

Doktorarbeit

Charakterisierung genomischer Veränderungen im Harnblasenkarzinom

Cora Beier

Lehrstuhl für Humangenetik
Ludwig-Maximilians-Universität München

Januar 2006

Bei der mündlichen Prüfung am 17.10.2006 waren

Herr Prof. Dr. Thomas Cremer

Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Herr PD Dr. Rainer Uhl

Frau Prof. Dr. Kirsten Jung

als Prüfer anwesend.

Frau Prof. Dr. Kirsten Jung hat das Protokoll geführt.

Meinen Eltern, in Liebe und Dankbarkeit

A: EINLEITUNG.....	7
A.1 DER WEG DER ZELLE ZUR TUMORZELLE.....	7
A.2 METHODEN ZUM SCREENEN VON NUMERISCHEN ABERRATIONEN.....	10
A.3 CHARAKTERISTIKA VON HARNBLASENTUMOREN.....	12
A.3.1 KLINIK.....	12
A.3.2 TNM-KLASSIFIKATION.....	13
A.3.3 GENETIK DER HARNBLASENKARZINOME.....	14
A.3.4 TUMORPROGRESSION.....	15
A.3.5 MULTIFOKALITÄT, ENTSTEHUNGSHYPOTHESEN.....	16
A.4 ZIELE DIESER ARBEIT.....	18
B: MATERIAL UND METHODEN.....	19
B.1 VERWENDETE GEBRAUCHSLÖSUNGEN.....	19
B.1.1 PUFFER.....	19
B.1.2 GEBRAUCHSLÖSUNGEN.....	19
B.1.3 ENZYME.....	21
B.1.4 FLUOROCHROME.....	21
B.2 VERWENDETE TECHNISCHE GERÄTE.....	22
B.3 VERWENDETE BACTERIAL-ARTIFICIAL-CHROMOSOMEN (BACs).....	22
B.4 VERWENDETE ZELLINIEN UND KLINISCHE PROBEN.....	24
B.5 VERWENDETE NÄHRMEDIEN.....	27
B.6 KULTIVIERUNG UND STAMMHALTUNG.....	27
B.6.1 KULTIVIERUNG VON HARNBLASENKARZINOM-ZELLINIEN.....	27
B.6.2 KULTIVIERUNG VON REKOMBINANTEN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	28
B.6.3 STAMMHALTUNG.....	28
B.7 HERSTELLUNG VON METAPHASEPRÄPARATEN.....	28
B.7.1 COLCEMIDBEHANDLUNG, HYPOTONIE UND FIXIERUNG.....	28
B.7.2 AUFBRINGEN AUF OBJEKTTRÄGER.....	29
B.8 ISOLIERUNG VON NUKLEINSÄUREN.....	30
B.8.1 GENOMISCHE DNS.....	30
B.8.2 PLASMID DNS.....	30
B.9 QUALITATIVE UND QUANTITATIVE UNTERSUCHUNG DER NUKLEINSÄURELÖSUNGEN.....	30
B.9.1 AGAROSE GELELEKTROPHORESE.....	30
B.9.2 PHOTOMETRISCHE ANALYSE.....	31
B.10 KONSTRUKTION VON PCR-PRIMERN UND PROBEN.....	31
B.11 <i>IN VITRO</i>- AMPLIFIKATION VON DNS.....	32
B.11.1 VERWENDETE PRIMER.....	32
B.11.2 VERWENDETE PCR-PROGRAMME.....	33

B.12 QUANTITATIVE PCR	35
B.12.1 VERWENDETE PRIMER, PROBEN UND REAGENTIEN.....	36
B.12.2 DURCHFÜHRUNG DER QPCR	37
B.12.3 AUSWERTUNG DER QPCR	37
B.13 FLUORESCENZ <i>IN SITU</i> HYBRIDISIERUNG (FISH)	39
B.13.1 MULTIPLEX FLUORESCENZ <i>IN SITU</i> HYBRIDISIERUNG (M-FISH)	39
B.13.1.1 Amplifikation der DNS-Pools.....	40
B.13.1.2 Markieren der DNS-Pools	40
B.13.1.3 DNase I- Verdau	41
B.13.1.4 Ethanolfällung und Herstellung des Hybridisierungsmixes.....	42
B.13.1.5 Vorbehandlung der Chromosomenpräparate	42
B.13.1.6 Denaturierung von Chromosomenpräparaten und Sonden, Hybridisierung.....	43
B.13.1.7 Stringenzwaschen und Nachweis indirekt markierter Sonden mit Immunfluoreszenz .	43
B.13.1.8 DAPI-Färbung	44
B.13.2 FLUORESCENZ <i>IN SITU</i> HYBRIDISIERUNG MIT BACTERIAL ARTIFICIAL CHROMOSOM-PROBEN (BAC-FISH).....	44
B.13.2.1 Amplifikation der BAC-DNS	45
B.13.2.2 Markierung der BAC-Sonden durch Nicktranslation	45
B.13.2.3 Ethanolfällung und Herstellung des Hybridisierungsmixes.....	46
B.13.2.4 Vorbehandlung der Chromosomenpräparate, Denaturierung, Hybridisierung	46
B.13.2.5 Nachweis indirekt markierter Sonden mit Immunfluoreszenz.....	46
B.13.3 VERGLEICHENDE GENOMHYBRIDISIERUNG (CGH)	47
B.13.3.1 Markierung der genomischen DNS durch Nicktranslation.....	48
B.13.3.2 Vorbehandeln der Chromosomenpräparate, Denaturierung, Hybridisierung	48
B.13.3.3 Nachweis indirekt markierter Sonden mit Immunfluoreszenz.....	48
B.14 EPIFLUORESCENZ-MIKROSKOPIE UND BILDANALYSE	48
B.15 AFFYMETRIX GENECHIP® MAPPING ASSAY	49
B.15.1 FUNKTIONSPRINZIP DES AFFYMETRIX GENECHIP® MAPPING ASSAYS.....	50
B.15.2 VERARBEITUNG DER DNS-PROBEN FÜR DEN AFFYMETRIX GENECHIP® MAPPING ASSAY.....	51
B.15.2.1 Xba I-Verdau	51
B.15.2.2 Ligation des Adaptors	52
B.15.2.3 PCR.....	52
B.15.2.4 Aufreinigung und Quantifikation.....	53
B.15.2.5 Fragmentierung.....	54
B.15.2.6 Markieren der DNS-Fragmente.....	55
B.15.2.7 Hybridisierung	55
B.15.2.8 Stringenzwaschen, Nachweis und Scannen.....	56
B.15.3 AUSWERTUNG DER AFFYMETRIX GENECHIP® MAPPING DATEN.....	57
B.15.3.1 Affymetrix GDAS-Software	57
B.15.3.2 Affymetrix Copynumber Tool	62

B.15.3.3 dChip	64
C: ERGEBNISSE.....	68
C.1 HARNBLASENKARZINOM ZELLINIEN	68
C.1.1 KARYOTYPISIEREN MIT M-FISH.....	68
C.1.2 RELATIVE QUANTIFIZIERUNG MIT CGH.....	74
C.1.2.1 Zelllinie Cal29.....	74
C.1.2.2 Zelllinie EJ28.....	75
C.1.2.3 Zelllinie HT1376	76
C.1.2.4 Zelllinie SW1710	77
C.1.2.5 Zelllinie T24.....	78
C.1.2.6 Zelllinie BC3C.....	79
C.1.2.7 Vergleich der CGH-Profile von Zelllinien EJ28 und T24	79
C.1.2.8 Zusammenfassung der numerischen Veränderungen.....	80
C.1.3 QUANTIFIKATION MIT DEM AFFYMETRIX GENECHIP® MAPPING ASSAYS.....	80
C.1.3.1 Quantifikation mit der Affymetrix GDAS-Software.....	80
C.1.3.2 Quantifikation mit dChip	82
C.1.4 ZUSAMMENFASSUNG DER CHROMOSOMEN CGH-ERGEBNISSE, M-FISH ERGEBNISSE UND DER AFFYMETRIX GENECHIP® MAPPING ASSAY ERGEBNISSE.....	90
C.1.4.1 Zusammenfassung der Veränderungen am Chromosom 4.....	90
C.1.4.2 Zusammenfassung der Veränderungen am Chromosom 8.....	92
C.1.4.3 Zusammenfassung der Veränderungen am Chromosom 20.....	95
C.1.4.4 Zusammenfassung der Veränderungen am Chromosom 9.....	98
C.1.5 VERIFIKATION DER AFFYMETRIX GENECHIP® MAPPING ASSAY ERGEBNISSE MIT BAC-FISH .	100
C.1.5.1 Chromosom 10 der Zelllinie EJ28	101
C.1.5.2 Chromosom 8 der Zelllinie SW1710.....	104
C.1.5.3 Chromosom 11 der Zelllinie SW1710.....	105
C.1.5.4 Chromosom 12 der Zelllinie SW1710.....	106
C.1.5.5 Chromosom 15 der Zelllinie SW1710.....	107
C.1.5.6 Chromosom 9 der Zelllinie BC3C.....	108
C.1.6 BAC-FISH FÜR P16/CDKN2A REGION AUF CHROMOSOM 9.....	110
C.1.7 VERIFIKATION DER AFFYMETRIX GENECHIP® MAPPING ASSAY ERGEBNISSE MIT QPCR	110
C.1.8 VERIFIKATION DER AFFYMETRIX GENECHIP® MAPPING ASSAY ERGEBNISSE MIT SPEZIFISCHER PCR.....	112
C.1.9 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE FÜR DIE P16 REGION AUF CHROMOSOM 9 DER ZELLINIE BC3C.....	113
C.1.10 ALLELVERTEILUNG UND LOH ANALYSE BEI DEN ZELLINIEN EJ28 UND T24	115

C.2 QUANTIFIKATION UND LOH ANALYSE VON PATIENTENPROBEN MIT DEM AFFYMETRIX GENECHIP®	
MAPPING ASSAYS	117
C.2.1 QUANTIFIKATION UND LOH ANALYSE VON PATIENTENPROBEN MIT DEM AFFYMETRIX GENECHIP®	
MAPPING ASSAYS	117
C.2.1.1 Hybridisierungsqualität	117
C.2.1.2 Abgeleitete Kopienzahlen	119
C.2.1.3 LOH Analyse	122
C.2.1.4 Zusammenfassung der mit dem Affymetrix GeneChip® Mapping Assays detektierten Veränderungen in frühen papillären Harnblasenkarzinomen (pTaG1)	128
C.2.2 RELATIVE QUANTIFIZIERUNG EINIGER PATIENTENPROBEN MIT CGH.....	135
C.2.2.1 Gewebeprobe CB17_26062U.....	135
C.2.2.2 Gewebeprobe CB21_4418U.....	136
C.2.2.3 Gewebeprobe CB24_4423U.....	137
D: DISKUSSION	138
D.1 HARNBLASENKARZINOM ZELLINIEN	140
DETEKTION GROßER GENETISCHER VERÄNDERUNGEN.....	140
dCHIP VS. AFFYMETRIX CNT.....	143
DETEKTION KLEINER GENETISCHER VERÄNDERUNGEN.....	146
SCHWELLENWERT UND AUFLÖSUNGSVERMÖGEN.....	148
ZUSAMMENFASSUNG KOPIENZAHLANALYSE.....	150
ALLELBESTIMMUNG	150
ZUORDNUNG DES GESCHLECHTS.....	151
BESTIMMUNG VON VERWANDTSCHAFT	152
D.2 TUMORPROBEN	153
CHROMOSOM 9, P16/CDKN2A	155
CHROMOSOM 8, FABP4	155
UNIPARENTALE DISOMIEN	156
LOH UND AMPLIFIKATION.....	157
LOH ANALYSE FÜR NICHT INVASIVE DIAGNOSTIK.....	157
ZUSAMMENFASSUNG.....	158
E: LITERATURVERZEICHNISS	160
F: ABKÜRZUNGS-, ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	164
G: ANHANG	168
G.1 DANKSAGUNG	168
G.2 LEBENSLAUF, AKADEMISCH	169
G.3 ERKLÄRUNG	170

A: Einleitung

A.1 Der Weg der Zelle zur Tumorzelle

Jeder Mensch beginnt sein Leben als omnipotente befruchtete Eizelle, die sich teilt und deren Tochterzellen sich weiterentwickeln, bis ein funktionierender vielzelliger Organismus aus etwa 10^{14} Zellen entstanden ist (Strachan and Read, 2004). Um als multizellulärer Organismus zu funktionieren, müssen die Zellen miteinander interagieren und dürfen sich nur aufeinander abgestimmt weiterentwickeln. Die meisten Tochterzellen differenzieren von einer omnipotenten Stammzelle zu einer spezialisierten Zelle und übernehmen für den Rest ihres Lebens eine ganz bestimmte Aufgabe im System (Strachan and Read, 2004). Muskelzellen sind für die Bewegung, Nervenzellen für die Reizleitung und Knochenzellen für die Stabilität zuständig. Drüsenzellen sekretieren je nach Typ Magensaft, Speichel, oder Hormone, rote Blutzellen transportieren Sauerstoff und Fettzellen speichern Energie. Alle diese Zellen haben jedoch immer noch genau dasselbe Erbgut, wie die omnipotente Zygote aus der sie entstanden sind. Der Unterschied entsteht, indem bei jedem Zelltyp nur ein Bruchteil aller möglichen Funktionen, die im Erbgut kodiert sind, aktiviert werden (Strachan and Read, 2004). Drüsenzellen in der Magenwand aktivieren z.B. die Funktionen für die Magensaftproduktion, die Funktionen für die Reizleitung sind dagegen stillgelegt.

Wenn nun während des Lebens einer Zelle Veränderungen im Erbgut entstehen, kann es dazu führen, dass die Zelle nicht mehr in der Lage ist ihre Funktion zu erfüllen und adäquat auf Signale im System zu reagieren. Das kann soweit führen, dass Zellen wieder anfangen sich zu teilen und nicht mehr damit aufhören. Die Zellteilungsaktivität kann zum Wachstum eines gutartigen Geschwulst führen. Oft wahren die Zellen ab einem gewissen Stadium die Grenzen zum benachbarten Gewebe nicht mehr und infiltrieren dieses. Diese malignen Tumorzellen können sich in einem späten Wachstumsstadium über das Lymphsystem oder das Blut in andere Gewebe verbreiten, d.h. metastasieren.

Laut Hanahan und Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2000) muss eine Zelle sechs funktionelle Veränderungen durchmachen, um von einer normal funktionierenden Körperzelle zu einer malignen Tumorzelle zu transformieren (Abbildung 1). Sie muss unabhängig von extrazellulären Wachstumssignalen und unempfindlich gegenüber Wachstum inhibierenden Signalen werden, muss in der Lage sein, Blutgefäße zu

rekrutieren, ein unlimitedes Teilungspotential entwickeln, dem programmierten Zelltod (Apoptose) entgehen und in anderes Gewebe infiltrieren und metastasieren können (Hanahan and Weinberg, 2000). Diese erweiterten Funktionen resultieren aus Veränderungen im Erbgut, wie z.B. Mutationen einzelner Basenpaare, Amplifikationen und Deletionen von einzelnen Genen, von chromosomalen Regionen oder auch von ganzen Chromosomen, sowie epigenetischen Effekten (Strachan and Read, 2004).

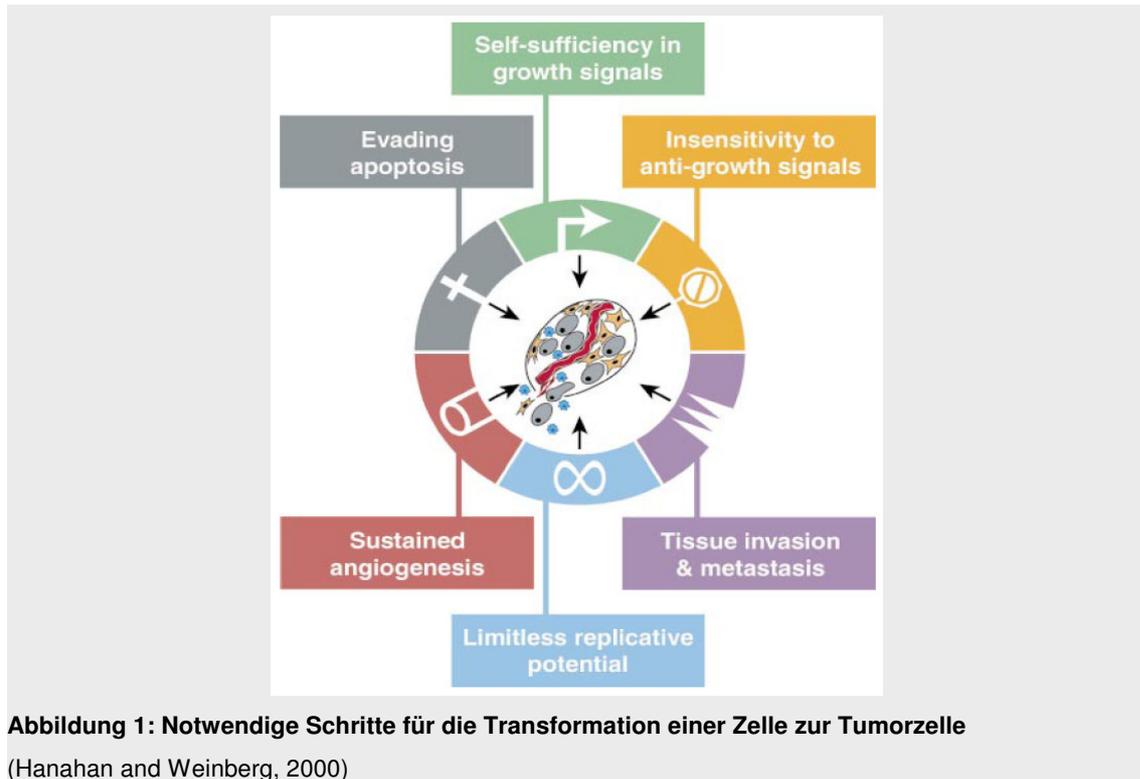


Abbildung 1: Notwendige Schritte für die Transformation einer Zelle zur Tumorzelle

(Hanahan and Weinberg, 2000)

Die Ursachen für Änderungen im Genom sind vielfältig, angefangen bei Reizen aus der Umwelt, wie z.B. kanzerogenen Chemikalien, Viren oder UV-Strahlen, bis hin zu erbten Veränderungen, die schon in der befruchteten Eizelle und damit in jeder einzelnen Körperzelle vorhanden sind (Strachan and Read, 2004). Genauso vielfältig sind die Theorien darüber, wie diese Ursachen zusammenwirken, und die Zelle transformieren. Die „Gatekeeper“ und „Caretaker“-Hypothese von Kinzler und Vogelstein postuliert z.B., dass in jedem Zelltyp ein bestimmtes Gen für die Aufrechterhaltung einer begrenzten Zellzahl verantwortlich ist (Kinzler and Vogelstein, 1996; Kinzler and Vogelstein, 1997). Kommt es zu einer Mutation in einem „Gatekeeper“-Genen, kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen Zellteilung und Zelltod und als direkte Folge davon zu einem Tumorwachstum. Die Inaktivierung eines „Caretaker“-Gens führt dagegen indirekt zu Tumorwachstum. Sie beeinflusst die genetische Stabilität der Zelle und führt zu einer erhöhten Mutationsrate aller Gene, u.a. der, für die Tumorentstehung entscheidenden, „Gatekeeper“-Gene. Jallepalli und Lengauer gehen davon aus, dass die Entstehung von genetischer Instabilität ein

entscheidender Schritt bei der Tumorentstehung ist (Jallepalli and Lengauer, 2001). Es gibt zwei verschiedene Formen von genetischer Instabilität, die Chromosomale Instabilität (CIN) und die Mikrosatelliteninstabilität (MIN). Bei der Chromosomalen Instabilität (CIN) kommt es zum Gewinn oder Verlust ganzer Chromosomen, bei der Mikrosatelliteninstabilität (MIN) kommt es zu Veränderungen auf der Nukleotid-Ebene. Die Ursache für die MIN sind meist Mutationen in Mismatch-Reparatur Genen (Loeb, 2001; Strachan and Read, 2004). CIN kann u.a. entstehen, wenn Chromosomen bei der Zellteilung falsch verteilt werden, weil z.B Gene, welche für die Ausbildung der Spindel wichtig sind, mutiert sind (Cahill et al., 1998). CIN kann auch entstehen, wenn Zellen eine „Telomer-Krise“ entwickeln, d.h. wenn die Telomere bis auf einen kritischen Wert verkürzt sind, und Chromosomen an den ungeschützten Enden miteinander fusionieren (Hypothese über die „Telogenomische Instabilität“, (Artandi et al., 2000; Artandi and DePinho, 2000). Loeb und Dey postulieren, dass am Anfang der Tumorentstehung eine Mutation stehen muss, die chromosomale Instabilität verursacht, und dass es nur in Folge dieser Instabilität zu der hohen Zahl an Veränderungen kommen kann, die notwendig ist, um eine Zelle zur Tumorzelle zu transformieren (Hypothese über den "Mutator-Phänotyp" von Loeb, 2001; Dey, 2004). Da sich alle Tumorzellen durch eine konsequent verbesserte Fitness gegenüber normalen Zellen auszeichnen, ist für Fisher und Kollegen (Fischer et al., 2004) die Transformation einer normalen Zelle in eine Tumorzelle das konsequente Resultat der Evolution, nicht das Resultat von genomischer Instabilität oder der Mutation einzelner Gene. Sie führen an, dass sich jeder Zelltyp in einer anderen „ökologischen Nische“ des Körpers behaupten muss und für eine Verbesserung der Fitness sehr unterschiedliche Funktionen wichtig sind. Fisher und Kollegen (Fischer et al., 2004) sind der Meinung, dass man die tumorrelevanten Veränderungen in der Zellfunktion nicht auf die sechs von Hanahan und Kollegen (Hanahan and Weinberg, 2000) aufgeführten Eigenschaften reduzieren kann.

Allen diesen Theorien gemeinsam ist der Gedanke, dass die funktionellen Veränderungen aus Veränderungen im Erbgut resultieren. Wenn die für die Transformation charakteristischen funktionellen Veränderungen und ihre Gene bekannt wären, könnten möglicherweise die entarteten Zellen in Zukunft schon sehr früh in der Tumorentstehung diagnostiziert werden und darauf basierend eine entsprechend fundierte Prognose abgegeben und eine speziell auf diesen Tumortyp abgestimmte Therapie einleitet werden (Strachan and Read, 2004).

A.2 Methoden zum Screenen von numerischen Aberrationen

Tumorspezifische Veränderungen auf verschiedenen funktionellen Ebenen (Proteinebene, RNS-Ebene oder DNS-Ebene) können mit unterschiedlichen molekularbiologischen Methoden untersucht werden. Mit den meisten Methoden kann man entweder mit geringer Auflösung das gesamte Proteom, die gesamte RNS oder das gesamte Genom oder aber einige wenige Veränderungen mit hoher Auflösung untersuchen (Strachan and Read, 2004).

Einen wertvoller Beitrag zum Screenen von Tumoren auf Veränderungen im Erbgut liefern zytogenetische Methoden, wie Bänderungsanalysen, Interphase Fluoreszenz in situ Hybridisierung, Multiplex Fluoreszenz in situ Hybridisierung (M-FISH) und die Vergleichende Genomische Hybridisierung (comparative genomic hybridization, CGH) (Speicher and Carter, 2005). Mit der G-Bänderungsanalyse können strukturelle und numerische Chromosomenveränderungen mit einer Auflösung von einer zytogenetischen Bande, im Mittel 10 Mb, festgestellt werden. Zur Charakterisierung von komplexen chromosomalen Regarrangements, wie sie bei vielen Tumoren die Regel sind (Speicher et al., 2000), reicht die schwarz-weiß Färbung der klassischen G-Bänderung jedoch meist nicht aus. Durch die Anwendung von Fluoreszenz in situ Hybridisierungstechniken, wie M-FISH (Speicher et al., 1996, SKY; Schrock et al., 1996, oder COBRA, Tanke et al., 1999), bei denen jedem Chromosom eine definierte Falschfarbe zugewiesen wird, wird die Detektion von strukturellen chromosomalen Aberrationen deutlich verbessert. Um einzelne Regionen im Genom gezielt genauer auf Veränderungen zu untersuchen, werden in weiterführenden Experimenten oft einzelne BAC (Bacterial-Artificial-Chromosomes) Klone auf Metaphasen und Zellkerne hybridisiert (Fauth et al., 2001). Das Auflösungsvermögen der Fluoreszenz in situ Hybridisierungstechniken wird durch Größe und Art der verwendeten Probe, d.h. durch das Detektionslimit des Mikroskops und der CCD (charged coupled device)-Kamera und durch die Zahl an verfügbaren Fluoreszenzfarbstoffen beschränkt (Fauth and Speicher, 2001). Bei den modernen, auf dem Prinzip der Fluoreszenz in situ Hybridisierungstechnik basierenden Array-Technologien, werden diese Limitationen zum Teil umgangen, so dass das gesamte Genom mit sehr hohem Auflösungsvermögen auf Veränderungen untersucht werden kann.

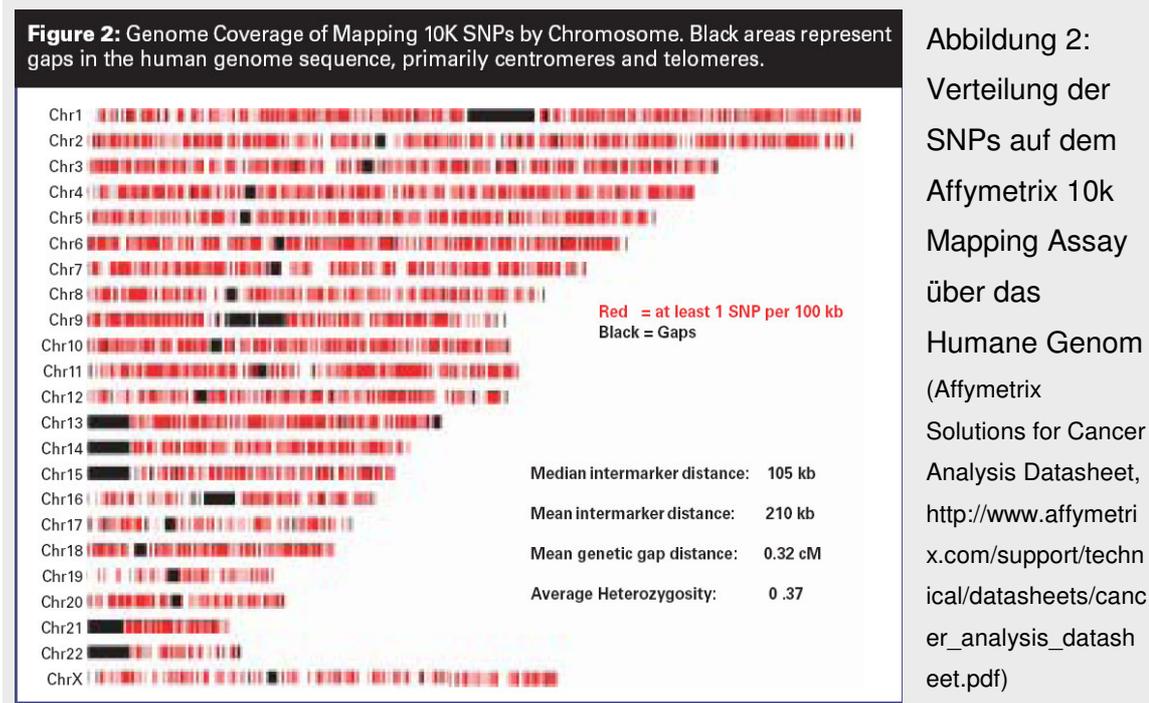


Abbildung 2:
Verteilung der
SNPs auf dem
Affymetrix 10k
Mapping Assay
über das
Humane Genom
(Affymetrix
Solutions for Cancer
Analysis Datasheet,
http://www.affymetrix.com/support/technical/datasheets/cancer_analysis_datasheet.pdf)

Zum Beispiel wird das Auflösungsvermögen der herkömmlichen Chromosomen CGH durch den Kondensationsgrad der Metaphasen bestimmt (du Manoir et al., 1995). Bei der Array-CGH wird dieses Problem umgangen, indem die Metaphase für die Hybridisierung sozusagen in ihre BAC-Klone unterteilt wird und diese auf einen festen Träger (Array) aufgebracht werden. Die zu testende DNS und die Referenz-DNS werden, wie für die herkömmliche Chromosomen-CGH vorbereitet und auf den Array hybridisiert. Das CGH-Profil wird erstellt, indem mit Hilfe von Computerprogrammen die einzelnen Signalpunkte auf dem Array ausgewertet und den korrespondierenden chromosomalen Regionen zugeordnet werden. Zur Bestimmung des Genotyps werden einzelne Regionen im Genom mit Mikrosatelliten-PCR charakterisiert (Little, 2003). Die Zahl der Regionen, welche mit einem vertretbaren Zeit und Materialaufwand untersucht werden können, ist begrenzt. Mit den in dieser Arbeit verwendeten Mapping Arrays kann der Genotyp von mehreren tausend Regionen gleichzeitig analysiert werden (http://www.affymetrix.com/support/technical/datasheets/10k_datasheet.pdf). Dazu werden zu SNPs (single nucleotide polymorphismen) korrespondierenden Oligonukleotidsonden auf einem festen Träger (Array) immobilisiert und markierte Test DNS wird auf den Array hybridisiert. Da sich auf dem 10k Mapping Assay von Affymetrix im Durchschnitt eine Oligonukleotidsonde pro 1000 bp im Genom befindet (Abbildung 2), ist das theoretische Auflösungsvermögen des Chips 1000 bp (http://www.affymetrix.com/support/technical/datasheets/10k_datasheet.pdf; Speicher and Carter, 2005).

A.3 Charakteristika von Harnblasentumoren

Blasentumore sind mit 336 000 neuen Fällen pro Jahr die siebthäufigste Tumorart weltweit. Sie treten v.a. im höheren Lebensalter auf (Eble et al., 2004). Mit einem Verhältnis von 3,5:1 ist das Erkrankungsrisiko dabei für Männer deutlich höher als das Erkrankungsrisiko für Frauen (Eble et al., 2004). Fortschritte bei der Früherkennung und bei der Behandlung haben die Prognose für Blasenkarzinompatienten deutlich verbessert. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt inzwischen bei 60-80% (Eble et al., 2004). Bekannte Risikofaktoren für die Entstehung von Harnblasenkarzinomen sind v.a. das Rauchen von Zigaretten, der Missbrauch von Analgetika und die berufliche Exposition zu karzinogenen Substanzen, wie aromatischen Aminen (Bichler et al., 2000; Eble et al., 2004). Darüber hinaus ist die Bilharziose, eine durch Schistosoma-Arten hervorgerufene chronische Infektionskrankheit, ein bekannter Risikofaktor für die Entstehung von Blasentumoren (Bichler et al., 2000; Eble et al., 2004).

Es gibt drei morphologisch verschiedene Typen von Harnblasenkarzinomen: das sogenannte Plattenepithelkarzinom, das Adenom und das vom Übergangsepithel ausgehende Malignom. In Europa und den USA sind Karzinome des Übergangsepithels (Transitional Cell Carcinoma, TCC) mit 79 bzw. 84 % (Frauen bzw. Männer) die verbreitetste Form bei den Blasentumoren (Eble et al., 2004).

A.3.1 Klinik

Das Leitsymptom des Harnblasenkarzinoms ist in ca. 80% der Fälle die schmerzlose Makrohämaturie (Eble et al., 2004). Für eine genauere Diagnostik können Zellen aus Spontan- oder Spül-Urin mikroskopisch auf Veränderungen untersucht werden. Mit Hilfe der Fluoreszenz in situ Hybridisierungstechnik (UroVysion™ Bladder Cancer Kit, Vysis) können u.a. an den Zellen numerische Veränderungen der Chromosomen 3, 7, 17 und der Chromosomenregion 9p21 detektiert werden. Die Ergebnisse aus der nichtinvasiven Untersuchung der Zellen aus Urin sind aber bisher noch nicht aussagekräftig genug, um den Tumor genau zu klassifizieren und zwischen aggressiven infiltrierenden und nicht infiltrierenden Formen zu unterscheiden (Eble et al., 2004). Deshalb werden diese Ergebnisse zur Zeit nur als Ergänzung zur herkömmlichen Harnblasenspiegelung, oder aber zur Verlaufskontrolle nach Tumorresektion, verwendet. Durch den Einsatz von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA)-induzierter Fluoreszenztechnik konnte die Sensitivität für die Tumordetektion während der Harnblasenspiegelung um 25% und für die Detektion von Dysplasien und Karzinoma in situ (CIS) um 50-60% gesteigert werden (Jichlinski et al., 1997; Zumbraegel et al., 2003). Für eine genaue Klassifikation der Veränderungen ist es

jedoch immer noch notwendig Tumore und Dysplasien zu resektieren und einen histologischen Befund zu erstellen. Es wäre wünschenswert in naher Zukunft durch eine genetische Charakterisierung von Zellen aus Urin, d.h. durch eine nicht invasive Diagnostik, Tumore schon im sehr frühen Stadium detektieren zu können und möglicherweise sogar schon im frühen Stadium zu erkennen, ob es sich um eine aggressive oder eine eher harmlose Tumorform handelt (Little, 2003).

A.3.2 TNM-Klassifikation

Ein wichtiges Klassifikationskriterium für Harnblasenkarzinome ist die Infiltrationstiefe. Sie wird bei der Einteilung in die verschiedenen Tumorstadien (TNM-Klassifikation, Abbildung 3) berücksichtigt (Eble et al., 2004). Im klinischen Alltag wird allgemein zwischen oberflächlich wachsenden, nicht infiltrierenden Karzinomen (pTa, CIS, pT1) und infiltrierenden Karzinomen (\geq pT2) unterschieden (Eble et al., 2004). Genau genommen beschränken sich aber nur die pTa-Tumore und die Karzinoma in situ (CIS) ausschließlich auf die Blasenmukosa. Im pT1-Stadium infiltrieren die Tumore schon das subepitheliale Bindegewebe und reichen bis an die untere Begrenzung davon (Lamina propria) heran. Invasive Tumorformen (\geq pT2) haben die Lamina propria durchbrochen und reichen mindestens in die oberflächliche Muskelschicht hinein. Bei den pT3-Tumoren ist bereits das perivesikale Gewebe infiltriert. Im Stadium pT4 sind auch Nachbarorgane des kleinen Beckens (Prostata, Samenblase, Uterus, Vagina) betroffen (Eble et al., 2004). Abbildung 3 fasst die bisher beschriebene Unterteilung der verschiedenen Tumorstadien zusammen.

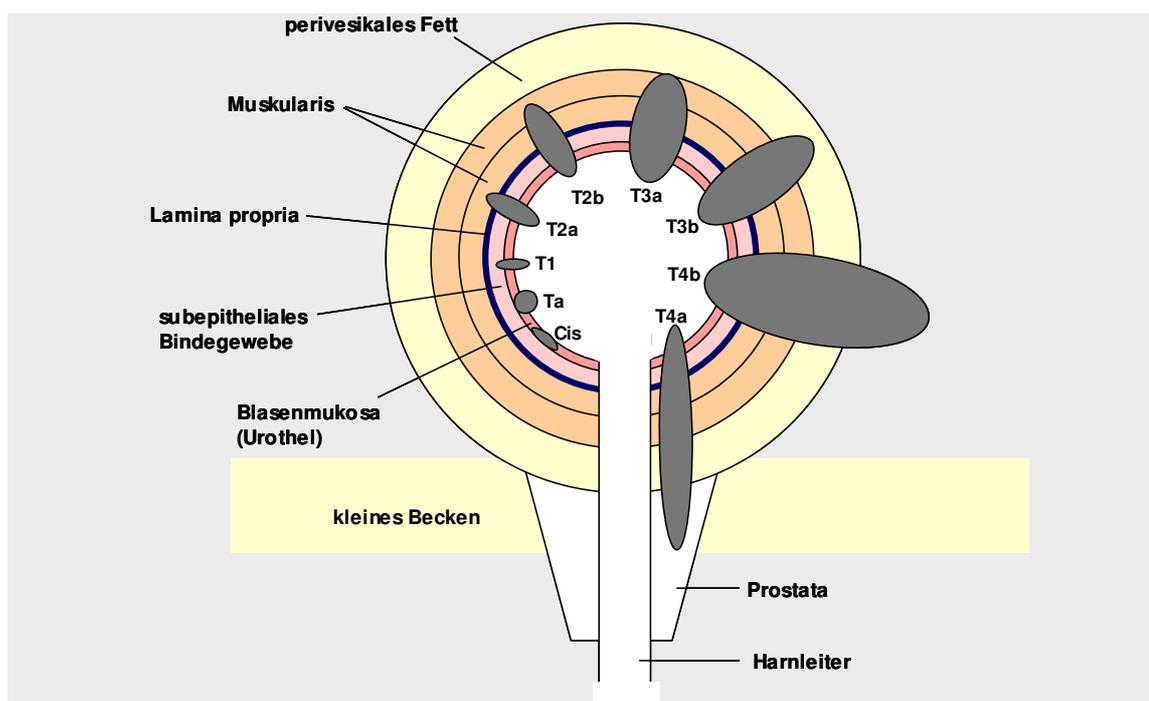


Abbildung 3: Schema zur TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms (nach Bichler et al., 2000)

Entsprechend der WHO-Klassifikation für Tumore (Eble et al., 2004) gehören zu den nicht-invasiven Formen der Blasen-tumore die sogenannten Karzinoma in situ Formen (CIS), niedriggradige (hoch differenzierte) nicht-invasive papilläre Urothelkarzinome (pTaG1-2, NILGC), hochgradige (niedrig differenzierte) nicht-invasive papilläre Urothelkarzinome (pTaG3, NIHGC), sogenannte nicht-invasive papilläre Urothelkarzinome mit niedrigem malignen Potential (PUNMLP), Papillome und invertierte Papillome. Als Vorläufer für invasive und nicht-invasive Urothelkarzinome gelten Hyperplasien und Dysplasien (Abbildung 4). Man geht davon aus, dass sich die invasiven Tumorformen entweder von hochgradigen (niedrig differenzierte) nicht-invasiven papillären Urothelkarzinomen (pTaG3, NIHGC) oder von Carzinoma in situ (CIS) ableiten (Abbildung 4).

A.3.3 Genetik der Harnblasenkarzinome

Die histologisch unterschiedlichen, nicht-invasiven Formen des Harnblasenkarzinoms unterscheiden sich auch bezüglich ihrer genetischen Stabilität. Nicht-invasive niedriggradige papilläre Blasen-neoplasien (pTaG1-2) haben nur wenige genetische Veränderungen und werden deswegen als "genetisch stabil" bezeichnet (Eble et al., 2004). Verlust von Chromosom 9 und Mutationen im FGFR3-Gen und HRAS-Gen sind die häufigsten bekannten genetischen Veränderungen in diesen Tumoren (Wu, 2005). Gen-Amplifikationen und TP53 Mutationen sind selten. Aneuploidien der gesamten DNS kommen in weniger als 50% vor (Eble et al., 2004). Hochgradige nicht-invasive papilläre Urothelkarzinome (pTaG3), CIS und invasiv wachsende (pT1-4) Karzinome sind genetisch instabil und besitzen im Durchschnitt 7-10 numerische Veränderungen pro Zelle (Eble et al., 2004). Verlust von Chromosom 9 gehören auch in diesen Formen zu den frühen genetischen Veränderungen (Wu, 2005). Darüber hinaus findet man Mutationen in den Tumorsuppressorgenen TP53 und RB, sowie in Genen, die mit der Tumorprogression und Metastasierung in Zusammenhang stehen (N-Cad, E-cad, MMPs, VEGF, TSP1, COX2; siehe auch Abschnitt A.3.5, Abbildung 5). Aneuploidien der gesamten DNS kommen in mehr als 90% der invasiven Tumore vor (Eble et al., 2004). Der Grad der genetischen Instabilität korreliert direkt mit Tumorstadium und Tumorgrad. Abbildung 4 fasst die bisher erwähnten Charakteristika zusammen.

