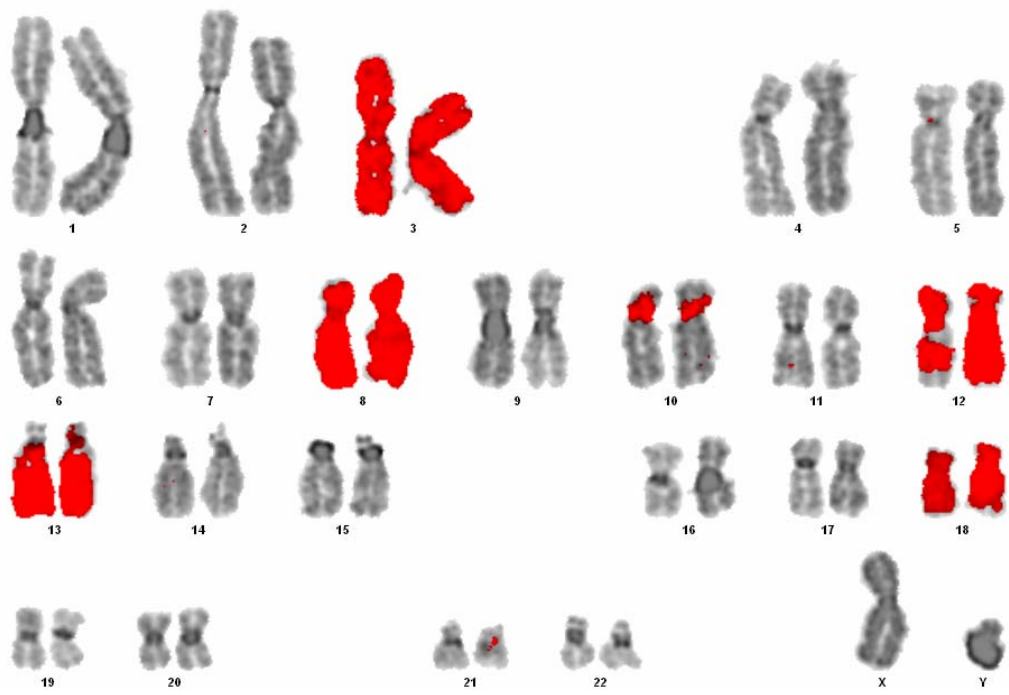
Abb. 27: Reverse FISH-Analyse von Durchfluss-Sortierungen der Zelllinie B42-16

A

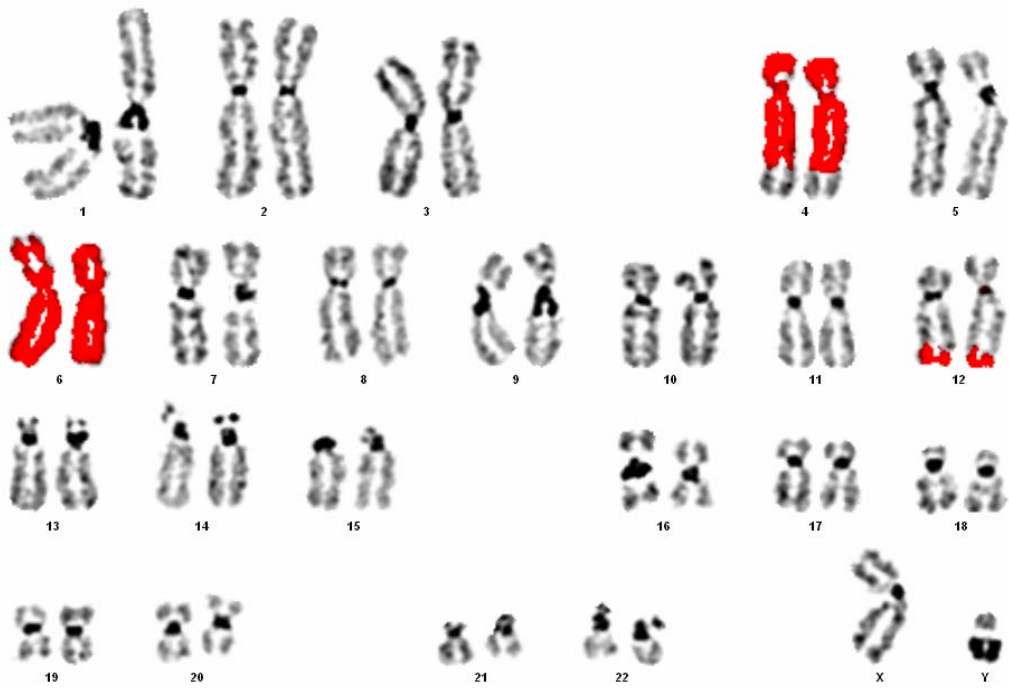


Fortsetzung Abb. 24

B



C



Fortsetzung Abb. 24

D

Die Abbildung zeigt die reversen Hybridisierungen der Durchfluss-Sortierungen FS16-A (A), FS16-B (B), FS16-C (C) und FS16-D (D). Die hybridisierten Regionen sind in der Falschfarbe rot wiedergegeben. A zeigt Hybridisierung des gesamten Chromosoms 7, von Chromosom 8 (pter bis größten Teil des q-Arms) und des q-terminalen Anteils von Chromosom 10. In B wurden die Chromosomen 3, 8, 13 und 18 komplett hybridisiert. Des Weiteren zeigt sich eine Markierung von Teilen des p-Arms von Chromosom 10, des p-Arms und Teilen des q-Arms von Chromosom 12. Das Karyogramm D zeigt p-terminale Markierung von Chromosom 8, eine vom Zentromer ausgehende bis in den q-Arm reichende Markierung von Chromosom 10 und eines mittleren und q-terminalen Bereiches von Chromosom 12.

3.1.5 Charakterisierung der chromosomalen Bruchpunkte in den Zelllinien B42-11 und B42-16 durch Array-Painting

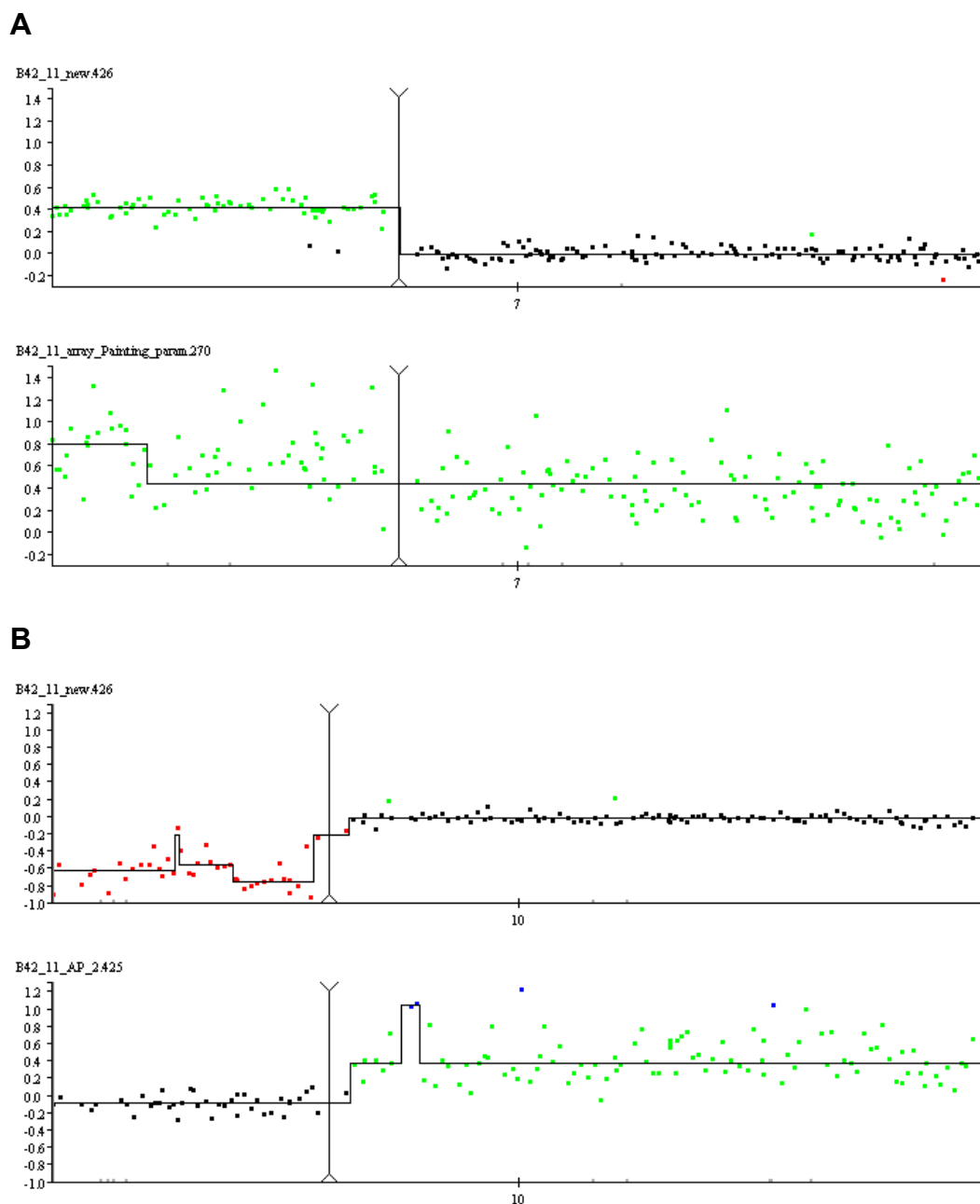
Die amplifizierte DNA der Markerchromosomen wurde auf die 1Mb-Arrays hybridisiert und die Bruchpunkt-flankierenden BAC-Klone bestimmt. Ein Beispiel für die Array-Painting Analyse des Markers M16-4 zeigt Abb. 31. Es wurden insgesamt sechs Markerchromosomen, von denen fünf aus der Zelllinie B42-16 und eines aus B42-11 isoliert worden ist, analysiert. Eine Zusammenfassung der Array-Painting Analysen gibt Tab. 12. Mit Hilfe der Bruchpunkt-flankierenden BAC-Klone konnten Kandidatengene identifiziert werden, die durch den Chromosomenbruch strukturell verändert worden sein könnten.

3.1.5.1 *Array-Painting Ergebnisse der Zelllinie B42-11*

In der Array-Painting Analyse des Markers M11-1 (Abb. 28) konnte das Kandidatengen c-Ret auf Chromosom 10 identifiziert werden.

Das Partnerchromosom in der Translokation, Chromosom 7, zeigt einen chromosomalen Bruchpunkt in der Bande q11.21. Dieser Bereich wird von den in der Array-Painting Analyse identifizierten BAC-Klonen RP5-905H7 und RP11-340I6 flankiert. In diesem Bereich liegt eine Gruppe von sehr kleinen (ein Exon) Genen (Q6ZQP9_Human), die bis dato noch nicht näher charakterisiert sind. Der Bruchpunkt von Chromosom 7 konnte nicht alleine durch die Array-Painting Analyse identifiziert werden. In Abb. 28 ist zur Charakterisierung des Markers M11-1 sowohl das Array-CGH-, als auch das Array-Painting Profil für die Chromosomen 7 und 10 dargestellt. Da der kurze Arm von Chromosom 7, welcher mit dem Chromosom 10-Fragment fusioniert ist, sich zusätzlich zu den normalen Chromosomen 7 in den Zellen befindet, erscheint dieses Fragment als Amplifikation im Array-CGH-Profil. Wahrscheinlich konnte der Bruchpunkt nicht im Array-Painting Profil identifiziert werden, weil sich in der Chromosomen-Sortierung normale Chromosomen 7 befanden, die die Analyse des Bruchpunktes im Profil überlagerten.

Abb. 28: Array-Painting Profil des Markerchromosoms M11-1



In den Array-CGH Profilen (oben) repräsentieren schwarze BAC-Klone unveränderte Bereiche, rote BAC-Klone deletierte Bereiche und grüne BAC-Klone amplifizierte Bereiche. In den Array-Painting Profilen symbolisieren grüne Punkte BAC-Klone, die das Markerchromosom repräsentieren und schwarze Punkte solche, die das Markerchromosom nicht repräsentieren. Die oberen Abschnitte zeigen die Array-CGH-Profile von Chromosom 7 (A) und von Chromosom 10 (B) der Zelllinie B42-11. Die unteren Abschnitte zeigen die Array-Painting Profile von Chromosom 7 (A) und von Chromosom 10 (B) des Markers M11-1.

3.1.5.2 Array-Painting Ergebnisse Zelllinie B42-16

Von der Zelllinie B42-16 konnten insgesamt fünf Markerchromosomen identifiziert werden. Da davon ausgegangen werden konnte, dass das Isochromosom 8 keine weiteren Veränderungen aufzeigte, wurden die vier Markerchromosomen M16-1, M16-2, M16-4 und M16-5 mittels Durchflusszytometrie isoliert und in der Array-Painting Analyse näher charakterisiert.

Der Marker M16-1 setzt sich aus Fragmenten der Chromosomen 4 und 12 zusammen. In der Array-Painting Analyse konnte der chromosomale Bruchpunkt auf Chromosom 4 durch die BAC-Klone RP11-28E24 und RP11-164P12 (4q31.2) eingegrenzt werden (Abb. 33A). In dieser Region liegen das Gen RPS3A (40S ribosomal Protein S3a) und drei weitere bislang nicht näher charakterisierte Gene. Das Chromosom 12 Profil der Array-Painting Analyse ließ eine Eingrenzung des chromosomalen Bruchpunktes durch Identifizierung der Bruchpunkt-flankierenden BAC-Klone RP11-25E2 und RP11-8A1 (12q24.21), zu (Abb 2B).

Die Array-Painting Analyse Profile des Markers M16-2 sind in Abb. 30 dargestellt. Es konnten die Bruchpunkt-flankierenden Klone RP11-16G11 und RP11-96B2 (8q24.13) für den Bruchpunkt auf Chromosom 8 und die Klone RP11-113E21 und RP11-396M20 (10q23.2) für den Bruchpunkt auf Chromosom 10 identifiziert werden. Die Region des Bruchpunktes auf Chromosom 8 enthält das Gen Has2 (Abb. 33A, „Hyaluronan Synthase 2“) und die des chromosomalen Bruchpunktes auf Chromosom 10 das Gen Grid1 (Abb. 33B, „Glutamate receptor ionotropic subunit 1“).

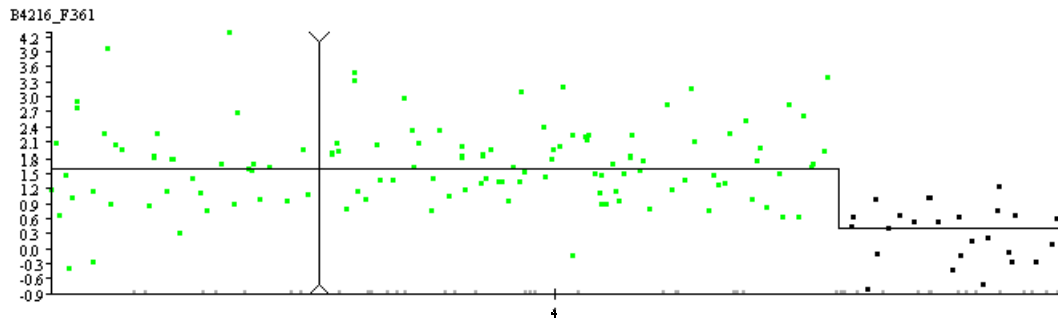
Abb. 31 zeigt die Array-Painting Profile des Markers M16-4. Dieses Markerchromosom besteht aus Fragmenten des Chromosoms 8, 10 und 12. Der chromosomale Bruchpunkt auf Chromosom 8 (Abb. 31A) wird von den BAC-Klonen RP11-16G11 und RP11-96B2 (10q24.13), der Bruchpunkt auf Chromosom 10 (Abb. 31B) wird von CTB-164I22 und RP13-445N5 umspannt. Die Bruchpunkte in 12q13.1 und 12q15 flankieren die BAC-Klone RP11-417E16 und RP11-89H19 bzw. RP11-444B24 und Cancer_3A4. Die Kandidatengene der betreffenden Regionen wurden für Chromosom 8 im Abschnitt über M16-2 und für die Chromosomen 10 und 12 im Abschnitt über M16-5 benannt.

In Abb. 32 sind die Array-Painting Analyse Profile des Markers M16-5 gezeigt. M16-5 besteht aus Fragmenten der Chromosomen 8, 10 und 12. Der Bruchpunkt auf Chromosom 8 (Abb. 32A) wird von den BAC-Klonen RP11-137P5 und RP11-567J20 (8q11.21) flankiert. In dieser Region sind die Gene PRKDC („DNA-dependent protein kinase catalytic subunit“), MCM4 („DNA replication licensing factor MCM4“) und UBE2V2 („Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2“) kodiert. Die beiden chromosomalen Bruchpunkte auf Chromosom 10 (Abb. 32B) werden von den BAC-Klonen RP11-337F21 und RP11-16O1 (10p13) und CTB-164I22 und RP13-445N5 (10p11.21) eingegrenzt. Im Bruchpunkt der Bande 10p13 befinden sich die Gene VIM („Vimentin“), TRDMT1 („tRNA (cytosine-5-)-methyltransferase“), ST8SIA6 („Alpha-2,8-sialyltransferase 8F“), PTPLA („protein tyrosine phosphatase-like, member A“) und STAM („Signal transducing adapter molecule 1“). Die Region in 10p11.2 enthält 4 Gene und noch nicht näher charakterisierte Zinkfinger-Proteine (ZNF248, ZNF25, ZNF33A und ZNF37A).

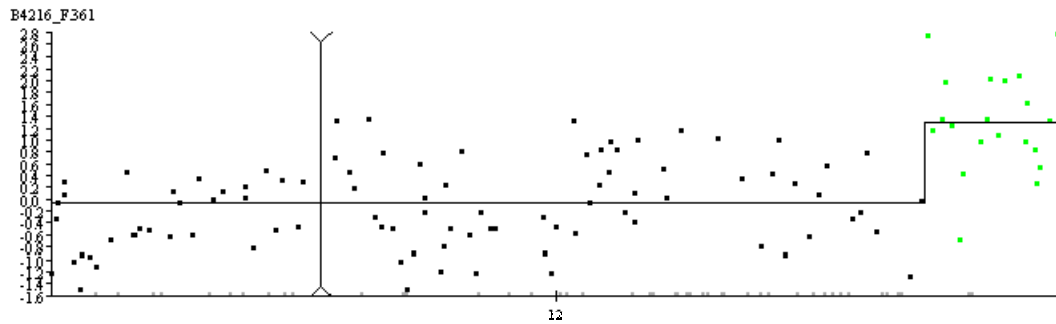
Chromosom 12 zeigt im Array-Painting Profil (Abb. 32C) drei chromosomale Bruchpunkte, die im Falle des Bruchpunktes in 12q13.1 von den BAC-Klonen RP3-417E16 und RP11-89H19, in 12q15 von RP11-444B24 und Cancer_3A4 und in 12q24.2 von RP11-25E2 und RP11-8A1 flankiert werden. Die in 12q13.1 eingegrenzte Region enthält die Gene TMEM106C („Transmembrane protein 106C“) und COL2A1 („Collagen alpha-1(II) chain precursor“). Die Region in 12q15 umspannt die Gene IL22 („Interleukin-22 precursor“), MDM1 („Mdm4, transformed 3T3 cell double minute 1, p53 binding protein isoform 1“), das bislang nicht charakterisierte Gen LOC387867, RAP1B („Ras-related protein Rap-1b precursor“), NUP107 („Nuclear pore complex protein Nup107“) und SCL35E3 („solute carrier family 35, member E3“). In der Region des eingegrenzten Bereiches in 12q24.2 befindet sich kein Kandidatengen.