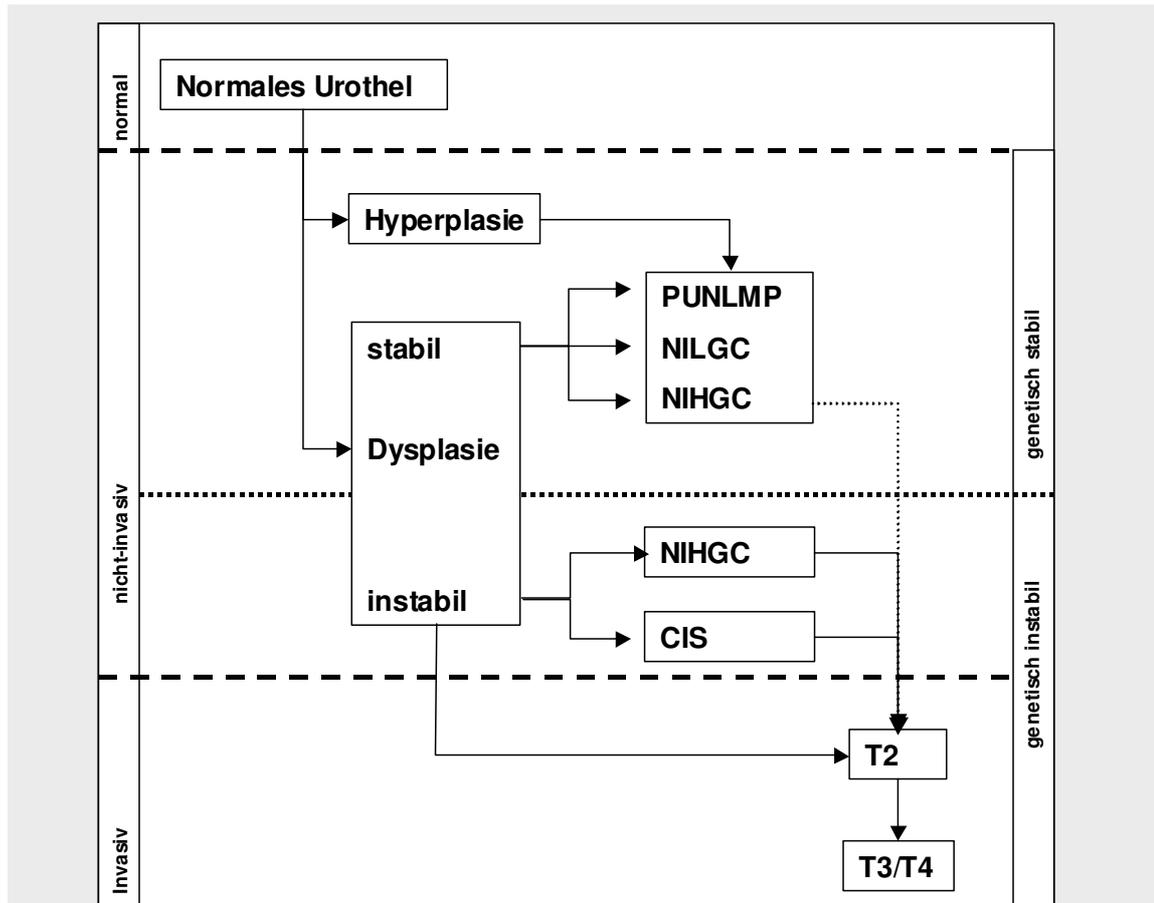


Abbildung 4: Entwicklung von Harnblasenkarzinomen;

durchgezogene Linien geben die wahrscheinlichen Entstehungspfade an, gepunktete Linien eher unwahrscheinliche Entwicklungspfade (Eble et al., 2004) (PUNLMP) papillary Urothelcarcinoma with low malignant potential, (NILGC) non invasive low grade carcinoma, (NIHG) non invasive high grade carcinoma, (CIS) Carcinoma in situ.

A.3.4 Tumorprogression

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose sind ca. 70-80% aller Tumore nicht invasiv und von diesen entwickeln sich nur 5 bis 10% zu infiltrierenden Tumoren weiter. Jedoch treten 50% der Tumore nach einiger Zeit wieder auf (Eble et al., 2004). Nach erstmaligem Wiederauftreten steigt das Risiko für ein weiteres Wiederkehren des Tumors sogar auf 80%. Papillome haben die beste Prognose, d.h. das niedrigste Risiko zu rezidivieren oder sich zu aggressiven Formen weiter zu entwickeln (Eble et al., 2004). PUNLMP haben ein etwas höheres Rezidiv-Risiko (35%), aber das Risiko sich zu einer malignen Form weiter zu entwickeln ist immer noch sehr gering. Nicht invasive niedrig-gradige papilläre Blasenkarzinome (pTaG1-2) kehren dagegen in 70%-80 der Fälle zurück und 12-15% der Tumore entwickeln sich zu invasiven Formen weiter (Eble et al., 2004). Die schlechteste Prognose bei den nicht invasiven Harnblasenkarzinomen haben Patienten mit einem nicht invasiven höher-gradigen papillären Blasenkarzinom

(pTaG3). Bis zu 65% dieser Patienten sterben an den Folgen des Harnblasenkarzinoms (Eble et al., 2004)

A.3.5 Multifokalität, Entstehungshypothesen

Neben einem häufigen Wiederauftreten sind die Anwesenheit kaum sichtbarer flacher Läsionen, wie z.B. Hyperplasien oder Dysplasien, und eine Multifokalität von Neoplasien charakteristisch für Harnblasentumore. Es gibt zwei verschiedene Theorien darüber, warum sich Neoplasien in der Harnblase meist nicht auf einen einzelnen Tumor beschränken. Die Theorie über die Aussaat von Tumorzellen (Simon et al., 2001) geht davon aus, dass neoplastische Zellen nur an einer einzelnen Stelle in der Blase entstehen und sich später - entweder durch aktive Migration oder durch Abschuppung und anschließender Übertragung durch den Urin und Wiederansiedlung - an anderen Stellen in der Blase verteilen. Diese Theorie wird von der Tatsache unterstützt, dass der Großteil (80-90%) der multifokalen Blasenepithelneoplasien monoklonalen Ursprungs sind (Simon et al., 2001). Ein gewisser Teil der multifokalen Neoplasien ist aber polyklonal (Hafner et al., 2002; Hafner et al., 2001). Deshalb geht eine zweite Hypothese über die Entstehung von Harnblasentumoren, die sogenannte „field cancerization“ Hypothese, davon aus, dass Mutagene aus der Außenwelt ein ganzes Feld von genetisch veränderten Zellen in der Blase schaffen und diese genetisch instabilen Zellen dann der Ursprung für polyklonale maligne Veränderungen sind. Es wäre auch denkbar, dass alle Tumoren zu Anfang polyklonal sind, sich mit der Zeit meistens nur ein erfolgreicher Klon durchsetzt und so eine scheinbare Monoklonalität ergibt (Braakhuis et al., 2003; Hafner et al., 2002).

Klinische Daten und Forschungsergebnisse lieferten den Hinweis, dass die Entstehung und Progression von Harnblasenkarzinomen in zwei getrennten Wegen abläuft (Wu, 2005). Der eine Weg führt über die Hyperplasie zum niedriggradigen (hoch differenzierten), nicht-invasiven papillären Harnblasenkarzinom (Abbildung 5). Der zweite Weg führt über Dysplasien oder CIS zur Entstehung von hochgradigen (niedrig differenzierten), invasiven Formen des Harnblasenkarzinoms (Abbildung 5). Deletionen am Chromosom 9 sind frühe genetische Veränderungen und charakteristisch für beide Entstehungswege (Eble et al., 2004; Reznikoff et al., 2000; Wu, 2005). Bei der Entstehung eines hochdifferenzierten, nicht invasiven, papillären Harnblasenkarzinoms scheint die Aktivierung der Rezeptor Thyrosin Kinase (RTK)-Ras eine entscheidende Rolle zu spielen. Gene, welche RTK-Ras aktivieren sind in 30-40% (HRAS) oder sogar 60-70% (FGFR3) der Fälle mutiert (Wu, 2005).

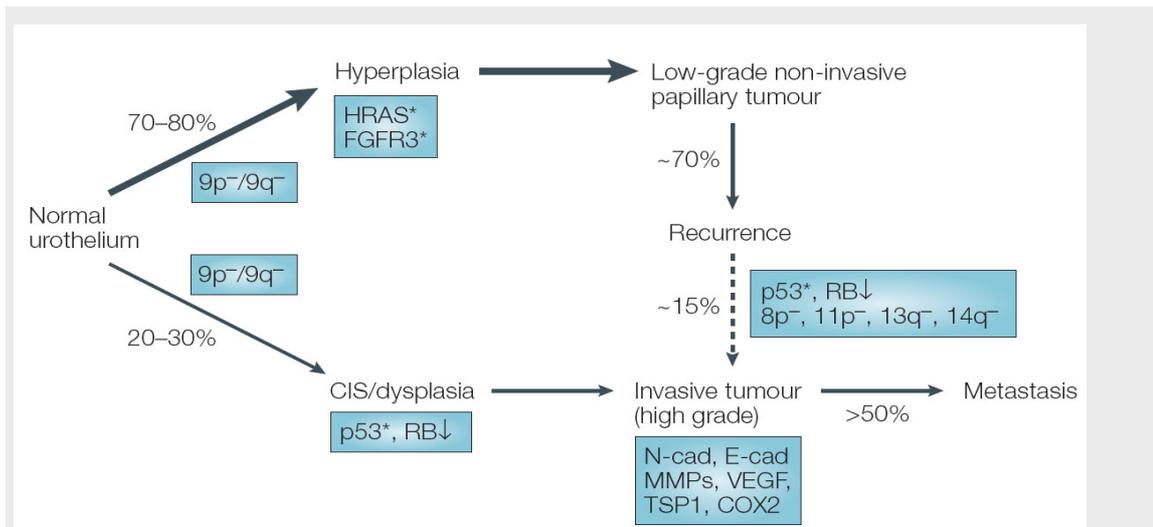


Abbildung 5: Zwei verschiedene Wege zur Entstehung und Progression des Harnblasenkarzinoms

HRAS (Onkogen), FGFR3 (Fibroblast growth factor receptor, Onkogen), p53 (Tumorsuppressor), RB (Retionblastoma Protein, Tumorsuppressor), N-cad (N-cadherin, Tumorprogression), E-cad (E-cadherin, Tumorprogression), MMPS (Matrix Metalloproteinasen, Tumorprogression), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor, Angiogenesefaktor), TSP1 (Trombospondin 1, Antiangiogenesefaktor), COX2 (Cyclooxygenase 2, Antiangiogenesefaktor), (Wu, 2005).

A.3.6. Histopathologie vs. Genetik

Die bisher aufgeführten Daten zum Harnblasenkarzinom verdeutlichen, dass der histopathologische Befund ein wertvoller prognostischer Faktor ist. Bei frühen Formen wie Hyperplasien und Dysplasien reichen die morphologischen Veränderungen des Gewebes jedoch nicht aus, um einzuschätzen, wie sie sich im Laufe der Zeit weiter entwickeln werden. Hyperplasien können zu papillären Tumorformen werden und sich sogar weiter zu aggressiven infiltrierenden Tumorformen entwickeln, können aber auch einfache Hyperplasien bleiben. Der histologische Befund liefert dazu keinen Anhaltspunkt. Dagegen können durch molekularzytogenetische Untersuchungen in Hyperplasien und sogar schon in normal erscheinendem Urothel, z.T. signifikante chromosomale Aberrationen gefunden werden. Sogar in histologisch normal erscheinendem Urothel von Blasenkarzinompatienten können chromosomale Aberrationen gefunden werden (Stoehr et al., 2005). Deshalb geht man davon aus, dass die genetische Analyse der histologischen Analyse in bezug auf die Diagnostik von frühen Neoplasien überlegen sein wird, sobald die charakteristischen genetischen Aberrationen der verschiedenen Tumortypen genau bekannt sind (Eble et al., 2004). Obwohl bis heute schon eine Vielzahl von Aberrationen beschrieben wurden, sind die charakteristischen genetischen Veränderungen, insbesondere der frühen Formen, bisher nur unzureichend bekannt.

A.4 Ziele dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten genomische Veränderungen des Harnblasenkarzinoms charakterisiert werden.

Durch Untersuchungen an Harnblasenkarzinom Zelllinien sollte die Tauglichkeit von dem Affymetrix GeneChip® Mapping Assay zur DNS-Kopienzahlanalyse validiert werden. Amplifikationen und Deletionen sollten detektiert und mit herkömmlichen Methoden wie Vergleichender Genomischer Hybridisierung (CGH) oder BAC-FISH (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit „Bacterial artificial Chromosom“-Proben) bestätigt werden.

Eine hochauflösende quantitative Analyse von Patientenproben mit dem Affymetrix GeneChip® Mapping Assay sollte klären, ob es gemeinsame Veränderungen im Genom von hoch differenzierten, papillären Harnblasenkarzinomen gibt. Durch einen paarweisen Vergleich von Tumormaterial mit korrespondierendem Normalgewebe sollten darüber hinaus Informationen über den Verlust der Heterozygotität (Loss of Heterozygoty, LOH) im Tumor gesammelt werden. Die LOH-Ergebnisse sollten mit der quantitativen Analyse korreliert werden, um Kandidatenregionen für charakteristische Veränderungen beim Harnblasenkarzinom zu identifizieren.

Die im Genom der Tumorproben gefundenen Veränderungen, sollten mit der Klinik der Patienten in Zusammenhang gebracht werden, um mögliche genetische Marker für die Tumorfrüherkennung und Prognose zu lokalisieren.

B: Material und Methoden

B.1 Verwendete Gebrauchslösungen

Für die Herstellung der Lösungen wurde entweder Aqua ad injectabilia (Delta Select GmbH, Pfullingen, Deutschland, im folgenden H_2O_{reinst}) oder einfach entionisiertes Wasser (im folgenden H_2O_{dest}) verwendet. Für die Verarbeitung der DNS für den Affymetrix GeneChip® Mapping Assay wurde Wasser von der Firma BioWhittaker Molecular Applications (Cambrex, BL, Kat. Nr. 51200, im folgenden H_2O_{MB}) verwendet. Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in p.a. Qualität bezogen und verwendet. Der pH-Wert von Lösungen wurde mit NaOH- und HCl-Lösungen entsprechender Verdünnungen und Normalitäten eingestellt. Alle Lösungen wurden, wenn nötig, in einem Wasserdampf-Hochdruckautoklaven (Vapoclv, Sterico, Dietikon, CH, oder Varioclav Typ 500, H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland) für 20 min bei 121 °C und $1,013 \times 10^5$ Pa Überdruck sterilisiert. Hitzelabile Substanzen, wie Antibiotika und Vitamine, wurden sterilfiltriert (Filter mit 0,22 µm Porengröße, Millipore, Eschborn, Deutschland) und nach dem Autoklavieren unter sterilen Bedingungen zugegeben.

B.1.1 Puffer

10 x PBS (Phosphorous Buffered Saline): 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,5 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 2,4 g KH_2PO_4 , ad 1 l mit H_2O_{dest} , pH 7,0

1 x PBS (Phosphorous Buffered Saline): 100 ml 10xPBS ad 1 l mit H_2O_{dest} , pH 7,0

20 x SSC (Standard Saline Citrat): 88,2 g 3M NaCit, 175,3 g NaCl ad 1 l mit H_2O_{dest} , pH 7,0

1 x SSC (Standard Saline Citrat): 100 ml 20xSSC ad 1 l mit H_2O_{dest} , pH 7,0

4 x SSC/Tween: 200 ml 20xSSC, 800 ml H_2O_{dest} , 2 ml Tween 20

50 x TAE: 242 g Tris base, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA ad 1 l H_2O_{dest} , pH 8

1 x TAE: 20 ml 50x TAE ad 1 l H_2O_{dest}

B.1.2 Gebrauchslösungen

5 mM AGC: aus dATP, dGTP und dCTP (je 100 mM, pH 7.5); Roche, Mannheim, Deutschland

0,5 mM AGC: 1 µl 5 mM AGC, 9 µl H_2O_{reinst}

Auftragspuffer: 0.25% Orange G (Merk 14 277), 15% Ficoll in H_2O_{reinst}

1%BSA: 1ml 3% BSA mit 2 ml 4xSSC/Tween verdünnen, bei -20 °C lagern

3%BSA: 0,3 g BSA (Sigma) in 10 ml 4xSSC/Tween lösen, bei -20 °C lagern

10xBSA: kommerzielle Lösung, New England Biolab, Deutschland, bei -20 °C lagern

Biotin-16-dUTP : 50nmol; Roche, Mannheim, Deutschland

Cy3-dUTP: 25 nmol; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland

B: Material und Methoden

Cy5-dUTP: 25 nmol; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland

DAPI-Stammlösung: 1 mg DAPI in 1 ml H₂O_{reinst}

DAPI-Arbeitslösung: 0,5 µl DAPI Stammlösung in 10 ml H₂O_{reinst}

DEAC (Diethylaminocoumarin)-5-dUTP: 25 nmol; NEN

Deionisiertes Formamid: pH 7; Sigma

Denaturierungslösung: 35 ml Formamid, 15 ml 2x SSC, pH 7

Denhardt's Solution: Sigma

30% DS (Dextransulfat): 3 g Dextransulfat in 10 ml 4xSSC/Tween lösen, bei -20°C lagern

40% DS (Dextransulfat): 4 g Dextransulfat (Sigma D6001-10G) in 10 ml 4xSSC/Tween lösen, bei -20°C lagern

Digoxigenin-11-dUTP, 125 nmol; Roche, Mannheim, Deutschland

DMSO: Sigma

0,5 M EDTA: pH8, Ambion

Ethidiumbromid-Stammlösung: 10 mg Ethidiumbromid in 1 ml H₂O_{reinst}

FITC-dUTP : 25mM; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland

FA: deionisiertes Formamid, Sigma

Fragmentation Reagent: DNaseI, 3 U/µl Affymetrix, UK, bei -20°C lagern

Gene Chip Labeling Reagent: Affymetrix, UK, bei -20°C lagern

Humane Cot-1 DNA: 1 mg/ml; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

HSDNA: Hering Sperm DNA, Promega

0,1M β-Mercaptoethanol: 1 µl 2-Mercaptoethanol mit 139 µl H₂O_{reinst} verdünnen, bei -20°C lagern

MES-free Acid monohydrate SigmaUltra: Sigma

MES-Sodium Salz: Sigma

12xMES: 70,4g MES-free Acid monohydrate SigmaUltra, 193,3g MES-Sodium Salz, 800 ml H₂O_{MB}, pH 6,5

MgCl₂: 50 mM, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

3M NaAc:

NE Puffer 2: kommerzielle Pufferlösung, New England Biolab, Deutschland, bei -20°C lagern

NuSieve® 3:1 Agarose: Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, USA

5 mM dNTPs: aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP (je 100 mM, pH 7.5); Roche, Mannheim, Deutschland

dNTPs: jeweils 2,5 mM, Panvera Takara, USA

10xNT-Puffer: 10 ml 1M TrisHCl (pH8,0), 1 ml 1M MgCl₂, 100 µl 10% BSA, ad 20 ml mit H₂O_{reinst} bei -20°C lagern

10 xPCR Puffer: 10x Salz ohne MgCl₂, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Salmon testes-DNA: 10.4 mg/ml, Sigma

5xTdT-Puffer: Terminale Desoxynucleotidyl Transferase Puffer, 5x, Affymetrix, UK, bei -20°C lagern

T4 DNA Ligase Puffer: kommerzieller Puffer, New England Biolab, Deutschland, bei -20°C lagern

5M TMACL: Tetramethyl Ammonium Chloride, Sigma

1M TrisHC pH 8,0: 60,55 g Tris base, 400 ml H₂O_{reinst}, pH 8,0 mit HCl_{konz}

5 mM dTTP: aus 100 mM dTTP, Roche, Mannheim, Deutschland

Texas Red – 12-dUTP: 1mM; Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

10% Tween-20: Sigma

Waschpuffer A: 300 ml 20xSSPE (BioWhittaker Molecular Applications, Cambrex, BL), 1,0 ml 10% Tween-20, ad 1l mit H₂O_{reinst}, sterilfiltrieren, 0,2 µm Filter, lagern auf RT

Waschpuffer B: 30 ml 20xSSPE (BioWhittaker Molecular Applications, Cambrex, BL), 1,0 ml 10% Tween-20, ad 1l mit H₂O_{reinst.} sterilfiltrieren, 0,2 µm Filter

B.1.3 Enzyme

DNA-Polymerase I: 5 U/µl; Boehringer Mannheim, Deutschland

DNase I Stammlösung: 3 mg DNase I (Roche 104 159) in 0.5 ml steriles 0,3M NaCl und 0.5 ml Glycerol lösen, bei -20 °C lagern

10% Pepin: 100 mg Pepsin (Sigma) in 1 ml H₂O_{reinst.} lösen, bei -20 °C lagern

Platinum Taq-Polymerase: 5U/µl, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

RNase Stammlösung: 10 mg RNase I (Roche109 134) in 1 ml sterilem TE-Puffer lösen, bei -20 °C lagern

Taq-Polymerase: 5U/µl, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

TdT: Terminale Desoxynucleotidyl Transferase 30 U/µl, Affymetrix, UK, bei -20 °C lagern

T4 DNA Ligase: 100 000U/µl, New England Biolab, Deutschland, bei -20 °C lagern

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium): 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, ad 1l H₂O_{reinst.}, pH 7

LB_{Amp.}Medium: 1 µl Ampicillinlösung pro ml LB-Medium

Xbal: 20 000U/ml, New England Biolab, Deutschland, bei -20 °C lagern

B.1.4 Fluorochrome

Folgende Fluorochrome wurden in dieser Arbeit verwendet:

Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Emmissionsmaximum
Diethylaminocoumarin (DEAC)	426 nm	480 nm
Fluorescein (FITC)	495 nm	521 nm
Cyanine Farbstoff (Cy3)	554 nm	568 nm
Cyanine Farbstoff (Cy3.5/TR)	581 nm	588 nm
Cyanine Farbstoff (Cy5)	652 nm	672 nm
Cyanine Farbstoff (Cy5.5)	682 nm	703 nm
Cyanine Farbstoff (Cy7)	710 nm	805 nm
6-FAM	495 nm	520 nm
TAMRA	546 nm	579 nm

Tabelle 1: Verwendete Fluorochrome

Die Fluorochrome waren entweder an Antikörper oder an dUTP gekoppelt.

B.2 Verwendete Technische Geräte

Gerät	Herstellerdaten
Inkubatoren	CO ₂ Inkubator BBD 6220, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
Gradientencycler	DNA Engine Tetrad PTC-225, MJ-Research, Biorad Laboratories, Waltham USA
Real-Time Thermocycler	API Prism® 7000, Eurogentec, Deutschland
Elektrophorese-Apparatur	Unipack 500 Power Supply und MIDI-Large Kammern, UniEquipe Laborgeräte und Vertrieb mBH, Martinsried, Deutschland
Epifluoreszenzmikroskop	Axioplan2 MOT mit motorisiertem Objektträgertisch, Zeiss, Jena, Deutschland Leica DMRXA-RF8, Leica Microsystems, Bensheim, Deutschland
Kühlzentrifuge	Micro22R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Mikroliterzentrifuge	Heraeus Biofuge Pico, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
Zentrifuge	Hereus Multifuge 3L, Hereus Laborfuge 300, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
Wasserbäder	Typ 1003, Typ 1002, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland MP-5, Julabo, SeelBACH Deutschland
UV-Apparatur	UV-Kompaktisch TCP-20.M, UV-Consulting Peschl, Mainz, Deutschland
Photometer	Biomate 3, Thermo Electron Corporation, Bremen, Deutschland

Tabelle 2: Verwendete Technische Geräte

B.3 Verwendete Bacterial-Artificial-Chromosomen (BACs)

Die folgende Liste informiert über Details der verwendeten BAC-Plasmide. Sämtliche Plasmide wurden als rekombinante *E. coli* Klone über das Sanger-Center (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/teams/team38/CloneRequest/CloneRequest>) bezogen. Die in Form von Weichagar verschickten Klone wurden wie in Abschnitt B.6.2 beschrieben kultiviert. Die Plasmide wurden wie in Abschnitt B.8.2 beschrieben isoliert.

Klonname	Target Zelllinie	Lokalisation	physikal. Kartierung	Klonname	Target Zelllinie	Lokalisation	physikal. Kartierung
RP11-458F20	BC3C	5p13.3	31,51-31,57 Mb	RP11-473O3	alle	9p21.3	21,67-21,73 Mb
RP11-152K4	BC3C	5p13.3	31,2-31,4 Mb	RP11-70L8	alle	9p21.3	21,7-21,9 Mb
RP11-5N11	BC3C	5p13.3	31,67-31,81 Mb	RP11-149I2	alle	9p21.3	21,90-22,00 Mb
RP11-422J14	BC3C	5p13.3	32,2-32,21 Mb	RP11-145E5	alle	9p21.3	22,00-22,16 Mb
RP11-461 E7	BC3C	5p13.3	32,3-32,4 Mb	RP11-408N14	alle	9p21.3	22,2-22,3 Mb
RP11-460D11	BC3C	5p13.3	32,8 Mb	RP11-441I5	alle	9p21.3	22,31-22,48 Mb
RP11-36C20	BC3C	5p13.3	33,1-33,2 Mb	RP11-512M18	BC3C	9p21.3	22,58-22,61 Mb
RP11-9H15	BC3C	5p13.3	34,1 Mb	RP11-370B11	BC3C	9p21.3	22,6-22,8 Mb
RP11-153N15	BC3C	5p13.2	34,4-34,6 Mb	RP11-399D6	BC3C	9p21.3	40,6-40,8 Mb
RP11-2A08	BC3C	5p13.3	34,9 Mb	RP11-103B9	BC3C	9p21.3	22,88-23 Mb
RP11-146A11	BC3C	5p13.2	35,3 Mb	RP11-167O6	EJ28	10p11.22	32,12-32,31 Mb
RP11-131 E15	BC3C	5p13.2	36,2 Mb	RP11-241I20	EJ28	10p11.22	32,30-32,45 Mb
RP11-151J19	BC3C	5p13.2	36,4 Mb	RP11-490O24	EJ28	10p11.22	34,18-34,35 Mb
RP11-317I23	BC3C	5p13.2	36,7-36,8 Mb	RP11-51B10	EJ28	10p11.2	35,12-35,30 Mb
RP11-169M01	BC3C	5p13.2	36,4 Mb	RP11-424H16	EJ28	10p11.21	36,47-36,65 Mb
RP11-109 E20	BC3C	5p13.2	37,1 Mb	RP11-291L22	EJ28	10p11.21	38,69-38,86 Mb
RP11-302I6	BC3C	5p13.2	37,67-37,8 Mb	RP11-453N3	EJ28	10cen	38,90-39,12 Mb
RP11-20K02	BC3C	5p13.3	38,2 Mb	RP11-165M8	EJ28	10q23.31	89,53-89,69 Mb
RP11-122C5	BC3C	5p13.1	38,7-38,9 Mb	RP11-425M17	EJ28	10q23.31	90,21-90,4 Mb
RP11-315A2	BC3C	5p13.1	37,67-39 Mb	RP11-94M14	EJ28	10q23.31	92,17-92,36 Mb
RP11-138C1	BC3C	5p13.1	39,2-39,4 Mb	RP11-106M14	EJ28	10q23.32	93,31-93,49 Mb
RP11-499B18	BC3C	5p13.3	39,5 Mb	RP11-30E16	EJ28	10q23.33	95,23-95,4 Mb
RP11-386 E5	BC3C	5p13.1	40,4-40,5 Mb	RP11-429H9	EJ28	10q23.33	95,66-95,84 Mb
RP11-263G2	BC3C	5p13.1	40,6-40,8 Mb	RP11-359 E10	SW1710	11p15.1	19,62-19,8 Mb
RP11-70K05	BC3C	5p13.3	41,2 Mb	RP11-6K5	SW1710	11p15.1	20,21-20,37 Mb
RP11-203G23	BC3C	5p13.1	41,5-41,6 Mb	RP11-3 E17	SW1710	11p15.1	20,75-20,90 Mb
RP11-112L7	BC3C	5p13.1	42,1-42,3 Mb	RP11-428C19	SW1710	11p15.1	19,09-19,29 Mb
RP11-434D11	HT1376	5q23.2	126,05-126,23 Mb	RP11-15D10	SW1710	11p14.3	21,76-21,92 Mb
RP11-483H11	HT1376	5q23.2	127,07-127,23 Mb	RP11-265F24	SW1710	11p14.3	21,89-22,07 Mb
RP11-326A8	HT1376	5p24.2	3,36-3,54 Mb	RP11-139M16	SW1710	11p14.3	22,53-22,71 Mb
RP11-32F11	HT1376	5p24.2	3,1-3,27 Mb	RP11-17A1	SW1710	11p14.3	22,76-22,91 Mb
RP11-207C16	HT1376	5p24.1	5,64-5,81 Mb	RP11-349A20	SW1710	11p14.3	22,93-23,10 Mb
RP11-16D05	BC3C	5q33.2	154,8 Mb	RP11-423H12	SW1710	11p14.3	24,06-24,24 Mb
RP11-102B3	BC3C	5q33.2	154,9-155,0 Mb	RP11-47K5	SW1710	11p14.3	25,15-25,31 Mb
RP11-318B23	BC3C	5q33.2	154,95-155,2 Mb	RP11-35P21	SW1710	11p14.3	25,3-25,46 Mb
RP11-351F14	BC3C	5q33.2	155 Mb	RP11-248 E9	SW1710	12q21.32	86,6-86,7 Mb
RP11-17H16	BC3C	5q33.2	155,6 Mb	RP11-464G3	SW1710	12q21.32	87,2-87,4 Mb
RP11-429O2	SW1710	8p21.2	24,91-25,09 Mb	RP11-463N10	SW1710	12q21.33	87,67-87,8 Mb
RP11-395I14	SW1710	8p21.2	25,15-25,34 Mb	RP11-495C19	SW1710	12q21.33	87,96-88,07 Mb
RP11-521M14	SW1710	8p21.2	26,98-27,16 Mb	RP11-18J9	SW1710	12q21.31	84,7-84,9 Mb
RP11-380I10	SW1710	8p21.1	28,08-28,26 Mb	RP11-408B11	SW1710	12q21.31	84,19-84,27 Mb
RP11-486M23	SW1710	8p21	29,35-29,54 Mb	RP11-1H8	SW1710	15q14	32,52-32,67 Mb
RP11-94H18	SW1710	8p21	29,80-29,95 Mb	RP11-323I15	SW1710	15q14	33,08-33,26 Mb
RP11-177H13	SW1710	8p21.3	23,11-23,29	RP11-37C7	SW1710	15q14	37,77-37,93 Mb
RP11-175E9	SW1710	8p21.2	23,66-23,81 Mb	RP11-151N17	SW1710	15q21.1	42,59-42,76 Mb
RP11-113D19	BC3C	9p21.3	20,996-21,16 Mb	RP11-25H11	SW1710	15q14	35,46-35,6 Mb
RP11-1P8	BC3C	9p21.3	21,16-21,21 Mb	RP11-102L12	SW1710	15q14	36,45-36,61 Mb
RP11-380P16	BC3C	9p21.3	21,2-21,3 Mb	RP11-96O20	SW1710	15q21.1	43,6-43,8 Mb
RP11-344A7	alle	9p21.3	21,5-21,7 Mb				

Tabelle 3: Hybridisierte Bacterial Artificial Klone

B.4 Verwendete Zelllinien und klinische Proben

Tabelle 4 fasst alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien zusammen. Die Kultivierung wird in Abschnitt B.6.1 genauer erläutert.

Zelllinie	Klinik	DSM ²¹ -Nummer
<i>BC-3C</i>	weiblich, 82 Jahre, Kaukasierin, TCC, G4 stage C, invasiv	ACC 450
<i>EJ28</i>	weiblich, 81 Jahre, Kaukasierin, TCC, G3	Subzelllinie von T-24, s.u.
<i>HT-1376</i>	weiblich, 58 Jahre, Kaukasierin, TCC, G3, invasiv, pleomorph	ACC 397
<i>CAL29</i>	weiblich, 80 Jahre, Kaukasierin, TCC, G4T ₂	ACC 515
<i>SW-1710</i>	weiblich, 84 Jahre, Kaukasierin, TCC	ACC426
<i>T-24</i>	weiblich, 81 Jahre, Kaukasierin, TCC, G3	ACC 376

Tabelle 4: Verwendete Zelllinien

Zelllinien BC-3C, HT1376, CAL29, SW-1710 und T-24 wurden über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen¹ bezogen. Die Harnblasenkarzinom-Zelllinie EJ28 wurde uns freundlicherweise von Dr. Rainer Gangnus (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Diese Zelllinie kann nicht über eine der gängigen Kultursammlungen^{1,2}, bezogen werden. Leider konnte der Ursprung der Zelllinie EJ28 nicht eindeutig rekonstruiert werden. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass die Zelllinien EJ28 und T24 den selben Ursprung haben und es sich bei Zelllinie EJ28 um eine Subpopulation von Zelllinie T24 handelt.

1978 wurde die Harnblasenkarzinom Zelllinie MGH-U1 beschrieben (Kato et al., 1978), welche später auch unter dem Synonym EJ verwendet wurde (Lin et al., 1985; O'Toole et al., 1983). Experimente von O'Toole und Kollegen, sowie Lin und Kollegen zeigten, dass die Zelllinien MGH-U1 (EJ) und T-24 sehr starke Ähnlichkeiten, z.B. in Bezug auf Wachstumskinetik, Karyotyp und verschiedene tumorspezifische Eigenschaften besitzen und folgerten daraus, dass beide Zelllinien den selben Ursprung haben. Da es aber auch einige morphologische und biochemischen Unterschiede zwischen den Zelllinien MGH-U1 (EJ) und T-24 gibt, gehen Lin und Kollegen davon aus, dass es die Zelllinien MGH-U1 (EJ) durch die Selektion eines Subklons von der Zelllinie T-24 entstanden ist (Lin et al., 1985).

¹ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, 38124 Braunschweig, Deutschland, www.dsmz.de

² American Type Culture Collection, LGC Promochem, 46485 Wesel, Deutschland, www.lgcpromochem-atcc.com

Im Zuge des "Cancer Genome Project" am Sanger Centre (www.sanger.ac.uk) werden Zelllinien mithilfe des Affymetrix GeneChip® Mapping Assays genotypisiert und paarweise miteinander verglichen. Zelllinie T24 zeigt dabei eine 96.8%ige Identität zu einer Zelllinie mit dem Namen EJ-1. Auch Zelllinie EJ-1 kann nicht über eine der gängigen Kultursammlungen^{1,2}, bezogen werden und ihr Ursprung konnte nicht eindeutig rekonstruiert werden.

Die in den publizierten Arbeiten verwendeten Zelllinien EJ28 wurden teilweise von Frau Professor Margaret Knowles (Cancer Research Centre, St James's University Hospital, Leeds, UK) zur Verfügung gestellt (Fujiyama et al., 2001). Nicht veröffentlichte Untersuchungen in ihrem Labor führten auch zu dem Ergebnis, dass Zelllinien T24 und EJ28 in wesentlichen genetischen Charakteristika (M-FISH Karyotyp, Mikrosatellitenanalyse) übereinstimmen (Frau Professor Margaret Knowles, persönliche Korrespondenz).

Tabelle 5 fasst alle in dieser Arbeit verwendeten Gewebeproben zusammen. Die Gewebeproben wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. med. R. Knüchel-Clarke zur Verfügung gestellt. Die Gewebeproben wurden ursprünglich am Klinikums Rechts der Isar (München, Deutschland) gewonnen und Schockgefroren und anschließend am Universitätsklinikum Aachen begutachtet und mikrodisseziert. Aus den mikrodissezierten Gewebeproben wurde wie in Abschnitt B.8.1 beschrieben DNS gewonnen. Leider waren für einige Gewebeproben die Patientendaten nicht mehr nachvollziehbar.

B: Material und Methoden

Probennummer	Patientendaten	Tumorklassifikation	
4423/A/98_U		pTaG1	
4423/A/98_S		Stroma (subepitheliales Bindegewebe)	
4423/A/98_Blut		Blut	
4418/D/97_U		pTaG1	
4418/D/97_S		Stroma (subepitheliales Bindegewebe)	
4418/D/97_Blut		Blut	
27182/03/A3_U		pTaG1	
27182/03/A3_S		Stroma (subepitheliales Bindegewebe)	
22452/G2/04_U		pTaG1	
22452/G2/04_S		Stroma (subepitheliales Bindegewebe)	
04_18223/04/A2_U	männlich, 51 Jahre	papilläre differenziertes Urothelkarzinom, pTaG1	multifokal
04_18223/04/A2_S	männlich, 51 Jahre	Stroma (subepitheliales Bindegewebe)	multifokal
04_11703/04/A3_U	männlich, 42 Jahre	papilläre hoch differenziertes Urothelkarzinom, pTaG1	multifoka
04_11703/04/A3_S	männlich, 42 Jahre	Stroma (subepitheliales Bindegewebe)	multifoka
04_13183/04/A1_U	männlich, 88 Jahre	papilläre hoch differenziertes Urothelkarzinom, pTaG1	monofokal
04_13183/04/A1_S	männlich, 88 Jahre	Stroma (subepitheliales Bindegewebe)	monofokal
04_13181/04/C_U	männlich, 79 Jahre	papilläre hoch differenziertes Urothelkarzinom, pTaG1	monofokal
04_13181/04/C_S	männlich, 79 Jahre	Stroma (subepitheliales Bindegewebe)	monofokal
03_23878/03/A3_U	männlich, 75 Jahre	papilläre hoch differenziertes Urothelkarzinom, pTaG1	monofokal
03_23878/03/A3+A2_S	männlich, 75 Jahre	Stroma (subepitheliales Bindegewebe)	monofokal
03_22926_U	männlich, 56 Jahre	papilläre hoch differenziertes Urothelkarzinom, pTaG1	monofokal
03_22926_S	männlich, 56 Jahre	Stroma (subepitheliales Bindegewebe)	monofokal
03_19604/03/A_U	weiblich, 72 Jahre	papilläre hoch differenziertes Urothelkarzinom, pTaG1	multifokal
03_19604/03/A_S	weiblich, 72 Jahre	Stroma (subepitheliales Bindegewebe)	multifokal
04_15130/04/1b_U	männlich, 60 Jahre	papilläre hoch differenziertes Urothelkarzinom, pTaG1	monofokal
04_15130/04/1b_S	männlich, 60 Jahre	Stroma (subepitheliales Bindegewebe)	monofokal
03_26062/03/A3_U	männlich, 81 Jahre	papilläre hoch differenziertes Urothelkarzinom, pTaG1	monofokal
03_26062/03/A3_S	männlich, 81 Jahre	Stroma (subepitheliales Bindegewebe)	monofokal
03_26062/03/A1+A3_U	männlich, 81 Jahre	papilläre hoch differenziertes Urothelkarzinom, pTaG1	monofokal
03_26062/03/A1_S	männlich, 81 Jahre	Stroma (subepitheliales Bindegewebe)	monofokal

Tabelle 5: Verwendete Gewebeproben

B.5 Verwendete Nährmedien

Tabelle 6 fasst alle in dieser Arbeit verwendeten Nährmedien zusammen. Zu den kommerziellen Nährmedien für die Zellkultur wurde vor Gebrauch 10-20% (v/v) Fetales Bovines Serum (FBS, PAN Biotech GmbH, Kat.-Nr. 3302-P230307, Aidengach, Deutschland) und 2% (v/v) Penicillin/Streptomycin (10 000 U/10mg/ml, PAN Biotech GmbH, Kat.-Nr. P11-010, Aidenbach, Deutschland) zugegeben. Im Folgenden werden diese, mit mit FBS und Penicillin/Streptomycin komplettierten Medien nur als „Medium“ bezeichnet. Die Kultivierung der Zelllinien wird in Abschnitt B.6.1 genauer erläutert.

Medium	Klinik	Hersteller	Katalognummer
RPMI	RPMI1640 Medium +25mM HEPES +LGlutamine	Gibco®, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	52400-025
McCoy	McCoy's 5A Medium +Glutamax-I	Gibco®, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	36600-021
DMEM	Dulbecco's MEM, 3,7 g/l NaHCO ₃ , 4,5 g/l D-Glucose, 1.028 g/l stabiles Glutamine	Biochrom AG, Berlin, Deutschland	FG 0445

Tabelle 6: Verwendete Nährmedien

B.6 Kultivierung und Stammhaltung

B.6.1 Kultivierung von Harnblasenkarzinom-Zelllinien

Die Harnblasenkarzinom-Zelllinien wurden entsprechend der Anweisungen der DSMZ kultiviert (siehe Tabelle 7). Im Allgemeinen wuchsen die Zellen so schnell, dass sie zweimal in der Woche geteilt werden mussten. Dazu wurde das Medium abgenommen, der Zellrasen mit 1 x PBS gewaschen und dann ca. 1ml Trypsin/EDTA (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) zugegeben. Wenn sich der Zellrasen vom Flaschenboden gelöst hatte, wurde die Trypsinreaktion durch die Zugabe von Medium gestoppt. Die Hälfte der Zellsuspension wurde in eine neue Zellkulturflasche überführt und jede Hälfte wurde mit frischem Medium auf 5 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden im CO₂-Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 81% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Medium	Zusatz	Zelllinie
DMEM	15% FBS, 2% Penicillin/Streptomycin	HT-1376, SW-1710
McCoy	10% FBS, 2% Penicillin/Streptomycin	Cal-29,BC-3C
DMEM	10% FBS, 2% Penicillin/Streptomycin	T-24
RPMI	10% FBS, 2% Penicillin/Streptomycin	EJ-28

Tabelle 7: Empfohlene Nährmedien

B.6.2 Kultivierung von rekombinanten *Escherichia coli*

Rekombinante *E. coli* Klone (siehe Abschnitt B.3) wurden nach der Lieferung auf LB_{Chloramp} bzw. LB_{Amp}-Platten vereinzelt und anschließend in LB_{Chloramp} bzw. LB_{Amp}-Flüssigmedium bei 37 °C über Nacht kultiviert. Die Platten wurden bei 4 °C gelagert, von den Flüssigkulturen wurden, wie unter B.8.2 beschrieben, Plasmide isoliert.