Abb. 29: Array-Painting Profile des Markers M16-1

A



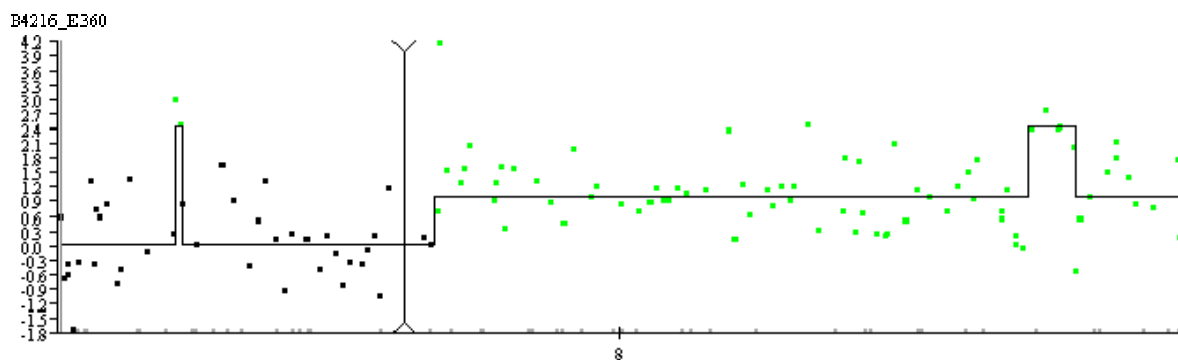
B



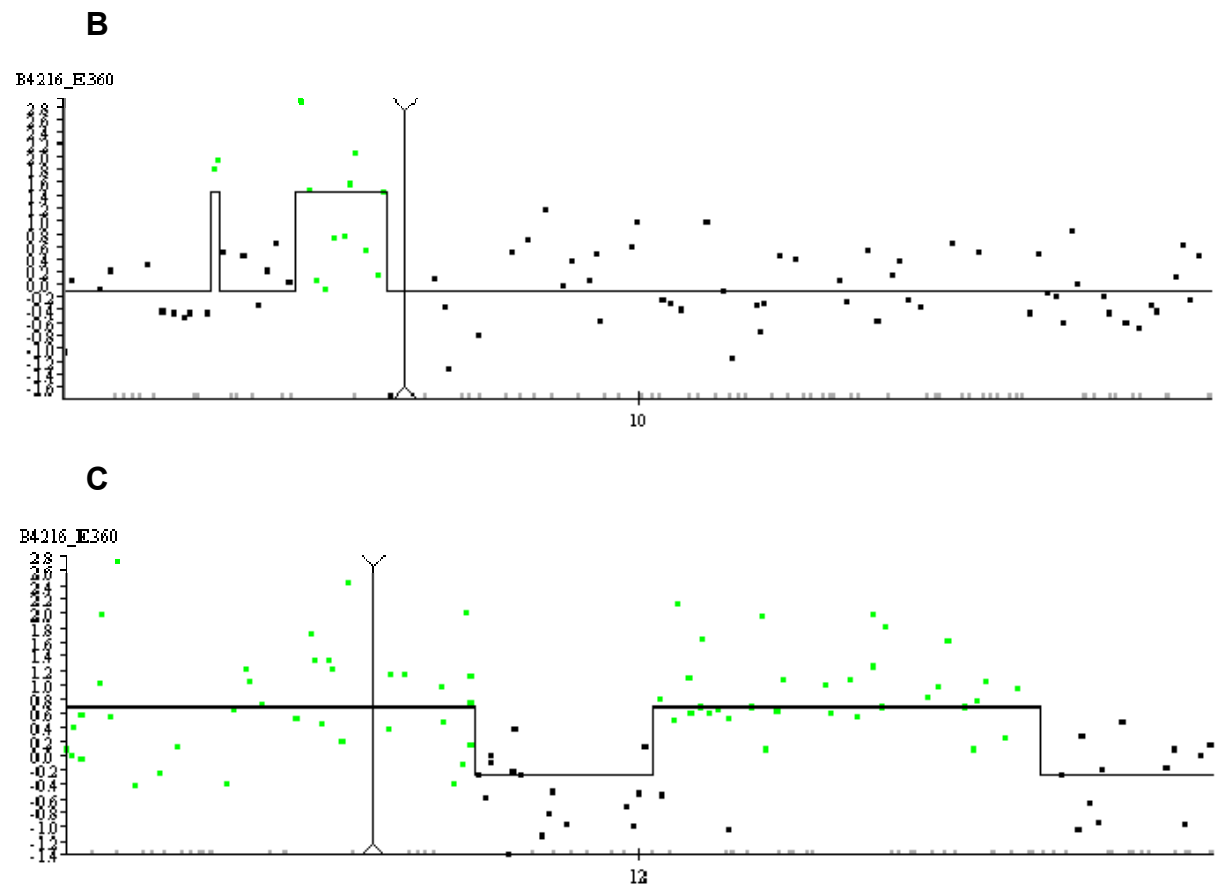
In den Array-Painting Profilen symbolisieren grüne Punkte BAC-Klone, die das Markerchromosom repräsentieren und schwarze Punkte solche, die das Markerchromosom nicht repräsentieren. Es sind die Array-Painting Profile von Chromosom 4 (A) und von Chromosom 12 (B) des Markers M16-1 gezeigt.

Abb. 30: Array-Painting-Profile des Markers M16-2

A

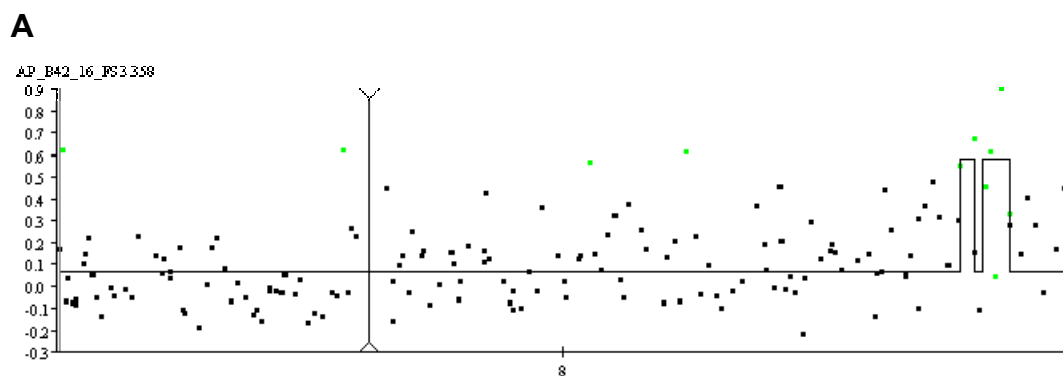


Fortsetzung Abb. 30



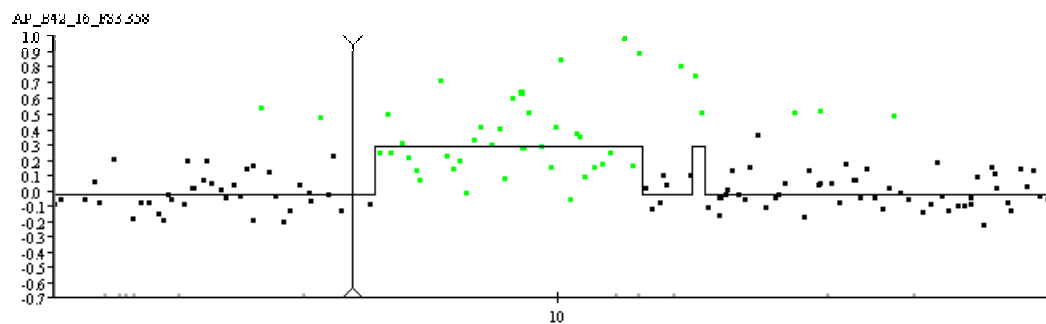
In den Array-Painting Profilen symbolisieren grüne Punkte BAC-Klone, die das Markerchromosom repräsentieren und schwarze Punkte solche, die das Markerchromosom nicht repräsentieren. Es sind die Array-Painting Profile von Chromosom 8 (A), Chromosom 10 (B) und von Chromosom 12 (C) des Markers M16-2 gezeigt.

Abb. 31: Array-Painting Profile des Markers M16-4

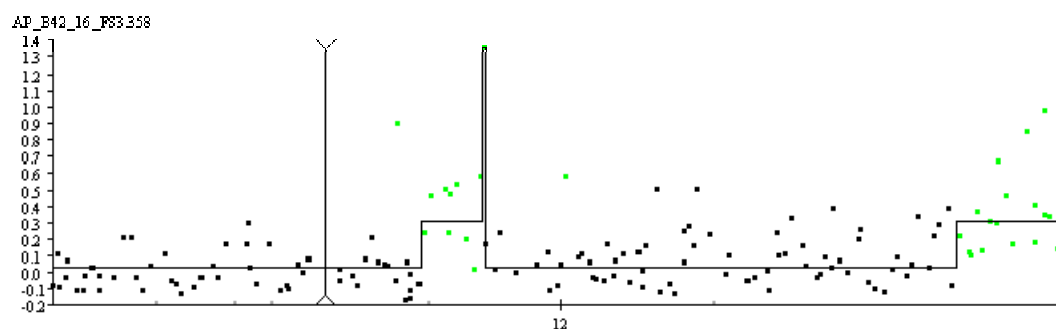


Fortsetzung Abb. 31

B



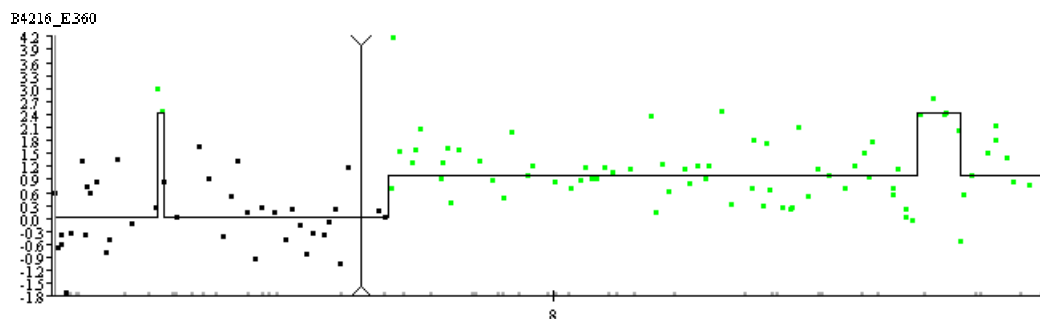
C



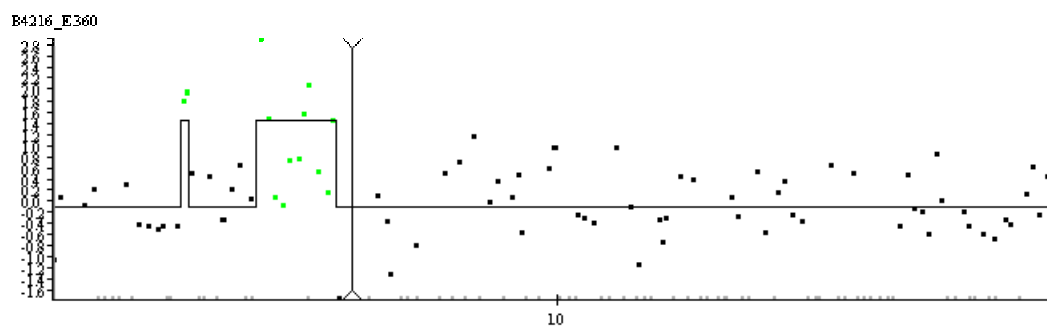
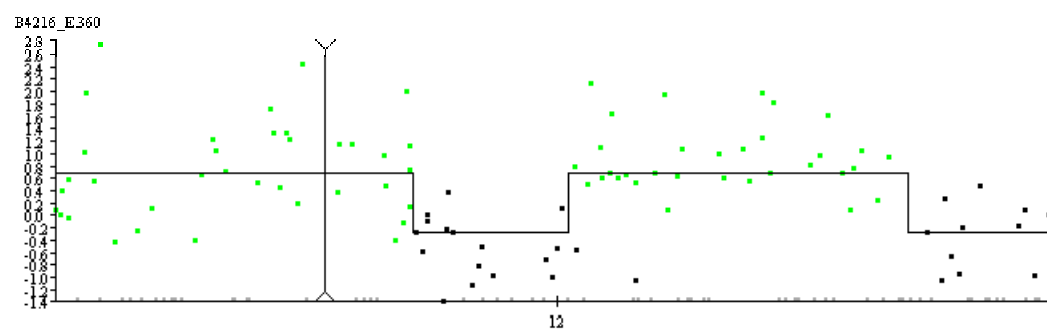
In den Array-Painting Profilen symbolisieren grüne Punkte BAC-Klone, die das Markerchromosom repräsentieren und schwarze Punkte solche, die das Markerchromosom nicht repräsentieren. Es sind die Array-Painting Profile von Chromosom 8 (A), Chromosom 10 (B) und von Chromosom 12 (C) des Markers M16-4 gezeigt.

Abb. 32: Array-Painting Profile des Markers M16-5

A

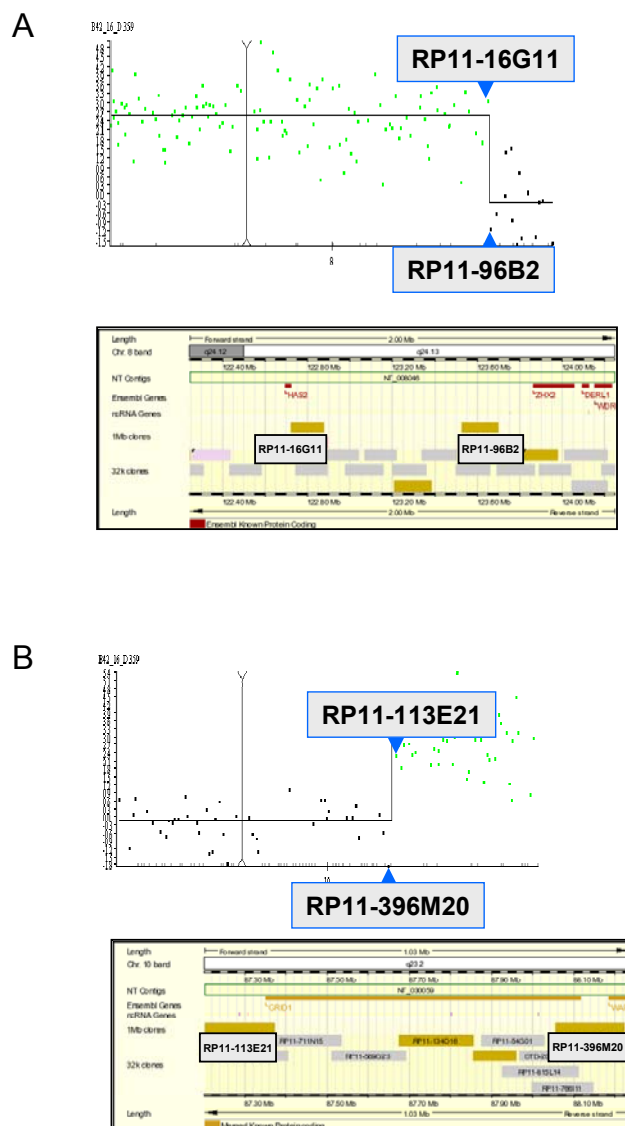


Fortsetzung Abb. 32

B**C**

In den Array-CGH Profilen repräsentieren schwarze BAC-Klone unveränderte Bereiche, rote BAC-Klone deletierte Bereiche und grüne BAC-Klone amplifizierte Bereiche. In den Array-Painting Profilen symbolisieren rote Punkte BAC-Klone, die das Markerchromosom repräsentieren und schwarze Punkte solche, die das Markerchromosom nicht repräsentieren. Es sind die Array-Painting Profile von Chromosom 8 (A), Chromosom 10 (B) und von Chromosom 12 (C) des Markers M16-5 gezeigt.

Abb. 33: Identifizierung von Kandidatengenen mit Hilfe von Array-Painting und der Genom-Datenbank Ensembl



A: Das obere Bild zeigt das Array-Painting Profil von Chromosom 8 des Markers M16-4. Alle BAC-Klone, welche den Chromosom 8-Anteil repräsentieren zeigten hohe Cy3-Fluoreszenz und damit große Log_2 -Ratios (grüne Punkte). Der letzte Klon mit einem hohem Log_2 -Ratio ist RP11-16G11 und der erste mit niedrigem ist RP11-96B2. Der untere Bereich zeigt den Ausschnitt aus Ensembl, welcher von den beiden Bruchpunkt-überspannenden Klonen repräsentiert wird. In diesem Bereich liegt das Gen Has2. B: Array-Painting Profil von Chromosom 10 des Markers M16-4. Die beiden Bruchpunkt-flankierenden Klonen RP11-113E21 und RP11-396M20 umspannen das Gen Grid1.

Tab. 12: Zusammenfassung der zytogenetischen Charakterisierung der Markerchromosomen der Zelllinien B42-11 und B42-16

Zelllinie	Marker	Zytogenetische Beschreibung (SKY)	BAC-basierte Beschreibung (Array-Painting mit 1 Mb BAC-Klon-Set)
<i>B42-11</i>			
	M11-1	der(7)(7pter→q11.1::10q11.2→qter)	der(7)(7pter→RP5-905H7::RP11-38B21→qter)
<i>B42-16</i>			
	M16-1	der(4)(4pter→4q31.2::12q24.2→qter)	der(4)(4pter→RP11-28E24::RP11-8A1→qter)
	M16-2	der(8)(8pter→q24.1::10q23.2→qter)	der(8)(8pter→RP11-16G11::RP11-396M20→qter)
	M16-3	i(8)(q)	
	M16-4	der(10)(12q13.1→q15::10p11.2→q23.2:8q24.1→qter)	der(10)(RP11-89H19→RP11-444B24::RP13-445N5→ RP11-113E21::RP11-96B2→qter)
	M16-5	der(12)(12pter→12q13.1::12q15→q24.2::10p13→p11.2::8q11.21→qter)	der(12)(12pter→RP3-417E16::Cancer_3A4→RP1-46F2::RP11-16O1→CTB-164I22::RP11-567J20→qter)

3.1.6 Feinkartierung der mit Array-Painting identifizierten Bruchpunkte durch FISH-Analyse mit überlappenden BAC-Sonden aus der 32K-BAC-Bibliothek

Mit Hilfe der Array-Painting Analyse konnten chromosomale Bruchpunkte mit einer Genauigkeit von etwa einer Megabase bestimmt werden. Um diese Bereiche zur Identifizierung von Kandidatengenen weiter einzugrenzen, wurden die Markerchromosomen mit BAC-Klonen, welche die Bruchpunkte überlappend abdeckten, hybridisiert. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Analysen ist in Tab. 12 dargestellt.

3.1.6.1 Klonierung der chromosomalen Bruchpunkte auf Chromosom 12

Die Array-Painting Analyse ergab drei Bruchpunkte (12q13.1, 12q15 und 12q24.2) auf Chromosom 12 (Tab. 12). Diese wurden durch die FISH-Analyse weiter eingegrenzt.

Dabei konnte der Bruchpunkt auf 12q13.1 mit den Sonden 4 und 5 (Tab. 14, Abb. 34) auf eine Region von 456 kb (Tab. 13) festgelegt werden. In diesem Bereich befinden sich mehrere Gene, wobei die Gene *Wnt1* („Proto-oncogene protein Wnt-1 precursor“) und *Arf3* („ADP-ribosylation factor 3“) aufgrund ihrer Relevanz in Brusttumoren (Li et al., 2002) nachfolgend näher analysiert wurden.

Der Bruchpunkt in 12q15 wurde mit der Sonde 6 (Tab. 14, Abb. 34) auf 282 kb (Tab. 14) eingegrenzt. In dieser Region liegt das in Brusttumoren bereits als verändert beschriebene Gen *CPM* („Carboxypeptidase M precursor“).

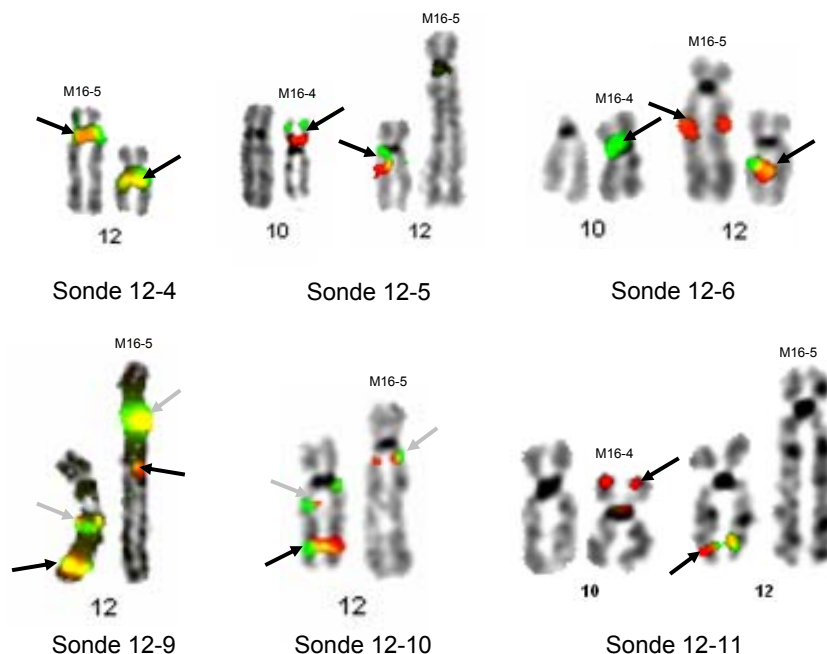
Bei der Feinkartierung des Bruchpunktes in 12q24 ergab sich eine Besonderheit. Zum einen konnte der Bruchpunkt auf die Bande 12q24.13 auf 246 bp eingegrenzt werden. Es stellte sich zudem heraus, dass eine Region (12q24.13→12q24.21) deletiert ist, was in der Array-CGH Analyse (Abb. 22) nicht festgestellt werden konnte. Dies konnte daraus geschlossen werden, dass Sonde 12-9 (Tab. 14, Abb. 34) noch Signale auf M16-4 und M16-5 zeigte, Sonde 12-10 (Tab. 14, Abb. 34) kein Signal auf diesen Markern und Sonde 12-11 (Tab. 14, Abb. 34) wieder ein rotes Signal auf M16-4. Das grüne Signal von Sonde 12-9 und das rote von Sonde 12-11 flankieren die Mikrodeletion. In dieser Region liegen die Gene *RBM19* („RNA-binding motif protein 19“), *TBX5* („T-box transcription factor TBX5“) und *TBX3* („T-box transcription factor

TBX3“). Für nachfolgende Analysen mittels Realtime RT-PCR wurden die Gene Wnt1, Arf3, CPM, RBM19, TBX5 und TBX3 ausgewählt.