B.6.3 Stammhaltung

Zur Stammhaltung von rekombinanten *E. coli*-Klonen wurden Glycerinkulturen angefertigt. Dazu wurden 1ml Übernacht-Kultur mit 500 µl 50% (v/v) sterilem Glycerin vermischt, in einem EtOH/Trockeneisbad abgekühlt und anschließend bei –80 °C gelagert.

Auch zur Stammhaltung von Harnblasenkarzinom-Zelllinien wurden Glycerinkulturen angefertigt. Dazu wurde von konfluent wachsenden Kulturen das Medium abgenommen, die Zellen mit sterilem 1 x PBS gewaschen und mit ca. 1ml Trypsin/EDTA (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) vom Flaschenboden abgelöst. Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe von ca. 5 ml, auf 37 °C vorgewärmten Medium gestoppt, die Suspension wurde in ein 10 ml Greiner Röhrchen überführt und zentrifugiert (10 min, 1000 rpm, Heraeus Multifuge 3L). Das Zellpellet wurde in 1 ml Medium resuspendiert, mit 1 ml Einfriermedium (8 ml Medium mit 10% FBS und 2% Pen/Strep, 1 ml FBS, 1 ml DMSO) gemischt und bei –80 °C gelagert.

B.7 Herstellung von Metaphasepräparaten

B.7.1 Colcemidbehandlung, Hypotonie und Fixierung

Zu sich teilenden Zellen wurden 50-150 µl Colcemidlösung pro 5 ml Medium zugegeben und, je nach Zellsystem, 5 min bis zu 2,5 h bei 37 °C im Brutschrank

inkubiert. Colcemid verhindert die Ausbildung eines Spindelapparates und damit die Aufteilung der Chromosomen in zwei neue Zellkerne. Das Zellwachstum wird dadurch in der Prometaphase, d.h. in dem Stadium, in welchem die Chromatiden zu Chromosomen kondensiert sind, arretiert. Die Erfolgskontrolle der Colcemidbehandlung erfolgte im Phasenkontrastmikroskop. Zellen im Stadium der Prometaphase erscheinen als stark lichtbrechende, kugelige Gebilde. Nach der Inkubation wurde der Kulturüberstand in 15 ml Falcons überführt. Der Zellrasen wurde mit 1xPBS gewaschen und durch Zugabe von ca. 1 ml Trypsin vom Flaschenboden abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden zu dem Überstand in das 15 ml Falconröhrchen gegeben und 10 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand bis auf ca. 1 ml verworfen, das Pellet resuspendiert und 5 – 6 ml 0,075 M KCl (für Blutkulturen), bzw. 0,8%iges NaCitrat (für Tumor Zelllinien) zugegeben. Die Suspensionen wurden für 10-20 min bei 37°C inkubieren. Da 0,075 M KCl, bzw. 0,8%iges NaCitrat hypotone Lösungen sind, wandert Wasser in die Zellen und der intrazelluläre Druck steigt. Die Dauer der Hypotonie kann je nach Zelltyp verlängert werden. Nach der Inkubation wurden die Zellen 10 min bei 800U/ min zentrifugiert, der Überstand wurde bis auf ca. 1 ml verworfen und das Pellet darin resuspendiert. 6 ml eiskaltes Fixativ (1 Vol. Eisessig, 3 Vol. Methanol) wurde unter Schütteln tropfenweise zugegeben, danach wurde 10 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Zum Waschen der Zellen wurde das Pellet in 5-6 ml frischem Fixativ resuspendiert. Dieser Arbeitsschritt wurde drei bis vier mal wiederholt, bis der Überstand farblos war. Die Zellsuspension wurde entweder bei 4°C gelagert oder sofort auf Objektträger aufgebracht (siehe Abschnitt B.7.2).

B.7.2 Aufbringen auf Objektträger

Objektträger (Super Frost, Menzel Gläser, Deutschland) wurden mit 70%igem Ethanol gewaschen und mit Papiertüchern getrocknet. Die fixierten Zellen (Abschnitt B.7.1.) wurden 10 min bei 1000 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in so viel frischem eisgekühltem Fixativ resuspendiert, dass eine leicht milchige Suspension entstand. Auf schräg (ca. 25°) über einem feuchten Papiertuch liegenden, mit EtOH gereinigten Objektträgern wurden ein bis zwei Tropfen Suspension aufgetropft. Anschließend wurde der Objektträger zum Trocknen bei 37°C (Heizplatte) waagrecht über ein feuchtes Papiertuch gelegt. Zell- und Metaphasendichte, sowie Spreitung der Metaphasen wurden unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Danach wurden die Präparate zur „Alterung“ für mind. 24h bei 42°C auf eine Heizplatte gelegt. Die Präparate wurden anschließend, wie in

Abschnitt B.13.1.5 beschrieben, für die Hybridisierung vorbehandelt, bzw. für längerfristige Lagerung in 70%igem Ethanol bei 4 °C aufgehoben.

B.8 Isolierung von Nukleinsäuren

B.8.1 Genomische DNS

Genomische DNS wurde entweder mit Hilfe des E.Z.N.A. Tissue DNA Kits II (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) nach den Anleitungen des Herstellers für die „Isolierung von genomischer DNS von Eukaryontischen Zellen und Gewebe“ oder durch konventionelle Phenol-Chloroform Extraktion (Sambrook and Russel, 2001) gewonnen. Bei beiden Verfahren werden die Zellbestandteile durch enzymatische Lyse freigesetzt. Beim E.Z.N.A. Tissue DNA Kit wird die DNS über eine „spin column“ an eine Silicamatrix gebunden und nach dem Prinzip des Anionenaustausches isoliert. Bei der Phenol-Chloroformextraktion verbleibt die DNS in der wässrigen Phase und wird nachfolgend durch eine Ethanolfällung von den Salzen abgetrennt (s. auch Abschnitt B.13.1.4). Mit H₂O_{reinst} oder TE-Puffer eluierte, bzw. resuspendierte DNS kann in entsprechender Verdünnung direkt, ohne weitere Reinigungsschritte, z.B. als PCR-Template eingesetzt werden.

B.8.2 Plasmid DNS

Für die Isolierung von BAC-Plasmiden aus rekombinanten *E. coli*-Klonen wurden je 2 ml einer Übernacht-Kultur mit dem „QIAprep Spin Plasmid Isolierungs Kit“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verarbeitet. Dabei werden die Zellen mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen und die Plasmid DNS über eine Silika-Matrix „spin-column“ abgetrennt. Die mit EB-Puffer (QIAGEN, Hilden, Deutschland) eluierte Plasmid-DNS kann in entsprechender Verdünnung direkt, ohne weitere Aufreinigungsschritte, als PCR-Template eingesetzt werden.

B.9 Qualitative und Quantitative Untersuchung der Nukleinsäurelösungen

B.9.1 Agarose Gelelektrophorese

Zur qualitativen Analyse wurden die Nukleinsäurelösungen durch eine horizontale Gelelektrophorese anhand ihrer Größe aufgetrennt (UniEquipe Laborgeräte und Vertrieb mBH, Martinsried, Deutschland). Je 1/10 Volumen eines PCR-Produkts und je 5 µl einer Nicktranslation wurden mit je 5 µl Auftragspuffer vermischt, in die Taschen

eines 1% Agarose Gels (Agarose NEEO Ultra Qualität, ROTH in 1 x TAE) geladen und bei einer Stromstärke von 100 – 200 mA für 20 – 60 min aufgetrennt. Die DNS wurde durch Zugabe von Ethidiumbromid zu Gel und Laufpuffer während des Laufes gefärbt und anschließend durch UV-Licht visualisiert (312 nm, UV-Consulting Peschl, Mainz, Deutschland). Die Dokumentation erfolgte mit einem Videodokumentationssystem (Sony® SSM-930CE, Korea).

B.9.2 Photometrische Analyse

Zur Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäurelösungen wurde ein geeignetes Aliquot mit TE-Puffer (10 mM TrisHCl, pH 8, 0,1 mM EDTA, Teknova, USA) verdünnt und spektralphotometrisch vermessen. Für die Konzentrationsberechnung gelten in Näherung folgende Zusammenhänge:

doppelsträngige (ds) DNS: $1 \text{ OD}_{260 \text{ nm}} \cong 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$

einzelsträngige (ss) DNS: $1 \text{ OD}_{260 \text{ nm}} \cong 20 \text{ } \mu\text{g/ml}$

einzelsträngige (ss) RNS: $1 \text{ OD}_{260 \text{ nm}} \cong 37 \text{ } \mu\text{g/ml}$

Verunreinigungen der Nukleinsäurelösung mit Proteinen können über den Extinktionsquotienten $E_{\text{OD } 260} / E_{\text{OD } 280}$ bestimmt werden. Bei Werten größer oder gleich 1,8 gilt die DNS als rein.

B.10 Konstruktion von PCR-Primern und Proben

Spezifische Oligonukleotidprimer für die PCR wurden mit dem web-basierten Programm „Primer3“ (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3_code.html, ; Rozen and Skaletsky, 2000) konstruiert. Ein geeigneter Primer besitzt eine Länge von 18-27 bp, eine Annealingtemperatur von 57°C-62°C und bildet weder Haarnadelstrukturen noch Duplexformationen aus. Primer und Proben für die Taqman PCR wurden mit der Version 1.5 der Primer Express® Oligo Design Software (Applied Biosystems, USA) konstruiert. Das Amplikon sollte dabei eine Länge zwischen 75-150 bp haben und die Primer sollten so nahe wie möglich neben der Taqman-Probe liegen, ohne diese zu überlappen. Die optimale Annealingtemperatur der Primer liegt zwischen 58-60°C, die der Taqman-Probe zwischen 65-67°C. Primer Express® besitzt eine implementierte Primer-Test Anwendung, mit der die gefundenen Oligonukleotide auf Duplexformation und Ausbildung von Haarnadelstrukturen getestet werden können. Die Spezifität aller Primer und Proben wurde abschließend mit der BLASTn („Basic Local Alignment Search“-Tool) Anwendung des NCBI (National Centre for Biotechnology Information) überprüft. BLASTn ist über die Homepage von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) frei

zugänglich. BLASTn sucht nach homologen Sequenzen innerhalb der öffentlichen Datenbanken DDBJ/EMBL/GenBank und gleicht Sequenzen ohne Wertung, rein aufgrund von Ähnlichkeiten, gegeneinander ab (Altschul et al., 1990; Altschul et al., 1997).

B.11 *In vitro*- Amplifikation von DNS

DNS wurde mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) vervielfältigt.

B.11.1 Verwendete Primer

Die folgende Liste informieren über Details der verwendeten Primer. Sämtliche Primer wurden über das Genzentrum der GSF bezogen und das Lyophilisat in H₂O_{reinst} resuspendiert.

Name	Zielregion	Sequenz (5'→3')	Produktlänge
CL 2	Alu-Repeats	CTG CAC TCC AGC CTG GG	variabel
CL 1	Alu-Repeats	TCC CAA AGT GCT GGG ATT ACA G	variabel
6MW		CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G	variabel
SNP_A1513414F	Region 5' von SNP_A1513414	GCA AAG GCA ATG GAG GAA TA	387 bp
SNP_A1513414R	Region 3' von SNP_A1513414	CAG AGG TCT CCC TTT CAT GC	
SNP_A1515857F	Region 5' von SNP_A1515857F	AAT CAC GGT GAA GGA GAT GC	234 bp
SNP_A1515857R	Region 3' von SNP_A1515857F	CCT GCC CTG TAT CAG CTT AA	
SNP_A1516703F	Region 5' von SNP_A1516703F	GGC ACG TCT AGA GCA TAG GG	465 bp
SNP_A1516703R	Region 3' von SNP_A1516703F	TAC CAC CCC ACC ATC TCA GT	
RP11_145E5re_F	Region 3' von BAC RP11-145E5	CAT TAA TCC TGG CAG CCC TA	408 bp
RP11_145E5re_R	Region 3' von BAC RP11-145E5	GGG GCT TAA GAA ACA CAC GA	
PCR-Primer Xba	Komponente aus dem Affymetrix GeneChip® Mapping Assay-Kit, Sequenz unbekannt		
Adaptor Xba	Komponente aus dem Affymetrix GeneChip® Mapping Assay-Kit, Sequenz unbekannt		

Tabelle 8: Verwendete PCR

B.11.2 Verwendete PCR-Programme

Programm für Alu-PCR:

LENGAUER:

Initiale Denaturierung		95 °C, 5 min
30 Zyklen	Denaturierung:	95 °C, 1 min
	Annealing	30 °C, 30 sec
	Elongation	72 °C, 6 min
Finale Elongation		72 °C, 5 min

Degenerate-Oligonucleotide-Primed-PCR zur Markierung von DNA:

LABEL DOP:

Initiale Denaturierung		94 °C, 3 min
30 Zyklen	Denaturierung:	94 °C, 1 min.
	Annealing	56 °C, 1 min
	Elongation	72 °C, 4 min
Finale Elongation		72 °C, 20 min

Degenerate-Oligonucleotide-Primed-PCR:

TELENIUS:

Initiale Denaturierung		95 °C, 5 min
5 Zyklen	Denaturierung:	95 °C, 1 min
	Annealing	30 °C, 1 min 30 sec
	Ramp 0,2 °C/sec auf 72 °C	
	Elongation	72 °C, 3 min
35 Zyklen	Denaturierung:	94 °C, 1 min
	Annealing	62 °C, 1 min 30 sec
	Elongation	72 °C, 3 min
Finale Elongation		72 °C, 5 min

Spezifische PCR:

CBspez:

Initiale Denaturierung		94 °C, 5 min
15 Zyklen	Denaturierung:	94 °C, 20 sec.
	Annealing	64/66 °C, 30 sec
	Elongation	72 °C, 20 sec
15 Zyklen	Denaturierung:	94 °C, 20 sec.
	Annealing	64/66 °C, 30 sec
	Elongation	72 °C, 30 sec
Finale Elongation		72 °C, 2 min

B: Material und Methoden

Taqman PCR:

TaqMan:

Initiale Denaturierung		95°C, 10 min
40 Zyklen	Denaturierung:	95°C, 15 sec.
	Annealing	60°C, 1 min

XbaI-Verdau (Affymetrix GeneChip® Mapping Assay):

Xba:

Verdau		37°C, 120 min
Inaktivierung des Enzyms		70°C, 20 min

Adaptor-Ligation (Affymetrix GeneChip® Mapping Assay):

Xba-Lig:

Ligation		16°C, 120 min
Inaktivierung des Enzyms		70°C, 20 min

PCR (Affymetrix GeneChip® Mapping Assay):

PCR-MJ:

Initiale Denaturierung		95°C, 3 min
35 Zyklen	Denaturierung:	95°C, 20 sec.
	Annealing	59°C, 15 sec.
	Elongation	72°C, 15 sec.
Finale Elongation		72°C, 7 min

Fragmentierung (Affymetrix GeneChip® Mapping Assay):

Fragment:

Ligation		37°C, 30 min
Inaktivierung des Enzyms		95°C, 15 min

Markierung (Affymetrix GeneChip® Mapping Assay):

Label-RK:

Ligation		37°C, 2h
Inaktivierung des Enzyms		95°C, 15 min

B.12 Quantitative PCR

Quantitative oder Real-time-PCR (qPCR bzw. RT-PCR) bezeichnet ein PCR-Verfahren, bei dem während der PCR-Reaktion die Menge der entstandenen Produkte in Echtzeit gemessen wird. Quantitative oder Real-Time PCR wird v.a. zur Bestimmung von Genexpressionleveln, aber auch zur Diskriminierung von Allelen und zur Quantifikation von DNS-Kopienzahlen (Bignell et al., 2004) genutzt. Die in RT-PCR-Experimenten gemessene Größe ist die Fluoreszenzintensität bei einer, oder mehreren Wellenlängen. Produktabhängige Fluoreszenz entsteht entweder unspezifisch, indem dsDNS-bindende Fluoreszenzfarbstoffe wie Sybr-Green oder Ethidiumbromid in die gebildeten Produkte interkallieren, oder spezifisch durch die Verwendung fluorophormarkierter Oligonukleotidsonden, die auf der Zielsequenz hybridisieren. Die bekannteste Variante solcher Oligonukleotidsonden sind die sogenannten TaqMan-Sonden. Sie sind 5'-terminal mit einem Reporterfluorophor und intern mit einem Quencher markiert. Durch Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET), einem spektroskopischen Prozess, bei dem Energie strahlungsfrei durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Molekülen mit überlappenden Emissions- und Absorptionsspektren über einen Bereich von 10-100 Å übertragen wird, wird die Anregungsenergie vom Reporterfluorophor auf das Quencherfluorophor übertragen und dann vom Quencher entweder vollständig absorbiert (Dark-Quencher) oder in Form von Fluoreszenz abgestrahlt. Während der PCR trifft bei der Verlängerung eines Primers die Taq DNS-Polymerase auf die Sonde und hydrolysiert diese. Dadurch wird das Reporterfluorophor räumlich vom Quencher getrennt. Das Reportermolekül kann nun die Anregungsenergie nicht mehr durch FRET auf das Quenchermolekül abgeben sondern fluoresziert stattdessen bei Anregung. Bei der PCR wird meist die produktabhängige Zunahme der Reporterfluoreszenz gemessen. Dabei gilt, je mehr Kopien eines bestimmten Gens oder einer bestimmten Region in der zu untersuchenden Probe vorhanden sind, desto eher im Verlauf der PCR, d.h. bei einer geringeren Zyklenzahl, werden Fluoreszenzwerte über einem Hintergrundwert gemessen.

Die quantitative PCR (qPCR) hat sich in kurzer Zeit zu einer etablierten Standardmethode in der medizinischen Forschung entwickelt. Auch in komplexen Proben lassen sich mittlerweile mit dieser Methode Nukleinsäuren mit Präzision und Spezifität quantitativ bestimmen höchster („PCR and RT-PCR Application Guide“, Quiagen, Hildesheim, Deutschland; „Critical Factors for Successful Real-Time PCR“, Quiagen, Hildesheim, Deutschland)

B.12.1 Verwendete Primer, Proben und Reagentien

Die nachfolgende Tabelle fasst alle in dieser Arbeit verwendeten Primer und Probenpaare zusammen.

Name	Zielregion	Referenz	Sequenz (5'→3')
PFKL_F	Phospho- fruktokinase	(Aveyard and Knowles, 2004)	GAT GCT GGC ACA ATA CCG
PFKL_R		(Aveyard and Knowles, 2004)	GGG TCA CGT GCT CCA GCT
PFKL_Probe		(Aveyard and Knowles, 2004)	FAM-TCA GTA TGG CCG CCT ACG TGT CAG G-TAMRA
GAPDHsense	Glycerinaldehyd phosphat- Dehydrogenase	(Berggren et al., 2003)	CCA CTA GGC GCT CAC TGT TCT
GAPDHantisense		(Berggren et al., 2003)	GCG AAC TCA CCC GTT GAC T
GAPDH_Probe		(Berggren et al., 2003)	FAM-CTC CCT CCG CGC AGC CGA GC- TAMRA
p14ARF-F	p14,	(Aveyard and Knowles, 2004)	TGA TGC TAC TGA GGA GCC AGC
p14ARF-R	Chr 9p21.3	(Aveyard and Knowles, 2004)	AGG GCC TTT CCT ACC TGG TC
P14_Probe		(Aveyard and Knowles, 2004)	FAM-TCT AGG GCA GCA GCCC GCT TCC TAG A-TAMRA
p15F	p15	(Aveyard and Knowles, 2004)	CCCTCG ACA CTC ACC ATG AA
p15R	Chr 9p21.3	(Aveyard and Knowles, 2004)	CGA CCC CTG GAA TGT CAC AC
P15_Probe		(Aveyard and Knowles, 2004)	FAM-AAA TAT CCC TGG AAA TCC GCT TCT CTG TGT T-TAMRA
P16_Probe	p16	(Aveyard and Knowles, 2004)	FAM-CCC ACC CTG GCT CTG ACC ATT CTG-TAMRA
p16exon2F	Chr 9p21.3	(Aveyard and Knowles, 2004)	TTT CCG TCA TGC CGG C
p16exon2R		(Aveyard and Knowles, 2004)	TCA TCA TGA CCT GCC AGA GAG A

Tabelle 9: Primer und Proben für die qPCR

B.12.2 Durchführung der qPCR

In den nachfolgenden Tabellen wird die Zusammensetzung der Gebrauchslösungen und des Mastermixes beschrieben. Die für die qPCR verwendeten Puffer, Lösungen und dNTPs waren Komponenten des „qPCR-Core Kits“ von Eurogenetech (Belgien).

Reagenzien	Mastermix
10xPuffer	2,5 µl
50 mM MgCl ₂	2,5 µl
5 mM dNTP	1,0 µl
10xMix (Tabelle 9a)	0,1 µl
Taq-Polymerase	2,5 µl
dH ₂ O _{reinst}	11,4 µl

Tabelle 10: Herstellung von Mastermix

	Konz. Stocklösung	für 1 ml 10x Mix	Konz. 10xMix	Konz. qPCR-Reaktion
Primer F	100 µM	90 µl	9 µM	900 nm
Primer R	100 µM	90 µl	9 µM	900 nm
Taqman-Probe	20 µM	100 µl	2 µM	200 nm
dH ₂ O _{reinst}		720 µl		

Tabelle 9a: Herstellung von 10xMix

Durchführung einer qPCR:

- 1.) Mastermix (MM) herstellen, in 96 well-Platte vorlegen
- 2.) Jeweils 5 µl DNS (2ng/µl) zugeben
- 3.) PCR-Programm Taqman PCR (siehe Abschnitt B.11.2)

B.12.3 Auswertung der qPCR

Die qPCR-Ergebnisse wurden mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode analysiert. Um die $\Delta\Delta C_t$ -Methode anwenden zu können, muss die Effizienz der Amplifikation der Zielsequenz wie auch der Referenzreaktion nahezu identisch sein. Erfahrungsgemäß ist bei Amplifikatgrößen von <150bp die Effizienz der Reaktionen nahe 100% und kann für die Quantifizierung von Templatemengen genutzt werden.

Während des Laufs wurde vom ABI7000-PCR Cycler die Fluoreszenz des Reportermoleküls gemessen und ein Amplifikationsgraph erstellt (Abbildung 6). Anschließend wurde der sogenannte Ct-Wert aus diesem Graph abgelesen. Der Ct-Wert entspricht der Zykluszahl bei der Signalwerte oberhalb der Hintergrundwerte gemessen werden und die Amplifikation sich in der exponentiellen Phase befindet. Für die Auswertung der hier dargestellten Ergebnisse wurde der Schwellenwert auf 0,1 gesetzt.

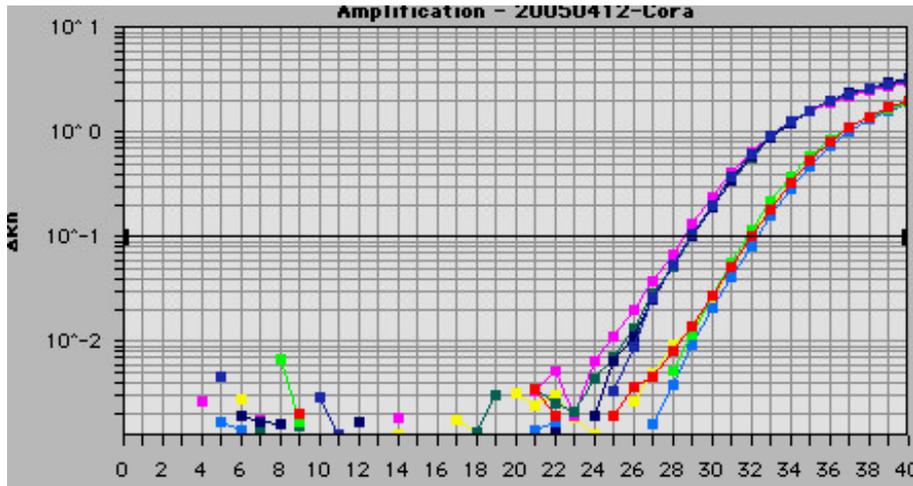


Abbildung 6: Amplifikationsgraphen für das GAPDH-Gen.

Jeweils vier Replikate für Plazenta-DNS (pink, blau, dunkelblau, dunkelgrün) und DNS der Zelllinie HT1376 (rot, gelb, hellgrün, hellblau). In X-Richtung ist die PCR-Zykluszahl aufgetragen, in Y-Richtung die Fluoreszenzintensität des Reportermoleküls.

Um die Ct-Werte in die relative Konzentration eines bestimmten Zielgens (hier p14, p15 und p16) umzurechnen, wurden die ermittelten Werte erst relativ zu einer endogenen Referenz (hier GAPDH und PFKL) normalisiert und der sogenannte ΔCt -Wert berechnet (Abbildung 7). Für die Auswertung der Ergebnisse wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene endogene Referenzen gewählt, da alle Tumorzelllinien eine Vielzahl numerischer Veränderungen aufwiesen (siehe Abschnitt C.1.1 und C.1.2) und im Vorfeld nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Regionen in denen die Referenzgene liegen (GAPDH Chr. 12p13, bzw. PFK Chr. 21q22.3), nicht amplifiziert bzw. unterrepräsentiert waren.

$$\Delta Ct_{\text{Zelllinien-DNS}} = Ct_{\text{Zielsequenz, Zelllinien-DNS}} - Ct_{\text{Referenzsequenz, Zelllinien-DNS}}$$

$$\Delta Ct_{\text{Placenta-DNS}} = Ct_{\text{Zielsequenz, Placenta-DNS}} - Ct_{\text{Referenzsequenz, Placenta-DNS}}$$

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Zelllinien-DNS}} - \Delta Ct_{\text{Placenta-DNS}}$$

$$\text{relative Konzentration des Zielgens in der Zelllinie} = 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

Abbildung 7: $\Delta \Delta Ct$ -Methode zur Berechnung der relativen Konzentration eines Gens

Die mit Hilfe dieser endogenen Referenzen ermittelten ΔCt -Werte für die Zelllinien wurden mit Hilfe der ΔCt -Werte der Plazenta-DNS (2n, Sigma, Deutschland) kalibriert und der sogenannte $\Delta \Delta Ct$ -Wert berechnet (Abbildung 7). Anschließend wurden die

Konzentrationen der Zielregionen relativ zu der Kalibrator DNS berechnet (Abbildung 7).

B.13 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Alle DNS-Hybridisierungsverfahren beruhen auf dem Prinzip der Komplementarität der Basen in den zwei gegenläufigen Strängen der DNS-Doppelhelix. Die Bindung der Basen aneinander ist reversibel. Durch Hitze oder entsprechende chemische Agenzien können die Stränge voneinander getrennt werden. Wird die Hitze reduziert, bzw. das denaturierende Agens entfernt, finden diese wie Schlüssel und Schloss zueinander passenden DNS Stränge wieder zueinander, und die Wasserstoffbrückenbindungen der Basen werden wieder ausgebildet. Werden spezifische DNS Abschnitte vorab chemisch markiert, können sie mit den auf Objektträgern aufgebracht Partnern ein Hybrid bilden und nach der Reaktion sichtbar gemacht werden (Strachan and Read, 2004).

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) ist ein DNS-Hybridisierungsverfahren, bei dem die DNS-Sonden entweder direkt oder indirekt über Antikörper mit Fluorochromen markiert werden. Nach der Hybridisierung auf Chromosomenpräparate werden die Fluorochrome durch Licht entsprechender Wellenlänge angeregt und durch Fluoreszenz sichtbar gemacht. Durch die Einführung der FISH konnte das Auflösungsvermögen der konventionellen Bänderungsanalyse verbessert werden. Mikrodeletionen und Amplifikationen von nur 2,6-4 Mb (Kraus et al., 2003; Speicher et al., 1996; Speicher and Ward, 1996) sowie komplexe Translokationen (Kraus et al., 2003) konnten erfolgreich nachgewiesen werden. Mit Hilfe der FISH- Technik konnte auch die Herkunft von Markerchromosomen bestimmt werden (Langer, 2002). Abhängig von der diagnostischen oder zytogenetischen Fragestellung werden unterschiedliche Sonden eingesetzt. Die Sonden können Regionen von einigen tausend Basenpaaren (Bacterial Artificial Chromosom-Probe) bis zu ganzen Chromosomen umfassen (Whole Chromosom painting-Proben).

B.13.1 Multiplex Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (M-FISH)

Mit M-FISH können sowohl einfache als auch komplexe chromosomale Umbauten detektiert werden. Insbesondere Umbauten, die so komplex sind, dass sie durch die konventionelle Bänderungsanalyse nicht identifiziert werden, können dadurch entschlüsselt werden (Kraus et al., 2003; Speicher et al., 2000). Für die M-FISH Analyse wird ein Pool von Sonden generiert, wobei jede Sonde jeweils ein gesamtes

Chromosom umfasst (Whole Chromosome Painting Probes). Jede Chromosomen Painting Sonde wird chemisch markiert und kann nach der Hybridisierung durch Fluoreszenz sichtbar gemacht werden. Durch kombinatorische Markierung der Sonden können mit fünf verschiedenen Fluorochromen 24 verschiedene Farben hergestellt werden. Dadurch kann durch nur eine Hybridisierung das Material jedes einzelne Chromosom eines menschlichen Karyotyps spezifisch einer Farbe zugeordnet werden (Eils et al., 1998; Speicher et al., 1996; Speicher and Ward, 1996).

B.13.1.1 Amplifikation der DNS-Pools

Chromosomen wurden mit Durchflußzytometrie sortiert und entsprechend des nachfolgenden Schemas (Abbildung 8) zu Pools zusammengefasst. Anschließend wurden die DNS-Pools mittels DOP-PCR amplifiziert. Mit der DOP-PCR (degenerate oligonucleotide-primed-PCR) wird die eingesetzte DNS mit einem degenerierten Primers, der etwa alle 4 kb an den DNA-Strang bindet, homogen amplifiziert (Telenius et al., 1992).

Standartansatz für eine DOP-PCR:

Komponente	10x Puffer	MgCl ₂	H ₂ O _{reinst}	dNTPs	6MW (100 µM)	Taq Polymerase
Volumen/Reaktion	2,5 µl	1	18,8 µl	1 µl	0,5 µl	0.2 µl
Endkonzentration	1 x Salz,	2 mM		0,2 mM	0,1 pmol	1 unit

Durchführung einer Markierungs- DOP-PCR:

- 1.) Mastermix (MM) herstellen
- 2.) Jeweils 1 µl DOP-PCR-Produkt zu 24 µl MM zugeben
- 3.) PCR-Programm TELENIUS (siehe Abschnitt B.11.2)

Zur Ergebniskontrolle werden die PCR-Produkte auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

B.13.1.2 Markieren der DNS-Pools

Für die Markierung wurden die amplifizierten DNS-Pools mit einer Markierungs-DOP-PCR reamplifiziert. Bei der Markierungs-DOP-PCR werden markierte Basenanaloga zugegeben, die während der Reaktion in die synthetisierten DNS-Stränge eingebaut werden. Fünf der DNS-Pools wurden direkt mit Fluorochromen (FITC, Cy3, Cy5; DEAC und Texas Red) und zwei mit Haptenen (Digoxigenin, Biotin) markiert. Letztere wurden nach der Hybridisierung wie in Abschnitt B.13.1.7 beschrieben mit Immunfluoreszenz nachgewiesen (Markierungsschema Abbildung 8).

Die Markierung der 7-Fluorochrom M-FISH Proben in dieser Arbeit erfolgte kombinatorisch nach unten stehendem Schema:

Name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y	ps
Colour																									
SC8	X					X				X			X			X							X		X
FITC	X			X	X		X											X	X		X				
Cy3			X			X		X			X				X			X		X					
Cy3.5			X	X					X	X							X					X		X	X
Cy5		X										X	X		X		X				X				
Cy5.5		X					X	X		X				X		X									
Cy7					X			X				X		X								X	X		X

Abbildung 8: Markierungsschema für 7-Fluorochrom M-FISH

Standardansatz für eine Markierungs-DOP-PCR mit CY3, Texas Red und Biotin:

Komponente	10x Puffer	MgCl ₂	H ₂ O _{reinst}	ACG-Mix	Markiertes dUTP	6MW	Taq Polymerase
Volumen/Reaktion	2,5 µl	1	16,8 µl	0,75 µl	1,25 µl	0,5 µl	0,2 µl
Endkonzentration	1 x Salz,	2 mM		0,2 mM	0,15 mM	0,1 pmol	1 unit

Standardansatz für eine Markierungs-DOP-PCR mit Deac, Fitc, Cy5 und Digoxigenin:

Komponente	10x Puffer	MgCl ₂	H ₂ O _{reinst}	ACG-Mix	Markiertes dUTP	6MW	Taq Polymerase
Volumen/Reaktion	2,5 µl	1	15,8 µl	0,5 µl	2,5 µl	0,5 µl	0,2 µl
Endkonzentration	1 x Salz,	2 mM		0,2 mM	0,15 mM	0,1 pmol	1 unit

Durchführung einer Markierungs- DOP-PCR:

- 1.) Mastermix (MM) herstellen
- 2.) Jeweils 1 µl DNS-Pool zu 24 µl MM zugeben
- 3.) PCR-Programm LABELDOP (siehe Abschnitt B.11.2)

Zur Ergebniskontrolle wurden die PCR-Produkte auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

B.13.1.3 DNase I- Verdau

Für optimale FISH-Ergebnisse sollten die markierten DNS-Sonden eine Länge von 100-800 bp besitzen. Da die markierten PCR-Produkt in der Regel jedoch größer waren, musste ein DNase I- Verdau durchgeführt werden.

Standardansatz für einen DNase-Verdau:

Komponente	10x Puffer	H ₂ O _{reinst}	DNase (1:10 000 in H ₂ O _{reinst})
Volumen/Reaktion	5 µl	15 µl	5 µl

- 1.) Mastermix (MM) herstellen
- 2.) 25 µl MM zu 25 µl PCR-Produkt zugeben
- 3.) Bei 15 °C im Wasserbad inkubieren

Die Dauer des DNase I Verdauens wurde entsprechend der Länge der PCR-Produkte variiert. Die Menge der zuzugebenden DNase I kann bei Bedarf erhöht werden. Zur Ergebniskontrolle wurden die PCR-Produkte auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

B.13.1.4 Ethanolfällung und Herstellung des Hybridisierungsmixes

Zur Volumeneinengung und zur Entfernung noch vorhandener freier Nukleotide wurden die markierten DNS-Pools entweder über Nacht bei –20 °C oder für ca. 1h bei –80 °C mit Ethanol gefällt. Bei der Fällung diente Salmon testis DNS als Trägermaterial. Außerdem wurde Humane Cot-1-DNS zugegeben, um bei der anschließenden Hybridisierung repetitive Sequenzen abzudecken und dadurch unspezifische Hintergrundfluoreszenz zu vermeiden (Lichter et al., 1988). Die eingesetzten Mengen der jeweiligen Sonden wurden empirisch aufeinander abgestimmt.

Standardansatz für einen 7-Fluorochrom M-FISH-Mix:

- 1.) Mischen von jeweils ca. 4-18 µl markiertem DNS-Pool mit 30 µl Humane Cot-1-DNS und 5 µl Salmon-Testis DNS.
- 2.) Zugabe von 1/10 Volumen 3M NaAc und 2,5 Volumen 100% EtOH
- 3.) Inkubation bei –20 °C ÜN, bzw. bei –80 °C für 30 min.
- 4.) Zentrifugation 30 min, max. rpm
- 5.) Überstand abnehmen, Zugabe von 70% EtOH
- 6.) Zentrifugation 10 min, max. rpm
- 7.) Überstand abnehmen, Pellet lufttrocknen lassen
- 8.) In 4-6 µl FA resuspendieren, gleiches Volumen 40% DS zugeben
- 9.) Bei 42 °C mindestens 20 min. schütteln

B.13.1.5 Vorbehandlung der Chromosomenpräparate

Um die Hybridisierungsergebnisse zu verbessern und den Hintergrund zu reduzieren, wurde das überschüssige Cytoplasma auf den Chromosomenpräparaten durch einen Pepsinverdau reduziert. Die Dauer des Pepsinverdau wurde entsprechend der Cytoplasmamenge angepasst. Die Menge des eingesetzten Pepsins kann bei Bedarf erhöht werden.

Standardansatz für einen Pepsin-Verdau:

- 1.) 50 ml H₂O_{dest} auf 37 °C vorwärmen
- 2.) 500 µl 1M HCl und 15 µl 10% Pepsin zugeben
- 3.) Präparate verdauen
- 4.) 5 min mit 1xPBS waschen
- 5.) Kurz mit H₂O_{dest} spülen
- 6.) Mit aufsteigender Ethanolreihe dehydrieren (70%, 90%, 100%, je 3 min.)
- 7.) Lufttrocknen lassen

Der Effekt des Pepsinverdau wurde mikroskopisch überprüft, bei Bedarf wurde nachverdaut.

B.13.1.6 Denaturierung von Chromosomenpräparaten und Sonden, Hybridisierung

Für die Hybridisierung muss die DNS auf den Präparaten genau wie die DNS der Sonden einzelsträngig vorliegen.

Denaturieren der Chromosomenpräparate:

- 1.) Präparate in auf 74 °C aufgewärmter Denaturierungslösung 2 min inkubieren
- 2.) Mit aufsteigender, eiskalter Ethanolreihe dehydrieren (70%, 90%, 100%, je 3 min.)
- 3.) Präparate lufttrocknen lassen

Denaturieren des 7-Fluorochrom M-FISH-Mix:

- 1.) Hybridisierungsmix 7 min. bei 78 °C denaturieren
- 2.) 20 min. bei 42 °C preannealen lassen (in dieser Zeit deck die Humane Cot-1-DNS die repetetive Sequenzen der Sonden ab)

Hybridisierung:

- 1.) 2-6 µl denaturierten Hybridisierungsmix auf ein denaturiertes Chromosomenpräparat aufbringen
- 2.) Mit Deckglas abdecken, mit Fixogum luftdicht verschließen
- 3.) Bei 37 °C für 2 Nächte inkubieren

B.13.1.7 Stringenzwaschen und Nachweis indirekt markierter Sonden mit Immunfluoreszenz

Nach der Hybridisierung wurde nicht gebundene Sonde durch Salzlösungen mit aufsteigender Stringenz (Salzkonzentration/Temperatur) abgewaschen. Indirekt markierte DNS-Pools wurden nach der Hybridisierung mit Fluorochrom-markierten Antikörpern nachgewiesen. Für den 7-Fluorochrom M-FISH wurden dazu folgende Antikörper und Verdünnungen eingesetzt.

Standardansatz für einen DNase-Verdau:

Antikörper	Verwendete Verdünnung	Hersteller
Avidin-Cy5.5	1:200	Rockland
sheep-anti-Dig-Cy7	1:50	Amersham

Durchführung des Nachweises:

- 1.) Entfernen von Fixogum und Deckglas
- 2.) 3x 5 min. waschen mit 42°C warmen 4xSSC/Tween
- 3.) 3x 5 min. waschen mit 62°C warmen 1xSSC
- 4.) 30 min. blocken mit 3% BSA
- 5.) 45 min mit Antikörperlösung (Antikörper in 1% BSA) färben
- 6.) 3x 5 min. waschen mit 42°C warmen 4xSSC/Tween

B.13.1.8 DAPI-Färbung

DAPI (4',6'-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid) bindet an AT-reiche Sequenzen der DNS und wird zur Gegenfärbung, d.h. zum Visualisieren von der gesamten DNS in Zellkernen verwendet. Der Farbstoff wird durch UV-Licht (352 nm) angeregt und emittiert Licht von 418 nm Wellenlänge.