Tab. 13: Ergebnisse der Feinkartierung der Bruchpunkte von M16-4 und M16-5 mit Klonen der 32K-BAC-Bibliothek

Chromosom	Bruchpunkt (zytogenetische Bande)	Bruchpunkt-flankierender BAC-Klon proximal	Bruchpunkt-flankierender BAC-Klon distal	Genomische Position der BAC-Klone (Mitte) [bp]		Lücke zwischen den BAC-Klonen [kb]
12	q13.1	RP11-680O10	RP11-626A16	48,107,545	47,474,938	456
12	q15	RP11-185H13	RP11-204P7	67,262,082	67,731,637	282
12	q24.13	RP11-666G06	CTD-2055G11	112,794,611	113,338,314	246
12	q24.21	RP11-351J12	RP11-25E2	113,886,332	114,032,551	37
10	p13	RP11-657A09	RP11-479M17	16,004,906	16,161,912	25
10	p13	RP11-467B17	RP11-468A06	16,365,396	16,477,637	überlappend
10	p13	RP11-629M21	RP11-347C08	16,679,686	16,798,886	57

Abb. 34: Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) zur Klonierung der chromosomalen Bruchpunkte des Chromosoms 12 in der Zelllinie B42-16



Die Abbildung zeigt die Chromosomen, auf denen sich nach FISH mit den Sonden 12-4, 12-5, 12-6, 12-9, 12-10 und 12-11 (Tab. 14) Hybridisierungssignale (schwarze Pfeile) zeigten. Es wurden immer paarweise BAC-Sonden, die mit Digoxigenin (Mit Cy3, rot, detektiert) und Biotin (mit FITC, grün, detektiert) markiert wurden, hybridisiert. Die Sonden 12-9 und 12-10 zeigten neben spezifischen Signalen (schwarze Pfeile) auch unspezifische Signale (Kreuzhybridisierung, graue Pfeile). Sonde 12-4 bindet proximal des chromosomalen Bruchpunktes auf 12q13.1- somit ist das Signalpaar auf dem nicht-veränderten (rechts) und dem Marker M16-5 (links) zu sehen. Sonde 12-5 bindet distal des chromosomalen Bruchpunkts in 12q13.1. Somit befindet sich ein Signalpaar auf dem unveränderten Chromosom 12 (links) und ein Signalpaar auf dem Chromosom 12-Fragment des Markers M16-4 (rechts). Die beiden BAC-Klone der Sonde 12-6 binden flankierend um den chromosomalen Bruchpunkt in 12q15. Der „rot“-markierte BAC (RP11-185H13) bindet proximal des Bruchpunktes und damit sowohl auf dem unveränderten Chromosom 12 als auch dem Chromosom 10-Marker M16-4. Der „grün“-markierte BAC (RP11-204P7) bindet distal des Bruchpunktes und damit sowohl auf dem unveränderten Chromosom 12 als auch auf dem Marker M16-5. Sonde 12-9 bindet proximal des Bruchpunktes 12q24.13 und bindet auf dem unveränderten Chromosom 12 und dem Marker M16-5. Sonde 12-10 repräsentiert den deletierten Bereich zwischen 12q24.13 und 12q24.21. Deswegen sind Signale auf dem unveränderten Chromosom 12, aber nicht auf Marker M16-5 zu sehen. Sonde 12-11 flankiert den Bruchpunkt in 12q24.1. Während der grün-markierte BAC RP11-351J20 noch in der deletierten Region liegt, befindet sich der rot-markierte BAC bereits distal des Bruchpunktes auf dem translozierten Teil von Chromosom 12 auf dem Marker M16-4.

Tab. 14: Bruchpunkt-spezifische BAC-Sonden für den Marker M16-5

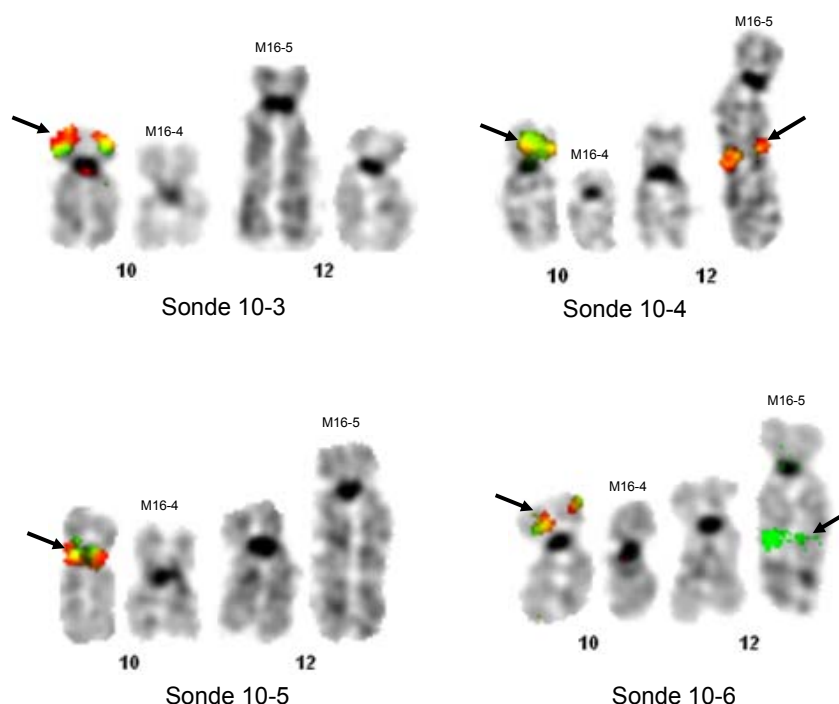
	Klon 1	Klon 2
Sonde	(biotin-markiert)	(digoxigenin-markiert)
12-4	RP11-373E24	RP11-626A16
12-5	RP11-680O10	RP11-44D17
12-6	RP11-185H13	RP11-207P7
12-9	RP11-195K16	RP11-666G06
12-10	CTD-2055G11	RP11-296E16
12-11	RP11-351J12	RP11-25E02

3.1.6.2 Klonierung der chromosomalen Bruchpunkte auf Chromosom 10

Der zentromernahe Bruchpunkt auf 10p11.2 mußte nicht weiter eingegrenzt werden, weil im entsprechenden Bereich keine Gene repräsentiert waren. Der Bruchpunkt auf 10q23.2 wurde bereits hinreichend durch die RACE Analyse (Ergebnisse 3.2.1) charakterisiert.

Eine Feinkartierung mittels FISH war hingegen für den Bruchpunkt in 10p13 erforderlich. Die FISH-Analyse konnte auch hier eine Mikro-Deletion in der Größe von 202 kb feststellen. Der deletierte Bereich befindet sich zwischen den BAC-Klonen RP11-468A06 und RP11-629M21. In dieser Region befinden sich die Gene Pter („Phosphotriesterase-related protein“) und C1qI3 („Complement C1q-like protein 3 precursor), welche noch nicht in Zusammenhang mit der Karzinogenese in Brustzellen publiziert worden sind.

Abb. 35: Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) zur Klonierung des chromosomalen Bruchpunktes 10p13 auf Chromosom 10



Die Abbildung zeigt die Metaphase-Chromosomen 10 und 12 aus der Zelllinie B42-16 nach Hybridisierung mit den FISH-Sonden 10-3, 10-4, 10-5 und 10-6 (Tab. 15). Die FISH-Signale sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. Sonde 10-3 bindet mit beiden BAC-Klonen distal des chromosomalen Bruchpunktes auf 10p13. Somit ist nur ein Signalpaar auf dem nicht-veränderten Chromosom 10 zu sehen. Das Sondenpaar 10-4 bindet bereits proximal des chromosomalen Bruchpunktes auf dem in Chromosom 12 inserierten Chromosomenbereich. Dadurch wird ein rotes und grünes Signalpaar sowohl auf dem nicht-veränderten Chromosom 10 als auch auf dem Marker M16-5 erzeugt. Die Sonde 10-5 und der rot-markierte BAC der Sonde 10-6 repräsentieren eine weitere Mikrodeletion. Dabei sind jeweils nur Signale auf dem nicht-veränderten Chromosom zu erkennen. Der grün-markierte BAC der Sonde 10-6 befindet sich proximal des Bruchpunktes der Deletion und zeigt sowohl ein Signal auf dem nicht-veränderten Chromosom 10, als auch auf dem in Chromosom 12 inserierten Chromosomenbereich von Chromosom 10.

Tab. 15: Bruchpunkt-spezifische BAC-Sonden für den Marker M16-4

	Klon 1	Klon 2		Klon 1	Klon 2
Sonde	(biotin-markiert)	(digoxigenin-markiert)	Sonde	(biotin-markiert)	(digoxigenin-markiert)
10-3	RP11-93B07	RP11-657A09	10-5	RP11-468A06	RP11-136J13
10-4	RP11-479M17	RP11-467B17	10-6	RP11-629M21	RP11-347C08

3.2 Ergebnisse aus den molekularbiologischen Analysen

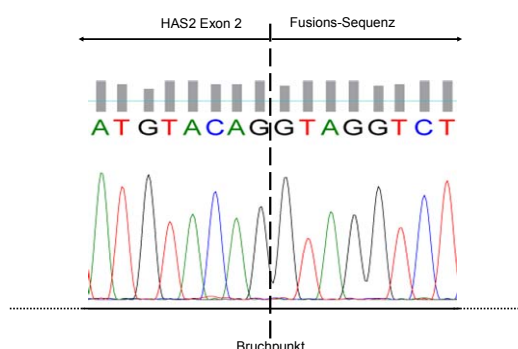
3.2.1 Klonierung von Fusions-Transkripten mit Hilfe von „Rapid Amplification of cDNA ends“ (RACE)

Für die nähere Charakterisierung der strukturellen Umlagerungen der Gene Has2 und Grid1 in der Zelllinie B42-16 wurde eine Klonierung der Fusionsprodukte mit Hilfe von RACE („Rapid amplification of cDNA ends) mit anschließender Sequenzierung durchgeführt. Anhand der Array-Painting-Daten konnte zunächst davon ausgegangen werden, dass eine Fusion der Gene Has2 und Grid1 stattgefunden hat. Allerdings stellte sich heraus, dass das veränderte Transkript von Grid1 am 5'-Ende mit der genomischen Sequenz von ZHX2 („Zinc fingers and homeoboxes protein 2“) fusioniert ist, Has2 hingegen am 3'-Ende mit einer bislang ungeklärten kurzen Sequenz.

3.2.1.1 Klonierung und Charakterisierung des Fusionstranskriptes von Has2

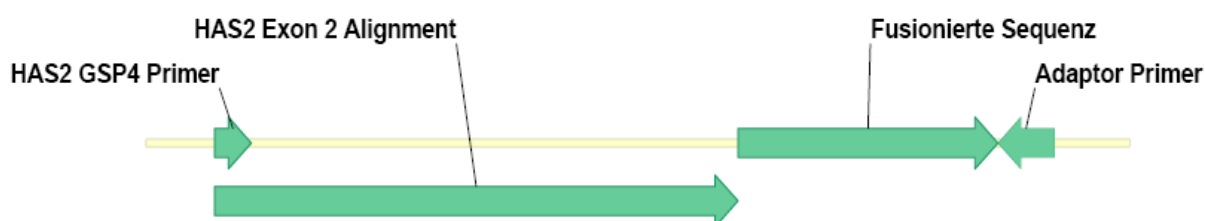
Durch 3'-RACE konnte eine 589 bp lange Sequenz des veränderten Has2-Transkripts kloniert werden (Abb. 36, 37). Das klonierte Fragment enthält am 5'-Ende 40 bp des Klonierungsvektors mit der 5'-Klonierungsstelle. Dem folgt beginnend mit der Sequenz des in der 3'-RACE verwendeten Primers Has2GSP4 eine 314 bp lange Sequenz, die 100 % Homologie zur cDNA-Sequenz von Exon 2 des Has2 Gens aufweist. Die Sequenz-Homologie zu Has2 bricht dann ab und es schließt sich die 156 bp lange Sequenz des Fusionsgens an. Die Herkunft dieser Sequenz konnte nicht vollständig geklärt werden. Eine Homologie-Suche unter Verwendung von <http://www.ensembl.org/MULTI/blastview> brachte kein eindeutiges Ergebnis. Es konnten nur Homologien für kurze Bereiche der Sequenz gefunden werden, so z.B. zu einem Bereich des Vorwärtsstrangs von Chromosom 10 (116185475 bis 116185490) aus Exon 24 von ABLIM1 („Actin-binding LIM protein 1“), einem Gen, welches als Strukturprotein („Scaffold Protein“) beschrieben ist.

Abb. 36: Sequenzierung des Bruchpunktes in Has2 auf Chromosom 8



Ausschnitt aus dem Chromogramm der Sequenzierung des klonierten Has2-Fragmentes. Die senkrechte gestrichelte Linie gibt den Bruchpunkt von Has2 wieder, wobei sich links des Bruchpunktes die Sequenz von Exon 2 von Has2 und rechts davon die Fusions-Sequenz befindet.

Abb. 37: Kloniertes Fusions-Transkript von Has2



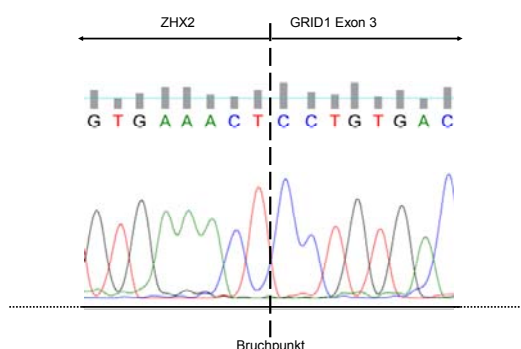
Das Fusions-Transkript von Has2 (589bp) besteht von Base 1-40 aus Sequenzen des Klonierungsvektors mit der 5'-Klonierungsschnittstelle. Danach folgt, angeführt von dem in der 3'-RACE verwendeten genspezifischen Primer Has2GSP4, eine 314 bp lange Sequenz, die zu Exon 2 von Has2 homolog ist und mit dem Ende von Exon 2 abschließt. Danach folgt die 156 bp lange Fusions-Sequenz, die vom Adapter-Primer (34 bp) und der 45 bp langen 3' Klonierungsschnittstelle des Vektors gefolgt wird.

3.2.1.2 Klonierung und Charakterisierung des Fusions-Transkriptes von Grid1

Mit Hilfe der 5' RACE war es möglich das Fusions-Transkript von Grid1 zu amplifizieren, in einen Vektor zu klonieren und diesen dann zu sequenzieren. Abb. 37 gibt einen schematischen Überblick über das klonierte Fusions-Transkript. Vom 5' Ende bis zu Base 118 enthält das Fragment die 5' Klonierungsstelle des Vektors PCR4TOPO. Danach (119 bp – 150 bp) schließt sich der AUAP-Primer an, der mit seiner poly-C-

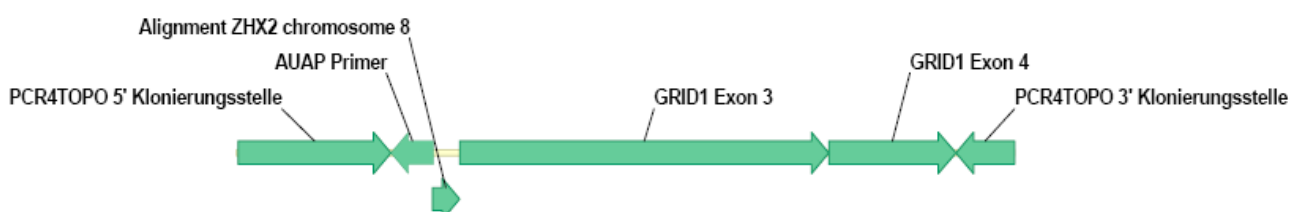
Sequenz an das unbekannte 5'-Ende des Transkriptes gebunden hat. Von Basenpaar 151 bis 171 befindet sich die genomische Sequenz des Fusionsgens ZHX2. Diese Sequenz (21 bp) umfasst die Basenpaare 123648997 bis 123649017 des Vorwärtsstrangs von Chromosom 8, den chromosomalen Bruchpunkt und dann anschließend die vollständige Sequenz von Exon 3 und der unvollständigen Sequenz von Exon 4 des Gens Grid1 (bp 87888663 bis bp 87956385 auf dem Rückwärtsstrang).

Abb. 38: Sequenzierung des Bruchpunktes in Grid1 auf Chromosom 10



Ausschnitt aus dem Chromogramm der Sequenzierung des klonierten Grid1-Fragmentes. Die senkrechte gestrichelte Linie gibt den Bruchpunkt in Grid1 wieder, wobei sich links des Bruchpunktes die fusionierte Sequenz von Zhx2 und rechts davon die von Grid1, Exon 3, befindet.

Abb. 39: Fusions-Transkript von Grid1



Das klonierte Fusionstranskript (599 bp) von Grid1 in schematischer Darstellung. Das sequenzierte Fragment besteht aus einem Teil des Klonierungsvektors PCR4TOPO mit der 5' Klonierungsstelle (Basen 1-118). Danach schließt sich die Sequenz des AUAP-Primers (Basen 119-150) an, welche von

der kurzen Sequenz (Basen 151–171) des Gens ZHX2 (8q24.13) gefolgt wird. Im Abschnitt von Base 172 bis 456 ist die komplette Sequenz von Grid1 Exon 3, sowie die unvollständige Sequenz von Exon 4 (Basen 457-554) enthalten. Danach (Base 555-599) folgt die 3' Klonierungsstelle von PCR4TOPO.

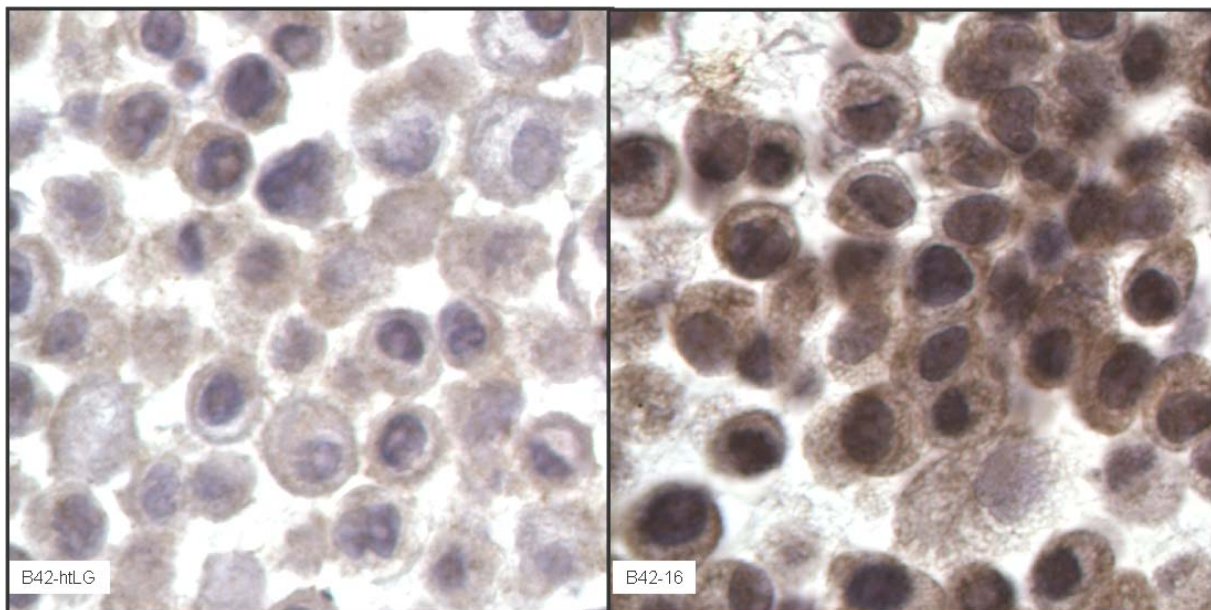
3.2.2 Immunhistochemischer Nachweis der Überexpression von Has2 und Grid1 in der Zelllinie B42-16

In der Zelllinie B42-16 wurden neben anderen strukturellen Genveränderungen Umlagerungen der Gene Has2 („Hyaluronan Synthase2“) und Grid1 („Glutamate receptor ionotropic 1“) nachgewiesen. Die aus den Umlagerungen resultierenden Überexpressionen konnten auf mRNA-Ebene mit Hilfe von Realtime RT-PCR bestätigt werden. Um zu überprüfen, ob die Überexpression dieser Gene auch auf Proteinebene stattfindet, wurden diese mit Hilfe von immunhistochemischer Färbung der membran-ständigen Proteine an Paraffin-eingebetteten Zellen nachgewiesen und die Höhe der Protein-Expression semiquantitativ im Vergleich mit der nicht-transformierten Zelllinie B42-htLG bestimmt.

3.2.2.1 Immunhistochemischer Proteinnachweis von Has2

Das Protein Has2 ist membranständig und stellt das für das osmotische Mileu der extrazellulären Matrix bedeutende Polysaccharid Hyaluronan her. Eine Überexpression des Proteins und damit eine überdurchschnittliche Produktion von Hyaluronan wird im Zusammenhang mit Mammakarzinomen, die sich im invasien Stadium befinden diskutiert (Udabage et al., 2005). Nach immunhistochemischer Färbung (Abb. 40) konnte gezeigt werden, dass das Protein in der strahlentransformierten Zelllinie B42-16 im Vergleich mit der nicht-transformierten Zelllinie B42-htLG überexprimiert wird.

Abb. 40: Immunhistochemische Untersuchung der Zelllinien B42-htLG und B42-16 mit Has2-spezifischem Antikörper

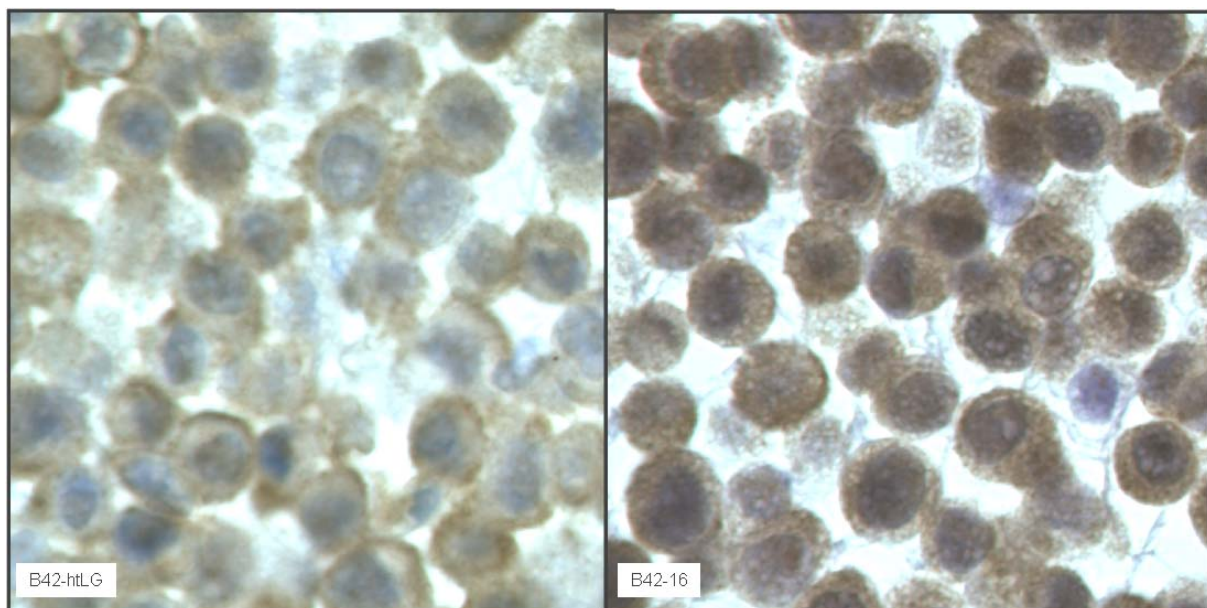


Die Zelllinien B42-htLG (links) und B42-16 (rechts) nach dem immunhistochemischen Nachweis des Has2-Proteins. Die Antikörperfärbung (braun) ist in der für das Gen unveränderten Ausgangs-Zelllinie B42-htLG nur schwach ausgeprägt, während die Zellen der strahlentransformierten Zelllinie B42-16 eine sehr starke Intensität der Immunfärbung zeigen.

3.2.2.2 Immunhistochemischer Proteinnachweis von Grid1

Das ebenfalls membranständige Protein Grid1 ist ein so genannter ionotropischer Glutamatrezeptor. Obwohl noch Unklarheit über seine funktionelle Bedeutung in Tumoren herrscht, wird das Protein im Zusammenhang mit der Tumorentstehung von histiocytischen Lymphomen (Haas et al., 2005) diskutiert. Der vergleichende immunhistochemische Nachweis des Proteins in den Zelllinien B42-16 und B42-htLG (Abb. 41) zeigt eine Überexpression des Proteins in der Zelllinie B42-16.

Abb. 41: Immunhistochemische Untersuchung der Zelllinien B42-htLG und B42-16 mit Grid1-spezifischem Antikörper



Die Zelllinien B42-htLG (links) und B42-16 (rechts) nach dem immunhistochemischen Nachweis des Grid1-Proteins. Die Antikörperfärbung von Grid1 (braun) ist in der strahlentransformierten Zelllinie B42-16 wesentlich stärker ausgeprägt als in der unveränderten Ausgangs-Zelllinie B42-htLG.

3.2.3 Ergebnisse der Real Time RT-PCR Analyse

In den Zelllinien B42-11 und B42-16, die einen tumorigenen Phänotyp aufwiesen, wurde die Expression von verschiedenen mRNA-Transkripten relativ zur Expression in der nicht-tumorigenen immortalisierten Asugangs-Zelllinie B42-htLG bestimmt. Dafür wurden Kandidatengene ausgewählt, für die es aufgrund der Array-Painting Analysen Hinweise auf eine Genveränderung gab, da sie in den chromosomalen Bruchpunkten der strukturellen Umlagerungen lagen. Darüber hinaus wurde bei der Auswahl berücksichtigt, ob es sich bei den zu untersuchenden Kandidatengenen um Karzinogenese-assoziierte Gene handelt.

Besonders detailliert wurde die Expression des Kandidatengens Ret untersucht. Dieses Gen wurde mit Primer-Kombinationen untersucht, die zum einen die Messung der relativen Häufigkeit der Transkripte der extrazellulären- (EC) und Tyrosinkinase-

Domäne (TK) erlaubten. Zum anderen konnte mit den RT-PCR-Sonden überprüft werden, ob das Ret-Gen in den untersuchten Zelllinien in einer von den zwei häufigsten Formen struktureller Umlagerungen, Ret/PTC1 (Fusion von TK mit dem Gen H4) und RetPTC3 (Fusion von TK mit Ele1), die aus der Schilddrüsen-Karzinogenese bekannt sind (Jhiang, 2000), vorliegt.

Des Weiteren wurden Gene, die eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung von Mamma-Karzinomen spielen (Fridlyand, et al., 2006), untersucht. Dabei handelt es sich um die Gene Brca1 („Breast cancer type 1 susceptibility protein“), Brca2 („Breast cancer type 2 susceptibility protein“), p53 („Cellular tumor antigen p53“). Darüber hinaus wurde die mRNA-Expression der Tumorsuppressorgene Mus81 (McPherson et al., 2004) und FancA (van Wezel et al., 2005) aufgrund ihrer Bedeutung in der Mamma-Karzinogenese überprüft.

Eine Zusammenfassung der Realtime-RT-PCR-Ergebnisse gibt Tab. 16. Die mRNA-Expressionen wurden relativ zur Expression der entsprechenden Gene in der nicht-transformierten Ausgangs-Zelllinie B42-htLG berechnet. Da die Gene Wnt1, Tbx5 und Ret in dieser Zelllinie nicht exprimiert waren, war hier eine relative Berechnung nicht möglich. Die Expression dieser Gene konnte somit nur semiquantitativ angegeben werden.

Zur Bestimmung der Ret-Expression in den strahlentransformierten B42-Zelllinien wurde die Zelllinie SHSY als Positivkontrolle verwendet, bei der die EC- und TK-Domäne von Ret in gleicher Stärke exprimiert wurden (Unger et al., 2004). Dieser Befund wurde in der Realtime RT-PCR Analyse bestätigt und diente als Vergleich zur Ret-Expression in den B42-Zelllinien (Abb. 42, 43).

Die Gene Arf3, Tbx3, Brca1, Brca2, Mus81 und FancA zeigten im Vergleich mit der nicht-transformierten Zelllinie B42-htLG keine veränderte Expression.

Die deutlichste Abweichung von einer normalen Expression zeigten die Gene Has2 und Grid1. Has2, welches in der Zelllinie B42-16 strukturell verändert ist, wird 41fach über-exprimiert. In der Zelllinie B42-11, in der für das Gen Has2 keine strukturelle Veränderung nachgewiesen werden konnte, ist Has2 zweifach exprimiert wie in B42-htLG. Das Gen Grid1, das in der Zelllinie B42-16 strukturell umgelagert und mit dem Gen ZHX2 fusioniert ist, wird in dieser Zelllinie dreifach überexprimiert. Obwohl Grid1

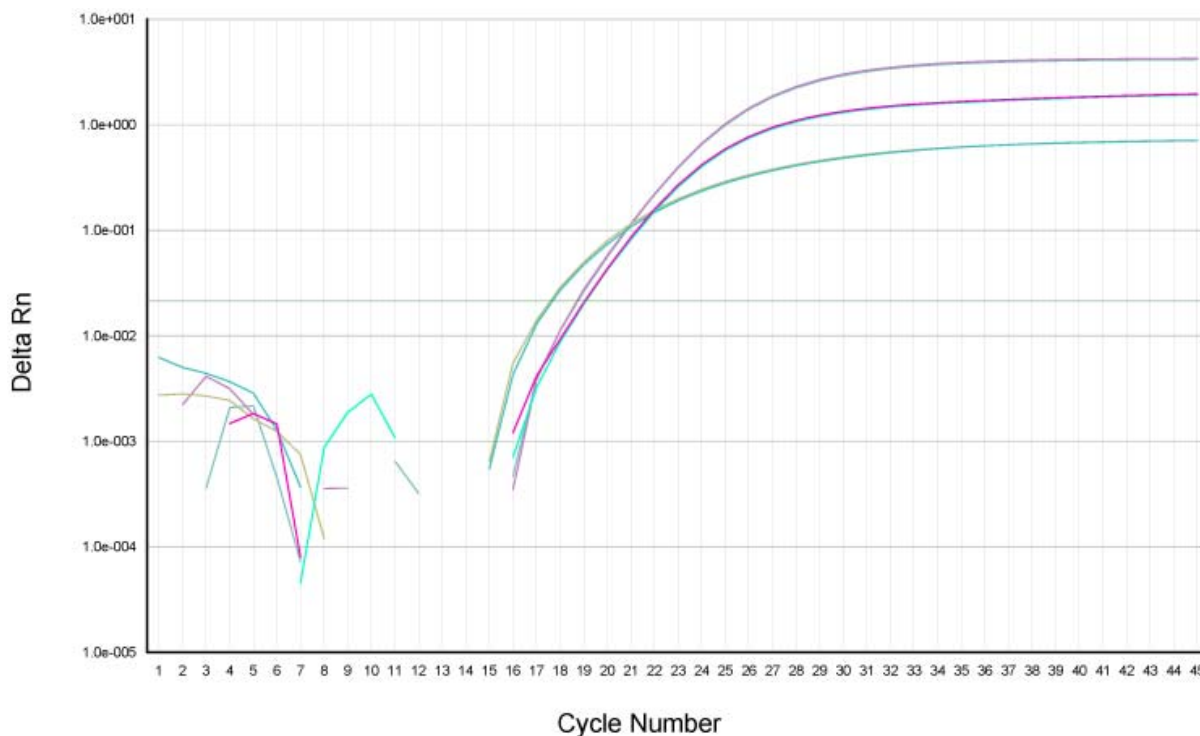
in der Zelllinie B42-11 strukturell unverändert ist, wird dieses Gen hier 32fach überexprimiert.

Das Gen CPM zeigt in der Zelllinie B42-11 normale Expression und in der Zelllinie B42-16 eine leicht erhöhte (1,4fache) Expression. Die Expression des Tumorsuppressorgen p53 ist in der Zelllinie B42-11 leicht vermindert (0,6fach), aber in B42-16 auf normalem Niveau.

Von den Genen, deren Expression nur semiquantitativ bestimmt werden konnte, ist Wnt1 in B42-11 nicht exprimiert, zeigt aber in B42-16 eine normale Expression. Tbx5 ist in B42-11 normal, aber in B42-16 nicht exprimiert.

Bei der Untersuchung der Expression der Ret-TK und -EC-Domänen, welche in B42htLG nicht exprimiert sind, zeigte B42-11 gleiche Expression der TK- und EC-Domänen. Bei der Zelllinie B42-16 war eine höhere Expression von TK- im Vergleich zur EC-Domäne festzustellen (unbalancierte Expression).

Abb. 42: Realtime RT-PCR Kurven der Sonden Retex10-11 und Retex12-13 mit der Kontroll-Zelllinie SHSY



Im Diagramm sind die Anzahl der PCR-Zyklen („Cycle-Number“) auf der X-Achse gegen die gemessene Fluoreszenzintensität der Taqman-Sonden aufgetragen. Zur Bestimmung der C_T -Werte („Thres-

Ergebnisse

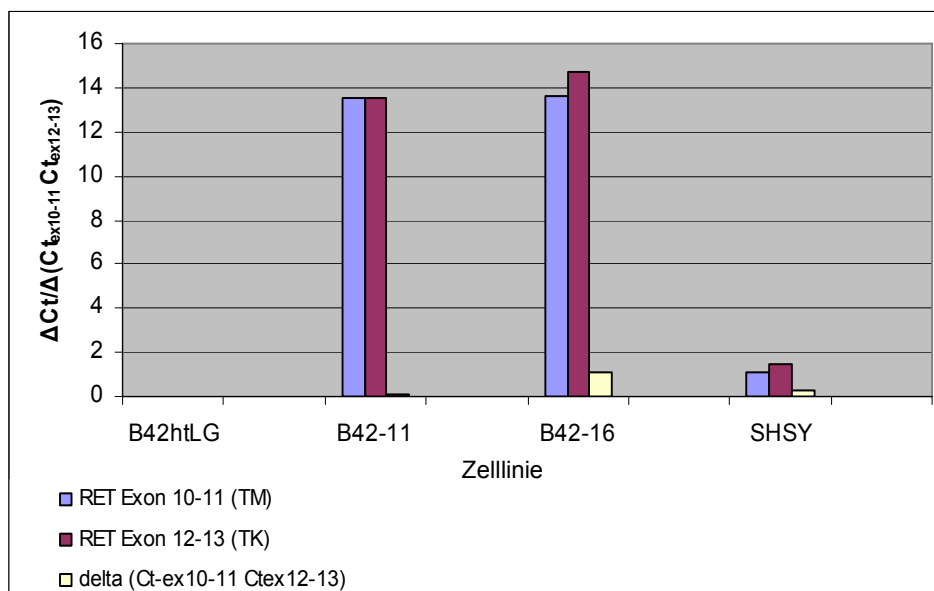
hold Cycle“) ist der Grenzwert („Threshold“, grüne horizontale Linie) eingetragen. Der X-Wert des Schnittpunktes der Grenz-Wert-Linie mit den Amplifikations-Kurven stellt den C_T -Wert dar. Die grüne und dunkelgrüne Linie ist die Amplifikations-Kurve der β -Actin-Sonde mit $C_T=17,5$, die dunkellila und dunkelgrüne Linie ($C_T=18,6$) entspricht der Retex10-11-Sonde (Tab. 8) und die hellgrüne und helllila Kurve ($C_T=19$) der Retex12-13 Sonde (Tab. 8).

Tab. 16: Realtime RT-PCR Analyse von Kandidatengenen in B42-11 und B42-16

Gen	Relative mRNA Expression		Lokalisation	Genomische Position	Beschreibung	Karzinogenese-assoziierte Funktion	Referenz
	B42-11	B42-16					
Has2	2,1	40,5	8q24.13	8:122694719-122722811	Hyaluronan synthase 2	Begünstigt Tumor-Progression	Udabage et al., 2005
Grid1	31,6	2,9	10q23.2	10:87351731-88116230	Glutamate receptor delta-1 subunit precursor (GluR delta-1)	Begünstigt Tumor-Progression	Haas et al., 2005
Wnt1*	Keine Expression	Expression	12q13.12	12:47658503-47662746	Proto-oncogene protein Wnt-1 precursor	Proto-Onkogen	Ozaki et al., 2005
Arf3	0,8	1,1	12q13.12	12:47616259-47637577	ADP-ribosylation factor 3	unklar	Hirai et al., 1996
CPM	0,9	1,4	12q15	12:67531227-67612891	Carboxypeptidase M precursor	unklar	Pessoa et al, 2002
Tbx3	0,9	0,8	12q24.21	12:67531227-67612891	T-box transcription factor Tbx3	Begünstigt Tumor-Wachstum	PlatoKeineva, 2007
Tbx5*	Expression	Keine Expression	12q24.21	12:113333477-113333712	T-box transcription factor Tbx5	Inhibiert Zellwachstum	Hatcher et al., 2001
Brca1	0,8	1,1	17q21.31	17:38449840-38530994	Breast cancer type 1 susceptibility protein	Tumor-Supressor	Bishop, 1994
Brca2	0,8	1,1	13q13.1	13:31787617-31871806	Breast cancer type 2 susceptibility protein (Fanconi anemia group D1 protein)	Tumor-Supressor	Bishop, 1994
p53	0,6	1,2	17p13.1	17:7512464-7531642	Tumor suppressor p53	Tumor-Supressor	Fridlyand, 2006
MUS81	0,8	1,1	11q13.1	11:65384525-65390485	Crossover junction endonuclease MUS81	Tumor-Supressor	McPherson et al., 2004
FANCA	0,9	1,1	16q24.3	16:88331460-88410566	Fanconi anemia group A protein	Tumor-Supressor	Wreesmann et al., 2007
Ret-TK*	Expression	Expression	10q11.2/Exon 10-11	10:42929010-42930190	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor ret precursor - Tyrosine Kinase (TK) Domain	Proto-Onkogen	Rhoden et al., 2004
Ret-EC*	Expression	Expression	10q11.2/Exon 12-13	10:42932038-42933934	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor ret precursor - Extra-cellular (EC) Domain	Proto-Onkogen	Rhoden et al., 2004
Ret/PTC1*	Keine Expression	Keine Expression	10q25.2/10q11.2	Fusion H4 Exon1/Ret Exon12	Probable palmitoyltransferase ZDHHC6/Proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor ret precursor	Proto-Onkogen	Klugbauer et al., 1995
Ret/PTC3*	Keine Expression	Keine Expression	10q11.23/10q11.2	Fusion Ele1 Exon6/Ret Exon12	Ret-activating protein Ele1/Proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor ret precursor	Proto-Onkogen	Klugbauer et al., 1995

Semiquantitative Bestimmung der Expression, da Bestimmung relativ zu B42-hLHG nicht möglich war.

Abb. 43: Semiquantitative Bestimmung der Expression Ret-TK- und –EC-Domäne



Real-Time RT-PCR (Taqman) der Zelllinien B42-htLG, -11 und -16 und SHSY (Positiv-Kontrolle) mit Exon-übergreifenden Primern. Die Primer sind für die extrazelluläre (EC) und Tyrosinkinase-Domäne des Ret-Gens spezifisch. Die blauen Balken zeigen den $\Delta\Delta C_t$ -Wert der TM- und die roten Balken den der EC-Domäne. Die Höhe der gelben Balken gibt den Unterschied zwischen EC- und TK-Expression wieder. B42-htLG zeigt keine Expression von EC und TM, B42-11 und SHSY gleich starke (balancierte) Expression von EC und TM. Die Zelllinie B42-16 exprimiert die TK-Domäne leicht höher als die EC-Domäne.