Durchführung der DAPI-Färbung:

- 1.) Überschichten des Präparats mit 500 µl DAPI-Gebrauchslösung
- 2.) Inkubieren bei 37°C, 3 min
- 3.) Abspülen der DAPI-Lösung mit H₂Odest
- 4.) Lufttrocknen lassen, überschichten mit Antifade

B.13.2 Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit Bacterial artificial Chromosom-Proben (BAC-FISH)

Ein BAC (Bacterial Artificial Chromosom) ist ein künstliches Chromosom, das aus dem single-copy-Sex-Faktor F des Bakteriums *Escherichia coli* entwickelt wurde. Das BAC dient als Vektor und erlaubt, im Gegensatz zu den Cosmiden, eine Klonierung von größeren Genomabschnitten. BACs können eine Größe von über 300 kb erreichen und sind extrem stabil. Zur Sequenzierung des menschlichen Genoms wurde eine BAC-Bibliothek mit mehr als 27,000 Klonen angelegt (<http://www.ensembl.org/>, ; <http://www.sanger.ac.uk/>). Da die physikalische Position der BACs bekannt ist, eignen sie sich sehr gut, um durch BAC-FISH Experimente die Ploidie einzelner Genomabschnitte oder Bruchpunkte von Translokationen genauer zu charakterisieren (Kraus et al., 2003). Dazu wird die BAC-DNS chemisch markiert, auf zu untersuchende Metaphasepräparate hybridisiert und mit Fluoreszenz sichtbar

gemacht. Ist eine Region heterozygot deletiert, sieht man in einem diploiden Genom statt regulär zwei Signalen nur noch ein Signal. Amplifikationen erscheinen nach einer BAC-Hybridisierung z.T. als einheitlich gefärbter Block.

B.13.2.1 Amplifikation der BAC-DNS

Ein Alu-Repeat ist ein etwa 280 bp langes Tandemrepeat. Es kommt etwa eine Millionen Mal im menschlichen Genom vor und ist damit eine der häufigsten Sequenzen im humanen Genom. Alu-Repeats sind gleichmäßig über das Genom verteilt und kommen etwa alle 3 kb vor (Strachan and Read, 1999). Die Alu-PCR verwendet Primer, die an den Enden der Alu-Repeats binden und so ausgerichtet sind, dass die DNS-Sequenz zwischen nebeneinanderliegenden Alu-Repeats amplifiziert wird (Strachan and Read, 1999). Die Alu-PCR eignet sich bei den meisten BAC-Plasmiden gut für eine homogene Amplifikation der DNS.

Standardansatz Alu-PCR:

Komponente	10x Puffer	MgCl ₂	H ₂ O _{reinst}	dNTPs	CL1 (50 µM)	CL2 (50 µM)	Taq Polymerase
Volumen/Reaktion	5 µl	1.5	37 µl	2,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	1 µl
Endkonzentration	1 x Salz,	1,5 mM		0,25 mM	0,1 pmol	0,1 pmol	0,1 unit

Durchführung Alu-PCR:

- 1.) Mastermix (MM) herstellen
- 2.) Jeweils 2 µl Plasmidprep zu 48 µl MM zugeben
- 3.) PCR-Programm LENGAUER (siehe Abschnitt B.11.2)

Zur Ergebniskontrolle wurden die PCR-Produkte auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

B.13.2.2 Markierung der BAC-Sonden durch Nicktranslation

Für optimale FISH-Ergebnisse sollten die markierten DNS-Sonden eine Länge von 100-800 bp besitzen. Durch eine Nicktranslation wurden die Alu-PCR-Produkte, die in der Regel noch zu lang waren, mit einem DNase I-Verdau auf eine Länge von 200 bis 600 bp gebracht. An den Einzelstrangbrüchen, die bei dem Verdau entstehen, kann ein zweites Enzym, die DNA-Polymerase I, ansetzen. Diese besitzt eine 5' → 3' Exonucleaseaktivität, durch die Nukleotide aus dem Strang entfernt werden. Gleichzeitig besitzt das Enzym eine Polymeraseaktivität, durch die bei der Reparatursynthese, Nukleotide in den DNS-Strang eingebaut werden. Durch Zugabe

von markierten Nukleotiden wurde bei der Nicktranslation die eingesetzte DNS gleichzeitig markiert.

Standardansatz Nicktranslation:

Komponente	NT-Puffer	0,5 M ACG-Mix	Markiertes dUTP	DNase I (1:10 000)	DNA-Polymerase I
Volumen/Reaktion	5 µl	5 µl	1 µl	15 µl	1 µl
Endkonzentration	1 x Salz,	0,01 mM	0,1 mM		0,1 unit

Durchführung Nicktranslation:

- 1.) Mastermix (MM) herstellen
- 2.) Jeweils 18 µl Alu-PCR-Produkt zu 32 µl MM zugeben
- 3.) Je nach Länge des PCR-Produkts 10-90 min bei 15°C inkubieren

Zur Ergebniskontrolle wurden die PCR-Produkte auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen, wenn nötig wurde nachverdaut.

B.13.2.3 Ethanolfällung und Herstellung des Hybridisierungsmixes

Für das Prinzip der Ethanolfällung siehe Abschnitt B.13.1.4.

Standardansatz BAC-FISH-Mix:

- 1.) Mischen von jeweils ca. 9 µl markierter BAC-DNS mit 35 µl Humane Cot-1-DNS und 5 µl Salmon-Testis DNS.
- 2.) Zugabe von 1/10 Volumen 3M NaAc und 2,5 Volumen 100% EtOH
- 3.) Inkubation bei -20°C ÜN, bzw. bei -80°C für 30 min.
- 4.) Zentrifugation 30 min, max. rpm
- 5.) Überstand abnehmen, Zugabe von 70% EtOH
- 6.) Zentrifugation 10 min, max. rpm
- 7.) Überstand abnehmen, Pellet lufttrocknen lassen
- 8.) In 6 µl FA resuspendieren, gleiches Volumen 40% DS zugeben
- 5.) Bei 42°C mindestens 20 min. schütteln

B.13.2.4 Vorbehandlung der Chromosomenpräparate, Denaturierung, Hybridisierung

Siehe Abschnitt B.13.1.5.

B.13.2.5 Nachweis indirekt markierter Sonden mit Immunfluoreszenz

Falls BACs mit Biotin- bzw. Digoxigenin-dUTP markierte wurden, wurden diese, wie in Abschnitt B.13.1.7 beschrieben, nach der Hybridisierung mit Fluorochrom-markierten Antikörpern nachgewiesen. Für den 7 Fluorochrom M-FISH wurden dazu folgende Antikörper und Verdünnungen eingesetzt.

Antikörper	Verwendete Verdünnung	Hersteller
Avidin-Cy5.5	1:200	Rockland
sheep-anti-Dig-Cy7	1:50	Amersham

Durchführung von Nachweis und DAPI-Färbung siehe Abschnitt B.13.1.7. Wurden nur direkt markierte BACs eingesetzt, wurde nach dem Waschen mit 1xSSC direkt DAPI gefärbt, das Präparat luftgetrocknet und eingedeckelt.

B.13.3 Vergleichende Genomhybridisierung (CGH)

Mit der Vergleichenden Genomhybridisierung (Comparative Genomic Hybridization, CGH) können relative genetische Imbalancen analysiert werden. Dazu wird Genomische DNS von zu untersuchenden Zellen und normale Kontroll-DNS mit verschiedenen Molekülen chemisch markiert, im Verhältnis 1:1 gemischt und auf Metaphasenpräparate von normalen Kontrollpersonen hybridisiert. Nach der Hybridisierung werden die verschiedenen Markierungen durch Fluoreszenz sichtbar gemacht. Die jeweilige Fluoreszenzintensität entlang der Chromosomenachse der Referenzmetaphasen repräsentiert dabei die relative Konzentration von DNS-Sequenzen. Bei einer Deletion in der zu untersuchenden DNS ist die Fluoreszenzintensität des Markermoleküls in der entsprechenden Region des Chromosoms im Verhältnis zur Fluoreszenzintensität des Markermoleküls der Kontroll-DNS unterrepräsentiert, bei einer Amplifikation entsprechend überrepräsentiert. Abhängig von der Länge der Referenzmetaphasen und der Qualität der Hybridisierung kann eine Auflösung von bis zu 2 Mb für Amplifikationen (Joos et al., 1992; Piper et al., 1995) und 10 Mb für Deletionen (du Manoir et al., 1995; Kallioniemi et al., 1992) erreicht werden. Mit der CGH können relative Imbalancen im Genom analysiert werden. Es ist nicht möglich balancierte Translokationen oder Ploidien gesamter Genome zu detektieren.

B.13.3.1 Markierung der genomischen DNS durch Nicktranslation

In Absatz B.13.2.2 wird das Prinzip der Nicktranslation beschrieben.

Standardansatz Nicktranslation für CGH:

Komponente	NT-Puffer	DNA	β -Merca ptoEtOH	0,5 M ACG-Mix	Biotin- dUTP	Digoxigenin -dUTP	DNase I (1:10 000)	DNA- Polymerase I
Volumen/Reaktion Test-DNS	5 μ l	18 μ l	5 μ l	5 μ l	-	1 μ l	15 μ l	1 μ l
Volumen/Reaktion Referenz-DNS	5 μ l	18 μ l	5 μ l	5 μ l	1 μ l	-	15 μ l	1 μ l
Endkonzentration	1 x Salz,	ca. 20 ng		0,01 mM	0,1 mM	0,1 mM		0,1 unit

Durchführung Nicktranslation:

- 1.) Mastermix (MM) herstellen
- 2.) 18 μ l genomische DNA zu 32 μ l MM zugeben
- 3.) 2 h bei 15°C inkubieren

Zur Ergebniskontrolle wurden die PCR-Produkte auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen, die Länge der markierten Sonden sollte zwischen 200-1000 bp liegen.

B.13.3.2 Vorbehandeln der Chromosomenpräparate, Denaturierung, Hybridisierung

Siehe Abschnitt B.13.1.5.

B.13.3.3 Nachweis indirekt markierter Sonden mit Immunfluoreszenz

Indirekt markierte DNS-Pools wurden wie in Abschnitt B.13.1.7 nach der Hybridisierung mit Fluorochrom-markierten Antikörpern nachgewiesen. Für die CGH wurden dazu folgende Antikörper und Verdünnungen eingesetzt.

Antikörper	Verwendete Verdünnung	Hersteller
Anti-Dig FITC	1:200	Amersham
Avidin-Cy3.5	1:200	Amersham

Durchführung des Nachweis und der DAPI-Färbung siehe Abschnitt B.13.1.8.

B.14 Epifluoreszenz-Mikroskopie und Bildanalyse

Nach der Hybridisierung, wurden die Fluorochrome mit einem motorisierten Epifluoreszenz-Mikroskop von Leica (Eils et al., 1998) bzw. von Zeiss (Axioplan 2,

Zeiss) aufgenommen. Beide Mikroskope sind mit einem 8-Filter-Rad sowie hochspezifischen Filtern ausgestattet, die es ermöglichen, jedes Fluorochrom mit einem separaten Anregungs-, Teilungs- und Emissionsfilter zu analysieren. Mit einer CCD-(charge coupled device) Kamera werden die Fluorochrome als skalierbare Grauwert-Bilder aufgenommen und dann einer bestimmten Farbe zugeordnet. Das Zeiss Axioplan2 hat darüber hinaus noch einen motorisierten Objektträgtisch, der über die Metapher-Software (MetaSystems, Deutschland) angesteuert und zur automatisierten Zell- bzw. Metaphasensuche genutzt werden kann. Beim Leica DMRXA-RF8 werden Mikroskop und Kamera über die Software Leica-QFISH (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK) gesteuert. Mit M-FISH hybridisierte Metaphasen wurden mit Leica-QFISH aufgenommen und die überlagerten Einzelbilder anschließend mit der Software Leica-MCK klassifiziert (Eils et al., 1998). CGH und BAC-FISH Experimente wurden mit dem Axioplan2 von Zeiss ausgewertet. Dazu wurden in einem ersten Schritt mit der Metapher-Software (MetaSystems, Deutschland) automatisiert Metaphasen von bis zu 8 Präparaten gleichzeitig gesucht, und anschließend mit der ISIS-Software (MetaSystems, Deutschland) Aufnahmen in den verschiedenen Fluoreszenzkanälen gemacht. Da ISIS ein modular aufgebautes System zur Bildaufnahme, -bearbeitung und -analyse ist, konnten die BAC-FISH Aufnahmen danach direkt ausgewertet, bzw. für die CGH-Experimente Karyogramme und CGH-Profile erstellt werden.

B.15 Affymetrix GeneChip® Mapping Assay

Der Affymetrix GeneChip® Mapping Assay wurde für großangelegte Kopplungs- und Assoziationsstudien entwickelt. Auf dem Chip befinden sich mehr als 10,000 Oligonukleotide (25-mer), welche zu „Single-Nucleotide-Polymorphismen“ (SNPs) korrespondieren. SNPs sind bestimmte Regionen im Genom bei denen Austausch von einzelnen Basenpaaren in einem DNS-Strang bei mindestens 1% der jeweiligen Population vorkommen (Strachan and Read, 2004), d.h. ein SNP kann entsprechend seiner Basenpaarzusammensetzung als A-Allel oder B-Allel vorliegen und ein Individuum kann bezüglich eines bestimmten SNPs homozygot (AA, bzw. BB-Genotyp) oder heterozygot (AB-Genotyp) sein. SNPs kommen über das gesamte Genom verteilt vor und stellen mit ca. 90% den größten Teil aller genetischen Variationen im menschlichen Genom dar (Strachan and Read, 2004). Sie werden zur Identifikation von Individuen und bei Verwandtschaftsdiagnosen, aber auch in der Forschung zur Medikamentenverträglichkeit genutzt.

Angelehnt an die Expressionsstudien mit Affymetrix Gen Chips wurde versucht, die Affymetrix GeneChip® Mapping Assay auch zur Analyse der Kopienzahlen der DNS zu verwenden. Theoretisch ergeben amplifizierte SNP-Region eine entsprechend stärkere Signalintensität auf dem Chip, unterrepräsentierte Regionen eine entsprechend schwächere Signalintensitäten (Bignell et al., 2004; Zhao et al., 2004). Mit dem Mapping GeneChip® Version 1 von der Firma Affymetrix können 11 560 SNPs gleichzeitig analysiert werden. Für einen Ansatz werden nur 250 ng DNS benötigt.

B.15.1 Funktionsprinzip des Affymetrix GeneChip® Mapping Assays

Abbildung 9 gibt eine Übersicht über das Funktionsprinzip des Affymetrix GeneChip® Mapping Assays. Es ist ein DNS-Hybridisierungsverfahren, bei dem die Sonden auf einem Träger (Chip) immobilisiert sind und die genomische DNS chemisch markiert und anschließend mit Fluorochrom markierten Antikörpern nachgewiesen wird. Da die Sonden im Gegensatz zu den M-FISH Sonden oder BAC-Sonden sehr klein (nur 25 bp) und damit besonders anfällig für unspezifische Kreuzhybridisierung sind, muss zusätzlich zur CISS (Lichter et al., 1988) durch die Zugabe von humaner Cot-1-DNS auch die Genomkomplexität reduziert werden. Die Reduktion der Genomkomplexität wird bei der Verarbeitung der DNS für den 10k Mapping Assay durch eine spezifische PCR erreicht, bei der die Bedingungen so gewählt sind, dass nur Fragmente von einer Länge von 250-1000 bp amplifiziert werden.

Für eine Hybridisierung wurden 250 ng hochmolekulare genomische DNS mit dem Restriktionsenzym XbaI verdaut. Anschließend wurde ein von Affymetrix bereitgestellter Adaptor, der auch eine Primerbindungsstelle besitzt, an die entstandene Restriktionsschnittstelle ligiert. Die entstandenen Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert und anschließend fragmentiert (DNase I Verdau). Danach wurden die Fragmente durch eine Terminale Transferase Reaktion mit Biotin markiert. Die, so vorbereiteten, Proben wurden mit einem Hybridisierungscocktail (siehe Abschnitt B.15.2.7) gemischt, denaturiert und auf den Chip aufgebracht. Nach der Hybridisierung folgte die Stringenzwaschung und der Nachweis der Markierung mit Immunfluoreszenz.

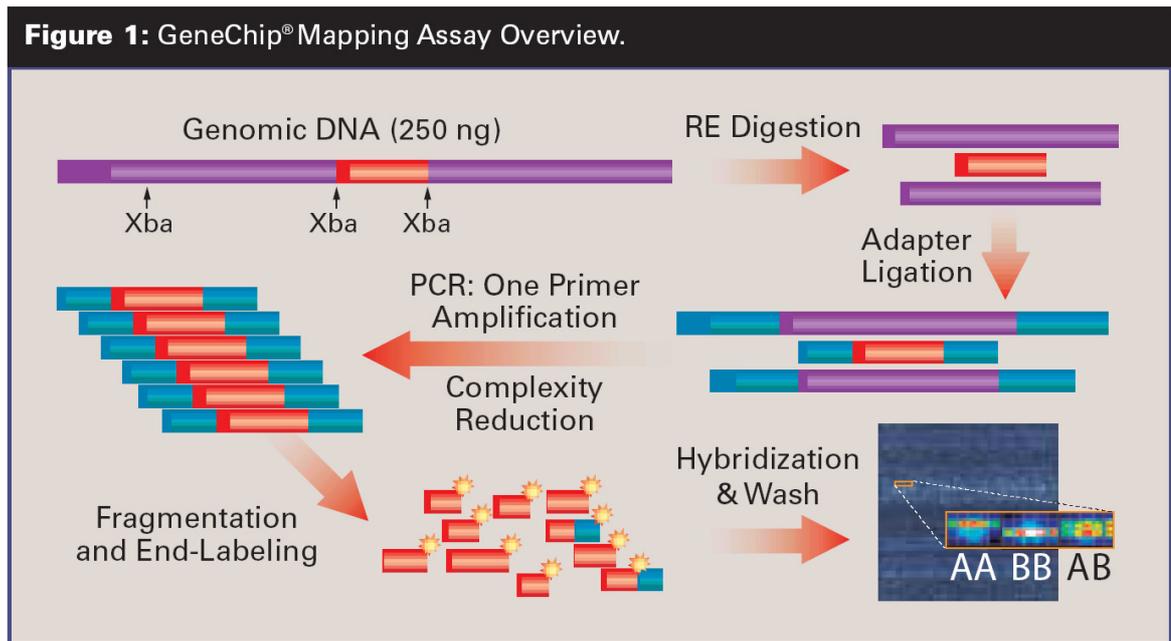


Abbildung 9: Überblick über die Funktionsweise des Affymetrix GeneChip® Mapping Assays
(http://www.affymetrix.com/support/technical/datasheets/10k_datasheet.pdf, 2003).

B.15.2 Verarbeitung der DNS-Proben für den Affymetrix GeneChip® Mapping Assay

B.15.2.1 Xba I-Verdau

XbaI ist ein Typ II Restriktionsenzym mit einer palindromischen Erkennungssequenz von 4 bp Länge. Es schneidet statistisch alle 256 bp und generiert dabei einen 4 bp langen, überhängenden DNS-Einzelstrang mit einer spezifischen Sequenz.

Standardansatz Xba-Verdau:

Komponente	H ₂ O _{MB}	NE-Puffer 2	10xBSA	XbaI
Volumen/Reaktion	10,5 µl	2 µl	2 µl	-
Endkonzentration		1 x Salz	0,01 mM	0,5 U/µl

Durchführung Xba-Verdau:

- 1.) Mastermix (MM) herstellen
- 2.) 5 µl genomische DNA (50 ng/µl) zu 15 µl MM zugeben
- 3.) Programm Xba im PCR-Gerät laufen lassen

B.15.2.2 Ligation des Adaptors

Standardansatz für die Ligation:

Komponente	Adaptor Xba (5 µM)	T4 DNA-Ligasepuffer
Volumen/Reaktion	1,25 µl	2,5 µl
Endkonzentration	0,25 µM	1 x Salz

Durchführung der Ligation:

- 1.) Mastermix (MM) herstellen
- 2.) 3,75 µl MM zu 20 µl verdauter Genomischer DNS (Abschnitt XX) zugeben
- 3.) 1,25 µl T4 DNA-Ligase zugeben
- 4.) Programm Xba-Lig im PCR-Gerät laufen lassen

B.15.2.3 PCR

Vor der PCR wird die verdaute und mit Adaptor versehene DNS verdünnt. Zu den 25 µl von Abschnitt B.15.2.2 werden 75 µl H₂O_{MB} zugegeben. Um genügend Material für die Hybridisierung zu erhalten, wurden pro Probe 4-5 PCR-Reaktionen angesetzt.

Standardansatz für die PCR:

Komponente	10xPCR-Puffer	MgCl ₂	H ₂ O _{MB}	dNTPs (je 2,5 mM)	Primer Xba (10 µM)	Platinum Taq DNA- Polymerase
Volumen/Reaktion	10 µl	10 µl	50,5 µl	10 µl	7,5 µl	2 µl
Endkonzentration	1x	2,5 mM		je 250 µM	0,75 µM	0,1 U/µl

Durchführung der PCR:

- 1.) Mastermix (MM) herstellen
- 2.) 10 µl verdaute, mit Adaptor versehene Genomische DNS (Abschnitt XX) zu 90 µl MM zugeben
- 3.) Programm PCR-MJ im PCR-Gerät laufen lassen

Zur Ergebniskontrolle wurden die PCR-Produkte auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen, die Länge der Produkte sollte zwischen 250-1000 bp liegen und ein ähnliches Bandenmuster, wie in Abbildung 10 dargestellt, ergeben.

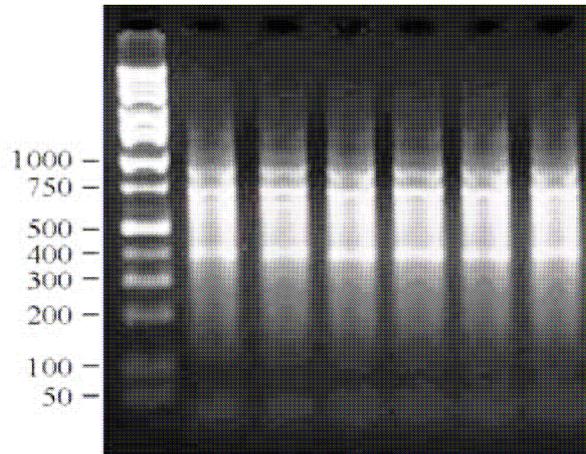


Figure 4.2
Example of PCR products run on 2% TBE agarose gel at 120V for 1 hour.

Abbildung 10: Gelkontrolle der PCR-Produkte für den Affymetrix GeneChip® Mapping Assay

(Affymetrix GeneChip® Mapping Assay Manual)

B.15.2.4 Aufreinigung und Quantifikation

Die PCR-Produkte wurden entweder mit dem „QIAquick PCR-Purification-Kit“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) oder mit „PCR Cleanup Filter Plates“ (Millipore, Schwalbach, Deutschland), nach Angaben des Herstellers (QIAquick Spin Handbook 07/2002, Schritt 1-7 bzw. MultiScreen® PCR₉₆ Plate User Guide) verarbeitet. Beim „QIAquick PCR-Purification-Kit“ werden die PCR-Produkte an ein Säulchen mit Silicamatrix gebunden. Salze und Nukleotide werden durch Zugabe von Waschpuffern und Zentrifugation der Säulchen abgetrennt. Die gereinigten PCR-Produkte werden durch die Zugabe von 55 µl Elutionspuffer (EB-Puffer, Qiagen, Hildesheim, Deutschland) nach dem, in Abbildung 11 gezeigten Prinzip, von der Säule gelöst und gleichzeitig konzentriert. Die „PCR Cleanup Filter Plates“ von Millipore reinigen die PCR-Produkte durch Ultrafiltration auf. An dem Boden der Platte wird ein Vakuum angelegt, durch eine ultrafeine Membran am Boden jeder Vertiefung wird der PCR-Ansatz filtriert. Die Membran hält die PCR-Produkte aufgrund ihrer Größe zurück, während Salze und Nukleotide durch die Poren hindurchpassen. Alle PCR-Produkte einer Probe werden nacheinander in die gleiche Vertiefung gegeben, d.h. durch die gleiche Membran filtriert und dadurch konzentriert. Nach der Filtration wurden die Produkte mit 55 µl EB-Puffer (Qiagen, Hildesheim, Deutschland) von der Membran abgelöst. Das Eluat wurde 1:40 verdünnt und photometrisch quantifiziert (siehe Abschnitt B.9.2). Für die

anschließende Fragmentierung wurden 20 µg PCR-Produkt in 45 µl EB-Puffer benötigt.

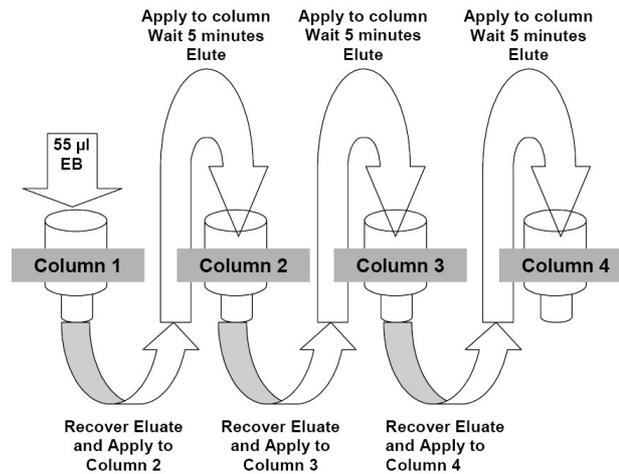


Figure 4.4
Elution procedure for one DNA sample

Abbildung 11: Schema zur Elution bei der Aufreinigung der PCR-Produkte für den Affymetrix GeneChip® Mapping Assays.

(Affymetrix GeneChip® Mapping Assay Manual): Vier PCR-Ansätze pro Probe werden nach der PCR jeweils auf ein Quiagen PCR-Purification Säulchen (Qiagen, Hildesheim, Deutschland) gegeben und nach Angaben des Herstellers gewaschen. Das Eluat von Säulchen 1 wird benutzt um die gebundenen PCR-Produkte von Säulchen 2 zu eluieren. Das so gewonnene Eluat von Säulchen 2 wird dann benutzt um die Produkte von Säulchen 3 zu eluieren, u.s.w. Im Eluat von Säulchen 4 befinden sich letztendlich die gepoolten Produkte aus vier verschiedenen PCR-Ansätzen von einer DNS-Probe.

B.15.2.5 Fragmentierung

Standardansatz Fragmentierung:

Komponente	Fragmentation-Reagent (3 U/µl)	10xFragmentation-Puffer	H ₂ O _{MB}
Volumen/Reaktion	2 µl	12,5 µl	110,5 µl
Endkonzentration	0,048 U/µl)		

Durchführung der Fragmentierung, alle Arbeiten auf Eis:

- 1.) 5 µl 10xFragmentation-Puffer zu 45 µl (20µg) gereinigtem PCR-Produkt zugeben
- 2.) Mastermix (MM) herstellen
- 3.) 5 µl MM zu 50 µl PCR-Produkt mit Puffer zugeben
- 4.) Programm FRAGMENT im PCR-Gerät laufen lassen

Zur Ergebniskontrolle wurden die 5 µl auf ein 4%iges NuSive-Agarosegel aufgetragen. Die Länge der Produkte sollte unter 200 bp liegen.

B.15.2.6 Markieren der DNS-Fragmente

Standardansatz Markierung:

Komponente	Fragmentation-Reagent (3 U/µl)	10xFragmentation-Puffer	H ₂ O _{MB}
Volumen/Reaktion	2 µl	12,5 µl	110,5 µl
Endkonzentration	0,048 U/µl)		

Durchführung Markierung:

- 1.) 5 µl 10xFragmentation-Puffer zu 45 µl (20µg) gereinigtem PCR-Produkt zugeben
- 2.) Mastermix (MM) herstellen
- 3.) 5 µl MM zu 50 µl PCR-Produkt mit Puffer zugeben
- 4.) Programm FRAGMENT im PCR-Gerät laufen lassen

B.15.2.7 Hybridisierung

Standardansatz für den Hybridisierungscocktail:

Komponente	Fragmentation-Reagent (3 U/µl)	10xFragmentation-Puffer
12xMES	12 µl	0,056 M
DMSO	13 µl	5%
Denhardt's Solution (50x)	13 µl	2,5
EDTA (0,5 M)	3 µl	5,77 M
HSDNA (10 mg/ml)	3 µl	0,115 mg/ml
Oligonucleotid Control Reagent	2 µl	
Humane Cot-1-DNA (1mg/ml)	3 µl	11,5 mg/ml
Tween-20 (3%)	1 µl	0,0115%
TMACL (5M)	190 µl	2,69 M

Durchführung der Hybridisierung:

- 1.) 190 µl Hybridisierungscocktail zu 70 µl fragmentiertem, markiertem PCR-Produkt geben
- 2.) 10 min auf 95°C erhitzen
- 3.) 10 sek. auf Eis abkühlen
- 4.) Kondensat abzentrifugieren, 2 min auf 48°C equilibrieren
- 5.) Auf RT equilibrierten Genchip mit 200 µl denaturiertem Hybridisierungsmix beladen
- 6.) Bei 48°C 16-18 h bei 60 rpm hybridisieren

B.15.2.8 Stringenzwaschen, Nachweis und Scannen

Zum Waschen und Färben des hybridisierten Genchips wurde die Affymetrix Fluidics Station 400 benutzt. Das Waschprogramm war DNAARRAY_WS2. Auf die unstringente Waschung mit Waschpuffer A (hohe Salzkonzentration, 25°C) folgt eine stringente Waschung mit Waschpuffer B (niedrige Salzkonzentration, 42°C). Um maximale Signalintensität zu erreichen, wurden die mit Biotin markierten, hybridisierten DNS-Fragmente durch die sogenannte „Sandwichmethode“ nachgewiesen. Zuerst bindet ein Antikörper an Biotin, danach bindet ein biotin-markierter Antikörper an diesen Antikörper. Zuletzt bindet Phycoerythrin-markiertes Streptavidin an alle noch frei liegenden Biotinmoleküle.

Standardansatz Färbepuffer:

Komponente	H ₂ O _{MB}	20xSSPE	3% Tween-20	50xDenhardt's Lösung
Volumen/Reaktion	1000 µl	450 µl	5 µl	30 µl
Endkonzentration		6x	0,01%	1x

Streptavidin-Färbelösung:

Komponente	Färbepuffer	Streptavidin (Pierce, 1 mg/ml)
Volumen/Reaktion	459 µl	5 µl
Endkonzentration	1x	10 µg/ml

Antikörper-Färbelösung:

Komponente	Färbepuffer	Anti-Streptavidin Antikörper (Ziege, Vector Laboratoris, 0,5 mg/ml)
Volumen/Reaktion	459 µl	5 µl
Endkonzentration	1x	5 µg/ml

SAPE (R-Phycoerythrin Streptavidin)-Färbelösung:

Komponente	Färbepuffer	R-Phycoerythrin Streptavidin (Molecular Probes, 1 mg/ml)
Volumen/Reaktion	459 µl	5 µl
Endkonzentration	1x	10 µg/ml

Die Signale wurden mit dem Affymetrix GeneChip Scanner 3000 abgelesen. GeneChip Fluidics Stations and Scanner werden durch die Affymetrix GeneChip® Operating Software (GCOS) gesteuert. GCOS verwaltet darüber hinaus alle Daten und Experimentinformationen und bildet die Schnittstelle zur Affymetrix GeneChip DNA Analysis Software (GDAS) und dem Affymetrix Copy Number Tool (CNT).

B.15.3 Auswertung der Affymetrix GeneChip® Mapping Daten

B.15.3.1 Affymetrix GDAS-Software

Die SNP Mapping Array Daten wurden mit der Affymetrix GeneChip® DNA Analysis Software (GDAS) ausgewertet. GDAS liegt ein Model-basierter Algorithmus (MPAM, Modified Partitioning Around Medoids, (Liu et al., 2003) zugrunde, der entscheidet, um welches Allel eines bestimmten SNPs es sich in der entsprechenden Probe handelt. Pro SNP befinden sich 40 verschiedene, den SNP überspannende, 25mere auf dem Chip (Abbildung 12). Die Hälfte dieser Oligonukleotidsonden, d.h. jeweils 20, korrespondieren zum „Sense“-Strang der DNS, die anderen 20 korrespondieren zum „Antisense“-Strang der DNS. Jeweils zehn der 20 Oligonukleotide pro Strang passen perfekt (PM: „perfect match“) zur Zielregion, die anderen zehn Oligonukleotide pro Strang besitzen jeweils eine Basenfehlpaarung gegenüber der Zielregion (MM: mismatch). Fünf der zehn PM-Oligonukleotide pro Strang passen perfekt für das Allel A (PM_A: „perfect match A“), fünf davon passen perfekt für das Allel B (PM_B: „perfect match B“). Genauso gibt es pro Strang fünf MM_A, bzw. MM_B Oligonukleotide. Bei der spezifischen Hybridisierung binden die PM-Sonden auf dem Chip markierte Proben-DNS, die MM-Sonden binden keine DNS (Abbildung 12). Bei homozygoten SNPs (AA oder BB) liefert der Chip 10 Signale pro SNP, bei heterozygoten SNPs (AB) sogar 20 Signale pro SNP (Abbildung 12). Für die Auswertung wird, in einem ersten Schritt, mit Hilfe eines sogenannten Diskriminierungsfilters, festgestellt, ob es sich bei der Hybridisierung um spezifische, oder unspezifische Hybridisierung handelt. Der Diskriminierungsfiler vergleicht die Signalintensitäten der 40 verschiedenen, zu einem bestimmten SNP korrespondierenden, Oligonukleotide miteinander. Genaugenommen vergleicht er die Signalintensitäten der „mismatch“-Proben mit den Signalintensitäten der „perfect match“-Proben (Abbildung 12).

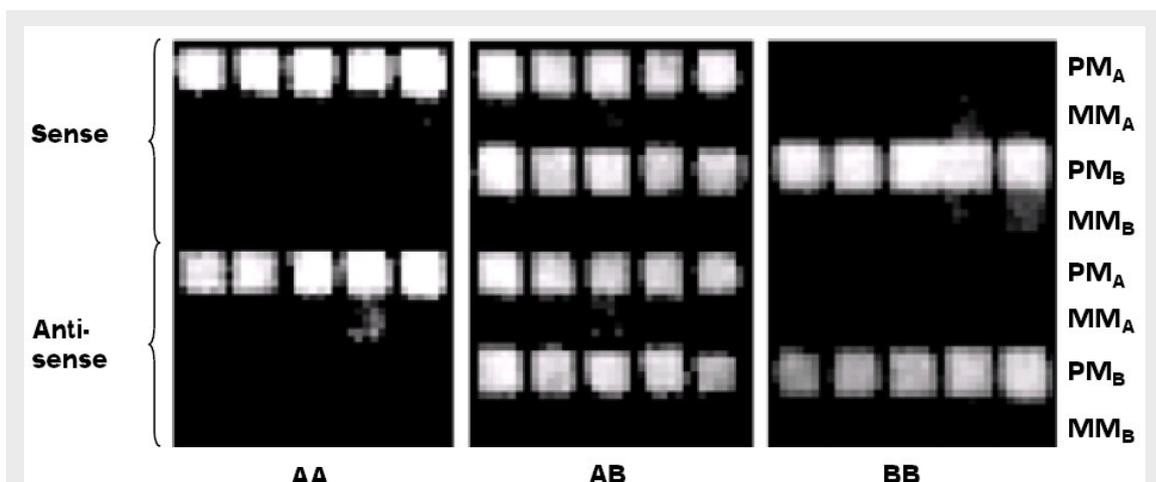


Abbildung 12: Spezifische Hybridisierung auf dem Affymetrix GeneChip® Mapping Assay

Darstellung der 40, zu einem einzelnen SNP korrespondierenden Oligonukleotide auf dem Chip. Von links nach rechts: Spezifische Hybridisierung einer Probe mit einem AA-Genotyp, von einer Probe mit einem AB-Genotyp und einer Probe mit einem BB-Genotyp des SNPs (Affymetrix GeneChip® Mapping Assay Manual).

Wenn die Hybridisierungsqualität entsprechend gut ist, passiert das Proben-Set den Filter, und es werden aus den 40 verschiedenen Signalintensitäten für jeden SNP zwei sogenannte RAS („Relative Allele Signal“-)Werte (RAS1: sense Strang, RAS2 antisense Strang) berechnet (Gleichung 1). Der RAS-Wert ist ein Maß für die Signalintensitäten der „perfect match“-Oligonukleotide eines SNPs. Die Werte liegen auf einer Scala von 0 bis 1 wobei BB-Allele einen RAS-Wert nahe 0, AA-Allele einen RAS-Wert nahe 1 und AB-Allele einen RAS-Wert im mittleren Bereich haben (Abbildung 13). Wenn der Probensatz eines SNPs den Diskriminierungsfilter nicht passiert, wird kein RAS-Wert berechnet, sondern willkürlich der Wert -2 festgelegt.

$$M = \frac{MA + MB}{2}$$

$$A = \text{Max}[PA - M, 0]$$

$$B = \text{Max}[PB - M, 0]$$

$$\text{RAS}_{\text{Oligo-Quartett}} = \frac{A}{A+B}$$

Gleichung 1: Berechnung der RAS-Werte:

Für eine bestimmte Region auf einem DNS-Strang gibt es vier Varianten eines 25mers: PM_A , PM_B , MM_A , MM_B („perfect match“ A und B; „mismatch“ A und B). Für jedes dieser Oligo-Quartette wird ein eigener RAS-Wert berechnet. Pro SNP und DNS-Strang gibt es jeweils fünf Quartetts, die zueinander jeweils um 1 bp verschoben sind aber alle den SNP überspannen. Der Mittelwert aller fünf RAS-Werte des sense-Strangs ergibt RAS1, der Mittelwert aller fünf RAS-Werte des antisense-Strangs ergibt RAS2.

A-Allele eines SNPs ergeben einen RAS-Wert nahe 1, B-Allele eines SNPs ergeben einen RAS-Wert nahe 0, der RAS-Wert für eine AB Konstellation liegt im mittleren Bereich (s. auch Abbildung 13).

M: Mittelwert der Mismatch-Signalintensitäten (M); A: Signalintensität vom PM_A -Oligonukleotide relativ zu Mittelwert der Mismatch-Signalintensitäten; B: wie A nur für PM_B

Da das Hybridisierungsverhalten der Oligonukleotide auf dem Chip naturgemäß variiert, wurden von Affymetrix aus den RAS-Werten von 133 Referenzhybridisierungen, mit Hilfe eines Clustering-Algorithmus (MPAM), drei zu den jeweiligen Genotypen, AA, AB oder BB, korrespondierende Bereiche („Call-Zonen“), abgeleitet (Abbildung 14). Dazu wurden die RAS-Werte der Referenzhybridisierungen in einen 2D-Graphen eingetragen (X-Achse: RAS1, Y-Achse: RAS2; Abbildung 14 und Abbildung 15). Wie im folgenden genauer beschrieben, werden bei der Auswertung der Hybridisierung einer Test-DNS die Ergebnisse der Probe mit den Ergebnissen aus den Referenzhybridisierungen verglichen. Dadurch wird ermittelt, welchen Genotyp der entsprechende SNP in der Test-DNS hat.

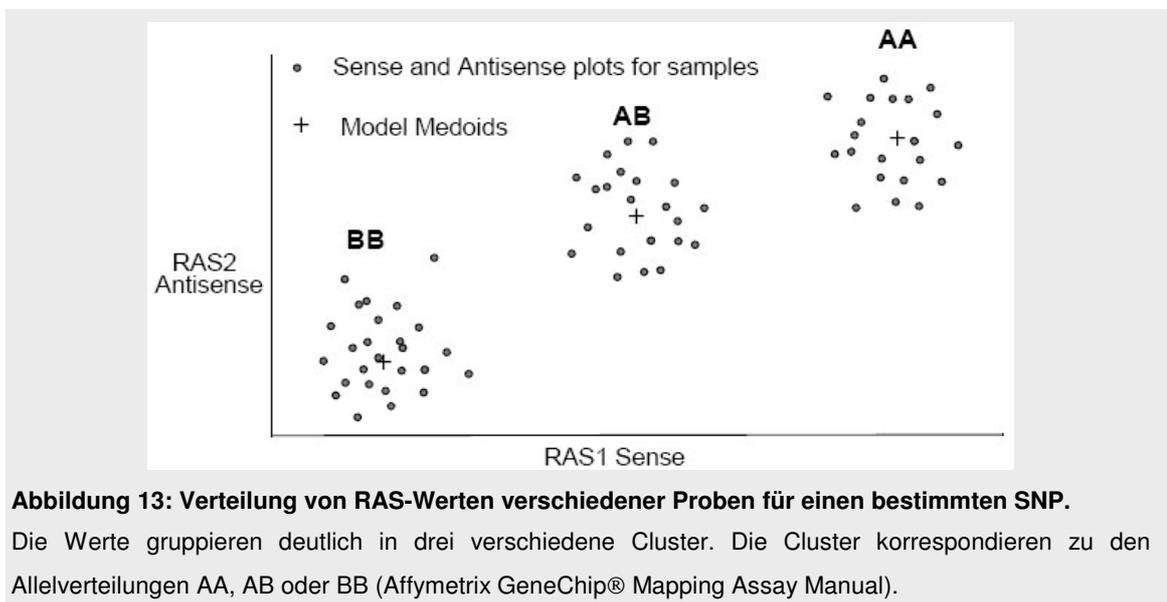


Abbildung 13: Verteilung von RAS-Werten verschiedener Proben für einen bestimmten SNP.