3.3 Validierung der gefundenen Genveränderungen

3.3.1 Untersuchung der Prävalenz von Zelllinien-spezifischen Genveränderungen in Mammakarzinomen

In den Array-Painting Analysen (Tab. 12) ergaben sich für das Gen Ret (Zelllinie B42-11) und für die Gene Has2 und Grid1 (Zelllinie B42-16) strukturelle Umlagerungen, deren zugrunde liegenden Bruchpunkte charakterisiert werden konnten. Für diese auf genomischer Ebene veränderten Gene konnte darüber hinaus eine Überexpression auf mRNA- und Protein-Ebene (IHC) gezeigt werden. Zur Untersuchung der Veränderung dieser Gene in Mammakarzinomen wurde ein Gewebe-Array mit 70 Mammakarzinomen unter Verwendung translokations-spezifischer FISH-Sonden hybridisiert. Die FISH-Analyse erfolgte in Interphasen-Kerne der Gewebe-Schnitte. Dabei konnte gezeigt werden, dass die in den Zelllinien gefundenen Veränderungen auch in nativen sporadischen Tumoren vorkommen. Bemerkenswert bei der Auswertung war, dass die Veränderungen in den Tumorgeweben heterogen verteilt war. Eine Übersicht über die Ergebnisse dieser Untersuchungen gibt Tab. 17. Im Vergleich zeigte sich, dass die Genveränderung von Has2 mit einer Prävalenz von 29 % in den untersuchten Brustkrebs-Fällen am häufigsten vorkam, gefolgt von Grid1 (15 %) und Ret (13 %).

3.3.1.1 Untersuchung der Umlagerung des Has2-Gens auf Brusttumor-Gewebe-Arrays

Bei der Überprüfung der Häufigkeit der Umlagerung des Has2 Gens konnten 68 von 70 Fällen in die Auswertung aufgenommen werden. Dabei zeigten 19 Fälle (28 %) eine Has2-Veränderung. 17 Fälle zeigten gespaltene FISH-Signale, welche eine strukturelle Veränderung des Gens anzeigen, und 2 Fälle vermehrte FISH-Signale, was auf eine Amplifikation des Gens hindeutet. Insgesamt konnten in den untersuchten Geweben Genveränderungen in 9,2 % - 91,4 % der Zellen nachgewiesen werden (Median: 25,3 %).

3.3.1.2 Untersuchung der Umlagerung des Grid1-Gens auf Brusttumor-Gewebe-Arrays

Nach Hybridisierung des Gewebe-Arrays mit der für die Umlagerung des Gens Grid1 spezifischen FISH-Sonde und Aufnahme der dreidimensionalen Bilderstapel konnten 67 der 70 Tumoren, die sich auf dem Array befanden, in die Auswertung aufgenommen werden. Davon zeigten 10 Fälle (15 %) eine Grid1-Veränderung (10,9 % bis 38,8 % veränderte Zellen). Der Median der Häufigkeit an veränderten Zellen pro untersuchtem Gewebe lag bei 17,8 Prozent.

3.3.1.3 Überprüfung der Umlagerung des Ret-Gens auf Brusttumor-Gewebe-Arrays

Von den 70 Fällen des Gewebe-Arrays, die mit der für die Umlagerung des Ret-Gens spezifischen Sonde hybridisiert wurden, konnten 62 Fälle in die Auswertung aufgenommen werden. Davon zeigten 8 Fälle (13 %) eine Ret-Veränderung. Der Anteil an Zellen mit Ret-Umlagerung innerhalb der untersuchten Gewebe lag zwischen 9,5 % und 31,1 % (Median: 14,1 %).

Tab. 17: Zusammenfassung der Ergebnisse der Interphase-FISH auf Brusttumor-Gewebe-Arrays

Gen	BAC-Klone, die als FISH-Sonden benutzt wurden	Anzahl der ausgewerteten Tumorgewebe	Anzahl der Fälle mit Umlagerungen [%]	Auflistung der Fälle mit Veränderung (Position auf dem Gewebe-Array/klinische Beschreibung gemäß Fußnote)	Häufigkeit der veränderten Zellen in den positiven Fällen: Bereich [%]/Median [%]
Grid1	RP11-369M20 RP11-711N15	67	10 (15)	A6 ^{CIS/HER} , C9 ^{ID/AR/HER} , E4 ^{ID/AR/ER/PR} , E6 ^{ID/ER/HER} , E14 ^{ID/HER} , G9 ^{ID/HER} , G11 ^{ID} , G15 ^{ID/AR/ER} , I6 ^{IL/HER} , I7 ^{ID/M}	10,9 – 38,8 / 17,8
Has2	RP11-115N9 RP11-711N15	68	19* (28)	A6 ^{CIS/HER/*} , A9 ^{ID/ER/PR/HER*} , A11 ^{ID/AR/ER/PR} , A12 ^{ID/HER} , A14 ^{ID} , C8 ^{ID/AR/HER} , C9 ^{ID/M/AR/HER} , C10 ^{ID/AR/ER/PR/HER} , C12 ^{ID/HER} , E3 ^{ID} , E5 ^{ID/HER} , E9 ^{ID/HER} , G4 ^{ID/AR/ER} , G5 ^{ID/M/HER/*} , G12 ^{ID/ER/HER} , G15 ^{ID/AR/ER} , I12 ^{ID/AR/ER/PR} , I14 ^{ID/M/AR/ER/PR/HER} , I15 ^{ID/HER}	9,2 – 91,4 / 25,3
Ret	YAC313F4/214H10 YAC344H4	62	8 (13)	A14/M, C12 ^{ID/HER} , E9 ^{ID/HER} , E13 ^{ID/AR/ER/HER} , G9 ^{ID/HER} , G12 ^{ID/ER/HER} , I12 ^{ID/AR/ER/PR} , I13 ^{ID/AR/ER/PR/HER}	9,5 – 31,1 / 14,1

^M: metastasierender Tumor: entweder N1-3 or M1 (25 von 70 Tumoren)

^{AR}: Androgen-Rezeptor-positive Fälle (36 von 70 Tumoren)

^{ER}: Östrogen-Rezeptor-positive Fälle (37 von 70 Tumoren)

^{PR}: Progesteron-Rezeptor-positive Fälle (28 von 70 Tumoren)

^{HER}: HER2/neu-Amplifikation (43 von 70 Tumoren)

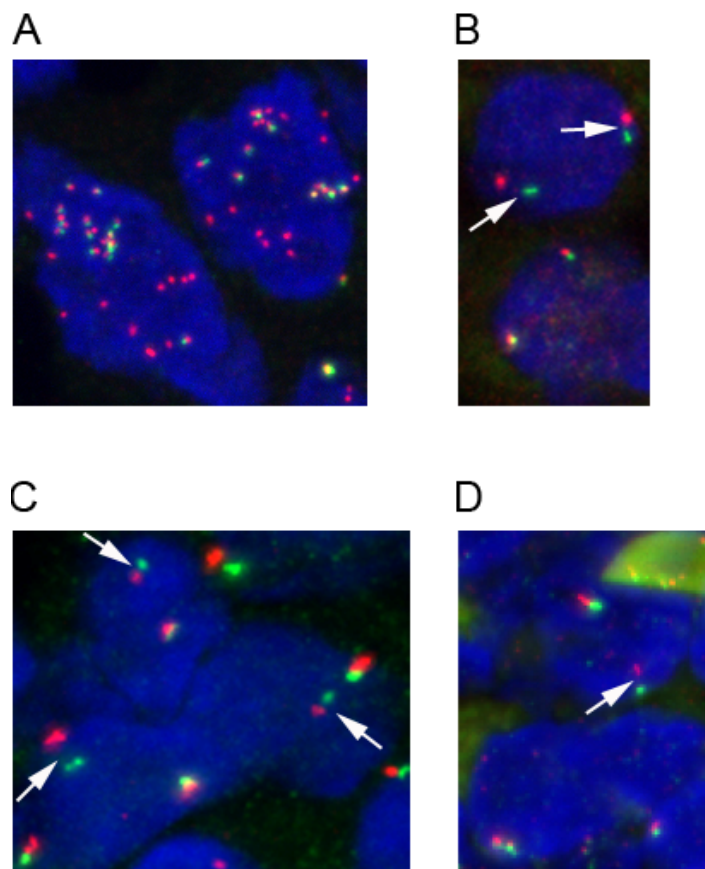
^{ID}: Invasiv-duktales Karzinome (64 von 70 Tumoren)

^{IL}: Invasiv-lobuläre Karzinome (4 von 70 Tumoren)

^{CIS}: Duktale Karzinome *in situ* (2 von 70 Tumoren)

*: Amplifiziertes Has2-FISH-Signal anstatt einer Translokation

Abb. 44: Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit genspezifischen Sonden für die Gene Has2, Grid1 und Ret auf Brustkrebs-Gewebe-Arrays mit Paraffin-eingebetteten Geweben von Brusttumoren



Für die Hybridisierung der Mammakarzinom-Gewebe wurden FISH Sonden (RP11-115M09, rot-markiert und RP11-497O14, grün-markiert), die den chromosomalen Bruchpunkt von Has2 in der Zelllinie B42-16 flankieren, verwendet. A: Zwei Zellen des Mammakarzinoms (B9) mit vielen roten FISH-Signalen, die eine „High-Level“-Amplifikation des Gens anzeigen. B: Brust-Tumor-Zellen (C9), von denen die obere eine Umlagerung des Has2-Gens zeigt (Pfeil; getrennte rote und grüne Signale), während die untere ein normales Signalmuster (fusionierte rote und grüne Signale) aufweist.

Für die Überprüfung der in B42-16 charakterisierten Umlagerung des Grid1-Gens wurden die Bruchpunkt-flankierenden BAC-Klone RP11-711N15 (rot-markiert) und RP11-396M20 (grün-markiert) verwendet. C: Die Umlagerung im Gen Grid1 im Tumor G9 wird durch gespaltene rote und grüne Signale (Pfeile) angezeigt. Zum Nachweis der in der Zelllinie B42-11 nachgewiesenen Umlagerung des Ret-Gens wurden die Bruchpunkt-flankierenden YAC-Klone 313F4 und 214H10 (proximal, grün-markiert) und 344H4 (distal, rot-markiert) verwendet. D: Die Mammakarzinomzelle des Falles G12 im oberen Bereich des Bildes zeigt ein gespaltenes FISH-Signal und somit eine Umlagerung im Ret-Gen.

4 Diskussion

4.1.1 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, BAC-Array basierte Techniken zu etablieren und mit deren Hilfe Veränderungen von Krebsgenen in einem Zellkultur-Modell der strahleninduzierten Karzinogenese von Brustzellen zu untersuchen. Hierzu wurden zum einen Kopienzahlveränderungen und zum anderen strukturelle chromosomale Umlagerungen von Genen ermittelt und in weiteren molekular-biologischen Analysen charakterisiert. Darüber hinaus sollte eine größere Anzahl an Mammakarzinomen hinsichtlich der gefundenen Veränderungen getestet und die Prävalenz dieser Veränderungen in diesen Tumoren festgestellt werden. Somit sollte die klinische Relevanz der in dem Zellkultur-Modell nachgewiesenen Veränderungen belegt und ihre mögliche Rolle während der Mammakarzinogenese aufgedeckt werden.

4.1.2 Überprüfung der strahlentransformierten Zelllinien auf Expression von bekannten mit der Mammakarzinogenese assoziierten Genen

Die tumorigenen Zelllinien wurden hinsichtlich der Expression von typischen Krebsgenen der Mammakarzinogenese überprüft. Es wurde die mRNA-Expression der Gene BRCA1, BRCA2, TP53 und FancA untersucht, die in früheren Studien häufig mit der Brustkrebs-Entstehung in Verbindung gebracht wurden. Brca1 und Brca2 spielen vor allem in der familiär vererbten Mammakarzinogenese eine große Rolle (Bishop, 1994). Sowohl Brca1, Brca2 als auch FancA sind dabei in DNA-Reparatur-Prozesse eingebunden. P53 gehört, wie die anderen genannten Gene auch, in die Gruppe der Tumorsuppressorgene (Fridlyand, et al., 2006) und hat in der Zellzyklus-Kontrolle eine regulatorische Funktion. Bei der Expressions-Analyse dieser Gene hat sich in beiden strahlentransformierten Zelllinien eine normale Expression gezeigt. Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass die tumorigenen Eigenschaften der Zelllinien durch Deregulation eines dieser Gene verursacht worden sein könnten. Vielmehr deutet dieser Befund darauf hin, dass bei der Strahlenkarzinogenese in Brustzellen andere Wege beschritten werden.

4.1.3 Molekularzytogenetische Veränderungen in Mammakarzinomen und im Zellkultur-Modell B42

Um alternative Wege der Krebsentstehung in epithelialen Brustzellen aufzudecken, wurden strahlentransformierte B42-Zelllinien zunächst auf Genkopienzahlveränderungen mittels Array-CGH untersucht und dabei folgende wiederkehrende Veränderungen festgestellt. Die Zelllinie B42-11 zeigte genomische Zugewinne auf den Chromosomen 7 (7p22.3-q11.2), 8 (8p23.3-8q12.1) und einen Verlust auf Chromosom 10 (10p15-q11.2). In der Zelllinie B42-16 waren Amplifikationen auf den Chromosomen 8 (8p23-8p12 und 8p11.1-q24.3), 12 (12q24.1-q24.3) und 13 (13q14-q34) und Deletionen auf den Chromosomen 4 (4q31.3-35.2), 10 (10p15-10p13) und 13 (13q14-q34) festzustellen. Da die veränderten Regionen eine Größe zwischen 16 und 98,2 Mb aufwiesen, konnten aus der Vielzahl von annotierten Genen keine einzelnen Kandidatengene aus den Datenbanken ermittelt werden, die mit dem tumorigenen Phänotyp in Verbindung gebracht werden könnten. Daher wurden zunächst die in den B42-Zelllinien veränderten chromosomalen Regionen mit den am häufigsten in Mammakarzinomen auftretenden Kopienzahlveränderungen verglichen, die eine Deregulation zur Folge hatten (Bergamaschi, et al., 2006). Hierbei wurden Gene identifiziert, die zum einen mit sehr hoher Prävalenz in Mammakarzinomen verändert sind und die zudem eine starke Korrelation von genomischer Kopienzahlveränderung mit Expression auf Transkriptions- und Protein-Ebene aufzeigen. Im Falle von DNA-Zugewinnen handelt es sich dabei um Proto-Onkogene auf den Chromosomen 4 (Herc5, 4q22.1 und Eif-4E, 4q23), 8 (c-myc, 8q24.21), 11 (Cyclin D1, 11q13.3) und Chromosom 17 (Her-2, 17q12). Herc-5 und Cyclin-D1 sind Gene, die in Prozesse bei der Zellzykluskontrolle eingebunden sind, EIF-4E kodiert für ein Initiator-molekül bei der Protein-Translation, c-myc ist ein Transkriptionsfaktor und Her-2 ein Tyrosinkinase-Rezeptor. Im Falle von DNA-Verlusten in Mammakarzinomen sind häufig Tumorsuppressorgene auf den Chromosomen 10 (Pten, 10q23.31), 11 (Atm, 11q22.3), 12 (p27, 12p13.2), 13 (Brca-2, 13q13.1 und Rb, 13q14.2) und 17 (p53, 17p13.1) betroffen. Die Funktion des Gens Pten wird mit der Inhibition des Akt-Signalübertragungsweges, die der Gene Rb, p27, Atm und p53 als Gene der Zellzykluskontrolle und Brca-2 als DNA-Reparatur-Protein beschrieben (Bergamaschi, et al., 2006). In den tumorigenen strahlentransformierten Zelllinien B42-11 und B42-16 lässt sich bis auf die Amplifikation von c-myc auf 8q24.21 in beiden Zelllinien keine

Kopienzahlveränderung dieser Gene nachweisen. Somit deutet auch dieser Vergleich auf einen alternativen Karzinogenese-Weg in strahlentransformierten Brustzellen hin.

Darüber hinaus wurde ein Vergleich mit publizierten Kopienzahlveränderungen von 812 sporadischen Mammakarzinomen durchgeführt, die in der Datenbank Progenetix (www.progenetix.de, Baudis und Cleary, 2001) zugänglich sind. Dabei zeigte sich ebenfalls wenig Übereinstimmung. Die einzige Veränderung, die sich mit über 10 % Prävalenz auch in den Summen-Profilen der Datenbank, wiederfindet ist die Amplifikation des q-Arms von Chromosom 8, von welcher auch die Region, in der das Gen c-myc liegt, betroffen ist.

Eine Über-Expression von c-myc wurde bereits nach der Immortalisierung mit hTERT in der epithelialen primären Brustzelllinie HME gezeigt (Kim et al., 2002). Des Weiteren wurde in einer Studie mit transgenen Mäusen herausgefunden, dass die alleinige Überexpression von c-myc keine Tumoren auslöst (Sinn et al., 1987). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass c-myc auch als Transkriptionsfaktor von hTERT fungiert. C-myc bildet dabei zusammen mit dem Protein C-max ein Heterodimer, welches an den Promoter von hTERT bindet und die DNA in ihrer räumlichen Struktur aufbiegt, so dass weitere Transkriptions-Faktoren an die Promoter-Sequenz binden können und damit die Transkription von hTERT begünstigt wird (Lebel et al., 2007). Da die mit hTERT immortalisierte Ausgangszelllinie B42htLG keinen tumorigenen Phänotyp (kein Wachstum in Weichagar durch Überwindung der Kontakt-Inhibition und keine Induktion von Tumoren in Nacktmäusen) zeigt, wirkt sich die Amplifikation von c-myc vermutlich auf eine stärkere Expression von hTERT, aber nicht auf die Expression von Faktoren aus, die eine maligne Transformation der Zellen zur Folge hätten. Somit handelt es sich bei dieser Genveränderung um eine sehr frühe Alteration bei der Karzinogenese von Brustzellen, die den Schritt der Immortalisierung einleitet und auch in den strahlentransformierten Zelllinien zu finden ist.

Bis auf diese Amplifikation von c-myc auf Chromosom 8q24.21 ließen sich bei diesen Vergleichen keine Übereinstimmungen zwischen den CGH-Daten von Mammakarzinomen und den B42-Zelllinien finden. Dies ist zunächst überraschend, weil es die Frage aufwirft, ob die in den B42-Zelllinien nachgewiesenen Veränderungen für die Entwicklung von Mammakarzinomen überhaupt von Bedeutung sind. Bei der Bewer-

tung der aufgeführten Befunde, die nur auf einen Vergleich mit den häufigsten Mammakarzinom-Veränderungen abzielten, sollte allerdings auch berücksichtigt werden, dass Mammakarzinome eine äußerst heterogene Gruppe von malignen Tumoren auf genetischer Ebene darstellen (Campbell und Polyak, 2007). In der Studie von Fridlyand et al. (2006) wurden deshalb die Mammakarzinome hinsichtlich der Genkopienzahl in drei Gruppen unterteilt: die „1q/16q“-Gruppe mit Amplifikation von 1q und Deletion von 16q, die „Complex“-Gruppe, die viele verschiedene Amplifikationen und Deletion aufwies, und die „Amplifier“-Gruppe, in denen neben weiteren Veränderungen vor allem Amplifikationen von 8q und 12p häufiger vorkamen als in den anderen Gruppen. Die „Complex“-Gruppe, die sich durch komplexe Veränderungen der Mammakarzinome auszeichnet, könnte mit den Genkopienzahlveränderungen in den B42-Zelllinien am besten in Übereinstimmung gebracht werden. Diese Annahme deckt sich auch mit der Tatsache, dass ionisierende Strahlung mit zunehmender Dosis auch komplexe Chromosomen-Veränderungen induziert (Brasemann et al., 2005). Da zur Strahlentransformation der B42-Zelllinien eine fraktionierte Gesamtdosis von 40 Gy verwendet wurde, lassen sich die vorliegenden Befunde aus dem Vergleich von B42-Zelllinien mit Mammakarzinomen sehr gut damit erklären.