Die Werte gruppieren deutlich in drei verschiedene Cluster. Die Cluster korrespondieren zu den Allelverteilungen AA, AB oder BB (Affymetrix GeneChip® Mapping Assay Manual).

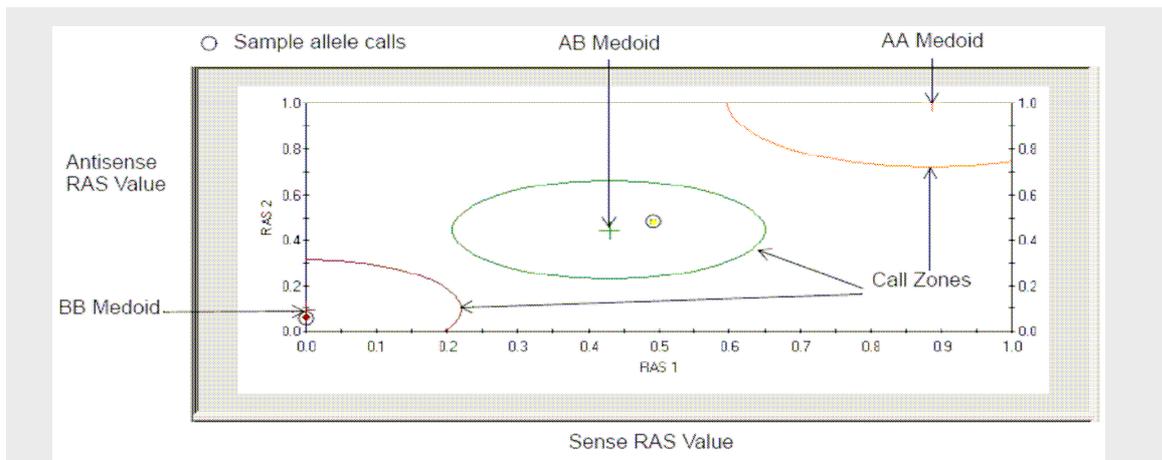


Abbildung 14: Medoid und Call Zone;

Für jedes Cluster einer RAS-Werte Verteilung eines jeden SNPs wird ein Mittelpunkt (Medoid) und eine kreisförmige, alle RAS-Werte eines Clusters umfassende Region (Call Zone mit Radius R) berechnet (Affymetrix GeneChip® Mapping Assay Manual).

Nachdem also ein Probenatz den Diskriminierungsfilter passiert hat, wird der sogenannte Call-Zonen Wert (auch „Distance to Radius ratio“, DTR) berechnet. Dazu werden sense- und antisense-RAS Werte eines SNPs in einen 2D-Graphen eingetragen und der Abstand (D) von den aktuellen Werten der Probe zum Medoiden (Call Zonen Mittelpunkt) der Referenzhybridisierungen, sowie der Abstand des Medoiden zum benachbarten Allel-Clusters ($2R$) ermittelt (Abbildung 15). Der Call-Zonen Wert entspricht dann dem Verhältnis von D/R (Abbildung 15). Ist der RAS-Wert -2 weil das Probenatz den Diskriminierungsfilter nicht passiert hat, wird der Call-Zonen Wert auf 10 gesetzt. Pro Probe werden die Call-Zonen Werte für jede mögliche Allelkombination eines bestimmten SNPs miteinander verglichen und getestet, ob sie innerhalb der, basierend auf den Referenzhybridisierungen empirisch ermittelten SNP Call Grenze liegen. Trifft dies zu, wird der entsprechende SNP Call (AA, AB oder BB) zugeordnet. Fällt keiner der berechneten Call-Zonen Werte in eine der drei (über die Werte der 133 Referenzhybridisierung ermittelten) SNP Call Grenzen, wird kein Allel Call zugeordnet („NoCall“). Da der Affymetrix GeneChip® Mapping Assay für Linkage Anwendungen entwickelt wurde, wurden die SNPs auf dem Array von Affymetrix danach ausgewählt, dass AA, AB und BB Konstellationen jeweils mit einer Wahrscheinlichkeit von $1/3$ in der Normalpopulation auftreten.

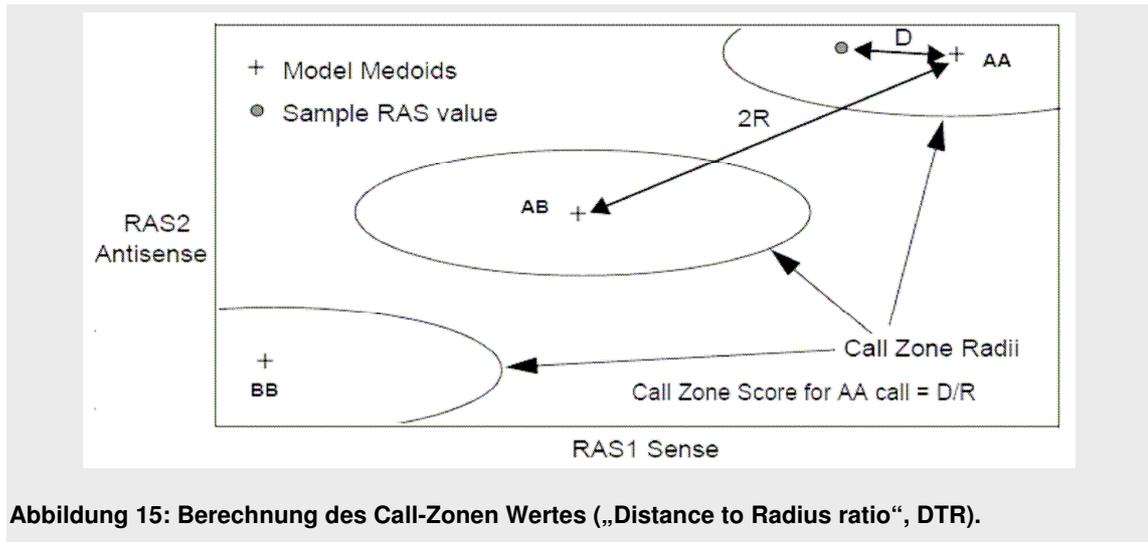


Abbildung 15: Berechnung des Call-Zonen Wertes („Distance to Radius ratio“, DTR).

Als letztes wird bei der Analyse mit der GDAS-Software das Geschlecht ermittelt. Da sich auf dem Array keine zum Y-Chromosom korrespondierenden SNPs befinden, kann das Geschlecht einer Probe nicht direkt, wie z.B. bei der Chromosomen-CGH, bestimmt werden. Stattdessen wird das Verhältnis der Anzahl von heterozygoten Calls auf dem X-Chromosom zu der Gesamtzahl aller Calls auf dem X-Chromosom berechnet (Gleichung 2). Überschreitet dieser Wert eine definierte Grenze („heterozygous call ratio boundary“, „HCRBound“, Gleichung 2), wird die Probe von der Affymetrix GDAS-Software als weiblich klassifiziert. Liegt das Verhältnis der heterozygoten zu den homozygoten SNPs auf dem X-Chromosom unterhalb dieser Grenze, wird die Probe als männlich klassifiziert. Alle in dieser Arbeit verwendeten Proben wurden mit den von der GDAS-Software vorgegebene Einstellungen analysiert. Die vorgegebene HCRBound lag bei 0,07, d.h. wenn die Zahl der heterozygoten SNPs auf dem X-Chromosom unter 7% war, wurde die Probe als männlich klassifiziert.

HCR= Anzahl SNPs auf X-Chromosom mit AB-Genotyp / Gesamtzahl SNPs auf X-Chromosom

Gleichung 2: Berechnung der „Heterozygous Call Ration Boundary“ zur Geschlechtsbestimmung

Mit der GDAS-Software können im „Modified Partitioning Around Medoids Mapping Analysis“-Fenster (Abbildung 16) die ermittelten Allel-Calls als SNP-Cluster mit assoziierten Qualitäts-Scores visualisiert werden. In dem Fenster kann darüber hinaus eine Vielzahl mit den SNPs assoziierte Informationen, wie z.B. chromosomale und physikalische Position, Länge des Xba-Fragments oder Geninformation, angezeigt werden. Dazu muss eine Verbindung zu dem NetAffx™ Analysis Center (<https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/index.affx>) hergestellt werden. Mit GDAS können auch Loss of Heterozygosity (LOH)-Werte für korrespondierende Normal- und

Tumorproben berechnet werden. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten LOH-Werte wurden aber alle mit der dChip Software ermittelt.

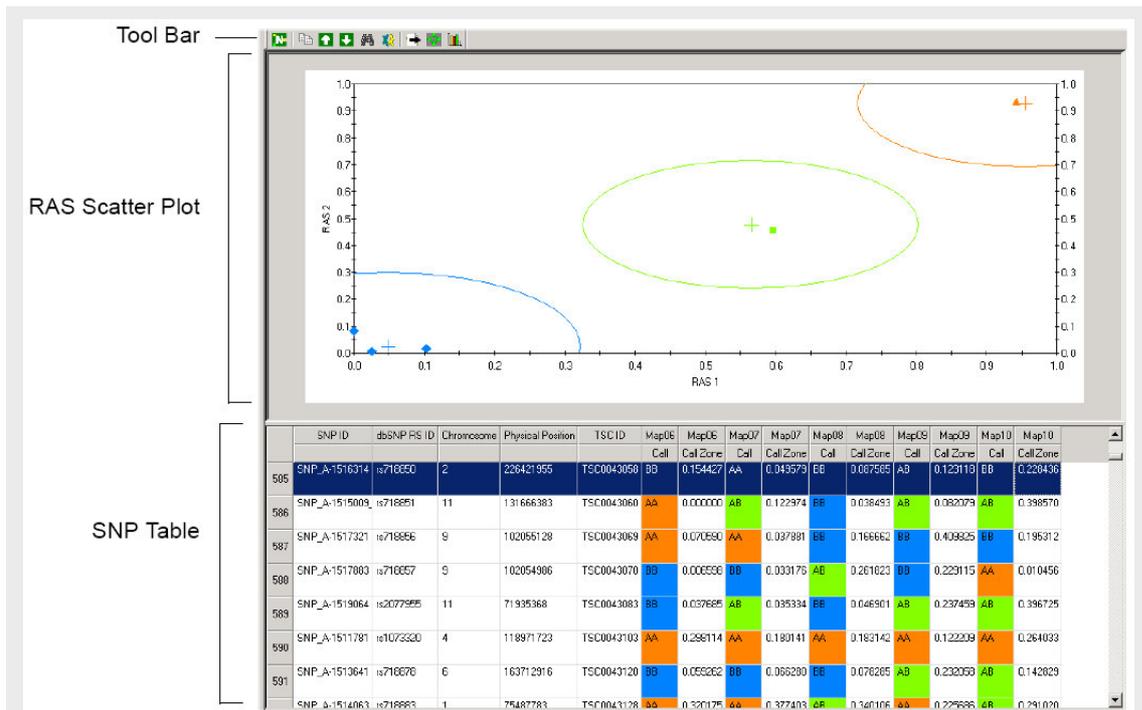


Abbildung 16: MPAM (Modified Partitioning Around Medoids) Mapping Analysis Fenster:

Im RAS Scatter Plot sieht man für einen ausgewählten SNP eine graphische Darstellung des Relativen Allel Signals (RAS) im Verhältnis zu dem Medoid und der Call-Zone aller im Bildschirm gelisteten Proben. Die SNP-Tabelle zeigt die SNPs, ihrer Genotypen und ihrer Call-Zonen. Über das Affymetrix NetAffx™ Analysis Center können noch zusätzliche Informationen, wie Chromosomale und Physikalische Position oder Länge des Xba-Fragments ausgewählt und in der SNP-Tabelle angezeigt werden (Affymetrix GDAS Manual).

B.15.3.2 Affymetrix Copynumber Tool

Das Affymetrix® GeneChip® Chromosom Copy Number Analysis Tool (CNT, frei verfügbar über <https://www.affymetrix.com>) wurde entwickelt, um anhand der Signalintensitäten der SNP-Chip Hybridisierung genomweit chromosomale Gewinne und Verluste zu identifizieren (Huang et al., 2004). Das CNT basiert auf einem Algorithmus der die Signalintensitäten einer Hybridisierung mit den Werten der 133 Referenzhybridisierungen vergleicht und sie dann entsprechend folgender Gleichung in einen Wert für die geschätzte Kopienzahl, des entsprechenden SNPs umwandelt (Huang et al., 2004).

$$\text{geschätzte Kopienzahl} \approx \exp(0,659 + 0,939 \times (S - \mu))$$

Gleichung 3: Berechnung der Kopienzahl mit Affymetrix CN-Tool

Dabei ist S der logarithmierten Signalintensität des SNPs und μ der zugehörige Mittelwert des Referenzdatensatzes. Steigung und y -Abschnitt der Geraden wurden empirisch ermittelt (Huang et al., 2004). Das CNT geht von der Annahme aus, dass die standardisierten Log-Intensitätswerte S normalverteilt und die SNPs unabhängig voneinander sind. Das CNT nutzt zwei verschiedene Methoden, um die Signifikanz des errechneten Kopienzahlgewinnes, bzw. -Verlustes zu ermitteln; die „single point analysis“ (SPA) und die „contiguous point analysis“ (CPA). Bei der SPA wird das p -value für jeden einzelnen SNP unabhängig vom Nachbar-SNP ermittelt. Bei der CPA werden über einen Algorithmus (Huang et al., 2004) Anfang und Ende von einem Veränderungstrend ermittelt und der mittlere Signifikanzwert über diesen Bereich berechnet. Der CPA geht davon aus, dass der ermittelte Signifikanzwert umso zuverlässiger ist, je größer die Zahl an nebeneinander liegenden SNPs ist, welche dieselbe Veränderungstendenz zeigen (Verlust bzw. Gewinn). Deswegen wird bei der CPA der SPA-Signifikanzwert dann durch den neu ermittelten Wert ausgetauscht, wenn dieser größer, d.h. zuverlässiger ist. Der CPA-Algorithmus wird angewandt um die Detektionsrate zu verbessern. Er kann homozygote Deletionen und Amplifikationen mit einer großen Kopienzahlabweichung sehr zuverlässig erkennen. Die Detektion von Regionen mit kleineren Kopienzahlveränderung ist noch schwierig und unzuverlässig. Bei der SPA werden Regionen mit kleinen Kopienzahlveränderungen zwar detektiert, verschwinden aber im „Rauschen“, d.h. der noch zu großen Menge an falsch positiven Ergebnissen. Die Detektion von Regionen mit kleineren Kopienzahlveränderung bleibt deswegen weiter schwierig.

Darüber hinaus kann mit dem CNT die Wahrscheinlichkeit dafür berechnet werden, dass an einer bestimmten Stelle ein LOH stattgefunden hat. Dazu wird der ermittelte Genotyp eines SNPs mit den Ergebnissen aus dem Referenzpool verglichen. Mit dem CNT ist es nicht möglich zwei Proben direkt miteinander zu vergleichen und damit die real vorkommenden LOH-Ereignisse, z.B. zwischen einem Tumor und dem korrespondierenden Normalgewebe, zu ermitteln. Die Version 2.0 des CNT hat im Vergleich zur Version 1.0 ein verbessertes graphisches Interface. Da es aber nicht möglich ist, die Werte von allen Chromosomen einer Hybridisierung, bzw. die Ergebnisse von verschiedenen Hybridisierungen simultan darzustellen, wurden für die vorliegende Arbeit die Daten aus dem CNT exportiert und mit Hilfe der Microsoft Office Anwendung Excel, den Fragestellungen entsprechend, graphisch dargestellt. Bei der Darstellung der mit dem CNT ausgewerteten Array Daten werden in X-Richtung die einzelnen SNPs, ohne Berücksichtigung ihrer physikalischen Distanz, vom p- zum q Arm aufgetragen und in Y-Richtung die entsprechenden vom CNT berechneten Werte.

Mit dem CNT werden vier verschiedene Werte berechnet: (i) die geschätzte Kopienzahl, (ii) die Signifikanz für die errechnete Kopienzahl (p-value), (iii) die mit der „contiguous point analysis“ (CPA) berechneten Signifikanz Werte (meta-p-value) und (iv) ein Wert für den LOH.

B.15.3.3 dChip

DNA-Chip Analyzer (dChip, frei verfügbar über <http://www.dchip.org/>) ist ein Softwarepaket, welches für die Expressionsanalyse mit Oligonukleotid-Arrays entwickelt wurde (Li and Hung Wong, 2001). Es wurde für die Kopienzahlanalyse und LOH Analyse mit dem Affymetrix GeneChip® Mapping Assays weiterentwickelt.

Im Gegensatz zum CNT sind mit dChip high-level Analysen, wie z.B. vergleichende Analysen und hierarchisches Clustern von Proben möglich. dChip besitzt darüber hinaus ein sehr benutzerfreundliches graphisches Interface.

Für die Auswertung greift dChip auf die Cell-files zu, d.h. es nutzt die Rohdaten und hat damit 40 verschiedene Signalintensitätswerte pro SNP für die Berechnungen zur Verfügung (s. Abschnitt B.15.3.1). Die Informationen über die Genotypen der SNPs ermittelt dChip nicht selber. Sie müssen mit der GDAS-Software von Affymetrix berechnet und dChip in Tabellenform, als txt-file, zur Verfügung gestellt werden (Abschnitt B.15.3.1).

Die in dieser Arbeit beschriebenen Arrays von Zelllinien, bzw. Patientenproben, wurden in dChip als gemeinsamer Datensatz behandelt und nicht getrennt analysiert. Tabelle 11 gibt eine Übersicht über die für die Auswertung verwendeten Referenzen.

Probennamen	Herkunft
CB_Ref_250304	Affymetrix Referenz DNS
GE_Ref_250304	
CB28_Fu	Blut von Patienten
GE_21173_250304	
GE_21178_250304	
GE_21188_250304	
CB_PLA_250304	männliche Plazenta-DNS

Tabelle 11: Verwendete Referenz-DNS für Affymetrix GeneChip® Mapping Assay

Da die durchschnittlichen Signalintensitätswerte der Arrays (Tabelle 12, Median Intensity“) von 73 bis 798 reichten, mussten die Arrays vor einer weiterführenden Analyse der Daten normalisiert werden. Dazu wurde der Array, mit der mittleren durchschnittlichen Signalintensität als sogenannter „baseline array“ gewählt, und die Signalintensitäten der anderen Arrays mit Hilfe einer Normalisierungsfunktion entsprechend dem „baseline array“ nach unten, bzw. nach oben angepasst (Zhao et al., 2004). Die Normalisierungsfunktion wird dabei für jeden Array individuell bestimmt und zwar basierend auf einzelnen Probensets, die sich im Vergleich zum „baseline array“ im selben Bereich befinden und so mit einer großen Wahrscheinlichkeit dieselbe Kopienzahl besitzen (Zhao et al., 2004). „Baseline array“ des in dieser Arbeit verwendeten Probensets (Tabelle 12) war Array CB25_4423Blut, mit einer durchschnittlichen Signalintensität von 352.

	Array	Median Intensity (unnormalized)	SNP call %	% Array outlier	% Single outlier
Zelllinien	CB_BC3C_250304	108	85.8	0.259	0.061
	287_CAL29	103	83.8	0.787	0.024
	A467_EJ28	112	92.3	0.19	0.048
	286_HT1376	85	78.2	3.027	0.151
	285_SW1710	73	67.5	4.895	0.39
	A466_T24	130	87.6	4.791	0.126
Patienten-Proben (Harblasenkarzinom: U; Stroma:S; Blut)	CB16_26062S	349	89.8	0.112	0.082
	CB17_26062U	340	87	0.043	0.013
	CB18_22452S	376	90.2	0.017	0.026
	CB19_22452U	330	87.9	0.095	0.013
	CB20_4418S	293	91.6	0.017	0.021
	CB21_4418U	386	93.9	0	0.01
	CB22_4418Blut	265	80	0.476	0.089
	CB23_4423S	262	91.5	0.009	0.007
	CB24_4423U	378	94.9	0.035	0.002
	CB25_4423Blut	352	85.4	0.078	0.087
	CB36_18223U	424	84.6	5.301	0.309
	CB37_11703S	375	84	0.216	0.051
	CB38_11703U	373	93.5	0.043	0.034
	CB39_13183S	500	96.7	0	0.01
	CB40_13183U	482	94.6	0.026	0.025
	CB41_22926S	476	94.9	0.052	0.016
	CB42_22926U	436	93.6	0.026	0.039
	CB43_26062S	653	96.3	0.017	0.006
	CB47_26062U	798	94.3	0.035	0.004
	CB48_19604S	557	95.8	0.009	0.008
	CB49_4770S	573	82	0.605	0.06
	CB50_4770U	482	92.4	0.061	0.008
	CB51_13181S	377	87.3	0.069	0.021
	CB52_13181U	336	77.5	3.796	0.177
	CB53_15130S	499	96.5	0.017	0.01
	CB54_15130U	294	93.2	0.208	0.058
	CB55_23878S	331	96.6	0.035	0.03
	CB56_23878U	477	97.4	0.017	0.015
CB57_27182S	367	95.8	0.026	0.014	
CB58_27182U	378	96	0.061	0.022	
Referenzen	CB28_Fu	475	84	0.484	0.055
	CB_PLA_250304	115	94.3	0.104	0.027
	CB_Ref_250304	117	96.6	0.086	0.029
	GE_21173_250304	116	95.9	0.086	0.008
	GE_21178_250304	111	92.4	0.649	0.041
	GE_21188_250304	123	94.1	0.069	0.077
	GE_Ref_250304	118	93.5	0.078	0.016

Tabelle 12: Mittlere Signalintensitäten, SNP-Call Rate und Outlier der hybridisierten Mapping Arrays

Für die Kopienzahlanalyse wurde danach zuerst, mit dem in dChip implementierten PM/MM-Modell, aus den Rohdaten (40 Signalintensitätswerte pro SNP, Abschnitt B.15.3.1) ein gemeinsamer Signalintensitätswert pro SNP abgeleitet. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden dazu die Signalintensitäten der PM_A und PM_B , bzw. die MM_A

und MM_B Oligonukleotide zusammengefasst und damit ein Allel-unabhängiger Signalintensitätswert pro SNP berechnet (Zhao et al., 2004). Darüber hinaus werden bei dieser Analyse die Proben auf Sensitivität und Richtigkeit überprüft, mögliche Artefakte und Ausreißer identifiziert (Tabelle 12, „% Array outlier) und für die weiterführende Analyse aus dem Probenset ausgeschlossen (Zhao et al., 2004). Für jeden SNP wurde ein Signalintensitätswert ermittelt der zu einer Kopienzahl von 2 korrespondiert. Dazu wurde der Mittelwert der Allel-unabhängigen Signalintensitäten der Referenzen gebildet. Die bei einer Probe beobachtete Kopienzahl wurde mit folgender Gleichung ermittelt (Zhao et al., 2004):

$$\text{Beobachtete Kopienzahl} = \frac{\text{beobachtete Signalintensität}}{\text{mittlere Signalintensität von 2 Kopien (Referenzen)}}$$

Gleichung 4: Beobachtete Kopienzahl, dChip

Die Werte für die beobachteten Kopienzahlen werden in dChip logarithmiert ($\ln 2$) und farbkodiert in chromosomaler Reihenfolge visualisiert (Abschnitt C.1.3.2). Falls das Ploidie-Level einer Probe von 2 abweicht, kann diese Information bei der Berechnung der Kopienzahl berücksichtigt werden (Zhao et al., 2004). Mit dChip kann neben der beobachteten Kopienzahl auch eine abgeleitete Kopienzahl berechnet werden. Dazu werden die Rohdaten mit Hilfe eines „Hidden Markov Models“ (HMM) analysiert. Das HMM geht davon aus, dass die beobachteten Signalintensitätswerte für jeden einzelnen SNP zufällig und t-verteilt sind. Die Parameter für die t-Verteilung sind die beobachtete Kopienzahl, die mittlere Signalintensität der Referenzen und deren Standardabweichung, d.h. der gewählte Satz an Referenzhybridisierungen beeinflusst die Analyse der Daten mit dem HMM deutlich. Darüber hinaus geht das HMM davon aus, dass benachbarte SNPs mit einer größeren Wahrscheinlichkeit eine ähnliche Kopienzahl haben, als weit voneinander entfernt liegende SNPs, da Kopienzahlveränderungen durch Rekombination im Genom zustande kommen. Die mit dem HMM abgeleitete Kopienzahl wird genauso wie die beobachtete Kopienzahl in dChip logarithmiert ($\ln 2$) und farbkodiert in chromosomaler Reihenfolge visualisiert (Abschnitt C.1.3.2).

C: Ergebnisse

C.1 Harnblasenkarzinom Zelllinien

C.1.1 Karyotypisieren mit M-FISH

Alle Zelllinien besaßen numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen. Bei allen Zelllinien sind die X-Chromosomen im Verhältnis zu den Autosomen unterrepräsentiert. Im Folgenden wird jeweils der zusammengesetzte Karyotyp der Zelllinien und beispielhaft ein Karyogramm gezeigt. Aberrationen, die nur bei einer der untersuchten Metaphasen beobachtet wurden, werden in dem zusammengesetzten Karyotyp nicht aufgelistet. Bei der Zelllinie HT1376 war die Variabilität zwischen den einzelnen Metaphasen so hoch, dass kein zusammengesetzter Karyotyp erstellt werden konnte. Für die Zelllinie HT1376 wird deswegen nur ein individueller Karyotyp gezeigt.

Zusammengesetzter Karyotyp der Zelllinie BC3C

70-73,XX,der(2)t(2;3)(p16,?q22)[8],-4[8],der(5)t(5;7)(p14,?) [7],-7[6],+8x2[7],+9x2[7],
der(12)t(12;13)(q24;?)t(13;15)(?;?) [8],-13[8],+14[7],+16[6],
der(17)del(17)(p11)del(17)q(11)[8],del(17)(p11)[5],-18[8],+20x2[8],-21[5],+22[4][cp8]

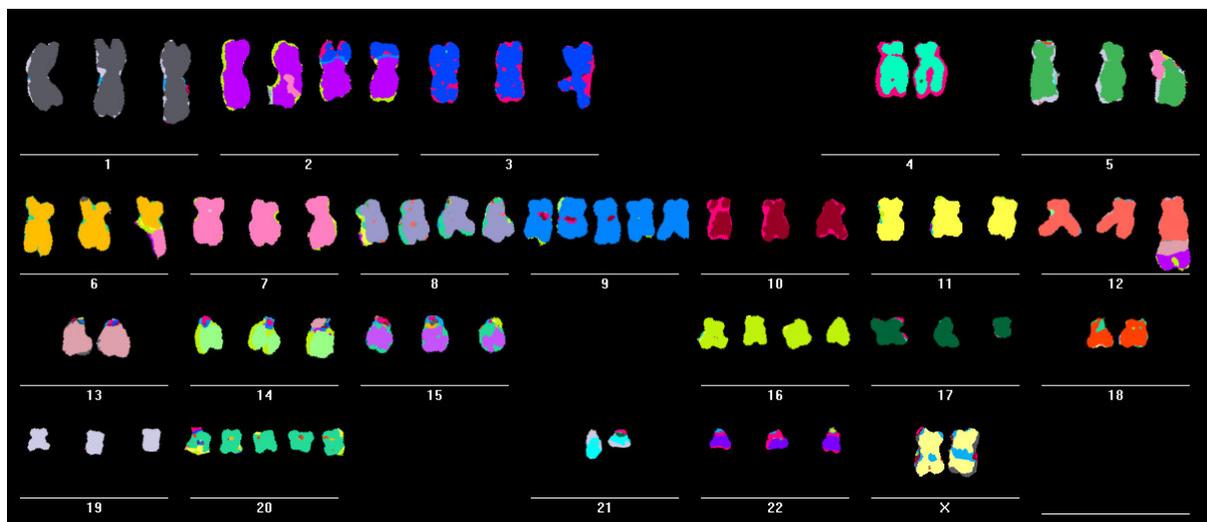


Abbildung 17: Karyogramm der Zelllinie BC3C in den Klassifizierungsfarben

Zusammengesetzter Karyotyp der Zelllinie Cal29

66-68,XXXX,der(X)t(X;19)(p10;q10)[4],-4[4],del(4)(q31)[3],del(5)(q10)[4],+7[2],
 der(7)t(7;20)(q33?;?)[2],der(7)t(7;20)(q33?;?)x2[2],der(7)t(7;12)(q33?;q24?)[2],
 der(7)t(7;12)(q33?;q24?)x2[2],del(10)(p12)[2],-11[3],+12[4],der(12)t(7;12)(p10?;p12)x2[4],
 -13[4],der(16)t(3;16)(?;p13)[2], der(17)t(7;17)(q31?;q22)[4],-18[4],-19[4],+20[2][**cp4**]

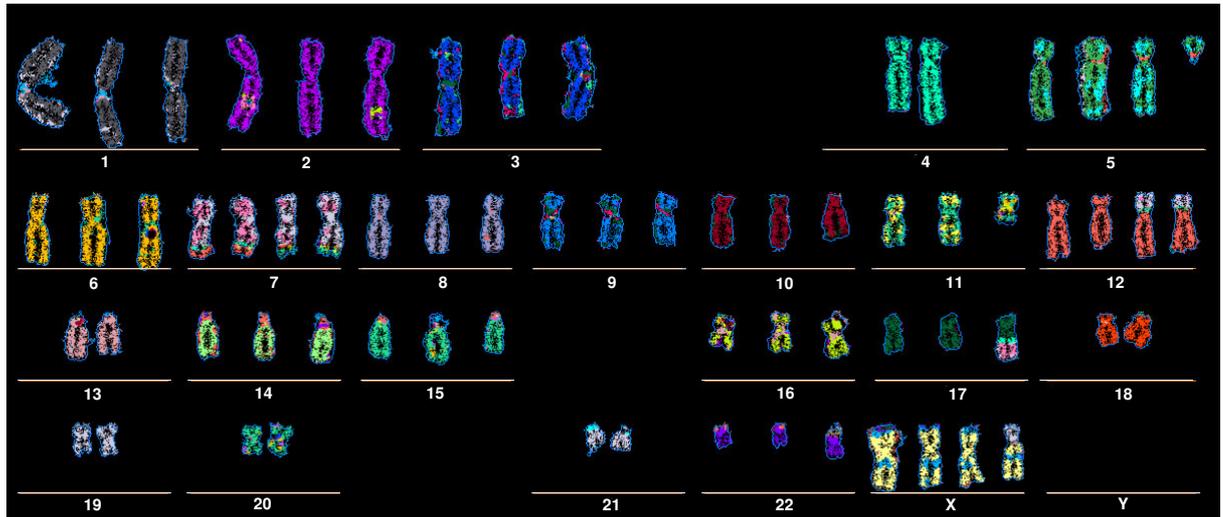


Abbildung 18: Karyogramm der Zelllinie Cal29 in den Klassifizierungsfarben

Zusammengesetzter Karyotyp der Zelllinie EJ28

84-89,XX,der(1;5)t(1;5)(q10;p10)[2],+2[2],der(2;16)t(2;16)(q10;p10)[2],-3[2],
der(3;7)t(3;7)(p10;q10)[2],-4[4],+4[2],del(4)(q31)[2],+5[2],-6[2],+7[2],-7[2],-8[3],
der(8)t(7;8)(p15;p10)x2[3],der(8;19)t(8;19)(q10;?) [2],del(9)(p21)x2[5],
der(10;13)t(10;13)(?;q10)[3],der(10;14)t(10;14)(q10;q10)[2],-11[2],-13[4],
der(13;15)t(13;15)(q10;q10)[3],der(13;20)t(13;20)(q10;?) [2],-14[2],-14x2[2],-15x3[2],
-15x2[3],del(15)(q21)[5],-16[4],-18[4],der(18)t(15;18)(p11;q21?) [2],i(18)(q10)[3],
+19[2],der(19)t(2;19)(q14;p13)[2],+20x2[4], del(20)(p10)[2],-21[4][cp6]

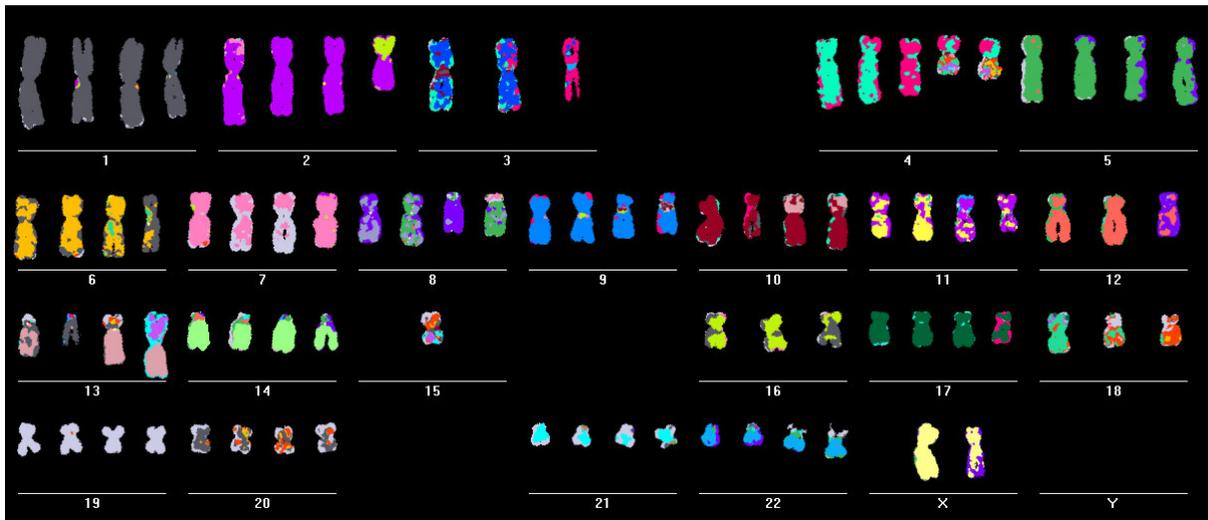


Abbildung 19: Karyogramm der Zelllinie EJ28 in den Klassifizierungsfarben

Karyotyp der Zelllinie HT1367

103,XX,der(X;11)(q10;p10),pseudic(X;15)(p10;q10)t(15;19)(q25;?),+1,
 der(2)t(2;12)(q14;q14),der(2;11)t(2;11)(?;p10)t(2;12)(?;q13),+3x2,
 der(3)t(3;22)(p26;q?13),der(3)t(3;10)(p26;?),der(3)t(2;3)(?;p21),der(3)t(3;14)(q26;q12),
 der(4)t(4;5)(q31;q33)x2,-4,+5x3,i(5)(q10),del(5)(q10)x2,der(5;6)t(5;6)(p10;q10),i(6)(q10),
 +7x2,der(7)t(7;20)(p21;?),del(7)(q10),der(8)t(3;8)(?;q23),+8x2,
 der(8;13)t(8;13)(q10;q10)del(13)(q31)t(8;22)(q21.3~22.2;q?)t(13;22)(q33;q?),
 der(8;13)(q10;q10),i(9)(q10),der(9;16)t(9;16)(p10;q10),
 der(10;20)t(10;20)(q10;?)t(10;20)(q23;?),+11,del(12)(p11~12.1),-12x2,+13x2,
 der(13)t(8;13)(?;q12~13)t(1;10)(?;?),
 der(13)t(13;13)(q10;q10)t(1;13)(?;q12)t(1;5)(?;q?)t(1;5)(q12;q?),-14,-15x2,
 der(15;22)t(15;22)(q10;q10)t(15;22)(q21;q12.3~13.2),
 der(16)t(10;16)(?;p13)t(5;10)(q?;?)t(16;17)(q23;q22),del(17)(q22),+18,-19,+20x2,
 der(22)t(15;22)(q12;q12.3)

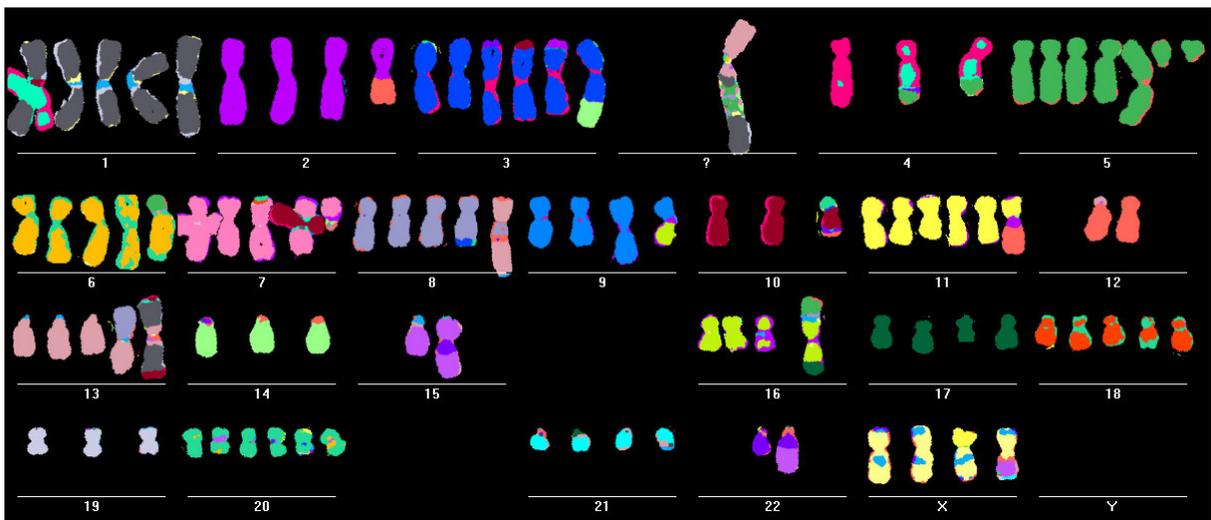


Abbildung 20: Karyogramm der Zelllinie HT1376 in den Klassifizierungsfarben

Zusammengesetzter Karyotyp der Zelllinie SW1710

71-80,XX[7],del(X)(p11)x2[8],+1[6],del(2)(p10)x2[8],+3[6],-4[5],+5[7],
der(5;9)t(5;9)(p10;p10)[8],der(6)t(X;6)(p11;q24)x2[8],+7[4],+7x2[2],
der(7)t(7;9)(p14;?)x2[7],der(9)(?) [6],+10[7],+11[7],
der(11)t(2;11)(?q;p15)t(8;11)(?q22)x2[7],der(12)t(12;22)(p10;?) [4],-13[8],-14[8],
der(16)t(16;19)(?,?)x2[8],der(17)t(5;17)(?,q25)[7],+18[6],i(18)(p10)[4],+19[6],+20x2[6],+21
[6], +22[7] [**cp8**]

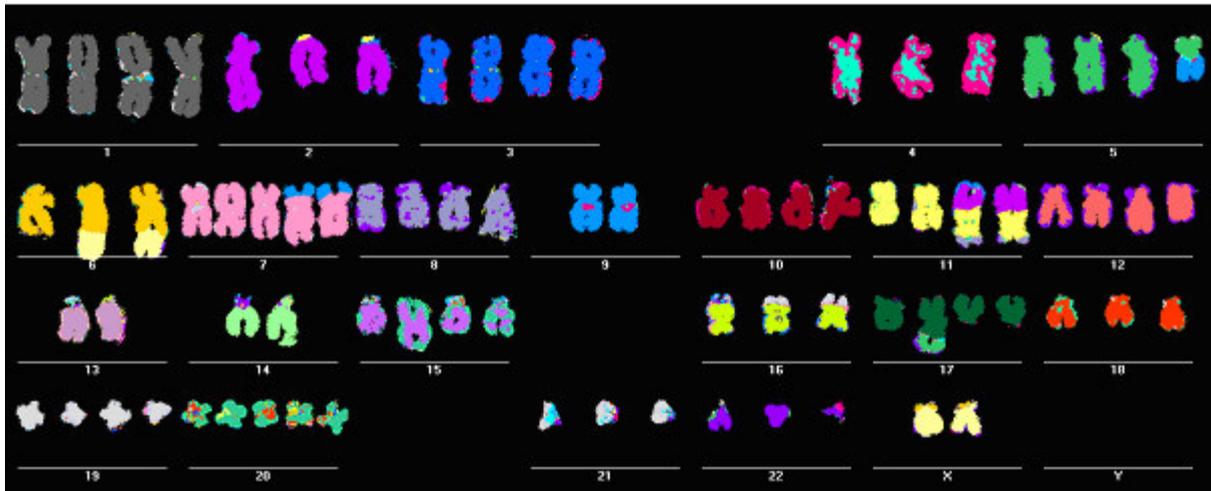


Abbildung 21: Karyogramm der Zelllinie SW1710 in den Klassifizierungsfarben

Zusammengesetzter Karyotyp der Zelllinie T24

70-76XX,der(X;15)t(X;15)(p10;q10)[4],+1[4],der(1)del(p10)del(q32)[5],
 der(1)t(1;6)(p3?;?) [6],-4[6],del(4)(q32)[3],+5[4],der(6;17)t(6;17)(q10;?p10)[6],
 der(8)t(7;8)(?;q10)[6],del(9)(p12)[6],der(10)del(10)(p10)t(10,11)(q?25;?) [5],+11[5],
 der(11)del(p14)del(q23)[3],+12[5],i(12)(p10)[6],der(12)t(12;20)(p12;q?10)[5],-13[3],
 i(14)(q10)[6],-15[5],del(15)(q22)[5],der(15;18)t(15;18)(q10;q10)[2],del(17)(p11)[5],
 der(17)t(17;20)(q24;?) [3],der(18)t(15;18)(q?14;p11)[4],+20[4],+der(20?) [2],-21[2],
 +22[4][cp6]

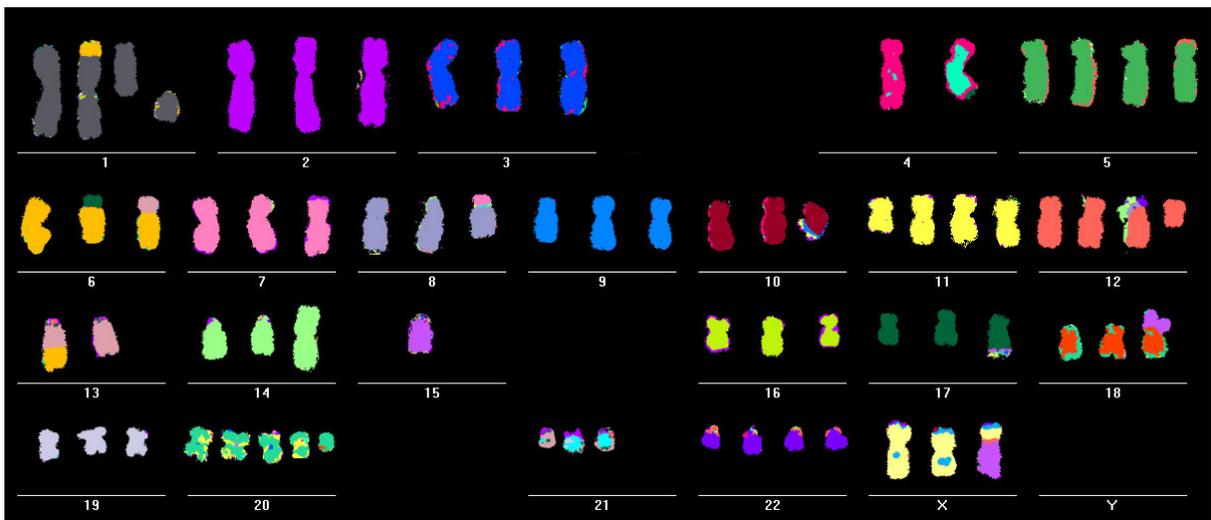


Abbildung 22: Karyogramm der Zelllinie T24 in den Klassifizierungsfarben

Vergleich der Karyogramme von Zelllinien EJ28 und T24

Beide Zelllinien sind nahe tetraploid und besitzen eine charakteristische Deletion am Chromosom 4 [del(4)(q3?)] sowie ein strukturell verändertes Chromosom 18 [der(18)t(15;18)(q?14;p11)].