Zu berücksichtigen ist auch, dass die in Mammakarzinomen auftretenden transformierten Zellpopulationen einem evolutions-ähnlichem Selektionsdruck ausgesetzt sind, der dazu führt, dass die Zellen, zusätzlich zu den Primär-Veränderungen der Karzinome auch weitere Genveränderungen anreichern (Merlo, et al., 2006). In diesem Zusammenhang lassen sich die Zelllinien B42-11 und B42-16 als zwei Zellklone interpretieren, die sich unmittelbar im neoplastischen Stadium nach der Strahlen-Transformation befinden. Im Unterschied zu fortgeschrittenen Mammakarzinomen, die in verschiedenen Studien (Fridlyand, et al., 2006, Pinkel et al., 1998) untersucht worden sind, haben diese Zellen noch keine Tumor-Evolution durchlaufen und demnach auch keine neuen Genveränderungen angereichert. Die in den untersuchten Zelllinien B42-11 und B42-16 gefundenen Genveränderungen dürften somit die Veränderungen eines sehr frühen Tumor-Stadiums repräsentieren. Dies zeigt sich auch deutlich anhand der c-myc Amplifikation bzw. Ausbildung des Isochromosoms 8 bei der Immortalisierung der Zellen, da dieser Marker in einem sehr frühen Stadium der Zelltransformation (Immortalisierung) auftritt und auch bei Mammakarzinomen als sehr frühes Ereignis angesehen wird (Aulmann et al., 2006).

Unter Berücksichtigung aller aufgeführten Argumente sind die in den B42-Zelllinien beobachteten Genkopienzahlveränderungen gut mit der Induktion der Zelltransformation durch ionisierende Strahlung in Einklang zu bringen. Es ist ferner anzunehmen, dass die in den Zelllinien gefundenen Veränderungen am besten mit dem Aberrationsmuster von Mammakarzinomen mit komplexen Veränderungen (Fridlyand, et al., 2006) übereinstimmen.

4.1.4 Genomische Rearrangierungen in den B42 Zellkultur Modellen

Die Exposition von Zellen mit ionisierender Strahlung verursacht bei nachfolgender Fehlreparatur der primären DNA Doppelstrangbrüche neben den bereits diskutierten genomischen Kopienzahlveränderungen auch strukturelle Rearrangierungen (Jeggo und Lobrich, 2006).

Solche genomischen Rearrangierungen wurden in den B42-Zelllinien auch durch spektrale Karyotyp-Analyse nachgewiesen. Außer dem Isochromosom 8 müssen in den Zelllinien alle übrigen Markerchromosomen durch die Strahlentransformation entstanden sein, da sie erst in den transformierten Zelllinien auftreten. Es ist bemerkenswert, dass neben den zu erwartenden reziproken Austauschprozessen (z.B. Translokation $t(8;10)(q24.1;q23.2)$, siehe Tab. 12, Marker M16-2) vor allem auch komplexe Veränderungen auftraten, die durch mehr als zwei Chromosomenbrüche entstanden sind oder verschiedene Aberrationsformen (Inversion, Deletion, Insertion) in sich vereinigen. Beispiele für solche komplexe Veränderungen sind die Marker M16-4 und M16-5 (siehe Tab. 12). Diese Befunde stützen wiederum die bereits erwähnte Annahme, dass sich die Karzinogenese in den B42-Zelllinien am besten mit Mammakarzinomen, die ein komplexes Aberrationsmuster aufweisen, in Einklang bringen lässt.

Die Bedeutung von Zellkultur-Modellen der Karzinogenese in epithelialen Brustzellen liegt nun genau in der Tatsache begründet, dass sich in diesen Zelllinien auch strukturelle Umlagerungen sehr gut analysieren lassen, die in Mammakarzinomen kaum nachweisbar sind, weil die überwiegende Mehrzahl der Karzinome nur als nicht-kultivierbares Paraffingewebe vorliegt. Man kann spekulieren, dass tatsächlich in Mammakarzinomen sehr viel mehr Genveränderungen vorliegen, die auf Rearrangie-

rungen zurückzuführen sind, als bislang nachgewiesen wurden. Diese Hypothese wird von der Tatsache gestützt, dass auch in anderen soliden malignen Tumoren, wie z.B. papillären Schilddrüsenkarzinomen, strukturelle Umlagerungen sehr häufige Phänomene sind. Ein Beispiel für sehr gut auf Sequenz-Ebene charakterisierte Rearrangierungen in Form von Translokationen und Inversionen, sind die in papillären Schilddrüsenkarzinomen häufig auftretenden so genannten Ret/PTC-Umlagerungen (Klugbauer et al., 1995). Dabei handelt es sich um chromosomale Umlagerungen, bei denen die katalytisch aktive Domäne des Ret-Gens, einer Rezeptor-Tyrosinkinase, mit dem starken Promoter eines anderen ubiquitär exprimierten „Haushalts“-Gens (z.B. E1a oder H4) fusioniert. Dadurch kommt es zur Überexpression der katalytischen Domäne von Ret, was zur konstitutiven Aktivierung des MAP-Kinase-Signalübertragungswegs und damit zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die die Zellteilung vorantreiben, führt (Ciampi und Nikiforov, 2007).

Ein sehr interessanter Befund in diesem Zusammenhang ist, dass eine Subgruppe von Mammakarzinomen auch Ret überexprimiert (Prof. G. Thomas, persönliche Mitteilung). Darüber hinaus war Ret auch in den B42-Zelllinien von Veränderungen betroffen (vgl. Diskussion 4.1.5). Dies legt den Verdacht nahe, dass ähnliche Veränderungen, wie sie in papillären Schilddrüsenkarzinomen auftreten, auch in Mammakarzinomen vorliegen könnten. Leider war es im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht mehr möglich, Mammakarzinome mit Ret Veränderungen auf ihre chromosomalen Aberrationsmuster z.B. mittels Array-CGH zu untersuchen.

Neben der Möglichkeit, strukturelle Umlagerungen während der Mammakarzinogenese zu untersuchen, haben die in dieser Arbeit verwendeten Zellkultur-Modelle auch den Vorteil, dass der Prozess der Karzinogenese schrittweise untersucht und auf eine spezifische Noxe zurückgeführt werden kann. Die ursprünglichen transformierenden Genveränderungen würden sich nur in einem sehr frühen Stadium der Mammakarzinogenese identifizieren lassen. Theoretisch könnte hierfür Material von Tumorstadien (z.B. Hyperplasie oder Dysplasie) verwendet werden. Da aber im Vorläufer-Stadium noch nicht klar ist, ob sich aus diesen wirklich ein Mammakarzinom entwickelt, wären die Ergebnisse einer solchen Analyse der Genveränderungen nicht sehr aussagekräftig. Für die Erforschung von Genveränderungen in frühen Stadien der Tumor-Entwicklung eignen sich deshalb die verwendeten Zellkul-

tur-Modelle, in denen sich das Stadium der Immortalisierung, das in der Ausgangszelllinie vorliegt und das Stadium der malignen Transformation, das in den transformierten Zelllinien existiert, getrennt voneinander untersuchen lassen.

Mit diesen Zellkultur-Modellen lassen sich demnach Fragen nach strahlenspezifischen Aberrationsmustern in Mammakarzinomen und zur zeitlichen Abfolge von Veränderungen während der Tumorentstehung beantworten. Es ist aufgrund der vorliegenden Befunde nahe liegend, dass durch ionisierende Strahlung induzierte Karzinome vermehrt komplexe Aberrationsmuster aufweisen. Darüber hinaus ist anzunehmen, dass alle in den B42-Zelllinien auftretenden Aberrationen relativ frühe Veränderungen während der malignen Transformation von epithelialen Brustzellen darstellen.

4.1.5 Nachweis veränderter Kandidatengene durch Klonierung der chromosomalen Bruchpunkte

Für die nähere Charakterisierung der chromosomalen Umlagerungen, die die Ermittlung von strukturellen Genveränderungen zum Ziel hatte, wurden die in den Zelllinien B42-11 und B42-16 nachgewiesenen Markerchromosomen einer Array-Painting Analyse unterzogen. Voraussetzung dafür war die Isolierung der Markerchromosomen aus den vorliegenden Zelllinien B42-11 und B42-16. Diese beiden Zelllinien wurden für die Untersuchungen in dieser Doktorarbeit ausgewählt, da sie in Tumorigenitätstests (Überwindung der Kontakt-Inhibition durch Wachstum in Weichagar und Induktion von Tumoren nach subkutaner Induktion der Zellen in immun-supprimierten Nacktmäusen) einen tumorigenen Phänotyp aufwiesen. Die Isolierung der Markerchromosomen aus diesen Zelllinien erfolgte durch Chromosomensortierung im Durchflusszytometer (Ng und Carter, 2006).

Die durchfluss-zytometrische Gewinnung von Markerchromosomen erlaubt zum einen eine sehr hohe Reinheit der Präparation, zum anderen können in kurzer Zeit sehr viele Chromosomen (> 500) präpariert werden (Fusco et al., 1989). Alternativ dazu können Markerchromosomen auch durch Mikrodissektion („Scratching“, Laser-Mikrodissektion) von Metaphasen-Präparationen gewonnen werden (Roberts et al., 2004, Thalhammer et al., 2004). Dabei müssen sehr viele Metaphasen dissektiert

werden, um ausreichend Markerchromosomen zu isolieren, die die chromosomale DNA in den nachfolgenden Array-Painting Analysen hinreichend repräsentieren.

Die Isolation der Markerchromosomen der Zelllinie B42-16 mittels Durchfluss-Zytometrie stellte sich als sehr schwierig heraus, weil die Chromosomen in der Metaphasen-Suspension sehr schnell zum Verklumpen neigten. Dies wirkte sich auf ein sehr schnelles Verstopfen der Düse des Durchflusszytometers und eine schlechte Auflösung im Karyogramm aus. Dies konnte durch die Verwendung eines verbesserten Chromosomen-Isolations-Puffers (Ng und Carter, 2006), bei dem der pH-Wert, Salz-Konzentration und verwendetes Detergenz optimiert wurden, gelöst werden.

Für die Array-Painting Analyse musste außerdem die DNA aus den Chromosomen amplifiziert werden. Dies ist mit mehreren Verfahren wie Adaptor-Linker PCR (Ludecke et al., 1989), DOP-PCR (Telenius, et al., 1992) oder der universellen Genom-Amplifikation mit Hilfe der Genomeplex-Technologie (Fiegler et al., 2007) möglich. Im Rahmen der Etablierung von Array-Painting in dieser Arbeit wurden diese drei Methoden für die Amplifikation von chromosomaler DNA getestet, wobei sich herausstellte, dass sich DNA, die mit Linker-Adaptor-PCR amplifiziert wurde, nicht für Array-Painting-Hybridisierungen eignete. Des Weiteren hat sich aber kein Unterschied in der Hybridisierungs-Qualität von DOP- und mit Genomeplex amplifizierter DNA gezeigt, die sich beide sehr gut für die Verwendung in mit Array-Painting Analysen eigneten. Jedoch hat sich gezeigt, dass die Amplifikation mit Hilfe der Genomeplex-Technologie zuverlässiger abläuft, d.h. weniger Ausfälle bei den PCR-Reaktionen zu beobachten waren.

Nach Amplifikation der chromosomalen DNA, und bevor diese in Array-Painting Experimenten verwendet wurde, wurden reverse FISH-Analysen (Blennow, 2004) vorgenommen, um zu überprüfen welche Chromosomen sich in den Sortierungen befanden. Dabei stellte sich heraus, dass neben den Markerchromosomen teilweise normale Chromosomen in den Sortierungen enthalten waren. Dies ist damit zu erklären, dass die Markerchromosomen in einigen Fällen ähnliche Größen wie die normalen Chromosomen besaßen und deswegen nicht quantitativ von diesen im Durchfluss zu trennen waren. Dies stellte bei der Interpretation der Ergebnisse allerdings so lange keine Probleme dar, als nicht die normalen homologen Chromosomen der Marker enthalten waren.

Somit ist es gelungen, alle Markerchromosomen erfolgreich aus den beiden Zelllinien zu isolieren, zu amplifizieren und in die Array-Painting Analyse einzusetzen.

Die Array-Painting Analyse wurde erst im Jahr 2003 von Fiegler et al. publiziert und erlaubt den Nachweis von Bruchpunkt-flankierenden oder Bruchpunkt-überspannenden BAC Klonen. Meist müssen die identifizierten Bereiche des Bruchpunktes durch weitere FISH Analysen mit überlappenden BAC Klonen weiter eingegrenzt werden, da in den auf 1Mb eingegrenzten Bereichen mehr als ein Gen annotiert war. Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, eine kombinierte Anwendung von Chromosomensortierung und Array-Painting an Markerchromosomen aus epithelialen Brustzellen zu etablieren. Dazu gehörte auch die Etablierung geeigneter Auswertesoftware, wobei es keine Software gibt, die speziell für die Auswertung von Array-Painting Analysen entwickelt wurde. Die Array-Painting Experimente wurden so angelegt, dass in die Hybridisierungen von Markerchromosomen-DNA zusätzlich markierte Normal-DNA eingesetzt wurde. Dies erlaubte die Verwendung der Software CAPweb (Liva et al., 2006), die eigentlich für die Auswertung von Array-CGH-Experimenten entwickelt wurde. Durch oben beschriebenes Vorgehen konnten in der CAPweb-Auswertung (vgl. 2.2.2) die chromosomalen Regionen, die von den Markerchromosomen repräsentiert wurden, als amplifizierte Bereiche (entsprechend einem Array-CGH Profil) angezeigt werden. Somit konnten die unterschiedlichen Anteile der Markerchromosomen und die Bruchpunkt-flankierenden BAC-Klone nachgewiesen werden.

Es konnten von allen Markerchromosomen der beiden untersuchten B42-Zelllinien Array-Painting Experimente durchgeführt werden. Insgesamt wurden auf der Grundlage Bruchpunkt-flankierender Klone acht Kandidatengene identifiziert, die möglicherweise durch Chromosomenbrüche verändert worden waren und bei der strahleninduzierten Karzinogenese von Brustzellen eine Rolle spielen könnten. Durch FISH Analysen konnte gezeigt werden, dass alle Gene tatsächlich verändert vorlagen. Interessanterweise waren die Gene Has2, Grid1, Ret, Wnt-1, Arf3, Tuba1A und Cpm durch chromosomale Rearrangements verändert, während eine sehr kleine Region mit den Genen Tbx3 und Tbx5 deletiert war. Dies zeigte wiederum die sehr komplexe Natur der in den Zelllinien vorliegenden Veränderungen.

Im Folgenden werden die Funktion und gegebenenfalls die Rolle der nachgewiesenen Kandidatengene in der Mammakarzinogenese kurz erläutert:

Has2 ist eine von drei Isoformen von Hyaluron-Synthasen und stellt davon die Isoform mit der höchsten katalytischen Aktivität dar. Has2 synthetisiert das hochmolekulare (2000 kDa) Hyaluron für die extrazelluläre Matrix, wodurch dort das osmotische Milieu reguliert wird (Udabage, et al., 2005, Itano et al., 1999). Es wurde bereits gezeigt, dass die erhöhte Bildung von Hyaluron in der extrazellulären Matrix in nicht-transformierten Brustzellen zu einem Verlust der Kontakt-Inhibierung und zu einer verstärkten Zell-Migration führt und somit wesentliche Eigenschaften einer malignen Zelle beeinflusst, wie z.B. das invasive Wachstum (Itano et al., 2002, Zoltan-Jones et al., 2003). Insbesondere bei Mammakarzinomen konnte eine erhöhte und durch Osteopontin induzierte Has2-Expression im Zusammenhang mit einer erhöhten Proliferation und Malignität nachgewiesen werden (Udabage, et al., 2005, Cook et al., 2006). Darüber hinaus wurde bereits berichtet, dass Has2 den Phosphoinositol-3-Kinase/Akt-Signalübertragungsweg stimuliert, welcher mit zellulären Funktionen wie Zell-Wachstum, -Proliferation, -Differenzierung, -Motilität und -Überleben verknüpft ist (Osaki et al., 2004). Im Rahmen dieser Arbeit konnte im Hinblick auf Has2 gezeigt werden, dass eine bislang unbekannte Umlagerung dieses Gens eine Überexpression verursacht, die bei der Mammakarzinogenese vermutlich eine wichtige Rolle spielt.

Bei Grid1 (Glutamate receptor ionotropic 1) handelt es sich um einen ionotropischen Glutamatrezeptor. Die Rolle von Glutamatrezeptoren, die sensitiv für den Neurotransmitter Glutamat sind, wurde lange ausschließlich im Zusammenhang mit der Reizübermittlung im zentralen Nervensystem (ZNS) gesehen. Allerdings wird seit kurzem auch eine Beteiligung des Rezeptors an Prozessen außerhalb des ZNS, u.a. in der Tumorbologie diskutiert (Kalariti et al., 2005). So konnte in Zellkultur-Experimenten mit Lymphomzellen gezeigt werden, dass eine Überexpression von Grid1 zu einer erhöhten Proliferationsrate in diesen Zellen führt (Haas, et al., 2005).

Die Funktion der Ret-Rezeptortyrosinkinase wurde bereits unter Abschnitt 4.1.4 der Diskussion beschrieben. Auf die Bedeutung von Ret-Umlagerungen wurde bereits hingewiesen, da nachgewiesen wurde, dass eine Gruppe von Mammakarzinomen Ret überexprimiert. Zudem wird weiter unten in Abschnitt 4.1.6 der Diskussion darauf

nochmals eingegangen, wo eigenen Ergebnisse zur Prävalenz von Ret-Umlagerungen in Mammakarzinomen diskutiert werden.

Wnt-1 (Proto-oncogene protein Wnt-1 precursor; van Ooyen, 1985) ist ein Protein, das im Notch-Signalübertragungsweg eine Rolle spielt und als wichtiges Onkogen im Zusammenhang mit der Mammakarzinogenese diskutiert wird (Huang et al., 2006). Darüber hinaus wurde die Expression von Wnt-1 und die damit einhergehende Aktivierung des Notch-Signalübertragungswegs bereits in Verbindung mit der Entstehung von Mammakarzinomen in einer Studie von Collu und Brennan (2007) beschrieben.

Das Protein Arf-3 (ADP-ribosylation factor 3; (Bobak et al., 1989) ist an Prozessen des intrazellulären Proteintransports beteiligt. Darüber hinaus wurde das Gen bereits in Zusammenhang mit Heregulin, dem Liganden von Her2/neu, publiziert (Li et al., 2002).

Tbx3 und Tbx5 (T-box transcription factor 3/5; He et al., 1999; Li et al., 1997) sind Gene, die eine Rolle in der Transkriptionskontrolle von Genen spielen. Tbx3 wurde im Kontext mit einer wachstumsfördernden Funktion in Brustzellen publiziert (Platonova et al., 2007). Tbx5 hingegen wurde noch nicht in Zusammenhang mit der Mammakarzinogenese beschrieben, ebenso wie Tuba1A (Alpha-Tubulin 3, Hall und Cowan, 1985), das eine Untereinheit von Mikrotubuli bildet. Ein möglicherweise neues Krebsgen in der Mammakarzinogenese ist auch Cpm (Carbopeptidase M Precursor, Tan et al., 1989), das eine sogenannte Carbopeptidase darstellt, die C-terminale basische Reste von Peptiden entfernen kann. Dadurch könnten Proteine, die in Signalübertragungswegen beteiligt sind, beispielsweise in ihrer Struktur so verändert werden, dass sie entweder aktiviert werden und somit Tumor-fördernde Prozesse konstitutiv anschalten oder deaktiviert werden und somit inhibierende Prozesse abschalten.

Es ist somit bemerkenswert, dass hier einige der nachgewiesenen Kandidatengene (Grid1, Cpm, Tbx5) zum ersten Mal mit der Karzinogenese von Brustzellen in Verbindung gebracht werden und neue Brustkrebs-Gene darstellen könnten.

Für Has2 und Grid1 konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass in den tumorigenen Zelllinien B42-11 und B42-16 auch eine erhöhte Proteinexpression vorlag. Die Expressionsstudien auf mRNA Ebene zeigten, dass auch die Gene Wnt-1, Cpm und

Ret durch die Umlagerungen in ihrer Expression dereguliert waren. Von besonderem Interesse waren hierbei die Deletion und der Verlust der Expression von Tbx5 in B42-16. Dieser Befund konnte erst durch die FISH Experimente und die quantitative RT-PCR Analyse erhoben werden und wäre durch die Array-Painting Analyse alleine nicht hervorgetreten. Dieses Beispiel zeigt sehr deutlich, dass für eine umfassende Charakterisierung aller Veränderungen die kombinierte Anwendung verschiedener molekularzytogenetischer und molekulargenetischer Techniken erforderlich ist.