C.1.2 Relative Quantifizierung mit CGH

Da aufgrund der M-FISH Ergebnisse bekannt war, dass die Harnblasenkarzinom Zelllinien nahe tetraploid sind, wurden für die Analyse der CGH-Profile die Schwellenwerte für tetraploide Probe (oberer Schwellenwert bei 1,12, unterer Schwellenwert bei 0,88) gesetzt. Ist bei einer tetraploiden Probe ein Chromosom einfach überrepräsentiert, ergibt sich ein Verhältnis von 5:4, d.h. 1,3. Ist ein Chromosom einfach unterrepräsentiert, ergibt sich ein Verhältnis von 3:4, d.h. 0,75. Die Schwellenwerte werden so gewählt, dass eine einfache Über-, bzw. Unterrepräsentierung in 50% aller Zellklone detektiert werden kann, d.h. bei einer tetraploiden Probe 1,12 und 0,88.

C.1.2.1 Zelllinie Cal29

Bei dem CGH-Profil von Zelllinie Cal29 (Abbildung 23) sind die Chromosomen 13 und 21 sowie die Chromosomenregionen 4p, 4q27-4q35, 11p, 11q14-11q25, und 18q relativ unterrepräsentiert. Chromosom 20 und Chromosomenregionen 7q11-17q22 und Xq sind relativ überrepräsentiert.

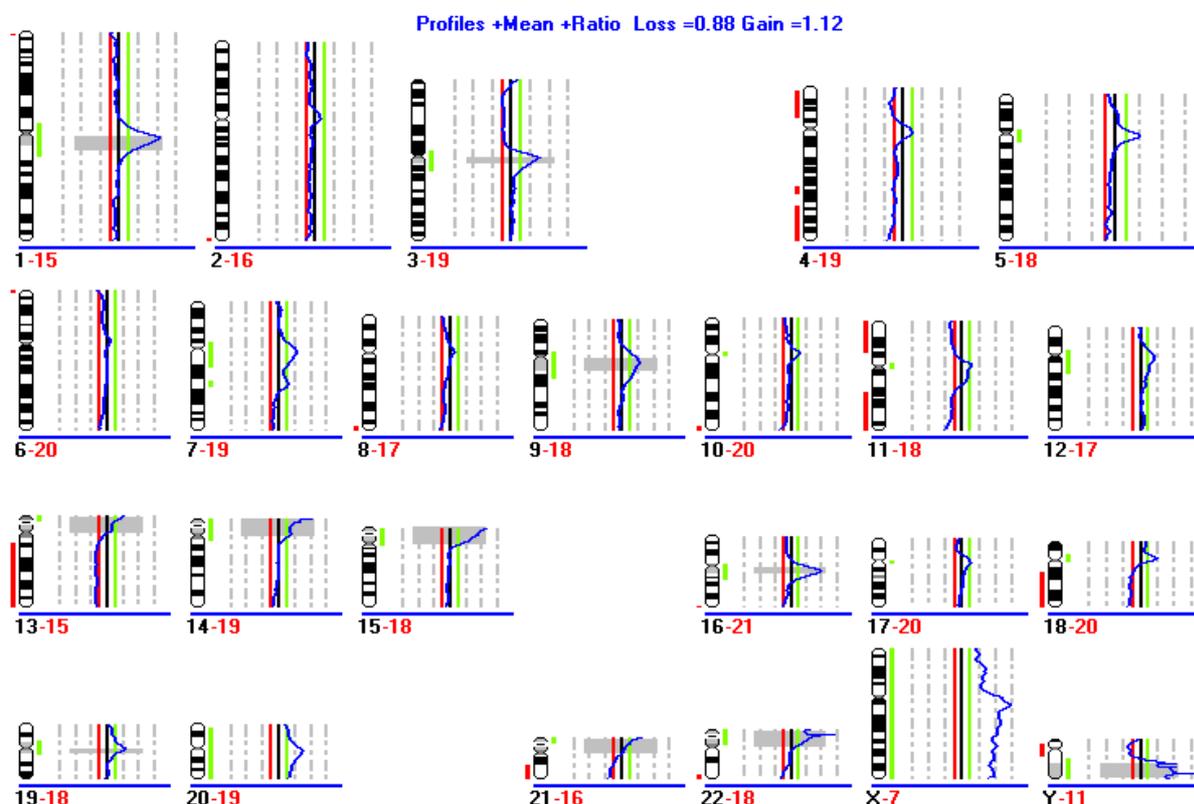


Abbildung 23: CGH-Profil Zelllinie Cal29

C.1.2.2 Zelllinie EJ28

Bei dem CGH-Profil von Zelllinie EJ28 (Abbildung 24) sind die Chromosomenregionen 4q27-4q35, 6p23-6p25, 8p, 9p21-9p24, 10p12-10p15, Xp und Xq21 relativ unterrepräsentiert. Chromosom 5 sowie Chromosomenregionen 7q33-7q36 und 20q sind relativ überrepräsentiert.

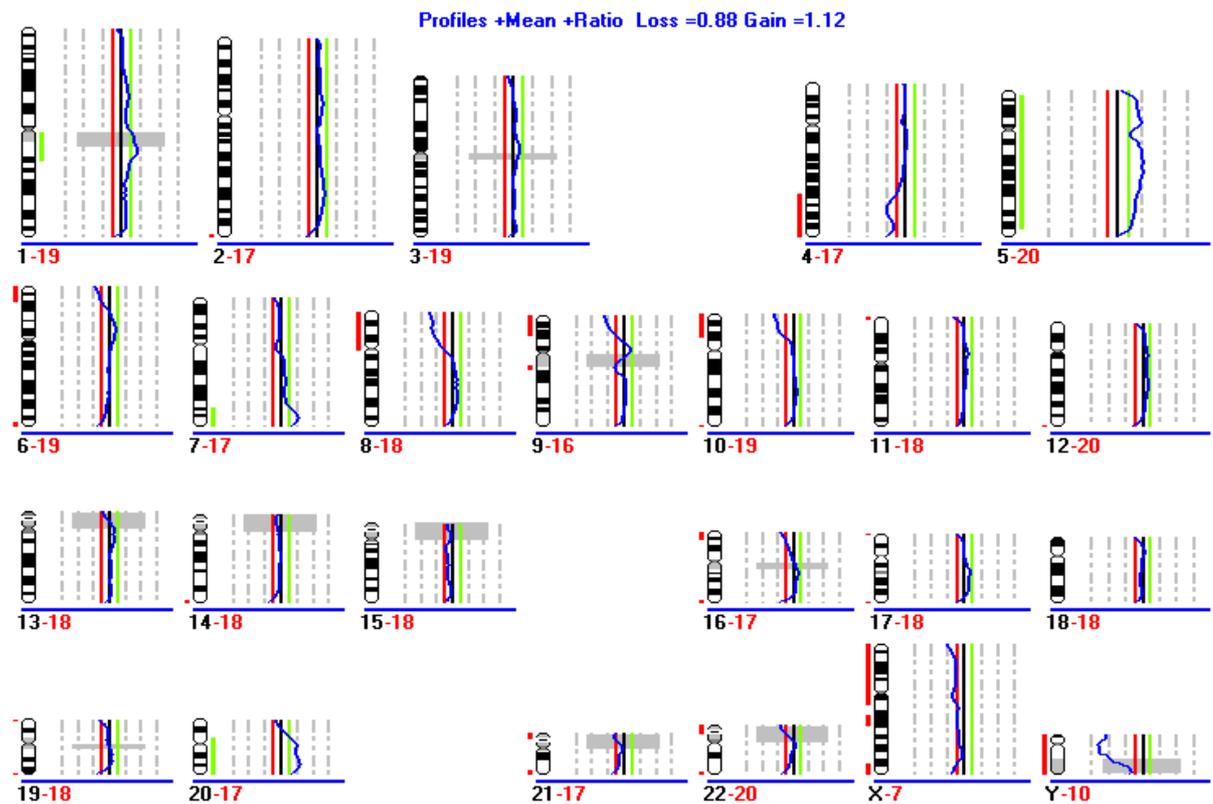


Abbildung 24: CGH-Profil Zelllinie EJ28

C.1.2.3 Zelllinie HT1376

Bei dem CGH-Profil von Zelllinie HT1376 (Abbildung 25) sind die Chromosomenregionen 4q33-4q35, 6q26-6q27, 8p, 12p und 18q12-18q23 relativ unterrepräsentiert. Chromosom X sowie Chromosomenregionen 6p22 und 13q22-13q34 sind relativ überrepräsentiert.

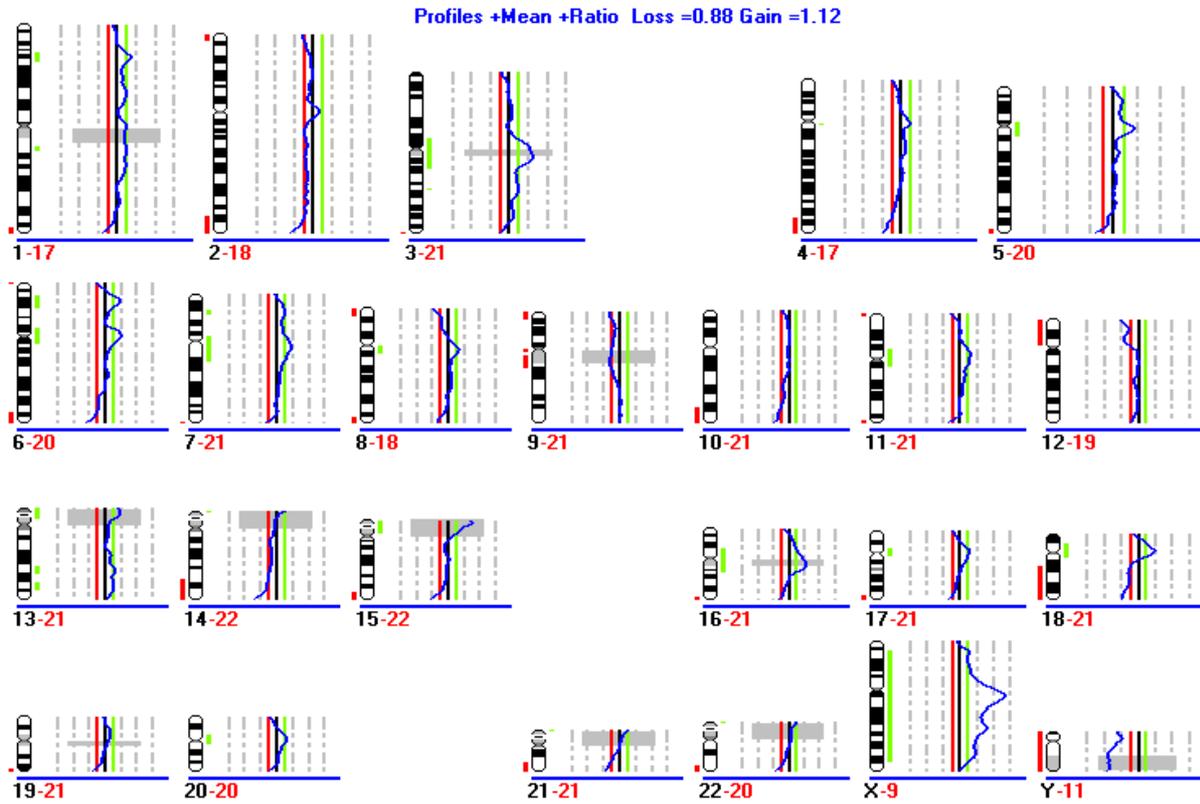


Abbildung 25: CGH-Profil Zelllinie HT1367

C.1.2.4 Zelllinie SW1710

Bei dem CGH-Profil von Zelllinie SW1710 (Abbildung 26) sind die Chromosomen 4, 13 und 14 sowie die Chromosomenregionen 5p, 7p21-17p22, 8p21-8p23, 9p-9q13, 11q22-11qter, 12p und Xp relativ unterrepräsentiert. Chromosomen 1 und 20 sowie Chromosomenregionen 3p21, 3q21-3q25, 5q31-5q35, 7p11-7p15, 7q, 8q24, 9q22-9q34, 11p11-11p13, 11q11-11q13 und 17q11-17q21 sind relativ überrepräsentiert.

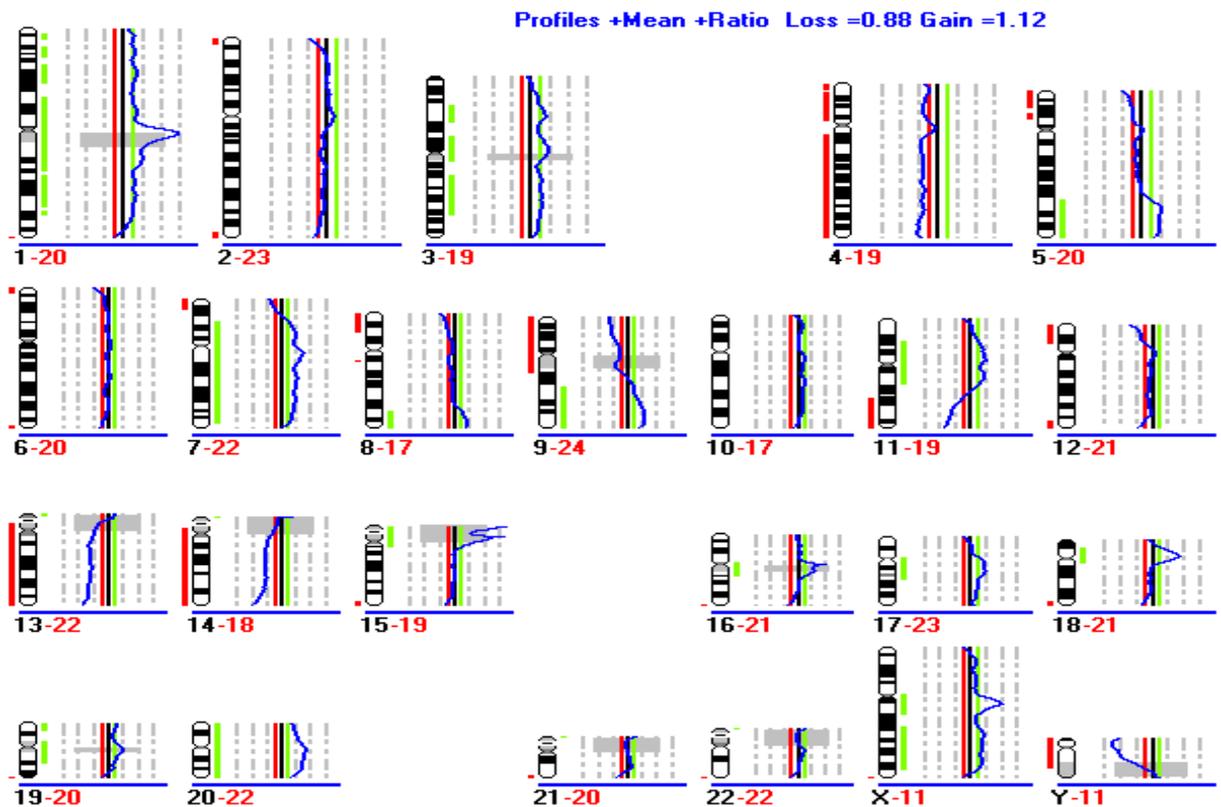


Abbildung 26: CGH-Profil Zelllinie SW1710

C.1.2.5 Zelllinie T24

N.B.: Aus technischen Gründen ist das Profil der Zelllinie T24 spiegelverkehrt. Amplifikationen werden nach rechts, Deletionen nach links angezeigt. Bei dem CGH-Profil von Zelllinie T24 (Abbildung 27) sind das Chromosom 4 sowie die Chromosomenregionen 1q, 6p11-6p21.2, 8p, 9p21-9p24, 10p12-10p15, und 10q25-10q26 relativ unterrepräsentiert. Chromosomen 5 und 20 sowie Chromosomenregionen 7q33-7q36, 11p14-11p15, 12p und 14q23-14q32 sind relativ überrepräsentiert.

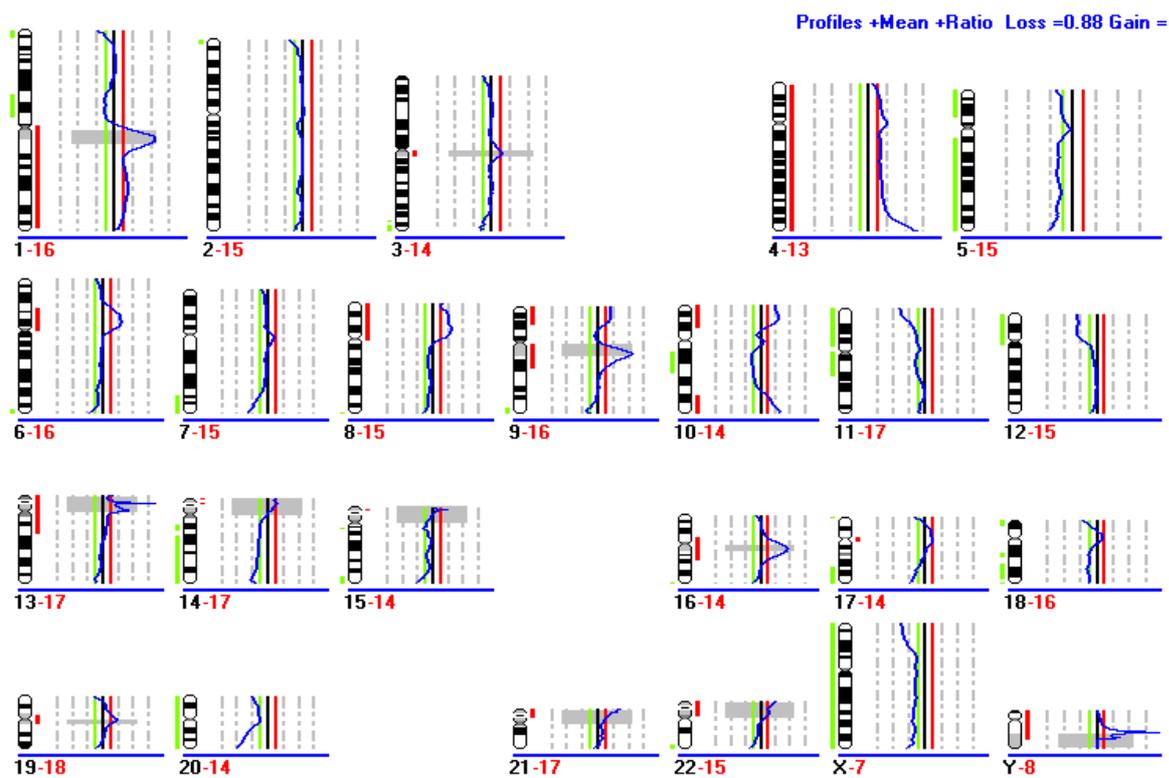


Abbildung 27: CGH-Profil Zelllinie T24

C.1.2.6 Zelllinie BC3C

N.B.: Aus technischen Gründen ist das Profil der Zelllinie BC3C spiegelverkehrt. Amplifikationen werden nach rechts, Deletionen nach links angezeigt. Bei dem CGH-Profil von Zelllinie BC3C (Abbildung 28) sind die Chromosomen 4 und 18 sowie die Chromosomenregionen 2p15-2p25, 3p11-3p22, 5p14-5p15, 7p11-7p13.3, 7q, 13q11-13q22, 19p und X relativ unterrepräsentiert. Chromosomen 8, 9, 14, 16 und 20 sowie Chromosomenregionen 2q23-2q34 und 3q sind relativ überrepräsentiert.

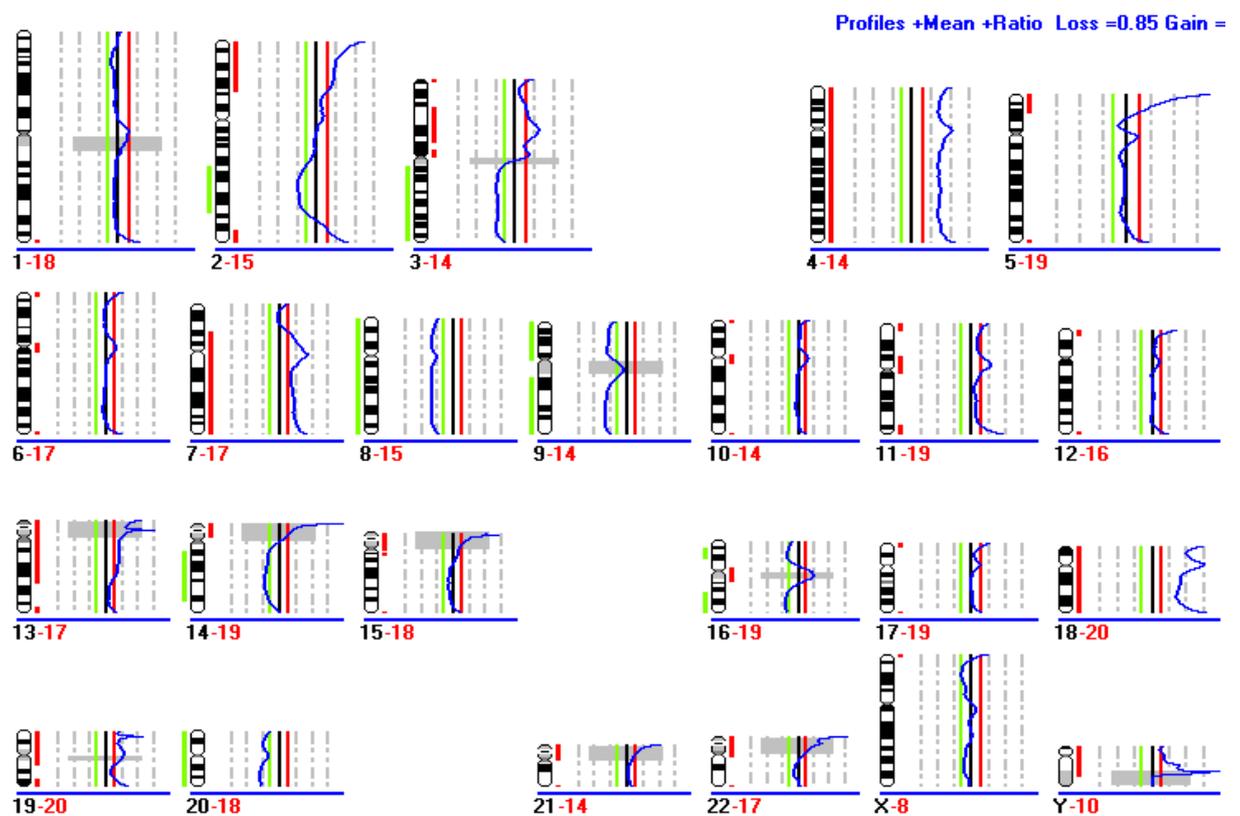


Abbildung 28: CGH-Profil Zelllinie BC3C

C.1.2.7 Vergleich der CGH-Profile von Zelllinien EJ28 und T24

Das CGH-Profil beider Zelllinien (Abbildung 24, Abbildung 27) zeigte einen Verlust von den Regionen 4q27-4q35, 8p, 9p21-9p24, 10p12-10p15 und einen Gewinn von Chromosome 5 sowie der Chromosomenregionen 7q33-7q36 und 20q.

C.1.2.8 Zusammenfassung der numerischen Veränderungen

Bei allen sechs Zelllinien wurden relative Gewinne und Verluste festgestellt. Tabelle 13 fasst zusammen, in wie vielen der sechs Zelllinien die verschiedenen Chromosomenregionen von Amplifikationen oder Deletionen betroffen waren. Als einziges waren die Chromosomen 15, 21 und 22 nie betroffen. Am häufigsten betroffen war Region 4q (Tabelle 13). In mehr als der Hälfte der Zelllinien waren die Chromosomen 9, 20 und X sowie Regionen in den Abschnitten 8p, 4q, 12p amplifiziert, bzw. unterrepräsentiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X
p	1	1	2	4	3	3	3	5	4	2	3	4	1	2	0	1	0	1	1	4	0	0	4
q	2	0	1	6	3	1	3	2	4	1	3	1	2	3	0	1	1	3	0	5	0	0	4

Tabelle 13: Häufigkeit von numerischen Aberrationen (keine Unterscheidung in Deletion oder Amplifikation) bei den sechs untersuchten Zelllinien in Bezug auf die einzelnen Chromosomenarme.

C.1.3 Quantifikation mit dem Affymetrix GeneChip® Mapping Assays

C.1.3.1 Quantifikation mit der Affymetrix GDAS-Software

Die Arraydaten wurden in einem ersten Schritt mit Hilfe der GDAS-Software von Affymetrix analysiert. Der Genotyp der einzelnen SNPs wurde bestimmt und ein Report file erstellt (Abschnitt B.15.3.2). Das Report file (Abbildung 29) gibt Auskunft über die Allelverteilung („Allel Calls“) und das ermittelte Geschlecht der Probe („Called Gender“) und liefert darüber hinaus Hinweise auf die Qualität der Hybridisierung („Signal Detection“, „SNP Call“).

Die Signalerfassungsrate („Signal Detection“) der hybridisierten Arrays lag zwischen 81 und 99 %, d.h. die Qualität der Hybridisierung war ausreichend bis sehr gut. Die Allelbestimmungsrate („SNP Call“) lag jedoch nur zwischen 67 und 92 %. Affymetrix weist darauf hin, dass eine Allelbestimmungsrate unter 85%, bei gleichzeitig hoher Signaldetektionsrate, ein Hinweis auf eine Kontamination der verwendeten Probe sein kann. Bei drei der sechs Zelllinien lagen die Call-Rates unter 85%. Bei weiteren zwei Zelllinien lagen die Call-Rates nur knapp über 85%. Nur Zelllinie EJ28 erreichte eine Call-Rate über 90%. Im Gegensatz zu DNS aus Patientenmaterial, ist bei der Verwendung von Zelllinien eine Kontamination mit Normalmaterial ausgeschlossen. Durch gleichzeitiges Verarbeiten und Hybridisieren von Zelllinien-DNS und Referenz-DNS von

Affymetrix konnte eine DNS-Kontamination im System ausgeschlossen werden (Daten der Referenzhybridisierung werden nicht aufgelistet).

Obwohl also bei den Tumorzelllinien keine Kontamination der Proben-DNS vorlag und die Hybridisierung gut, d.h. die „Signal Detection“ hoch war, war die Allelerkennungsrate („Allel Call“) niedrig. Wie in Abschnitt B.15.3.1 genauer erläutert wird der Genotyps eines SNPs ermittelt, indem die Signalintensitäten der PM_A -Oligonukleotide zu den Signalintensitäten der PM_B -Oligonukleotide ins Verhältnis gesetzt werden, und bestimmt wird, in welche „Call-Zone“ (AA, AB oder BB) die so berechneten RAS-Werte („relative allele signal“-Werte) fallen. Die „Call-Zonen“ Bereiche für diesen Abgleich wurden von Affymetrix empirisch, durch die Hybridisierung von 133 normalen, diploiden Referenzen, ermittelten (s. Abschnitt B.15.3.1). Wie aus den M-FISH und CGH-Experimenten ersichtlich, waren alle verwendeten Zelllinien aneuploid. Bei den Tumorzelllinien waren deshalb die Verhältnisse der Allele und damit der Signalintensitäten der PM -Oligonukleotide zueinander verschoben. Während bei einer diploiden Probe das Allele A nur im Verhältnis 2:0, 1:1 oder 0:2 zum Allel B vorkommen kann, sind bei einer tetraploiden Probe theoretisch die Verhältnisse 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 und 0:5 möglich. Deswegen konnten die für die Tumorzellen ermittelten RAS-Werte nicht immer eindeutig in die drei, durch die Referenzhybridisierungen ermittelten, „Call-Zonen“ eingeteilt werden. In diesem Fall wurde dem SNP kein Genotyp zugeordnet, er wurde zum „NoCalls“ Trotz hoher Signal-Detection Rate kommt es also bei aneuploiden Zellen dazu, dass die Call-Rate niedrig ist, obwohl keine DNS-Kontamination vorliegt.

Mapping Array Report

Total number of SNPs: 11560
 Total number of QC Probes: 4
 Probe array type: Mapping10K_Xba131

SNP Performance

CEL Data	Gender	Called Gende	SNP Call	Signal			
				Detection	AA Call	AB Call	BB Call
285_SW1710	Unknown	M	67.46%	81.26%	39.45%	22.17%	38.38%
286_HT1376	Unknown	M	78.16%	92.13%	42.88%	14.22%	42.90%
287_CAL29	Unknown	F	83.79%	96.71%	39.51%	20.76%	39.73%
A465_SW1710	Unknown	M	66.65%	82.49%	38.27%	23.75%	37.98%
A466_T24	Unknown	M	87.60%	98.04%	42.78%	14.34%	42.89%
A467_EJ28	Unknown	M	92.34%	98.48%	40.95%	18.34%	40.71%
CB_DC3C_250304	Unknown	M	85.83%	98.84%	39.43%	21.21%	39.37%

QC Performance

CEL Data	AFFX-5Q-123	AFFX-5Q-456	AFFX-5Q-789	AFFX-5Q-ABC
285_SW1710	7725.5	1815	11754	12074.5
286_HT1376	8474.8	2367	12992.7	14497.8
287_CAL29	6191.5	2077.6	10879.5	12413.2
A465_SW1710	11726	3406.5	16504	16288.3
A466_T24	14227.2	3842.8	16248.5	16802.2
A467_EJ28	13766.5	3825.9	16285	17945.5
CB_DC3C_250304	9000.8	2438.9	10968.7	14264.4

Abbildung 29: GDAS-Report der Zelllinien-Arrays

Die Auswertung der Affymetrix GeneChip® Mapping Assay Hybridisierung ergab nur für die Zelllinie Cal29 einen weiblichen Karyotyp (Abbildung 29, „Called Gender“, F: female). Die anderen Zelllinien (BC3C, EJ28, HT1376, SW1710, T24) wurden durch die GDAS-Software als männlich klassifiziert (Abbildung 29, „Called Gender“, M: male), obwohl Zelllinien sie alle von weiblichen Spendern abstammen (Tabelle 4). Der Grund für die Zuordnung des Geschlechts ist, dass Zelllinien BC3C, EJ28, HT1376 und SW1710 keine heterozygoten SNPs auf dem X-Chromosom haben (Tabelle 14), während bei der Zelllinie Cal29 21% der SNPs auf dem X-Chromosom heterozygot sind (Tabelle 14, Abschnitt B.15.3.1, Gleichung 2).

	BC3C		Cal29		EJ28		HT1376		SW1710		T24	
	Absolut	Prozent										
NoCall	21	7	35	11	40	13	107	35	151	49	48	16
BB	146	48	100	33	123	40	99	32	72	23	126	41
AB	0	0	64	21	0	0	0	0	0	0	0	0
AA	140	46	108	35	144	47	101	33	84	27	133	43
Gesamt	307	100	307	100	307	100	307	100	307	100	307	100

Tabelle 14: Allelverteilung der 307 SNPs auf dem X-Chromosom

C.1.3.2 Quantifikation mit dChip

Im zweiten Schritt wurden die Daten mit dem Softwareprogramm dChip quantitativ analysiert. Wie in Abschnitt B.15.3.3 genauer beschrieben, verwendet dChip die Informationen über die Allel-Calls, die von GDAS ermittelt wurden sowie die Rohinformationen über die Signalintensitäten der Hybridisierung für jedes einzelne Oligonukleotid auf dem Chip (40 für jeden SNP) und errechnet daraus eine beobachtete und eine mit einem „Hidden Markov Model“ abgeleitete Kopienzahl. Vor der Berechnung werden Call-Rates („SNP Call %“, Tabelle 15), Hybridisierungsartefakte und Ausreißer (Tabelle 15, „% Array Outlier“, Abbildung 30) bei den Daten festgestellt.

	Array	Median Intensity (unnormalized)	SNP call %	% Array outlier	% Single outlier
Zelllinien	CB_BC3C_250304	108	85.8	0.259	0.061
	287_CAL29	103	83.8	0.787	0.024
	A467_EJ28	112	92.3	0.19	0.048
	286_HT1376	85	78.2	3.027	0.151
	285_SW1710	73	67.5	4.895	0.39
	A466_T24	130	87.6	4.791	0.126

Tabelle 15: Mittlere Signalintensitäten, SNP-Call Rate und Outlier der hybridisierten Zelllinien

Als Array-Ausreißer werden zu einem SNP korrespondierende Oligonukleotid-Sets (40 Oligonukleotide pro SNP) bezeichnet, bei denen das Hybridisierungsergebnis deutlich von dem, bei allen anderen Arrays ermittelten, Ergebnissen abweichen.

Ein Array-Ausreißer Prozentsatz von 5% ist ein Hinweis auf ein mögliches Problem bei der Hybridisierung oder auf eine mögliche Verunreinigung des Hybridisierungsbildes. Die Zelllinien BC3C, Cal29 und EJ28 haben einen Array-Ausreißer Prozentsatz unter 1% (Tabelle 15, „% array outlier“), bei Zelllinien HT1376, SW1710 und T24 liegt er zwischen 3,0 und 4,9%. Visuelle Analyse der Hybridisierungsbilder bestätigen den Qualitätsunterschied zwischen den Hybridisierungen (Abbildung 30). Die Zelllinien BC3C, Cal29 und EJ28 haben deutlich weniger „Array-outlier“ (Abbildung 30, weiße Punkte) und „Single-outlier“ (Abbildung 30, magentafarbene Punkte) als die Zelllinien HT1376, SW1710 und T24. Bei Zelllinien SW1710 und T24 sind darüber hinaus Bildartefakte zu erkennen (Abbildung 30). Das Artefakt auf dem Genchip der Zelllinie SW1710 scheint eine Verunreinigung oder ein Kratzer auf dem Chip zu sein. Der kreisförmige Bereich am Rande des Chips bei Zelllinie T24 ist wahrscheinlich ein Bereich, bei dem sich beim Stringenzwaschen des Chips eine Luftblase gebildet hat. Damit die Kopienzahlenanalyse mit dChip zuverlässiger wird, können Array-Ausreißer bei der Berechnung ausgeschlossen werden. Das dChip Manual empfiehlt, Arrays mit einem Array-outlier Prozentsatz über 15% vollständig aus der Analyse auszuschließen.

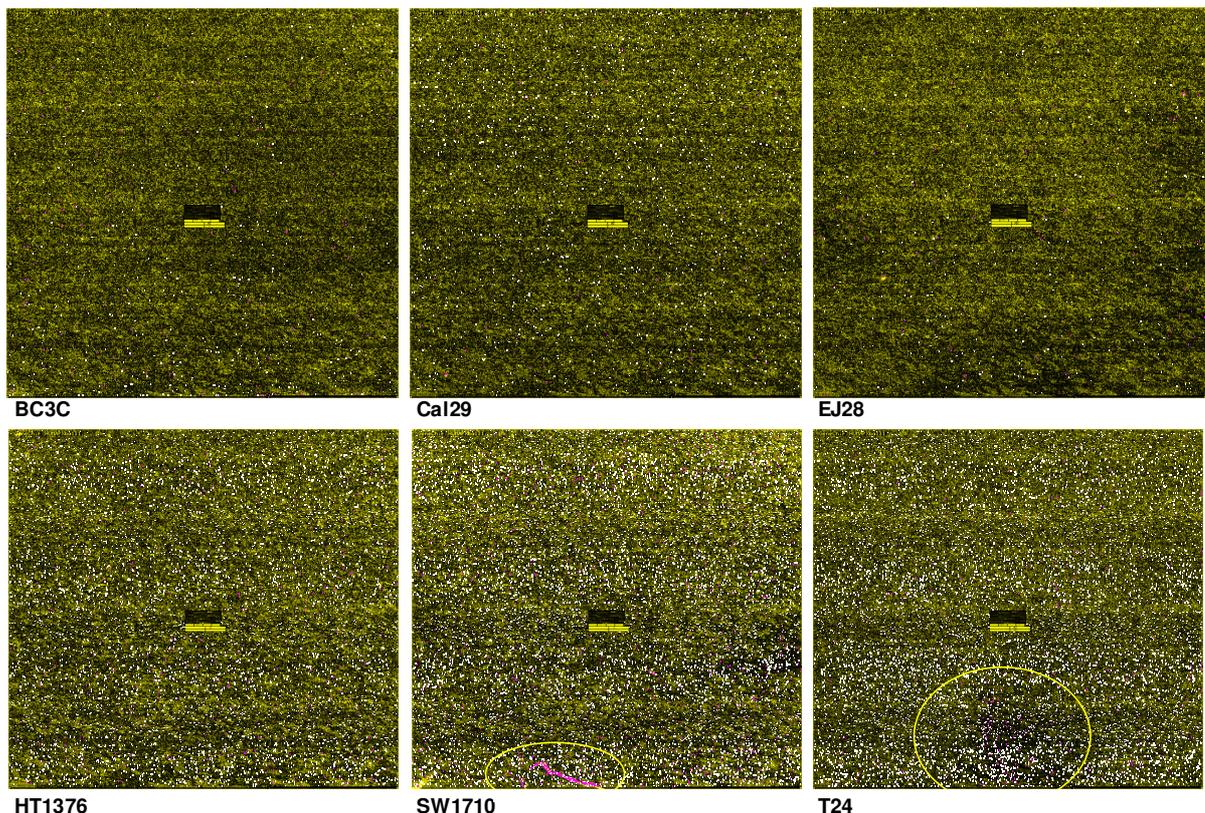


Abbildung 30: Affymetrix GeneChip® Mapping Assay Hybridisierungsbilder der Zelllinien

Array-Ausreißer werden als weiße Punkte, Einzel-Ausreißer (Single-Outlier) als magentafarbene Punkte dargestellt; gelbe Linien markieren Bereiche mit deutlichen Hybridisierungsartefakten.