Von ganz besonderem Interesse ist die beschriebene Rearrangierung und Überexpression von Has2 und Grid1. Has2 auf Chromosom 8 ist auf eine Region in Chromosom 10 transloziert, die auch das Gen Grid1 enthält. Das Fusions-Transkript von Has2 konnte erfolgreich mit RACE kloniert werden. Dabei stellte sich heraus, dass Has2 zwischen Exon 2 und 3 gebrochen war. Die mit dem Gen fusionierte Sequenz konnte zwar bestimmt, aber nicht weiter charakterisiert werden. Da das Protein Has2 noch sehr ungenau charakterisiert ist, kann auch keine Aussage hinsichtlich des Mechanismus einer Aktivierung oder funktionellen Änderung getroffen werden. Es liegt allerdings nahe, dass die an Has2 fusionierte Sequenz die Expression des Gens regulatorisch beeinflusst, da eine starke Überexpression des Gens nachgewiesen werden konnte.

Die genomische Umlagerung von Grid1 konnte ebenfalls mit Hilfe von RACE auf Sequenz-Ebene charakterisiert werden. Dabei stellte sich heraus, dass der chromosomale Bruchpunkt des Gens ebenfalls zwischen Exon 2 und 3 lag. Dabei ist Grid1 auf eine Region auf Chromosom 8, in der das Gen Zhx2 (Kawata et al., 2003) kodiert ist, transloziert. Bei Zhx2, das ebenfalls noch nie im Zusammenhang mit Mammakarzinogenese publiziert worden ist, handelt es sich um ein noch weitgehend uncharakterisiertes Zinkfinger-Protein, das durch seine Funktion als Transkriptions-hemmendes Element bekannt ist. Da das Gen Gewebs-unspezifisch exprimiert wird („Housekeeping“-Gen), ist es vorstellbar, dass die eigentliche Funktion der Transkriptions-Kontrolle durch die Umlagerung zerstört wurde und seine Promotersequenzen vergleichbar mit dem Mechanismus bei den Ret/PTC-Umlagerungen zu einer erhöhten Grid1-Expression führt. Die Proteinstruktur von Grid1 ist relativ gut aufgeklärt. Da die translozierten Exons 1 und 2 von Grid1 für einen Bereich innerhalb der Signal-Erkennungsdomäne kodieren, könnte es sein, dass es im Fusionsgen zu einer Kon-

formationsänderung innerhalb des Proteins und einer damit verbundenen Signal-unabhängigen Aktivierung des Rezeptors gekommen ist.

Leider sind die Versuche, die Fusionsprodukte der translozierten Sequenzen der ersten beiden Exons von Grid1 und Has2 zu klonieren gescheitert, möglicherweise aufgrund einer fehlenden Expression bzw. Deletion dieser Bereiche. Nachdem bekannt ist, dass bei der Reparatur von chromosomalen Bruchpunkten die terminalen Sequenzen häufig „getrimmt“, also abgespalten werden (Jeggo und Löbrich, 2006), ist eine Deletion wahrscheinlich.

Ein weiteres wichtiges Kandidatengen aus den Untersuchungen der B42-Zelllinien ist Ret. Obwohl der Ret-Lokus nur in einer der beiden Zelllinien, B42-11, strukturell verändert vorliegt, wird das Gen in beiden strahlentransformierten Zelllinien über-exprimiert (keine Expression in der Ausgangs-Zelllinie B42-htLG). Eine Erklärung dafür könnten unterschiedliche Aktivierungsmechanismen sein. Dabei könnte in B42-16 eine Punkt-Mutation oder ein epigenetischer Mechanismus, dagegen in B42-11 eine Ret/PTC-ähnliche Rearrangierung zur Aktivierung geführt haben. Gegen eine Gen-Rearrangierung in B42-16 spricht allerdings die Tatsache, dass die Ret-TK und Ret-EC-Domänen etwa ein gleich hohes Expressions-Niveau aufwiesen (Ciampi und Nikiforov, 2007). Eine solche balancierte Expression von Ret in den strahlentransformierten Zelllinien B42-11 und B42-16 wurde außerdem bereits auch in Mammakarzinomen publiziert und unterstreicht die mögliche klinische Relevanz dieser Veränderung (Merit et al., 2002). Damit wird die Karzinogenese von Brustzellen zum ersten Mal mit der Aktivierung des MAP-Kinase Signalübertragungswegs in Zusammenhang gebracht, welcher bisher nur mit Schilddrüsenkarzinomen assoziiert wurde (Ciampi und Nikiforov, 2007). Ein weiterer Hinweis für die möglicherweise wichtige Rolle dieses Signalübertragungsweges in der Mammakarzinogenese kommt von transgenen Mäusen, die genetisch so manipuliert wurden, dass sie das für Schilddrüsenkarzinome typische Fusionsprodukt Ret/PTC1 (Fusion von Ret mit H4, Klugbauer et al., 1995) Gewebs-unspezifisch exprimierten. Erstaunlicherweise entwickelten diese Mäuse Mammakarzinome mit höheren Prävalenzen als Schilddrüsenkarzinome (Portella et al., 1996). Dieser Befund unterstreicht die potentiell wichtige Rolle von Ret-Veränderungen in Mammakarzinomen.

Die Analyse der chromosomalen Bruchpunkte in den strahlentransformierten Zelllinien B42-11 und B42-16 mit Hilfe von Array-Painting zeigte, dass in dem untersuchten Zellkultur-Modell sowohl bereits bekannte als auch neue Genveränderungen in der Mammarkarzinogenese aufgedeckt werden konnten. Somit wird deutlich, dass durch die gewählte Strategie der positionellen Klonierung von Bruchpunkten in Zellkultur-Modellen neue Krebsgene der Mammarkarzinogenese entdeckt werden können. Inwieweit die hier beschriebenen Genveränderungen auch ein strahlenspezifisches Gen-Muster widerspiegeln, kann erst in weiteren Untersuchungen an Mammarkarzinom-Kohorten mit und ohne Strahlenvorgeschichte eindeutig belegt werden. Die Tatsache, dass in den untersuchten strahlentransformierten Zelllinien B42-11 und B42-16 keine der bekannten Genveränderungen wie Brca1/2, p53 oder Her2/neu nachgewiesen werden konnten, andererseits aber Genveränderungen von Ret und Has2 stark in den Vordergrund traten, könnte auf ein solches strahleninduziertes Muster veränderter Gene hinweisen.

4.1.6 Prävalenz veränderter Gene in Mammarkarzinomen

Da es sich bei dem untersuchten Zellkultur-Modell um ein *in vitro* System handelt, stellte sich bezüglich der in den B42-Zelllinien nachgewiesenen Genveränderungen die Frage, inwieweit diese auch in Mammarkarzinomen auftreten. Um diese Frage zu beantworten wurden 70 Mammarkarzinome eines kommerziellen Gewebearrays mit Hilfe von FISH-Sonden, die für die in den Zelllinien identifizierten chromosomalen Umlagerungen der Gene Has2, Grid1 und Ret spezifisch waren, untersucht. Die Untersuchung von Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten mit Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung hat den Vorteil, dass es sich um eine Einzelzell-spezifische Technik handelt. Dadurch wird eine genaue quantitative Analyse hinsichtlich des Anteils der Zellen, die verändert sind, ermöglicht. Außerdem können Abschätzungen bzw. Berechnungen bezüglich des Ausmaßes an Heterogenität einer Genveränderung innerhalb eines Karzinom-Gewebes gemacht werden. Die untersuchten Gene wurden ausgewählt, weil sie hinsichtlich ihrer mRNA-Transkripte eine deutliche Überexpression und im Falle von Grid1 und Has2 darüber hinaus noch eine eindeutig hochregulierte Proteinexpression in den Zelllinien zeigten.

Es ist bemerkenswert, dass alle drei untersuchten Gene zwar mit unterschiedlicher Frequenz, aber in jedem Fall mit einer Prävalenz über 10 % auch in Mammarkarzi-

nomen verändert sind. Damit zeigt sich eindeutig, dass diese bisher nicht beschriebenen strukturellen Genveränderungen auch in Mammakarzinomen auftreten und eine klinische Bedeutung haben. Das Fehlen bisheriger Befunde lässt sich mit einer bislang fehlenden Nachweisstrategie für solche strukturellen Genveränderungen erklären.

Bei der dreidimensionalen Auswertung der Karzinomgewebe fiel bei allen drei Genveränderungen eine deutlich heterogene Verteilung innerhalb der Karzinome auf. Dabei war deutlich zu erkennen, dass innerhalb der Karzinom-Areale Bereiche mit einem höheren Anteil an Tumorzellen mit entsprechenden Genveränderungen und solche mit einem niedrigeren zu beobachten waren (siehe Abb. 44). Ähnliche Beobachtungen wurden bereits bei der Untersuchung von Ret/PTC-Umlagerungen in papillären Schilddrüsenkarzinomen gemacht (Unger, et al., 2004).

Von ganz besonderem Interesse ist die hohe Frequenz von 29%, mit der Has2-Veränderungen in Mammakarzinomen auftreten. Eine erhöhte Expression von Has2 wurde zwar bereits in Mammakarzinomen beschrieben (Udabage, et al., 2005), allerdings wurde die tatsächliche Prävalenz dieser Genveränderung nie systematisch untersucht. Wenn diese Veränderung fast in einem Drittel der Mammakarzinome auftritt, kann dies u.U. prognostische oder therapeutische Bedeutung haben, wie es z.B. auch für Her2/neu Amplifikation der Fall ist, die mit ähnlicher Häufigkeit in Mammakarzinomen nachgewiesen werden können (Stark et al., 2007). Um einen solchen Zusammenhang für Has2 zu verifizieren, sind weiterführende Studien und die Korrelation mit klinischen Verlaufsdaten unbedingt erforderlich.

Auch der Nachweis von Ret-Rearrangierungen in Mammakarzinomen ist von außerordentlichem Interesse, da diese Veränderung in papillären Schilddrüsenkarzinomen sehr häufig auftritt (siehe Diskussion 1.4). Wie bereits ausführlich im vorangegangenen Abschnitt diskutiert, deutet dieser Befund auf einen gemeinsamen molekularen Signalübertragungsweg in der Karzinogenese der beiden hormon-abhängigen Organe Brust und Schilddrüse hin. Auch hier sind systematische Studien an einem größeren Kollektiv von Mammakarzinomen erforderlich, um die Bedeutung von Ret-Veränderungen in der Mammakarzinogenese aufzuklären.

Dies gilt auch für Grid1-Umlagerungen, die wie bereits erwähnt, neuartige Veränderungen in Mammakarzinomen darstellen. Die Wechselwirkung mit einem spezifischen Signalübertragungsweg sind ebenfalls noch ungeklärt.

Bezüglich der Koinzidenz der gefundenen Genveränderungen in den untersuchten Mammakarzinomen ergeben sich interessante Zusammenhänge. So zeigten sich für die überprüften Rearrangierungen in den Mammakarzinom-Geweben bei zwei Fällen eine koinzidierende Veränderung von Grid1 und Has2, in nur einem Fall von Grid1 und Ret, aber in fünf Fällen von Has2 und Ret. Somit ist es wahrscheinlich, dass in einer bestimmten Gruppe von Mammakarzinomen beide betroffenen Signalübertragungswege, der PI3K-Akt- und der MAPK-Signalübertragungsweg, bei der Karzinogenese beteiligt sind.

Von den insgesamt 70 untersuchten Mammakarzinom-Geweben auf dem Gewebe-Array lagen auch einige klinischen Daten (TNM-, Androgenrezeptor-, Östrogenrezeptor-, Progesteronrezeptor- und Her2/neu-Amplifikations-Status) vor. Dabei zeigte sich, dass die meisten Genveränderungen in nicht-metastasierenden, invasiv-duktalem Mammakarzinomen vorkamen. In Bezug auf die Veränderungen des Has2-Gens ist dies ein erstaunlicher Befund, weil aufgrund der zellulären Veränderungen (erhöhte Zellmotilität und Invasivität), die mit einer erhöhten Has2-Expression einhergehen (Udabage et al., 2005), ein Zusammenhang zwischen Metastasierungsverhalten und Has2-Veränderung zu erwarten gewesen wäre. Dieser Widerspruch läßt sich möglicherweise dadurch erklären, dass es sich bei der Metastasierung von Mammakarzinomen um einen multi-faktoriellen Prozeß handelt, in dem die Überexpression von Has2 nur einen Faktor von mehreren alternativen Möglichkeiten darstellt (Wang et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Zellkultur-Modelle der malignen Transformation von Brustzellen geeignet sind, um auf chromosomalen Umlagerungen basierende Genveränderungen zu ermitteln. Die weitere Charakterisierung dieser Genveränderungen sowie die Untersuchung ihrer Prävalenz in Mammakarzinomen hat gezeigt, dass sie bei der Mammakarzinogenese beteiligt sein müssen. Des Weiteren wurde aufgrund der nachgewiesenen Prävalenz der drei untersuchten Genveränderungen auch ihre klinische Relevanz deutlich. Eine herausstechende Rolle fällt dabei der Has2-Umlagerung zu, da dieser aufgrund der hohen Frequenzen

sowohl prognostisch-diagnostische als auch therapeutische Bedeutung zukommen könnte.

5 Zusammenfassung

Die frühen genetischen Ereignisse der Mammakarzinogenese sind bislang weitgehend ungeklärt. Ebenso ist unklar, ob es strahlenspezifische Aberrationsmuster in Mammakarzinomen gibt. Um diesen Fragen nachzugehen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Zellkultur-Modell der Mammakarzinogenese, bestehend aus einer immortalisierten Ausgangszelllinie und verschiedenen strahlentransformierten Zelllinien, mit molekular-zytogenetischen Techniken untersucht. Hierbei wurden Genkopienzahl-Veränderungen sowie strukturelle Genveränderungen mittels Array-basierter Methoden, wie Array-CGH und Array-Painting, erfasst. Der große Vorteil des Zellkultur-Modells war, dass auch strukturelle Gen-Veränderungen ermittelt werden konnten. Diese betrafen vor allem die Gene *Has2*, *Grid1* und *Ret*, die auf genomischer, Transkriptions- und Proteinexpressions-Ebene Veränderungen aufwiesen. Darüber hinaus konnten diese Gen-Veränderungen in Mammakarzinomen mit zum Teil hoher Prävalenz nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass die Gene eine wichtige Rolle bei der Mammakarzinogenese spielen.

Bei der Untersuchung von Mammakarzinomen stellt sich bei der Aufklärung der frühen genetischen Ereignisse die Schwierigkeit dar, dass maligne Zellen während der Karzinogenese und der damit verbundenen Tumor-Evolution zahlreiche Gen-Veränderungen anreichern. Dadurch können die initialen Veränderungen zum einen nur noch schwer erkannt werden, zum anderen können Gen-Alterationen kaum bestimmten Stadien zugeordnet werden. Aus diesem Grund wurde ein Zellkultur-Modell verwendet, das die einzelnen Schritte der Mammakarzinogenese, über die Stadien der Immortalisierung und malignen Transformation der epithelialen Zellen, nachvollzieht. Da die tumorigenen Zelllinien unmittelbar nach der malignen Transformation ohne weitere Progression untersucht wurden, konnten die nachgewiesenen Gen-Veränderungen einem initialen Stadium der Karzinogenese zugeordnet werden.

Im Einzelnen wurden die strahlentransformierten und tumorigenen epithelialen Zelllinien B42-11 und B42-16, sowie die durch ein Telomerasekonstrukt immortalisierte epitheliale Ausgangszelllinie B42-htLG untersucht. Voruntersuchungen mit spektraler Karyotypisierung legten strukturelle, zum Teil komplexe chromosomale Umlagerungen in Form von Translokationen und Insertionen, offen. Für eine weitere Charakterisierung dieser strukturellen Veränderungen und für den Nachweis betroffener Kandi-

datengene wurde die Array-Painting-Technik etabliert, die es erlaubt chromosomale Bruchpunkte mit einer Auflösung von 1Mb zu analysieren. Dafür wurden die Markerchromosomen der Zelllinien mittels Durchfluss-Zytometrie isoliert und auf so genannte 1Mb BAC-Arrays, welche mit ca. 3400 BAC-Klonen das humane Genom im 1Mb-Abstand abdecken, hybridisiert. Dadurch konnten alle chromosomalen Bruchpunkte der untersuchten Zelllinien auf 1Mb eingegrenzt werden. Die Bruchpunkte wurden für die weitere Charakterisierung und die Identifizierung von Kandidatengenen durch FISH-Analysen mit Hilfe von BAC-Klonen positionell kloniert.

In den einzelnen Bruchpunkten wurden somit die Gene Has2, Grid1, Wnt-1, Arf-3, Tuba1A, Cpm, Tbx3 und Tbx5 in der Zelllinie B42-16 und das Gen Ret in der Zelllinie B42-11, ermittelt. Die Fusionsprodukte der Gene Has2 und Grid1, die infolge eines Austausches von Chromosom 8 und Chromosom 10 transloziert wurden, wurden durch RACE („Rapid Amplification of cDNA ends“) und nachfolgende Sequenzierung weiter charakterisiert.

Die nachgewiesenen Kandidatengene wurden auch hinsichtlich ihrer mRNA-Expression mit Taqman-realtime RT-PCR untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass die Gene Has2, Grid1, Ret, Wnt1, Cpm und Tbx5 auf Transkriptions-Ebene in den Zelllinien dereguliert sind. Die auffälligsten Abweichungen von einer normalen Expression zeigten dabei die Gene Has2, Grid1 und Ret. Die Überexpression der Gene Has2 und Grid1 konnte darüber hinaus auch auf Proteinebene belegt werden.

Für eine Bewertung der klinischen Relevanz der nachgewiesenen Gen-Veränderungen wurden Gewebe-Arrays mit 70 sporadischen Mammakarzinomen durch FISH-Analysen unter Verwendung genspezifischer DNA-Sonden untersucht und die Prävalenz der oben genannten Gen-Veränderungen ermittelt. Es zeigte sich, dass Has2 in 28 %, Grid1 in 15 % und Ret in 13 % der 70 untersuchten Mammakarzinome verändert war.

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Untersuchung eines Zellkultur-Modells der Mammakarzinogenese unbekannte strukturelle chromosomale Umlagerungen aufdeckt, die auch im Mammakarzinom auftreten. Des Weiteren wurde das Potenzial einer kombinierten Anwendung von SKY, Chromosomensortierung, Array-Painting und FISH demonstriert, die es ermöglichte neue Krebsgene und neuartige Gen-Veränderungen in der Mammakarzinogenese zu entdecken. Dieser me-

thodische Ansatz erlaubte es auch, mögliche strahlenspezifische Alterationen in Form komplexer Veränderungen und frühe genetische Ereignisse in der Karzinogenese von Brustzellen zu erfassen. Somit konnte ein wichtiger Beitrag zur Aufklärung molekularer Mechanismen in der Mammakarzinogenese geleistet werden, der auch Ansatzpunkte für neue diagnostische und therapeutische Behandlungsstrategien bieten kann.