In den Abbildung 31 und Abbildung 32 werden die mit dem dChip Software ermittelten Kopienzahlen graphisch dargestellt. Jede einzelne Spalte repräsentiert die Ergebnisse einer Zelllinie, jede einzelne Zeile stellt die, für einen bestimmten SNP errechnete, Kopienzahl dar. Die errechnete Kopienzahl entspricht den zusammengefassten Signalintensitätswerten von 40 zu einem SNP korrespondierenden Oligonukleotiden (siehe Abschnitt 15.3.2). In Abbildung 31 wurden Kopienzahlverringeringen mit blauer Farbe und Kopienzahlerhöhungen mit roter Farbe kodiert. Je intensiver der Farbton, desto stärker die Abweichung vom Mittelwert; d.h. Bereiche mit einer normalen Kopienzahl erscheinen hell bis weiß. In Y-Richtung sind die SNPs entsprechend ihrer chromosomalen Position (N.B.: nicht proportional zu ihrer physikalischen Distanz) von p zu q Arm und von Chromosom 1 bis Chromosom X aufgetragen. Das Profil am Rand der rotblauen Graphik stellt beispielhaft das Kopienzahlprofil der Zelllinie BC3C dar. Die rote Linie markiert den Mittelwert. Für die visuelle Auswertung der beobachteten Kopienzahlen wurden subjektiv intensiv blau, bzw. rot gefärbte Regionen als deletiert, bzw. amplifiziert gewertet. Es wurden keine objektiven Kriterien, wie z.B. eine gewisse Zahl benachbarter SNPs mit Signalintensitätswerten unter, bzw. über einem gewissen Schwellenwert gewählt. Bei einigen dieser Regionen, bei denen auf diese Arte eine Abweichung von der normalen Kopienzahl festgestellt wurde, wurde durch nachfolgende M-FISH, CGH, BAC-FISH und PCR Experimente die ermittelte Kopienzahl verifiziert.

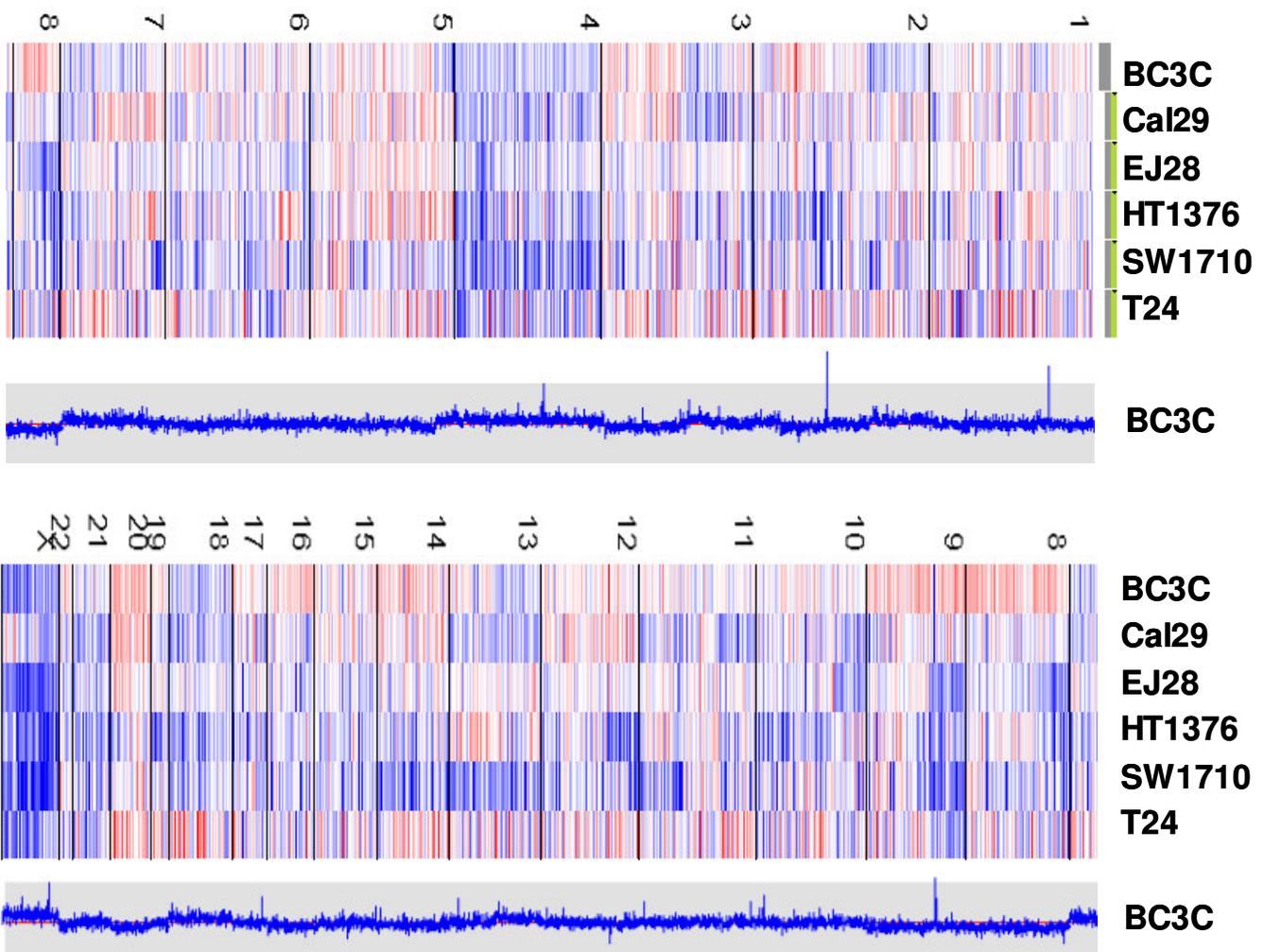


Abbildung 31 : Kopienzahl Analyse mit dChip; Darstellung der beobachteten Kopienzahl

Visuelle Auswertung der Profile der beobachteten Kopienzahlen und Zuordnung zu den vom dChip bereitgestellten Kartierungsangaben ergab folgende veränderte Regionen:

Zelllinie BC3C:

Amplifikationen: 2q22-2q33, 3p12-3p29, 8, 9, 16p13, 20

Verringerungen: 2p25-2p14, 3p14-3p13, 4, 5p15-5p14, 7p15-7q36, 13q12-13q21, 18, X

Zelllinie Cal29:

Amplifikationen: 3p11-3q29, 7p21-7p22, 14q12-14q13, 20

Verringerungen: 3p26-3p12, 4, 6q25-6q27, 9q31-9q34, 10p15-10p12, 11p15-11p12, 11q13-11q24, 13, 16p13.3-16p13.2, 18, 21, X

Zelllinie EJ28:

Amplifikationen: 7q35-7q36, 20p11-20q13

Verringerungen: 4q31-4q32, 6p25-6p22, 8p23-8p12, 9p24-9p21, 10p15-10p11, X

Zelllinie HT1376:

Amplifikationen: 6p22, 7p21, 13q21-13q34

Verringerungen: 2q13-2q37, 4p16-4p15, 4q28-4q35, 8p23-8p11, 9p24-9p23, 9p22-9p21, 10q23-10q24, 10q25-10q26, 12p13-12q12, 12q23.2-12q23.3, 12q24.31-12q24.32, 14q13-14q32, 15q24-15q26, 17q12, 18, 19, 21, X

Zelllinie SW1710:

Amplifikationen: keine

Verringerungen: 4, 8, 9p24-9p13, 11q14-11q25, 12p12, 13, 14, 18q12-18q23, X

Zelllinie T24:

Amplifikationen: 1p13-1q23, 4p15, 11p15-11p13, 12p12, 20q11-20q13

Verringerungen: 1q25-1q41, 4q, 6p22-6q12, 9p24-9p23, X

In Abbildung 32 sind die mit dem HMM abgeleiteten Kopienzahlen (Abschnitt B.15.3.3) dargestellt. Normale Kopienzahlen erscheinen hellrot. Unterrepräsentierte Regionen werden vom Farbton heller bis weiß, amplifizierte Regionen werden im Farbton intensiver bis dunkelrot. In Y-Richtung sind die SNPs entsprechend ihrer chromosomalen Position (N.B.: nicht proportional zu ihrer physikalischen Distanz) von p zu q Arm und von Chromosom 1 bis Chromosom X aufgetragen. Das Profil am Rand der rotblauen Graphik

stellt beispielhaft das abgeleitete Kopienzahlprofil der Zelllinie BC3C dar. Die rote Linie markiert den Mittelwert.

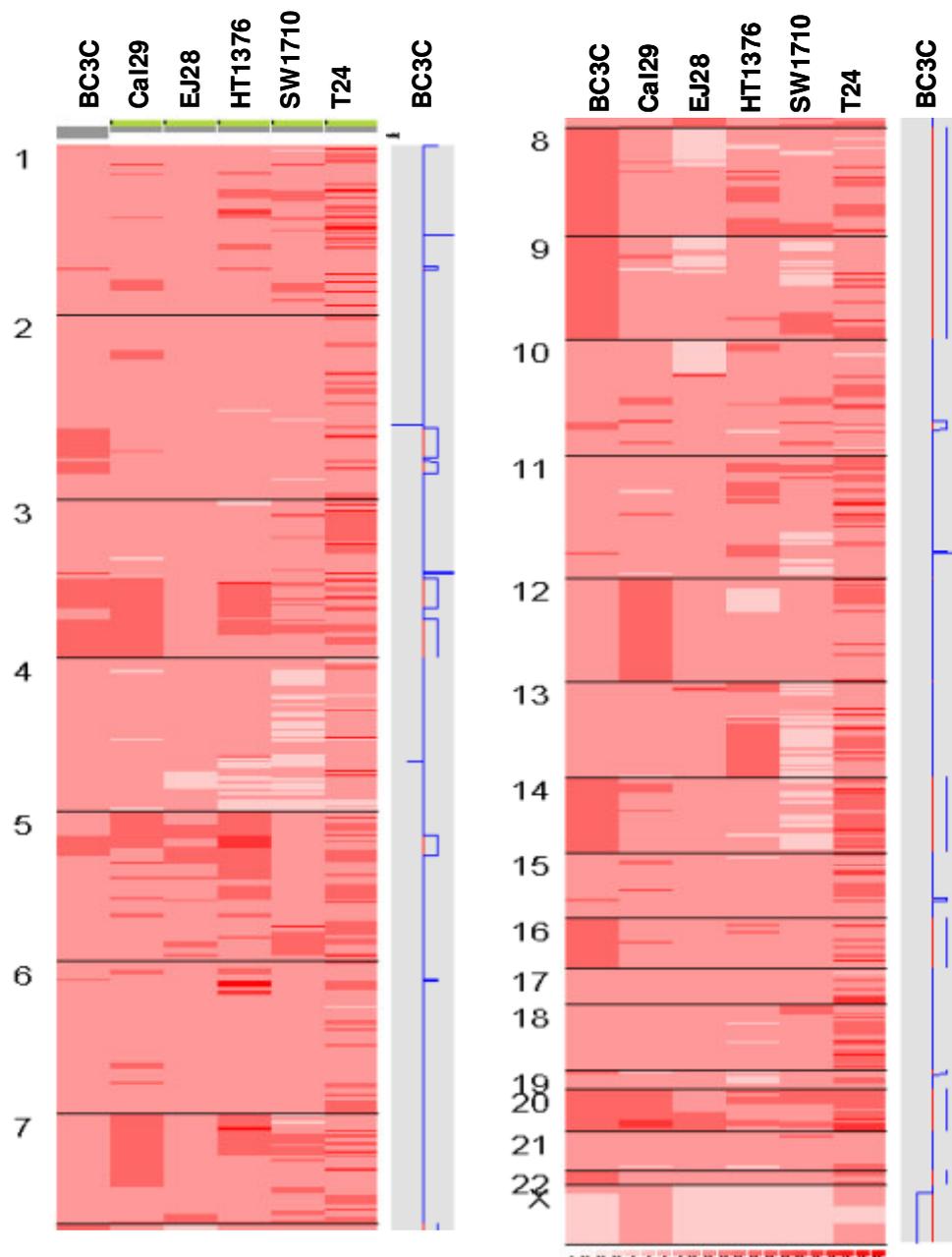


Abbildung 32: Kopienzahl Analyse mit dChip, Darstellung der abgeleiteten Kopienzahl

Die Zuordnung der mit dem HMM abgeleiteten Kopienzahlen zu den vom dChip bereitgestellten Kartierungsangaben ergab folgende veränderte Regionen:

Zelllinie BC3C:

Amplifikationen: 2q22.1-2q33.3, 3p12.2, 3q11.2-3q29, 5p13.3-5q11.1, 5q31.3-5q33.1, 6p22.3, 8, 9, 10q23.31-10q24.2, 14, 15q21.3-15q22.31, 16, 20, 22q11.21-22q13.33

Verringerungen: 2q22.1, Xq24-Xq25, Xq27.2-Xq28

Zelllinie Cal29:

Amplifikationen: 1p22.1, 1q31.3-1q41, 2p22.1-2p21, 3q11.2-3q29, 5p15.33-5p12, 5q22.1-5q22.2, 7p22.3-7q22.3, 10q23.31-10q23.32, 11q13-11q13.3, 12p13.33-12q12, 12q12-12q24.33, 14q12-13.1, 14q22-14q23.2, 15q14, 20 ganz (v.a. 20q12-20q13.2)

Verringerungen: 3p14.2, 4q23-4q24, 9p21.3, 13q33.3-13q34, 19p13.3-19p13.12

Zelllinie EJ28:

Amplifikationen: 5p15.2-5p13.2, 5q21.3-5q22.2, 5q35.1-5q35.2, 7q34-7q36.2, 9p13.1-9p11.2, 10p11.22-10p11.21, 13q12.12-13q12.13, 20p11.21-20q13.33

Verringerungen: 4q31.21-4q32.3, 6p25-22, 8p23.3-8q12, 9p24.3-9p21.3, 10p15.2-10p11.22, X

Zelllinie HT1376:

Amplifikationen: 1p34.3-1p33, 1p31.3-1p31.1, 1p2.2-1p21.1, 1q23.2-1q23.3, 3q12.2-3q13.11, 3q13.31-3q23, 3q25.1-3q26.1, 4q28.1, 5p15.33-5q21.2, 5q22.1-5q22.2, 6p25.1-6p24.1, 6p22.3, 6p22.1-6p21.33, 7p22.3-7p21, 8q11.23-8q22.1, 10p15.3-10p13, 11p14.1, 11p13, 11p11.2-11p11.12, 13q12.11-13q12.3, 13q14.3-13q34, 16p13.2-16p13.12, 16p12.2-16q12.1, 20p13-20p12.1, 20q12-20q13.2

Verringerungen: 2q14.3, 3p23.3-2p26.2, 4q28.1-4q28.2, 4q28.3-4q31.1, 4q31.1-4q32.1, 4q32.2-4q32.3, 4q34.1, 4q34.3-4q35.2, 6p2.2, 6p21.31, 10q23.33-10q25.1, 12p12.3-12q12, 13q14.2, 13q14.3, 14q21.1, 14q31.3, 15q24.1-15q25.1, 18q11.2, 19, 22q13.31-22q13.33

Zelllinie SW1710:

Bei Zelllinie SW1710 ergibt die Kopienzahlberechnung mit dem HMM wegen dem stärkeren Rauschen der Hybridisierungsdaten kaum einheitliche Blöcke mit Kopienzahlveränderungen, sondern nur viele kleinere, amplifiziert bzw. deletiert erscheinende Regionen. Die Tendenzen zum Kopienzahlgewinn, bzw. -verlust stimmen generell gut mit den CGH-Ergebnissen überein. Das Rauschen war jedoch so hoch, dass die Amplifikations-, bzw. Deletionsregionen nicht einzeln aufgelistet wurden.

Zelllinie T24:

Wegen dem stärkeren Rauschen der Hybridisierungsdaten ergibt die Kopienzahlberechnung mit dem HMM bei Zelllinie T24 auch keine einheitlichen Blöcke, sondern sehr viele kleinere, amplifiziert, bzw. deletiert erscheinende Regionen. Die Tendenzen zum Kopienzahlgewinn, bzw. -verlust stimmen nicht gut mit den CGH-Ergebnissen überein. Im Vergleich mit den Ergebnissen der Chromosomen CGH

erscheinen die abgeleiteten Kopienzahlveränderungen nach der Analyse mit dChip in Richtung Gewinn verschoben. So erscheint z.B. die Region 8p nach der Analyse mit dChip als normal repräsentiert (Abbildung 32) im CGH-Profil erscheint diese Region deletiert (Abschnitt C.1.2.5Abbildung 27). Die relativen Kopienzahlen der abgeleiteten Kopienzahlen nach der Analyse mit dChip stimmen jedoch mit den CGH-Ergebnissen überein. So ist auch bei der abgeleiteten Kopienzahl nach dChip die Region 8p genauso wie in der Chromosomen CGH im Verhältnis zu 8q unterrepräsentiert. Auch bei Zelllinie T24 wurde darauf verzichtet, die einzelnen amplifiziert, bzw. deletiert erscheinenden Regionen, nach der Analyse mit dem HMM in dChip, einzeln aufzulisten.

Werden die Array-Ausreißer bei der Berechnung der abgeleiteten Kopienzahlveränderungen ausgeschlossen, wird das Profil der Zelllinien mit einem stärkeren Rauschen der Hybridisierungsdaten, wie z.B. bei Zelllinie T24 und SW1710. etwas einheitlicher. Das Rauschen der Daten bei Zelllinie SW1710 und v.a. T24 wird, durch das Auslassen der Array-Ausreißer vermindert (Abbildung 33).

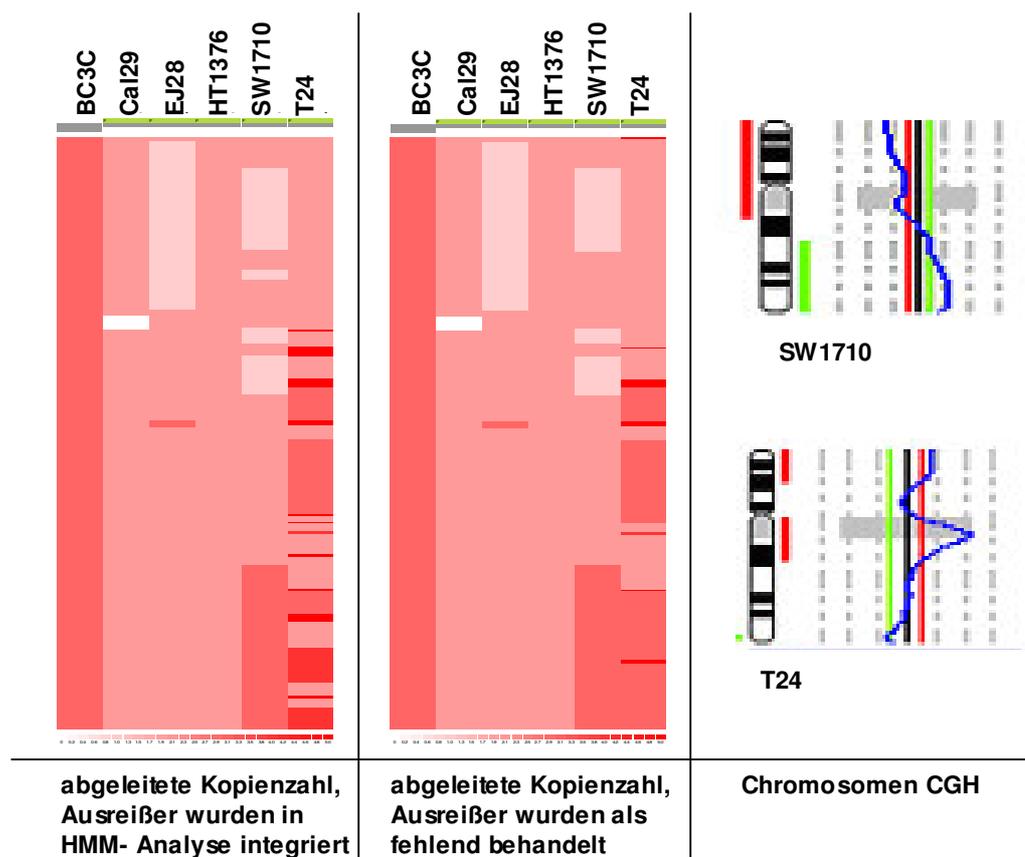


Abbildung 33: Unterschiede in der Kopienzahlanalyse verursacht durch Array-Ausreißer am Chromosom 9

N.B.: Aus technischen Gründen sind die CGH-Profile der Zelllinie T24 spiegelverkehrt. Amplifikationen werden nach rechts, Deletionen nach links angezeigt.

C.1.4 Zusammenfassung der Chromosomen CGH-Ergebnisse, M-FISH Ergebnisse und der Affymetrix GeneChip® Mapping Assay Ergebnisse

Eine interessante Frage war, inwieweit sich die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen vergleichen lassen. Im folgenden wird dies beispielhaft für die Chromosomen 4, 8, 9 und 20 dargestellt.

C.1.4.1 Zusammenfassung der Veränderungen am Chromosom 4

Die durch den Affymetrix GeneChip® Mapping Assay ermittelten Tendenzen zu Kopienzahlgewinnen und –verlusten am Chromosom 4 der Zelllinien **SW1710** stimmten im Allgemeinen gut mit den Profilen der Chromosomen-CGH überein. Die Ergebnisse beider Versuche bestätigten eine Unterrepräsentation des gesamten Chromosom 4. Auch die M-FISH Resultate zeigten, dass in mehr als 50% der untersuchten Metaphase eine Kopie von Chromosom 4 fehlt.

Bei der Zelllinie **EJ28** war laut CGH die Region 4q27-4q35 unterrepräsentiert. Durch die Kopienzahlanalyse mit dem Affymetrix Array wurde der Verlust in 4q bestätigt und die Region auf die Banden 4q31.21 bis 4q32.3 begrenzt. Die M-FISH Analyse zeigte, dass das Chromosom 4 bei Zelllinie EJ28 häufig strukturell verändert war. Außer der im zusammengesetzten Karyotyp nach M-FISH beschriebenen Deletion 4q31, wurden in einzelnen Metaphasen der Zelllinie EJ28 einmal eine Deletion des gesamten q-Arms von Chromosom 4, einmal zwei Chromosomen 4 mit Translokationen (der(4;15)t(4;15)(p10;q10)) und einmal ein Isochromosom 4p gefunden. Die Region 4q war wegen der strukturellen Aberrationen tendenziell unterrepräsentiert.

Bei Zelllinie **HT1376** zeigte die CGH eine Unterrepräsentation in der Region 4q33 bis 4q35. Der Chip detektierte sechs Regionen mit verminderter Kopienzahl, welche sich von 4q28.1 bis 4q35.2 erstreckten. Durch die Chip-Analyse wurde darüber hinaus eine kleine, deutlich amplifizierte Region in 4q28.1 gefunden, welche direkt an die deletierte Region angrenzt.

Wie die M-FISH Experimente und die CGH Analyse zeigten, war bei Zelllinie **BC3C** das Chromosom 4 gegenüber den anderen Chromosomen deutlich unterrepräsentiert. Bei der Auswertung der Array Daten mit dChip war die Verminderung der Kopiezahl am Chromosom 4 jedoch nicht deutlich zu erkennen. Bei der farbkodierten Darstellung der beobachteten Kopienzahlen erschien das Chromosom 4 zwar tendenziell „blauer“, d.h. unterrepräsentiert; bei der Darstellung der abgeleiteten Kopienzahlen erschien das Chromosom jedoch in dem Rot-Ton, der eine normale Kopienzahl kodiert. Wurden die Array Daten mit dem Affymetrix CNT ausgewertet und die Kopienzahlen anschließend

mit Microsoft Excel graphisch dargestellt, wurde eine Verminderung in der Kopienzahl über die gesamte Länge des Chromosoms festgestellt.

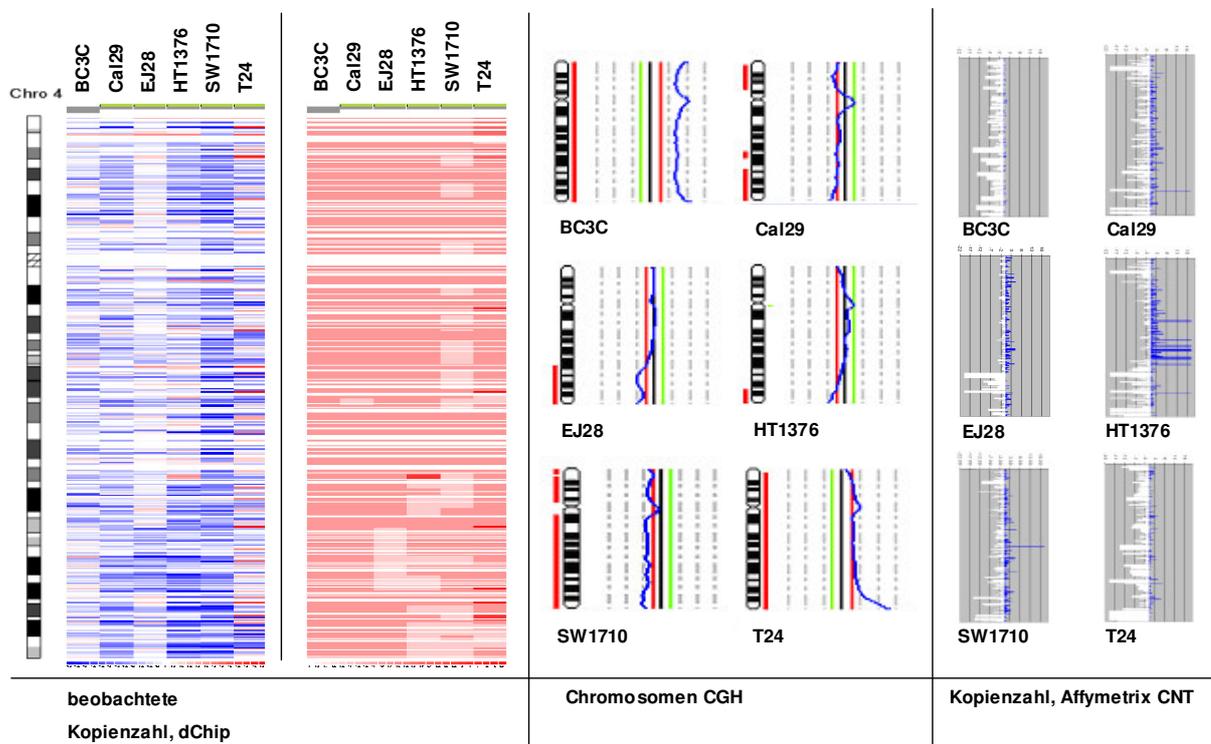


Abbildung 34: Zusammenfassung Array Daten und CGH für Chromosom 4

N.B.: Aus technischen Gründen sind die Profile der Zelllinien BC3C und T24 spiegelnverkehrt, d.h. Amplifikationen werden nach links, Deletionen nach rechts angezeigt. Bei der mit dem Affymetrix CNT berechneten Kopienzahl werden die SNPs von p- zu q-Arm (von oben nach unten, ohne Berücksichtigung der physikalischen Distanz) und die Werte für das meta-p-value (Abschnitt B.15.3.2) dargestellt. Negative meta-p-Werte erscheinen weiß, positive meta-p-Werte erscheinen blau.

Auch bei der Auswertung der Array Daten von Zelllinie **Cal29** mit dChip konnte die, durch die CGH detektierte Verminderung der Kopienzahl in den Regionen 4p und 4q27-35, nicht eindeutig festgestellt werden. Wie bei Zelllinie BC3C erschienen die verminderten Regionen in der Darstellung der beobachteten Kopienzahlen tendenziell „blauer“, d.h. unterrepräsentierter; in der Darstellung der abgeleiteten Kopienzahlen war die Verminderung jedoch nicht zu erkennen. Wurden die Array Daten mit dem Affymetrix CNT ausgewertet und die Kopienzahlen anschließend mit Microsoft Excel graphisch dargestellt, wurde eine Verminderung der Kopienzahl über das ganze Chromosom 4 festgestellt, mit einer scheinbar stärkeren Verminderung der Kopienzahl am p-Arm und dem distalen q-Arm. In den mit M-FISH untersuchten Metaphasen der Zelllinie Cal29 war das gesamte Chromosom 4 unterrepräsentiert und z.T. die Region 4q31 bis 4q35 deletiert. Relative Unterrepräsentation des p-Arms wurde mit M-FISH nicht beobachtet.

Das CGH-Profil von Zelllinie **T24** zeigte eine Kopienzahlverminderung über die ganze Länge des Chromosoms 4. Bei der Auswertung der Array Daten mit dChip schien das

Chromosom 4 in normaler Kopienzahl vorzuliegen, und nur eine kleine Region in den Banden 4q34.3 bis 4q35.2 schien eine verminderte Kopienzahl zu besitzen. Wurden die Array Daten mit dem Affymetrix CNT ausgewertet und die Kopienzahlen anschließend mit Microsoft Excel graphisch dargestellt, erschien das gesamte Chromosom 4 relativ unterrepräsentiert, wobei die Kopienzahl der distalen 4q Region stärker reduziert erschien, als der Rest des Chromosoms. Mit M-FISH wurde die durch die CGH festgestellte Verminderung der Kopienzahl von Chromosom 4 gegenüber den anderen Chromosomen bestätigt. Darüber hinaus war die Region 4q32 bis 4q35 bei Zelllinie T24 in 50% der Metaphasen deletiert.

Fazit: Am Chromosom 4 stimmten die Ergebnisse aus M-FISH, CGH und Gene Chip Experimenten bei den Zelllinien BC3C, HT1376, SW1710, EJ28, und T24 sehr gut überein. Bei der Auswertung der Array Daten mit dChip konnte bei Zelllinie HT1376 eine Amplifikation detektiert werden, welche durch die anderen Experimente nicht festgestellt werden konnte. Auf der anderen Seite konnte, durch die Auswertung der Array Daten mit dChip, bei Zelllinien BC3C und T24 die Unterrepräsentation des gesamten Chromosom 4 nicht festgestellt werden. Bei der Zelllinie Cal29 stimmten M-FISH, CGH und Array Daten weniger gut überein. Während durch die CGH nur eine Unterrepräsentation der Chromosomenenden detektiert werden konnte, zeigten M-FISH Analyse und Auswertung der Array Daten mit dem CNT übereinstimmend, dass das gesamte Chromosom 4 unterrepräsentiert ist.

C.1.4.2 Zusammenfassung der Veränderungen am Chromosom 8

Die durch den Affymetrix GeneChip® Mapping Assay ermittelten Tendenzen zum Kopienzahlgewinn von Chromosom 8 bei der Zelllinien **BC3C**, stimmten gut mit dem Resultat der Chromosomen-CGH überein. Auch bei der Analyse mit M-FISH wurden bei fast allen untersuchten Metaphasen zwei vollständige, zusätzliche Chromosome 8 detektiert.

Zelllinie **Cal29** zeigte übereinstimmend, weder bei der M-FISH Analyse noch bei der Kopienzahlbestimmung mit CGH oder dem Affymetrix Array, Abweichungen von der normalen Kopienzahl am Chromosom 8.

Bei Zelllinie **EJ28** wurde mit allen drei Experimenten eine Verminderung der Kopienzahl am p-Arm von Chromosom 8 detektiert. Mit M-FISH wurden in 50% der untersuchten Metaphasen jeweils zwei derivative Chromosomen 8 mit fehlendem p-Arm gefunden (der(8)t(7;8)(p15;p10)). Auch mit der CGH erscheint der gesamte p-Arm unterrepräsentiert. Durch dem Affymetrix GeneChip® Mapping Assay wurde die unterrepräsentierte Region auf die Banden 8p23.3 bis 8q12 erweitert.

Laut M-FISH hat die Zelllinie **SW1710** vier ganz normale Chromosomen 8, bei einem tetraploiden Karyotyp. Durch CGH wurde bei Zelllinie SW1710 eine Verminderung der Kopienzahl in der Region 8p21 bis 8p23 und eine Amplifikation in der Region 8q24 festgestellt. Die Auswertung der GeneChip® Mapping Assay Daten mit dChip und dem CNT zeigte, dass nicht der gesamte p-Arm unterrepräsentiert ist, sondern nur die Region 8p21.2-8p21.1. Die Amplifikation am q-Arm konnte durch die Analyse der Affymetrix Array Daten bestätigt und auf die Banden 8q24.13 bis 8q24.3 genauer eingegrenzt werden. Jedoch war bei der Darstellung der beobachteten Kopienzahlen mit dChip die amplifizierte Region nicht deutlich zu erkennen. So erschien diese Region zwar weniger blau, d.h. in einer höheren Kopienzahl vorhanden, als der Rest von Chromosom 8. Bei einer Amplifikation hätte man jedoch eine deutliche Rotfärbung der Region erwartet. Bei der Darstellung der abgeleiteten Kopienzahlen durch dChip und bei der Auswertung mit dem CNT war die Amplifikation in 8q24 jedoch deutlich zu erkennen.

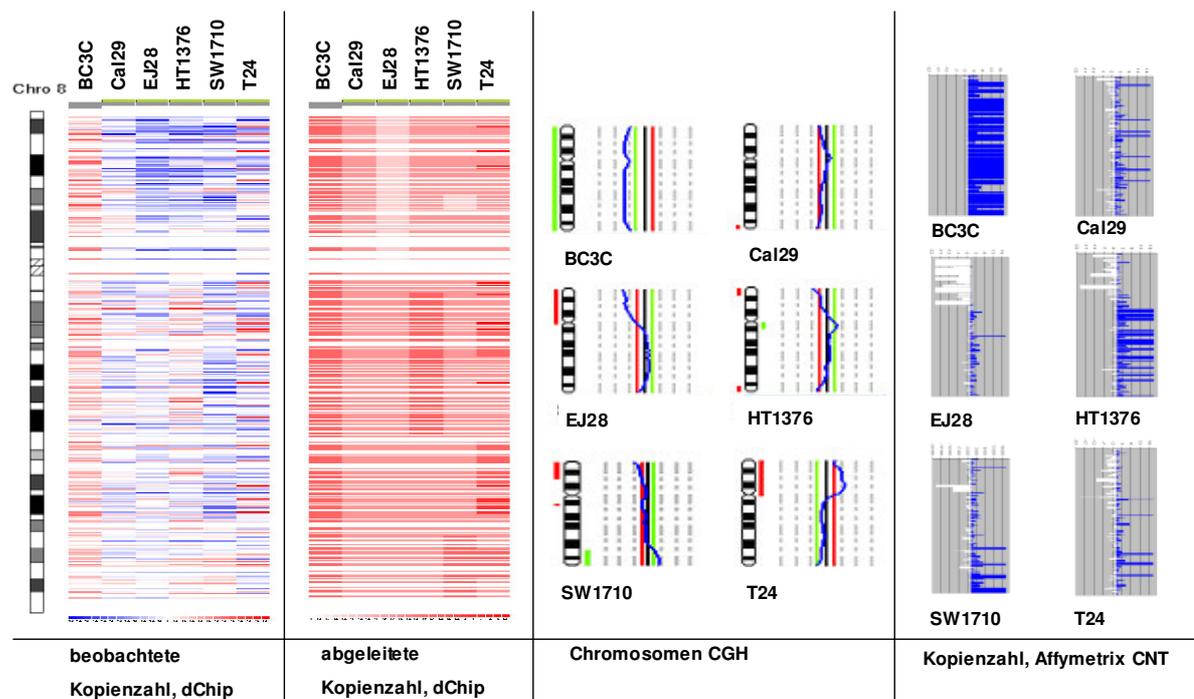


Abbildung 35: Zusammenfassung Array Daten und CGH für Chromosom 8

N.B.: Aus technischen Gründen sind die Profile der Zelllinien BC3C und T24 spiegelverkehrt, d.h. Amplifikationen werden nach links, Deletionen nach rechts angezeigt. Bei der mit dem Affymetrix CNT berechneten Kopienzahl werden die SNPs von p- zu q-Arm (von oben nach unten, ohne Berücksichtigung der physikalischen Distanz) und die Werte für das meta-p-value (Abschnitt B.15.3.2) dargestellt. Negative meta-p-Werte erscheinen weiß, positive meta-p-Werte erscheinen blau.

Bei Zelllinie **T24** besaß jede der mit M-FISH untersuchten Metaphasen ein derivatives Chromosom 8, bei dem der p-Arm verloren gegangen war ($\text{der}(8)\text{t}(7;8)(?;q10)$). Entsprechend der M-FISH Ergebnisse wäre bei Zelllinie T24 also die Region 8p unterrepräsentiert. Auch das CGH-Profil zeigte den Verlust von 8p an. Aus der

Darstellung, der mit dem Affymetrix beobachteten, Kopienzahlen mit der dChip-Software, konnte jedoch keine Aussage über Amplifikationen oder Deletionen abgeleitet werden, da das Rauschen der Daten zu stark war. Bei der Darstellung, der mit dChip abgeleiteten Kopienzahlen, schien 8p tendenziell normal repräsentiert zu sein, 8q dagegen amplifiziert. Die Auswertung der Array Daten mit dChip zeigte also keine Übereinstimmung mit den M-FISH und CGH-Daten. Wurden die Array Daten dagegen mit dem Affymetrix CNT ausgewertet und mit Microsoft Excel dargestellt, wurde übereinstimmend mit den CGH und M-FISH Ergebnissen eine leichte Verminderung der Kopienzahl am p-Arm von Chromosom 8 sichtbar.

Bei Zelllinie **HT1376** überschritt das CGH-Profil den Schwellenwert für eine Amplifikation, bzw. Deletion in 50% der Zellen nicht. Die M-FISH Analyse zeigte, dass Zelllinie HT1376 eine sehr heterogene Zelllinie ist, welche sich aus vielen verschiedenen Klonen zusammensetzt und kein einheitliches Muster an strukturellen Aberrationen erkennen lässt. Durch M-FISH wurden in jedem Klon eine große Vielzahl verschiedener struktureller Umbauten, oft mit Beteiligung von Chromosom 8 Material, detektiert. Das Chromosom 8 Material konnte meist nicht eindeutig einer bestimmten chromosomalen Region zugeordnet werden. Aus der M-FISH Analyse lässt sich deswegen keine Aussage über mögliche Gewinne oder Verluste von Chromosom 8 Material bei Zelllinie HT1376 ableiten. Wurden die Array Daten mit dem Affymetrix CNT ausgewertet und mit Microsoft Excel graphisch dargestellt, war ein Verlust der Region 8p23.3 bis 8p11.22 zu erkennen. Die Region zwischen 8q11.22 und 8q24.21 schien amplifiziert, und die Region distal davon, d.h. 8p24.21-8p24.3 schien normal repräsentiert zu sein. Wurden die Array Daten mit dChip ausgewertet, war in der Ansicht der abgeleiteten Kopienzahlen die Region 8q11.22-8q22.1 amplifiziert, der Rest des Chromosom 8 normal repräsentiert. In der Darstellung der beobachteten Kopienzahlen wirkte der p-Arm von Chromosom 8 „blauer“ als der q-Arm; der q-Arm erschien jedoch nicht deutlich amplifiziert, d.h. die Auswertung der Array Daten mit dChip oder dem CNT ergeben ähnliche Resultate. Bei der Darstellung der beobachteten Kopienzahlen (dChip) wurden die Veränderungen nicht besonders deutlich. Dennoch lässt sich aus den Array Daten ableiten, dass bei Zelllinie HT1376 der p-Arm von Chromosom 8 schwach unterrepräsentiert und eine Region zwischen 8q11 und 8q24 schwach amplifiziert ist. Diese Regionen sind jedoch nicht in mehr als 50% der Zellen verändert, da man die Veränderungen sonst auch mit der CGH hätte detektieren können. Das CGH-Profil lässt jedoch in diesen Bereichen eine leichte Verschiebung nach links (Deletion, 8p), bzw. rechts (Amplifikation, 8q11-8q24) erkennen.