6 Referenzen

- Aulmann S, Adler N, Rom J, Helmchen B, Schirmacher P, Sinn HP** 2006 c-myc amplifications in primary breast carcinomas and their local recurrences. *J Clin Pathol* 59:424-428
- Baudis M, Cleary ML** 2001 Progenetix.net: an online repository for molecular cytogenetic aberration data. *Bioinformatics* 17:1228-1229
- Bergamaschi A, Kim YH, Wang P, Sorlie T, Hernandez-Boussard T, Lonning PE, Tibshirani R, Borresen-Dale AL, Pollack JR** 2006 Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 45:1033-1040
- Birnboim HC, Doly J** 1979 A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523
- Bishop DT** 1994 BRCA1, BRCA2, BRCA3 ... a myriad of breast cancer genes. *Eur J Cancer* 30A:1738-1739
- Blennow E** 2004 Reverse painting highlights the origin of chromosome aberrations. *Chromosome Res* 12:25-33
- Bobak DA, Nightingale MS, Murtagh JJ, Price SR, Moss J, Vaughan M** 1989 Molecular cloning, characterization, and expression of human ADP-ribosylation factors: two guanine nucleotide-dependent activators of cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:6101-6105
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE** 1998 Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279:349-352
- Braselmann H, Kulka U, Baumgartner A, Eder C, Muller I, Figel M, Zitzelsberger H** 2005 SKY and FISH analysis of radiation-induced chromosome aberrations: a comparison of whole and partial genome analysis. *Mutat Res* 578:124-133
- Campbell LL, Polyak K** 2007 Breast Tumor Heterogeneity: Cancer Stem Cells or Clonal Evolution? *Cell Cycle* 6
- Carter NP, Ferguson-Smith MA, Perryman MT, Telenius H, Pelmeur AH, Leversha MA, Glancy MT, Wood SL, Cook K, Dyson HM, et al.** 1992 Reverse chromosome painting: a method for the rapid analysis of aberrant chromosomes in clinical cytogenetics. *J Med Genet* 29:299-307
- Chomczynski P, Sacchi N** 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159
- Ciampi R, Nikiforov YE** 2007 RET/PTC rearrangements and BRAF mutations in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology* 148:936-941

- Coe BP, Ylstra B, Carvalho B, Meijer GA, Macaulay C, Lam WL** 2007 Resolving the resolution of array CGH. *Genomics* 89:647-653
- Collier LS, Largaespada DA** 2006 Transforming science: cancer gene identification. *Curr Opin Genet Dev* 16:23-29
- Collu GM, Brennan K** 2007 Cooperation between Wnt and Notch signalling in human breast cancer. *Breast Cancer Res* 9:105
- Cook AC, Chambers AF, Turley EA, Tuck AB** 2006 Osteopontin induction of hyaluronan synthase 2 expression promotes breast cancer malignancy. *J Biol Chem* 281:24381-24389
- Crosland-Taylor PJ** 1953 A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube. *Nature* 171:37-38
- Devries S, Nyante S, Korkola J, Segraves R, Nakao K, Moore D, Bae H, Wilhelm M, Hwang S, Waldman F** 2005 Array-based comparative genomic hybridization from formalin-fixed, paraffin-embedded breast tumors. *J Mol Diagn* 7:65-71
- Ferguson-Smith MA** 1997 Genetic analysis by chromosome sorting and painting: phylogenetic and diagnostic applications. *Eur J Hum Genet* 5:253-265
- Fiegler H, Carr P, Douglas EJ, Burford DC, Hunt S, Scott CE, Smith J, Vetrie D, Gorman P, Tomlinson IP, Carter NP** 2003 DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. *Genes Chromosomes Cancer* 36:361-374
- Fiegler H, Geigl JB, Langer S, Rigler D, Porter K, Unger K, Carter NP, Speicher MR** 2007 High resolution array-CGH analysis of single cells. *Nucleic Acids Res* 35:e15
- Fiegler H, Gribble SM, Burford DC, Carr P, Prigmore E, Porter KM, Clegg S, Crolla JA, Dennis NR, Jacobs P, Carter NP** 2003 Array painting: a method for the rapid analysis of aberrant chromosomes using DNA microarrays. *J Med Genet* 40:664-670
- Fridlyand J, Snijders AM, Ylstra B, Li H, Olshen A, Segraves R, Dairkee S, Tokuyasu T, Ljung BM, Jain AN, McLennan J, Ziegler J, Chin K, Devries S, Feiler H, Gray JW, Waldman F, Pinkel D, Albertson DG** 2006 Breast tumor copy number aberration phenotypes and genomic instability. *BMC Cancer* 6:96
- Fusco JC, McNinch JS, Collins CC, Van Dilla MA** 1989 Human chromosome-specific DNA libraries: construction and purity analysis. *Cytogenet Cell Genet* 50:211-215

- Gribble SM, Fiegler H, Burford DC, Prigmore E, Yang F, Carr P, Ng BL, Sun T, Kamberov ES, Makarov VL, Langmore JP, Carter NP** 2004 Applications of combined DNA microarray and chromosome sorting technologies. *Chromosome Res* 12:35-43
- Haas HS, Pfragner R, Siegl V, Ingolic E, Heintz E, Schauenstein K** 2005 Glutamate receptor-mediated effects on growth and morphology of human histiocytic lymphoma cells. *Int J Oncol* 27:867-874
- Hall JE** 2000 *Radiobiology For The Radiologist*. Lippincott Williams &Wilkins
- Hall JL, Cowan NJ** 1985 Structural features and restricted expression of a human alpha-tubulin gene. *Nucleic Acids Res* 13:207-223
- Hanahan D, Weinberg RA** 2000 The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70
- Hayflick L** 1965 The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 37:614-636
- Heeg S, Doebele M, von Werder A, Opitz OG** 2006 In vitro transformation models: modeling human cancer. *Cell Cycle* 5:630-634
- Huang S, Podsypanina K, Chen Y, Cai W, Tsimelzon A, Hilsenbeck S, Li Y** 2006 Wnt-1 is dominant over neu in specifying mammary tumor expression profiles. *Technol Cancer Res Treat* 5:565-571
- Hupe P, Stransky N, Thiery JP, Radvanyi F, Barillot E** 2004 Analysis of array CGH data: from signal ratio to gain and loss of DNA regions. *Bioinformatics* 20:3413-3422
- Itano N, Atsumi F, Sawai T, Yamada Y, Miyaishi O, Senga T, Hamaguchi M, Kimata K** 2002 Abnormal accumulation of hyaluronan matrix diminishes contact inhibition of cell growth and promotes cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3609-3614
- Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, Shinomura T, Hamaguchi M, Yoshida Y, Ohnuki Y, Miyauchi S, Spicer AP, McDonald JA, Kimata K** 1999 Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem* 274:25085-25092
- Jeggo P, Lobrich M** 2006 Radiation-induced DNA damage responses. *Radiat Prot Dosimetry* 122:124-127
- Jhiang SM** 2000 The RET proto-oncogene in human cancers. *Oncogene* 19:5590-5597
- Kalariti N, Pissimissis N, Koutsilieris M** 2005 The glutamatergic system outside the CNS and in cancer biology. *Expert Opin Investig Drugs* 14:1487-1496

- 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* 258:818-821
- Kawata H, Yamada K, Shou Z, Mizutani T, Yazawa T, Yoshino M, Sekiguchi T, Kajitani T, Miyamoto K** 2003 Zinc-fingers and homeoboxes (ZHX) 2, a novel member of the ZHX family, functions as a transcriptional repressor. *Biochem J* 373:747-757
- Kim H, Farris J, Christman SA, Kong BW, Foster LK, O'Grady SM, Foster DN** 2002 Events in the immortalizing process of primary human mammary epithelial cells by the catalytic subunit of human telomerase. *Biochem J* 365:765-772
- Klugbauer S, Lengfelder E, Demidchik EP, Rabes HM** 1995 High prevalence of RET rearrangement in thyroid tumors of children from Belarus after the Chernobyl reactor accident. *Oncogene* 11:2459-2467
- Krzywinski M, Bosdet I, Smailus D, Chiu R, Mathewson C, Wye N, Barber S, Brown-John M, Chan S, Chand S, Cloutier A, Girn N, Lee D, Masson A, Mayo M, Olson T, Pandoh P, Prabhu AL, Schoenmakers E, Tsai M, Albertson D, Lam W, Choy CO, Osoegawa K, Zhao S, de Jong PJ, Schein J, Jones S, Marra MA** 2004 A set of BAC clones spanning the human genome. *Nucleic Acids Res* 32:3651-3660
- Lebel R, McDuff FO, Lavigne P, Grandbois M** 2007 Direct Visualization of the Binding of c-Myc/Max Heterodimeric b-HLH-LZ to E-Box Sequences on the hTERT Promoter. *Biochemistry* 46:10279-10286
- Lemke J, Claussen J, Michel S, Chudoba I, Muhlig P, Westermann M, Sperling K, Rubtsov N, Grummt UW, Ullmann P, Kromeyer-Hauschild K, Liehr T, Claussen U** 2002 The DNA-based structure of human chromosome 5 in interphase. *Am J Hum Genet* 71:1051-1059
- Li F, Mandal M, Mishra SK, Barnes CJ, Kumar R** 2002 Heregulin promotes expression and subcellular redistribution of ADP-ribosylation factor 3. *FEBS Lett* 524:49-53
- Liva S, Hupe P, Neuvial P, Brito I, Viara E, La Rosa P, Barillot E** 2006 CAPweb: a bioinformatics CGH array Analysis Platform. *Nucleic Acids Res* 34:W477-481
- Livak KJ, Schmittgen TD** 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408
- Longobardi GA** 2001 *Flow Cytometry, First Principles*.
- Ludecke HJ, Senger G, Claussen U, Horsthemke B** 1989 Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. *Nature* 338:348-350

- McPherson JP, Lemmers B, Chahwan R, Pamidi A, Migon E, Matysiak-Zablocki E, Moynahan ME, Essers J, Hanada K, Poonepalli A, Sanchez-Sweatman O, Khokha R, Kanaar R, Jasin M, Hande MP, Hakem R** 2004 Involvement of mammalian Mus81 in genome integrity and tumor suppression. *Science* 304:1822-1826
- Meric F, Lee WP, Sahin A, Zhang H, Kung HJ, Hung MC** 2002 Expression profile of tyrosine kinases in breast cancer. *Clin Cancer Res* 8:361-367
- Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC** 2006 Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer* 6:924-935
- Neuvial P, Hupe P, Brito I, Liva S, Manie E, Brennetot C, Radvanyi F, Aurias A, Barillot E** 2006 Spatial normalization of array-CGH data. *BMC Bioinformatics* 7:264
- Ng BL, Carter NP** 2006 Factors affecting flow karyotype resolution. *Cytometry A* 69:1028-1036
- Osaki M, Oshimura M, Ito H** 2004 PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* 9:667-676
- Piao CQ, Liu L, Zhao YL, Balajee AS, Suzuki M, Hei TK** 2005 Immortalization of human small airway epithelial cells by ectopic expression of telomerase. *Carcinogenesis* 26:725-731
- Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG** 1998 High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20:207-211
- Platonova N, Scotti M, Babich P, Bertoli G, Mento E, Meneghini V, Egeo A, Zucchi I, Merlo GR** 2007 TBX3, the gene mutated in ulnar-mammary syndrome, promotes growth of mammary epithelial cells via repression of p19ARF, independently of p53. *Cell Tissue Res* 328:301-316
- Portella G, Salvatore D, Botti G, Cerrato A, Zhang L, Mineo A, Chiappetta G, Santelli G, Pozzi L, Vecchio G, Fusco A, Santoro M** 1996 Development of mammary and cutaneous gland tumors in transgenic mice carrying the RET/PTC1 oncogene. *Oncogene* 13:2021-2026
- Preston DL, Ron E, Tokuoka S, Funamoto S, Nishi N, Soda M, Mabuchi K, Kodama K** 2007 Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958-1998. *Radiat Res* 168:1-64
- Prysyazhnyuk A, Gristchenko V, Fedorenko Z, Gulak L, Fuzik M, Slipenyuk K, Tirmarche M** 2007 Twenty years after the Chernobyl accident: solid cancer incidence in various groups of the Ukrainian population. *Radiat Environ Biophys* 46:43-51

- Rhim JS, Yoo JH, Park JH, Thraves P, Salehi Z, Dritschilo A** 1990 Evidence for the multistep nature of in vitro human epithelial cell carcinogenesis. *Cancer Res* 50:5653S-5657S
- Rhoden KJ, Johnson C, Brandao G, Howe JG, Smith BR, Tallini G** 2004 Real-time quantitative RT-PCR identifies distinct c-RET, RET/PTC1 and RET/PTC3 expression patterns in papillary thyroid carcinoma. *Lab Invest* 84:1557-1570
- Riches AC, Herceg Z, Bryant PE, Stevens DL, Goodhead DT** 1997 Radiation-induced transformation of SV40-immortalized human thyroid epithelial cells by single exposure to plutonium alpha-particles in vitro. *Int J Radiat Biol* 72:515-521
- Roberts I, Foster N, Nacheva E, Coleman N** 2004 Paint-assisted microdissection-FISH: Rapid and simple mapping of translocation breakpoints in the embryonal rhabdomyosarcoma cell line RD. *Cytometry A* 58:177-184
- Sinn E, Muller W, Pattengale P, Tepler I, Wallace R, Leder P** 1987 Coexpression of MMTV/v-Ha-ras and MMTV/c-myc genes in transgenic mice: synergistic action of oncogenes in vivo. *Cell* 49:465-475
- Stark A, Kapke A, Schultz D, Brown R, Linden M, Raju U** 2007 Advanced stages and poorly differentiated grade are associated with an increased risk of HER2/neu positive breast carcinoma only in White women: findings from a prospective cohort study of African-American and White-American women. *Breast Cancer Res Treat*
- Tan F, Chan SJ, Steiner DF, Schilling JW, Skidgel RA** 1989 Molecular cloning and sequencing of the cDNA for human membrane-bound carboxypeptidase M. Comparison with carboxypeptidases A, B, H, and N. *J Biol Chem* 264:13165-13170
- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, Tunnacliffe A** 1992 Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13:718-725
- Thalhammer S, Langer S, Speicher MR, Heckl WM, Geigl JB** 2004 Generation of chromosome painting probes from single chromosomes by laser microdissection and linker-adaptor PCR. *Chromosome Res* 12:337-343
- Udabage L, Brownlee GR, Nilsson SK, Brown TJ** 2005 The over-expression of HAS2, Hyal-2 and CD44 is implicated in the invasiveness of breast cancer. *Exp Cell Res* 310:205-217
- Unger K, Zitzelsberger H, Salvatore G, Santoro M, Bogdanova T, Braselmann H, Kastner P, Zurnadzhy L, Tronko N, Hutzler P, Thomas G** 2004 Heterogeneity in the distribution of RET/PTC rearrangements within individual post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 89:4272-4279

- van Beers EH, Nederlof PM** 2006 Array-CGH and breast cancer. *Breast Cancer Res* 8:210
- van Wezel T, Lombaerts M, van Roon EH, Philippo K, Baelde HJ, Szuhai K, Cornelisse CJ, Cleton-Jansen AM** 2005 Expression analysis of candidate breast tumour suppressor genes on chromosome 16q. *Breast Cancer Res* 7:R998-1004
- Wang W, Eddy R, Condeelis J** 2007 The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. *Nat Rev Cancer* 7:429-440
- Watson JV** 1999 The early fluidic and optical physics of cytometry. *Cytometry* 38:2-14; discussion 11
- Wyllie FS, Jones CJ, Skinner JW, Haughton MF, Wallis C, Wynford-Thomas D, Faragher RG, Kipling D** 2000 Telomerase prevents the accelerated cell ageing of Werner syndrome fibroblasts. *Nat Genet* 24:16-17
- Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, Speed TP** 2002 Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* 30:e15
- Zitzelsberger H, Bruch J, Smida J, Hieber L, Peddie CM, Bryant PE, Riches AC, Fung J, Weier HU, Bauchinger M** 2001 Clonal chromosomal aberrations in simian virus 40-transfected human thyroid cells and in derived tumors developed after in vitro irradiation. *Int J Cancer* 96:166-177
- Zitzelsberger H, Hieber L, Richter H, Unger K, Briscoe CV, Peddie C, Riches A** 2004 Gene amplification of atypical PKC-binding PARD3 in radiation-transformed neoplastic retinal pigment epithelial cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 40:55-59
- Zoltan-Jones A, Huang L, Ghatak S, Toole BP** 2003 Elevated hyaluronan production induces mesenchymal and transformed properties in epithelial cells. *J Biol Chem* 278:45801-45810

7 Anhang

7.1 Verwendete Primer-Sequenzen

Primer	Sequenz
GS1Grid1A	5'-CTCGTTGATGAAGGAGTG-3'
GS1Grid1B	5'-GCATGTCTTTGCCAAAAGTC-3'
GS2Grid1A	5'-CGGTAGCGATTCAGC-3'
GS3Grid1	5'-GGTGAATACGTGGCTAATGTTC-3'
RETSP2	5'-GGCGTTCTCTTTCAGCAT-3'
RETSP3	5'-CTGCTCTGCCTTTCAGATGGA-3'
Has2_3P_GSP1	5'-ATTTTTTTTTGGCCGGTCGTC-3'
Has2_3P_GSP2	5'-CCCAGGGTAGGTTAGCCTTTT-3'
Has2_3P_GSP3	5'-GCTGGGTCAAGCATAGTGTCT-3'
Has2_3P_GSP4	5'-TGTGAAAAGGCTAACCTACCCT-3'
M13-fwd	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
M13-rev	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
Adaptor Primer AP-3P	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
AUAP-3P/5P (Universeller Adaptor-Primer für 3' /5'-RACE)	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'
Abridged Anchor Primer (AAP) - 5P	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3'

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Molekulare Strahlenbiologie, AG Zytogenetik, des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit unter Leitung von PD Dr. Horst Zitzelsberger durchgeführt.

Bei Herrn PD Dr. Zitzelsberger bedanke ich mich ganz besonders für die Bereitstellung des Themas, für seine großartige Unterstützung und Förderung in allen Phasen der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Johannes Wienberg, Institut für Anthropologie und Humangenetik der Ludwig-Maximilians-Universität München, danke ich für die Erstellung des Erstgutachtens.

Herrn Prof. Dr. T. Cremer, Institut für Anthropologie und Humangenetik der Ludwig-Maximilians-Universität München, danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Mein ganz besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern der AG Zytogenetik, die mich während der letzten Jahre tatkräftig unterstützt und die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Cordelia Langford, Leiterin der Microarray-Facility des Sanger-Instituts, Cambridge möchte ich für die Bereitstellung der verwendeten Array-Objektträger danken.

Ich bedanke mich bei meinen lieben Kolleginnen und Kollegen Verena Bauer, Anna Freno, Katrin Heiliger, Elke Konhäuser, Herbert Braselmann, Dr. Ludwig Hieber, Reinhard Huber und Dr. Gerhard Jackl für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung, die mir zuteil wurde.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern Heidi und Richard, meinen beiden Schwestern Tanja und Stefanie und besonders auch bei meinen Neffen Fabian, Stefan und Lennart für die emotionale und finanzielle Unterstützung während meiner Doktorarbeit bedanken.

Curriculum vitae

KRISTIAN M. UNGER

Geboren am 15. Juli 1977 in Sulzbach-Rosenberg

BILDUNG

1983 bis 1987:

Grundschule, Sulzbach-Rosenberg

1987 bis 1997:

Gymnasium, Sulzbach-Rosenberg

1997:

Allgemeine Hochschulreife, Abitur

September 1997 bis Juni 1998:

Wehrdienst

Oktober 1998:

Grundstudium Diplombiologie an der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen

September 2000:

Vordiplom

Oktober 2000:

Beginn des Hauptstudiums Diplombiologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München mit dem Hauptfach Humangenetik und den Nebenfächern Zellbiologie, Biochemie und Medizinische Physiologie.

Juni 2004:

Diplom mit der Diplomarbeit mit dem Titel "Positionelle Klonierung von chromosomalen Bruchpunkten in strahlentransformierten Brustzelllinien und strahleninduzierten Schilddrüsenkarzinomzelllinien." (vom Juli 2003 bis April 2004 in der Arbeitsgruppe Zytogenetik des Instituts für Molekulare Strahlenbiologie im GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Neuherberg unter der Leitung von PD Dr. Horst Zitzelsberger).

Von Juli 2004 bis Oktober 2007:

Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Zytogenetik des GSF-Instituts Molekulare Strahlenbiologie mit dem Titel: "Nachweis von Genveränderungen bei der Strahlenkarzinogenese von Brustzellen mittels Array-Painting".

PUBLIKATIONEN

Unger K, Zitzelsberger H, Salvatore G, Santoro M, Bogdanova T, Braselmann H, Kastner P, Zurnadzhly L, Tronko N, Hutzler P, Thomas G 2004 Heterogeneity in the distribution of RET/PTC rearrangements within individual post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 89:4272-4279

Zitzelsberger H, Hieber L, Richter H, Unger K, Briscoe CV, Peddie C, Riches A 2004 Gene amplification of atypical PKC-binding PARD3 in radiation-transformed neoplastic retinal pigment epithelial cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 40:55-59

Rhoden KJ, Unger K, Salvatore G, Yilmaz Y, Vovk V, Chiappetta G, Qumsiyeh MB, Rothstein JL, Fusco A, Santoro M, Zitzelsberger H, Tallini G 2006 RET/papillary thyroid cancer rearrangement in nonneoplastic thyrocytes: follicular cells of Hashimoto's thyroiditis share low-level recombination events with a subset of papillary carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 91:2414-2423

Unger K, Zurnadzhy L, Walch A, Mall M, Bogdanova T, Braselmann H, Hieber L, Tronko N, Hutzler P, Jeremiah S, Thomas G, Zitzelsberger H 2006 RET rearrangements in post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas with a short latency analysed by interphase FISH. *Br J Cancer* 94:1472-1477

Fiegler H, Geigl JB, Langer S, Rigler D, Porter K, Unger K, Carter NP, Speicher MR 2007 High resolution array-CGH analysis of single cells. *Nucleic Acids Res* 35:e15

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit einschließlich Tabellen und Abbildungen, die anderen Werken im Wortlaut oder Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat, daß sie noch nicht veröffentlicht worden ist und dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn PD Dr. Horst Zitzelsberger und Herrn Prof. Dr. Johannes Wienberg betreut worden.

Kristian Unger

München, 24. September 2007