Fazit: Am Chromosom 8 stimmten die Ergebnisse aus M-FISH, CGH und Gene Chip Experimenten bei Zelllinie BC3C, Cal29, EJ28 und SW1710 sehr gut überein. Bei Zelllinie

EJ28 und SW1710 konnten Regionen mit veränderter Kopienzahl durch die Auswertung der Affymetrix GeneChip® Mapping Assay Daten genauer eingegrenzt werden. Die Darstellung der mit dem Array beobachteten Kopienzahlen (dChip) lieferte für Zelllinie SW1710 jedoch keine aussagekräftigen Resultate.

Bei Zelllinie T24 und HT1376 stimmten die Ergebnisse aus M-FISH, CGH und Gene Chip Experimenten weniger gut überein. Während sowohl die M-FISH als auch die CGH Daten bei Zelllinie T24 eine Unterrepräsentation von 8p diagnostizierten, konnte mit dem Affymetrix GeneChip® Mapping Assay nur bei der Auswertung der Daten mit dem CNT eine leichte Verminderung in der Region 8p sichtbar gemacht werden. Die Auswertung der Array Daten mit dChip diagnostizierte eine normale Repräsentation von 8p und eine Amplifikation von 8q (abgeleitete Kopienzahlen), bzw. war nicht auswertbar (beobachtete Kopienzahl).

Bei Zelllinie HT1376 diagnostizierte die CGH keine Abweichungen von der normalen Kopienzahl. Da die Zelllinie zu heterogen war, lieferte auch das M-FISH Experiment keinen zuverlässigen Hinweis auf numerische Aberrationen. Während die Auswertung der Array Daten mit dChip eine Amplifikation in einem Abschnitt des q-Arms beschrieb, wurde bei der Auswertung der Daten mit dem CNT zusätzlich noch eine Verminderung der Kopienzahl von 8p detektiert.

C.1.4.3 Zusammenfassung der Veränderungen am Chromosom 20

Bei Zelllinie **BC3C** wurden in allen mit M-FISH untersuchten Zelllinien zwei zusätzliche Chromosomen 20 festgestellt, im CGH Profil und bei der Darstellung der Array Daten erschien das gesamte Chromosom amplifiziert.

Bei Zelllinie **Ca129** wurde in der Hälfte der mit M-FISH untersuchten Metaphasen zusätzliche Chromosomen 20 festgestellt. CGH Profil und Array Daten bestätigten die Amplifikation. Bei der Analyse der Array Daten mit dChip erschien die Region 20q12 bis 20q13.2 stärker amplifiziert als das restliche Chromosom 20. Dieser Unterschied wurde mit der CGH nicht festgestellt und konnte auch bei der Auswertung der Array Daten mit dem Affymetrix CNT nicht detektiert werden.

Wurden die Array Daten für Chromosom 20 von Zelllinie **T24** mit dChip ausgewertet, erschien das gesamte Chromosom 20 amplifiziert. Die Amplifikation war bei der Darstellung der abgeleiteten Kopienzahlen (dChip) gut sichtbar, wurde jedoch bei der Darstellung der beobachteten Kopienzahlen (dChip) nicht sehr deutlich. Wurden die Array Daten dagegen mit dem Affymetrix CNT ausgewertet und die Kopienzahlen anschließend mit Microsoft Excel graphisch dargestellt, erschien nur der q-Arm von Chromosom 20 amplifiziert. Wie bei der Darstellung der beobachteten Kopienzahlen

(dChip) erschien auch in der CGH das Chromosom 20 bei Zelllinie T24 über die ganze Länge amplifiziert. Der Ausschlag des CGH-Profiles war aber am q-Arm deutlich stärker, was einer stärkeren Amplifikation des q-Arms des Chromosom 20 entsprechen könnte, d.h. während bei der Darstellung der Kopienzahlen mit dem CNT der Unterschied in der Kopienzahl zwischen p- und q-Arm bei Chromosom 20 der Zelllinie T24 festgestellt werden konnte, die Amplifikation am p-Arms jedoch übersehen wurde, konnte bei der Darstellung der abgeleiteten Kopienzahlen durch dChip die Amplifikation des gesamten Chromosom 20 detektiert werden, die stärkere Amplifikation des q-Arms wurde jedoch nicht deutlich. Die M-FISH Analyse bestätigt die Überrepräsentation des gesamten Chromosoms. Bei Zelllinie T24 wurden in mehr als 50% der Metaphasen zusätzliche Kopien des Chromosom 20 festgestellt. Darüber hinaus liefert die M-FISH Analyse den Hinweis, dass Chromosom 20 an strukturellen Aberrationen beteiligt war. So wurde in drei Metaphasen ein verändertes Chromosom 17 ($\text{der}(17)\text{t}(17;20)(\text{q}24;?)$) und in zwei Metaphasen ein verändertes Chromosom 12 ($\text{der}(12)\text{t}(12;20)(\text{p}12,\text{q}?)10$) jeweils mit Chromosom 20 Material gefunden. In zwei weiteren Metaphasen wurde ein verändertes Chromosom 20 gefunden. Das Material konnte nicht eindeutig einem der Chromosomenarme zugeordnet werden. Aufgrund der Array Daten kann man vermuten, dass es sich um 20q Material handelt.

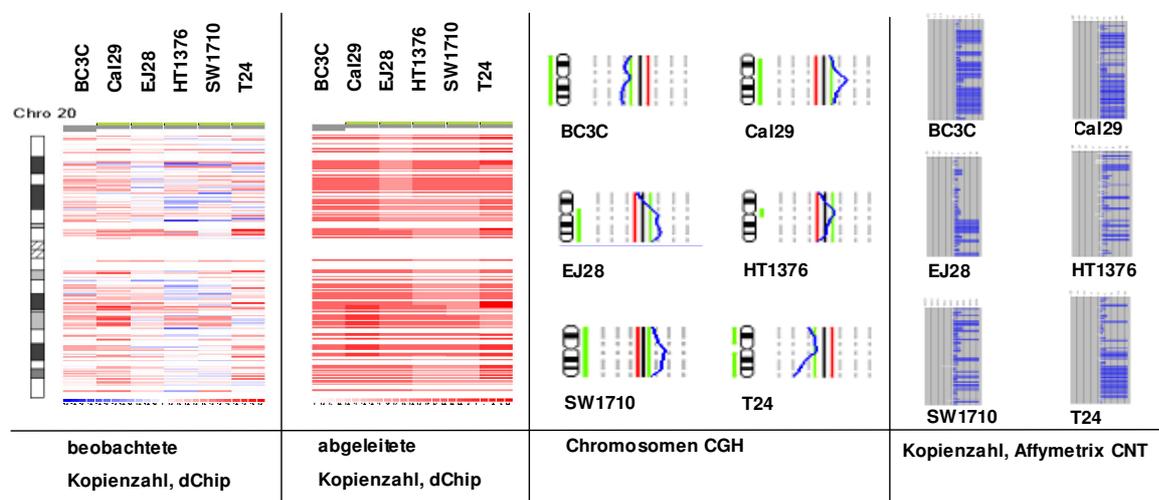


Abbildung 36: Zusammenfassung Array Daten und CGH für Chromosom 20

N.B.: Aus technischen Gründen sind die Profile der Zelllinien BC3C und T24 spiegelverkehrt, d.h. Amplifikationen werden nach links, Deletionen nach rechts angezeigt. Bei der mit dem Affymetrix CNT berechneten Kopienzahl werden die SNPs von p- zu q-Arm (von oben nach unten, ohne Berücksichtigung der physikalischen Distanz) und die Werte für das meta-p-value (Abschnitt B.15.3.2) dargestellt. Negative meta-p-Werte erscheinen weiß, positive meta-p-Werte erscheinen blau.

Bei Zelllinie **EJ28** ist laut CGH und Affymetrix GeneChip® Mapping Assay der q-Arm von Chromosom 20 amplifiziert. Durch die Array Daten konnte die amplifizierte Region auf die Banden 20p11.21 bis 20q13.3 ausgeweitet werden. In mehr als 50% der Metaphasen

von Zelllinie EJ28 wurden mit M-FISH zusätzliche Chromosomen 20 gefunden. In zwei Metaphasen wurde ein Chromosom 20 gefunden, bei dem der q-Arm deletiert war ($\text{del}(20)(p10)$). In einer Metaphase wurde ein derivatives Chromosom 20 mit zusätzlichem Material von Chromosom 15 gefunden ($\text{der}(20)t(15;20)(?;p11)$).

Mit der CGH wurde für die Zelllinie **SW1710** eine Amplifikation über die gesamte Länge von Chromosom 20 angezeigt. Die Analyse der Array Daten mit dChip zeigte nur eine Amplifikation im Bereich 20p13 bis 20p12.1. M-FISH detektierte in fast allen untersuchten Metaphasen zusätzliche Chromosomen 20. Bei der Darstellung der mit dem Affymetrix CNT abgeleiteten Kopienzahlen war nicht klar ersichtlich, ob das Chromosom 20 der Zelllinie SW1710 amplifiziert war, oder es sich nur um ein Rauschen der Daten handelt.

Bei dem CGH-Profil von Zelllinie **HT1376** erschien das gesamte Chromosom 20 in normaler Kopienzahl vorhanden zu sein. Bei der Darstellung der Array Daten mit dChip (abgeleitete Kopienzahlen) erschienen die Regionen 20p13 bis 20p12.1 und 20q12 bis 20q13.2 amplifiziert. Die amplifizierte Region 20q12 bis 20q13.2 war auch in der Darstellung der beobachteten Kopienzahlen mit dChip deutlich erkennbar. Die amplifizierte Region 20p13 bis 20p12.1 konnte man dagegen bei der Darstellung der beobachteten Kopienzahlen mit dChip nicht sehr gut erkennen. Auch bei der Darstellung der mit dem Affymetrix CNT abgeleiteten Kopienzahlen war nicht klar ersichtlich, ob das Chromosom 20 oder bestimmte Regionen des Chromosoms 20 bei Zelllinie HT1376 amplifiziert waren.

Fazit: Am Chromosom 20 stimmten die Ergebnisse aus M-FISH, CGH und Gene Chip Experimenten bei Zelllinie BC3C, Cal29, EJ28 und T24 sehr gut überein. Bei Zelllinie EJ28 konnte die amplifizierte Region mit Hilfe der Array Daten genauer eingegrenzt werden.

Bei Zelllinie T24 waren die mit dChip berechneten beobachteten Kopienzahlen nicht aussagekräftig. Bei Zelllinie SW1710 erscheint mit der CGH das gesamte Chromosom 20 amplifiziert, während die von den Array Daten mit dChip abgeleiteten Kopienzahlen nur eine kleine Amplifikation im p-Arm detektieren. Die Auswertung der Array Daten mit dem CNT war nicht aussagekräftig.

Bei Zelllinie HT1376 waren auch laut Array Daten (beobachtete und abgeleitete Kopienzahlen, dChip) nur zwei Regionen am p- bzw. q-Arm amplifiziert, während laut CGH das gesamte Chromosom amplifiziert war. Die Auswertung der Array Daten mit dem CNT lieferte keine aussagekräftigen Resultate.

C.1.4.4 Zusammenfassung der Veränderungen am Chromosom 9

Die Ergebnisse der CGH detektierten eine Amplifikation des gesamten Chromosom 9 bei Zelllinie **BC3C**. Der Befund wurde durch die M-FISH Resultate bestätigt. Diese zeigten, dass in fast allen untersuchten Metaphasen zwei Kopien von Chromosom 9 zusätzlich vorhanden waren. Chromosom 9 war bei Zelllinie BC3C darüber hinaus nicht an strukturellen Aberrationen beteiligt. Bei der Darstellung der beobachteten Kopienzahlen mit dChip und der Kopienzahlen mit dem Affymetrix CNT erschien das gesamte Chromosom 9 der Zelllinie BC3C amplifiziert, ausgenommen einer kleinen, deutlich unterrepräsentierten Region in der Bande 9p21.3. Diese kleine unterrepräsentierte Region war bei der Darstellung der mit dChip abgeleiteten Kopienzahlen und im CGH Profil nicht erkennbar.

Zelllinie **Ca129** zeigte weder bei der M-FISH Analyse der Metaphasen, noch bei der CGH Abweichungen von der normalen Kopienzahl. Bei der Darstellung der Array Daten mit dChip wurde darüber hinaus eine kleine, unterrepräsentierte Region in der Bande 9p21.3 sichtbar. Diese Region war sowohl in der Darstellung der mit dChip beobachteten, der mit dChip abgeleiteten und der mit dem CNT bestimmten Kopienzahlen sichtbar.

Bei Zelllinie **EJ28** erschien die Region 9p24.3-9p21.3 relativ unterrepräsentiert. In fast allen, mit M-FISH untersuchten Metaphasen, wurden jeweils zwei Chromosomen mit einer Deletion am p-Arm von Chromosom 9 gefunden ($\text{del}(9)(p21)\times 2$). CGH und Affymetrix GeneChip® Mapping Assay detektierten übereinstimmend die Verminderung der Kopienzahl in dieser Region. Sowohl in den beiden Darstellung der Kopienzahlen mit dChip, als auch in der Excel-Graphik der mit dem Affymetrix CNT berechneten Kopienzahlen, war die unerrepräsentierte Region deutlich zu erkennen.

Bei Zelllinie **HT1376** wurde mit dem Affymetrix Array (Auswertung mit dem CNT) eine leichte Verminderung der Kopienzahl in der Region 9p und eine normale Kopienzahl in der Region 9q festgestellt. Das CGH-Profil für Chromosom 9 überschreitet jedoch den Schwellenwerte für eine Deletion nur im Zentromerbereich und im Telomerbereich von 9p. Diese Regionen würden aufgrund der bekannten Artefakte der CGH (Telomerflucht, Zentromerflucht, (du Manoir et al., 1995)) nicht als Deletion gewertet. In der Darstellung der, aus den Array Daten abgeleiteten Kopienzahlen mit dChip, wurde eine normale Kopienzahl über die gesamte Länge des Chromosom 9, angezeigt. Bei der Darstellung, der mit dem Array beobachteten Kopienzahlen (dChip), erschien der p-Arm etwas „blauer“ als der Rest des Chromosoms. Die Unterrepräsentation wurde jedoch nicht besonders deutlich.

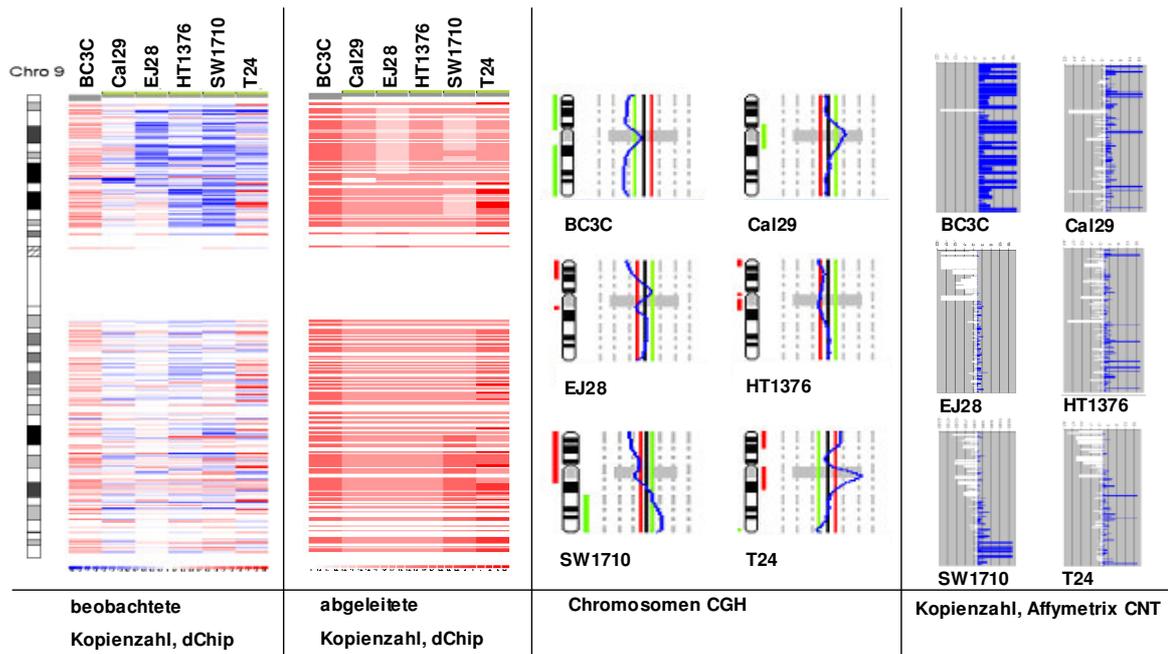


Abbildung 37: Zusammenfassung Array Daten und CGH für Chromosom 9

N.B.: Aus technischen Gründen sind die Profile der Zelllinien BC3C und T24 spiegelverkehrt, d.h. Amplifikationen werden nach links, Deletionen nach rechts angezeigt. Bei der mit dem Affymetrix CNT berechneten Kopienzahl werden die SNPs von p- zu q-Arm (von oben nach unten, ohne Berücksichtigung der physikalischen Distanz) und die Werte für das meta-p-value (Abschnitt B.15.3.2) dargestellt. Negative meta-p-Werte erscheinen weiß, positive meta-p-Werte erscheinen blau.

Die mit der CGH detektierte Verminderung der Kopienzahl in 9p24 bis 9q13 bei Zelllinie **SW1710** konnte mit den Array Daten auf die Region 9p24.1-9q13.1 eingegrenzt werden. In dieser Region wurden bei der Darstellung, der aus den Array Daten mit dChip abgeleiteten Kopienzahlen, drei kleineren Regionen mit verminderter Kopienzahl sichtbar. In der Darstellung der beobachteten Kopienzahlen mit dChip erschien die 9p-Region deutlich „blauer“, d.h. vermindert. Die mit dem Affymetrix CNT berechneten Werte waren in diesem Bereich deutlich negativ. Darüber hinaus wurde bei der Zelllinie SW1710 mit der CGH eine Amplifikation in der Region 9q22 bis 9q34 detektiert. Diese Amplifikation konnte mit den Array Daten bestätigt und auf die Region 9q31.1 bis 9q34 begrenzt werden. Wie die Auswertung der M-FISH Experimente zeigt, war Chromosom 9 bei Zelllinie SW1710 an einer Vielzahl verschiedener struktureller Aberrationen beteiligt. Die einzelnen translozierten Fragmente mit Material vom Chromosom 9 konnten bei der M-FISH Analyse jedoch meist nicht eindeutig einem der beiden Chromosomen zugeordnet werden. Die M-FISH Analyse gab deswegen keinen Hinweis auf die relative Kopienzahl bei Chromosom 9.

Durch CGH wurde am Chromosom 9 der Zelllinie **T24** eine Verminderung der Kopienzahl in der Region 9p21 bis 9p24 festgestellt. Wurden die Array Daten mit den Affymetrix CNT ausgewertet und mit Microsoft Excel graphisch dargestellt, konnte die

Verminderung in der Kopienzahl bestätigt und die Region auf die Banden 9p24.3 bis 9p21.3 eingegrenzt werden. Wurden die Array Daten mit dChip ausgewertet, erschien die Region 9p bei der Darstellung der abgeleiteten Kopienzahlen normal repräsentiert zu sein. Das restliche Chromosom, d.h. die Region 9p21.3 bis 9q34.3 erschien amplifiziert. Bei der Darstellung der beobachteten Kopienzahlen (dChip) war nicht klar erkennbar, ob Bereiche amplifiziert oder deletiert sein sollen, da das Rauschen der Daten zu stark war. Mit M-FISH wurde in allen untersuchten Metaphasen eine normale Kopienzahl für das Chromosom 9 und bei jeweils einem der Chromosomen eine Deletion mit Bruchpunkt in der Region 9p12 festgestellt, d.h. M-FISH bestätigt den Befund von CGH und die Auswertung der Array Daten mit dem Affymetrix CNT.

Fazit: Am Chromosom 9 stimmten die Ergebnisse aus M-FISH, CGH und Gene Chip Experimenten bei Zelllinie BC3C, Cal29, EJ28 und SW1710 sehr gut überein. Bei Zelllinien BC3C und Cal29 konnte mit dem Affymetrix Assay darüber hinaus jeweils eine kleine Region mit reduzierter Kopienzahl in der Bande 9p21.3 detektiert werden, welche mit den anderen Experimenten nicht nachgewiesen werden konnte.

Bei Zelllinie HT1376 schien das Chromosom 9 in normaler Kopienzahl vorzuliegen (CGH, beobachtete Kopienzahlen dChip). Bei der Auswertung der Array Daten mit dem CNT erschien die Region 9p geringfügig unterrepräsentiert.

Bei Zelllinie T24 zeigten CGH, M-FISH und die Auswertung der Array Daten mit dem Affymetrix CNT übereinstimmend eine Unterrepräsentation von 9p. Wurden die Array Daten mit dChip ausgewertet erschien 9p normal repräsentiert, 9q dagegen amplifiziert.

C.1.5 Verifikation der Affymetrix GeneChip® Mapping Assay Ergebnisse mit BAC-FISH

Aufgrund der Ergebnisse des Affymetrix GeneChip® Mapping Assays wurden einzelne amplifiziert oder deletiert erscheinende chromosomale Regionen für BAC-FISH Experimente ausgewählt. In Abbildung 38, sowie Abbildung 41 bis Abbildung 45 werden die Ergebnisse der BAC-FISH Experimente zusammengefasst und mit den meta-p-Werten aus dem CNT in Zusammenhang gebracht. Die Graphiken wurden mit der Microsoft Office Anwendung Excel erstellt, die zugrundeliegenden Daten sind die mit dem CNT errechneten meta-p-Werte der Kopienzahlen (Abschnitt B.15.3.2). Aus Platzgründen wurde in den Abbildungen nicht der vollständige Name der BACs angegeben. Alle BACs stammen aus der Bibliothek, die mit RP11 bezeichnet wird.

C.1.5.1 Chromosom 10 der Zelllinie EJ28

Durch das BAC-FISH Experiment wurde die Verminderung der Kopienzahl am p-Arm von Chromosom 10 bei der Zelllinie EJ28 bestätigt (Abbildung 38). Die im CNT deutlich verringert erscheinende Region 10p11.22-p15.3 (meta-p-Werte von -20) ergibt bei der BAC-Hybridisierung Signalzahlen von deutlich unter vier pro Metaphase (Abbildung 38, Abbildung 39). Die Kopienzahlerhöhung in der Region 10p11 war bei der Hybridisierung deutlich als einheitlich gefärbter Block zu sehen (Abbildung 39 und Abbildung 40), was dem typischen Hybridisierungsmuster einer „homogenous staining region“ (HSR) entspricht. Tabelle 16 fasst die in der amplifizierten Region liegenden Gene und ihre Funktionen zusammen. In der, im CNT geringfügig amplifiziert erscheinenden Region in der Bande 10q23 wurden für jeden BAC jeweils 2,4 Signale pro Metaphase gezählt (Abbildung 38, Abbildung 39 und Abbildung 40). Die geringfügige Kopienzahlerhöhung, welche durch den Affymetrix GeneChip® Mapping Assay angezeigt wurde, konnte durch die BAC-Hybridisierung nicht bestätigt werden.

Graphik meta-p-Werte aus CNT

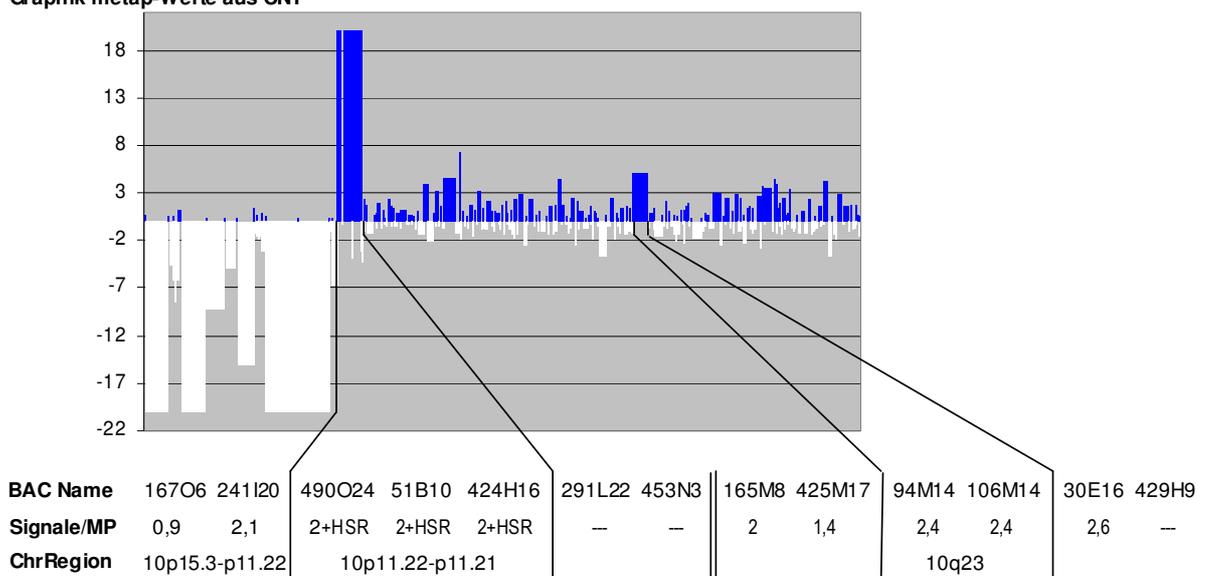


Abbildung 38: BAC-FISJ Chromosom 10 der Zelllinie EJ28

Graphischer Zusammenhang zwischen meta-p-Werten des Affymetrix Copynumber-Tools und den hybridisierten BAC-Klonen. Graphik: Y-Achse: meta-p-Werte des Affymetrix Copynumber-Tools; X-Achse: SNPs entsprechend ihrer chromosomalen Position von p zu q Arm, nicht proportional zur physikalischen Distanz; (weiß) SNPs mit negativen meta-p-Werten, d.h. unterrepräsentierte Regionen; (blau) SNPs mit positiven meta-p-Werten, d.h. überrepräsentierte Regionen. Tabelle: (Signale/MP) Mittelwert der gezählten BAC-FISH Signale pro Metaphase; (--) hybridisierter BAC ergab keine auswertbaren Signale; (ChrRegion) chromosomale Region.

Genname	Funktion
Partitioning-defective 3 homolog, PARD3	asymmetrische Zellteilung und Zell Polarisierungsprozess
cAMP responsive element modulator, CREM	bindet "cAMP response element "(CRE) eine Promotersequenz
Cullin-2, CUL2	Komponente von E3 Ubiquitin Ligase Komplexes, beteiligt an Zellteilungskontrolle in Hefe
Neuropilin-1 precursor, NRP1	Vascular endothelial Zell Wachstumsfaktor Rezeptor
cyclin fold protein 1, CFP1	Zellzyklus Regulation

Tabelle 16: Gene in der amplifizierten Region auf Chromosom 10p11.22-p11.21 der Zelllinie EJ28

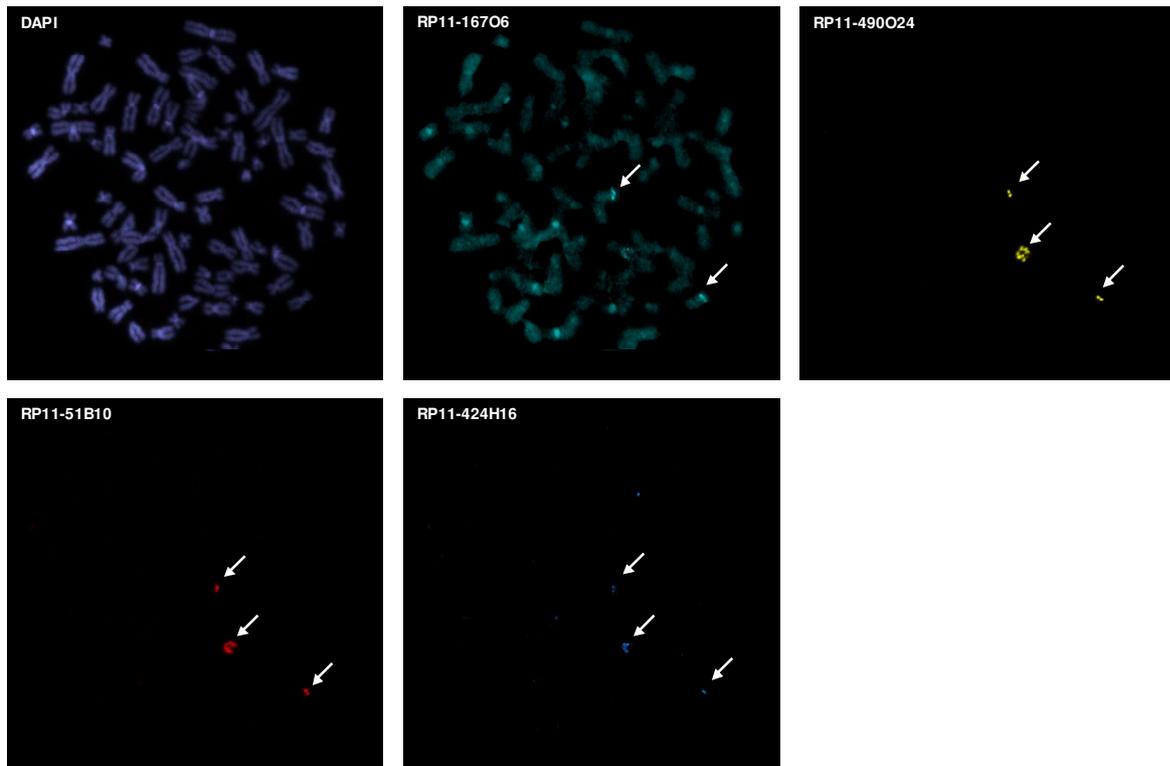


Abbildung 39: Hybridisierung auf Zelllinie EJ28 mit BACs, die in die deletierte, bzw. amplifizierte Region fallen. Signale sind mit Pfeilen markiert.

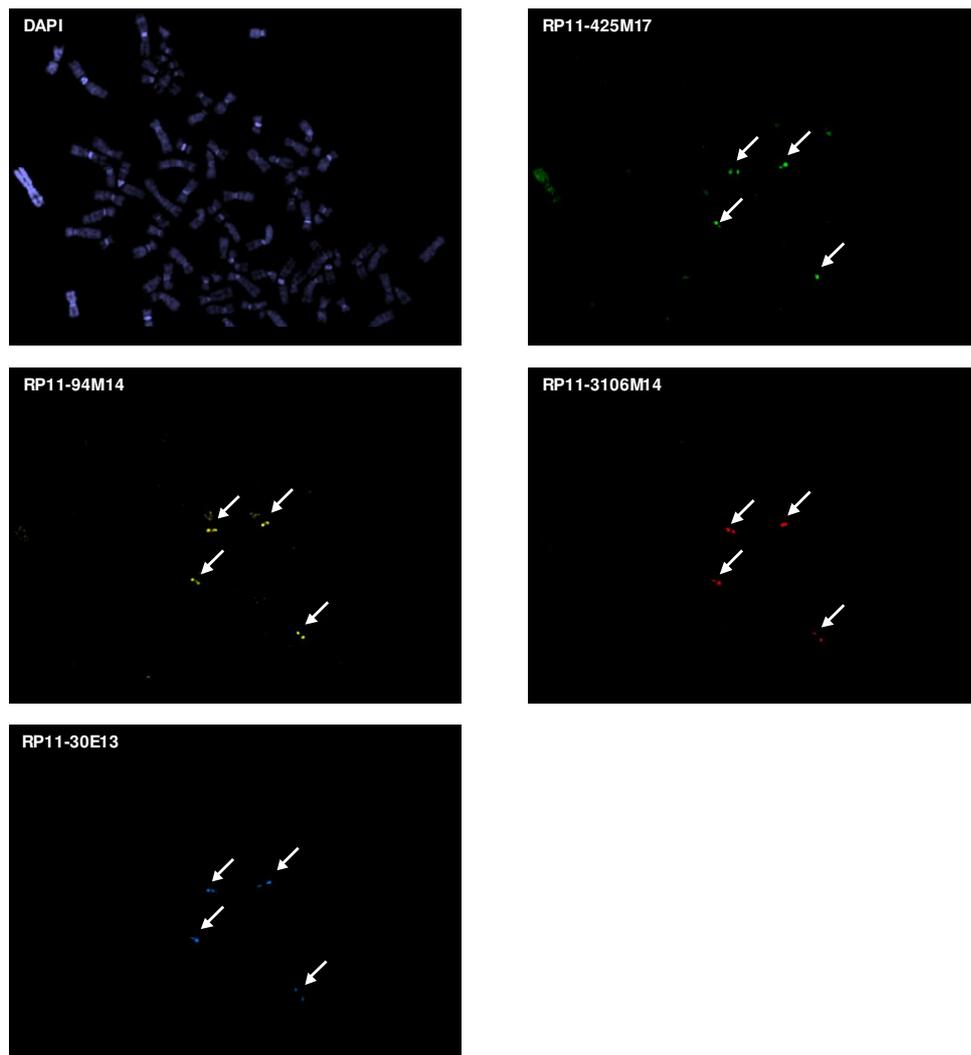


Abbildung 40: Hybridisierung auf Zelllinie EJ28 mit BACs, die in die deletierte, bzw. amplifizierte Region fallen. Signale sind mit Pfeilen markiert

C.1.5.2 Chromosom 8 der Zelllinie SW1710

Durch das BAC-FISH Experiment wurde die Verminderung der Kopienzahl am p-Arm von Chromosom 8 der Zelllinie SW1710 bestätigt. Die BACs am distalen Ende von Chromosom 8 ergaben 3,1, bzw. 4,4 Signale pro Metaphase (Abbildung 41). Da die Zelllinie SW1710 nahe tetraploid ist (Abschnitt C.1.1) entsprechen Signalzahlen um die 4 Signale pro Metaphase der normalen Kopienzahl. Die im CNT deutlich verringert erscheinende Region 8p21.2 (meta-p-Werte von -20) ergab dagegen bei der BAC-Hybridisierung Signalzahlen von deutlich unter vier pro Metaphase (Abbildung 41). In der Region mit meta-p-Werten von -10 zeigte aber nur ein BAC (RP11-521M14) deutlich verminderte Signalzahlen pro Metaphase. Der zweite BAC (RP11-380I10) zeigte eine Signalzahlen von 3 Signalen pro Metaphase.

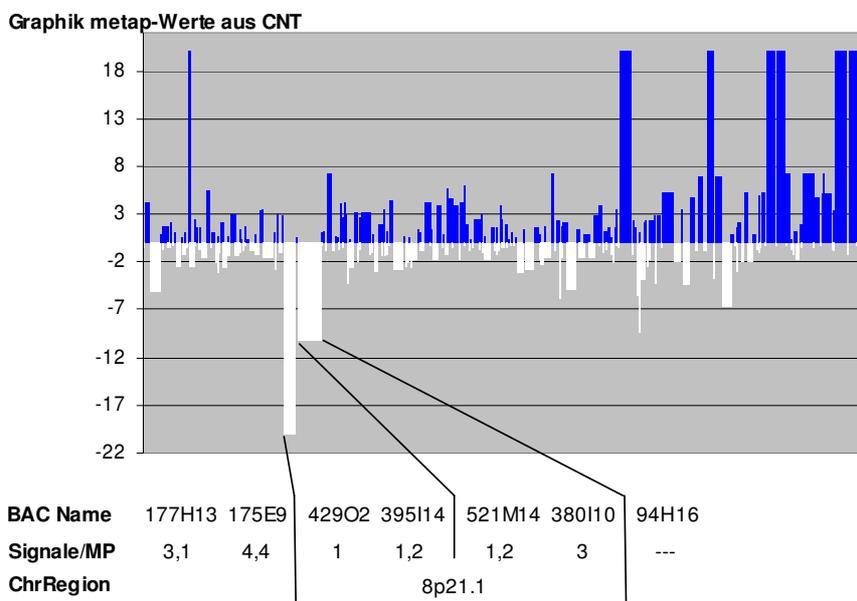


Abbildung 41: BAC-FISH Chromosom 8 der Zelllinie SW1710

Graphischer Zusammenhang zwischen meta-p-Werten des Affymetrix Copynumber-Tools und den hybridisierten BAC-Klonen. Graphik: Y-Achse: meta-p-Werte des Affymetrix Copynumber-Tools; X-Achse: SNPs entsprechend ihrer chromosomalen Position von p zu q Arm, nicht proportional zur physikalischen Distanz; (weiß) SNPs mit negativen meta-p-Werten, d.h. unterrepräsentierte Regionen; (blau) SNPs mit positiven meta-p-Werten, d.h. überrepräsentierte Regionen. Tabelle: (Signale/MP) Mittelwert der gezählten BAC-FISH Signale pro Metaphase; (--) hybridisierter BAC ergab keine auswertbaren Signale; (ChrRegion) chromosomale Region.

C.1.5.3 Chromosom 11 der Zelllinie SW1710

Von den im CNT amplifiziert erscheinenden Regionen auf Chromosom 11 der Zelllinie SW1710 konnte keine eindeutig mit BAC-FISH als amplifiziert verifiziert werden (Abbildung 42). Nur einer der BACs (RP11-265F24) in den Regionen zeigte, korrespondierend zu den Ergebnissen vom Affymetrix GeneChip® Mapping Assays, erhöhte Signalzahlen pro Metaphase (Abbildung 42). Alle anderen BACs ergaben Signalzahlen im nahe tetraploiden Bereich.

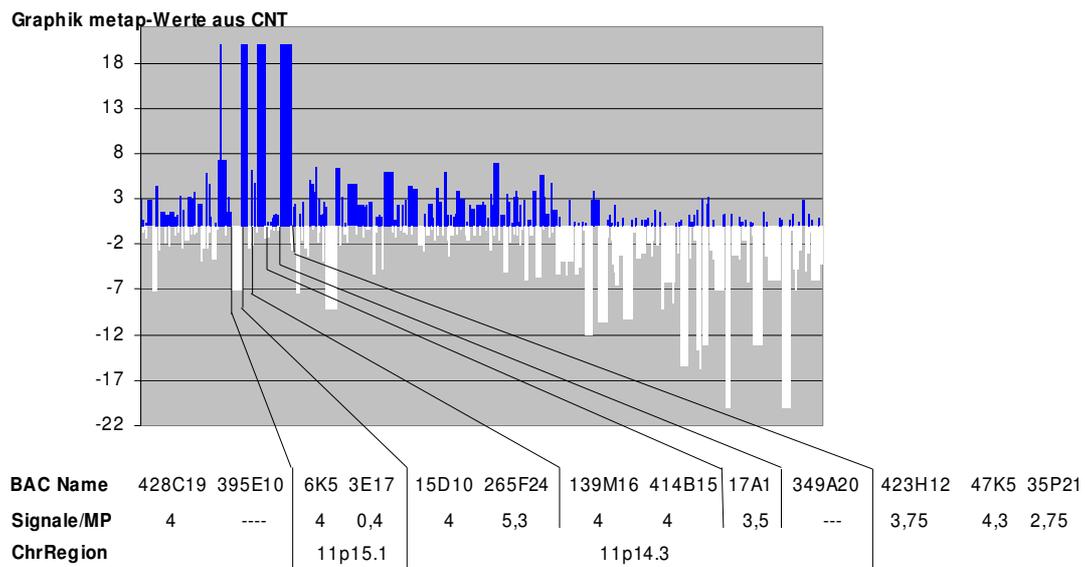


Abbildung 42: BAC-FISH Chromosom 11 der Zelllinie SW1710

Graphischer Zusammenhang zwischen meta-p-Werten des Affymetrix Copynumber-Tools und den hybridisierten BAC-Klonen. Graphik: Y-Achse: meta-p-Werte des Affymetrix Copynumber-Tools; X-Achse: SNPs entsprechend ihrer chromosomalen Position von p zu q Arm, nicht proportional zur physikalischen Distanz; (weiß) SNPs mit negativen meta-p-Werten, d.h. unterrepräsentierte Regionen; (blau) SNPs mit positiven meta-p-Werten, d.h. überrepräsentierte Regionen. Tabelle: (Signale/MP) Mittelwert der gezählten BAC-FISH Signale pro Metaphase; (--) hybridisierter BAC ergab keine auswertbaren Signale; (ChrRegion) chromosomale Region.

C.1.5.4 Chromosom 12 der Zelllinie SW1710

Für das Chromosom 12 der Zelllinie SW1710 zeigten alle BACs eine in etwa normale Signalzahl pro Metaphase (Abbildung 43). Die durch den Affymetrix GeneChip® Mapping Assay detektierte Amplifikation in der Region 12q21.32 konnte durch das BAC-FISH Experiment nicht verifiziert werden (Abbildung 43).

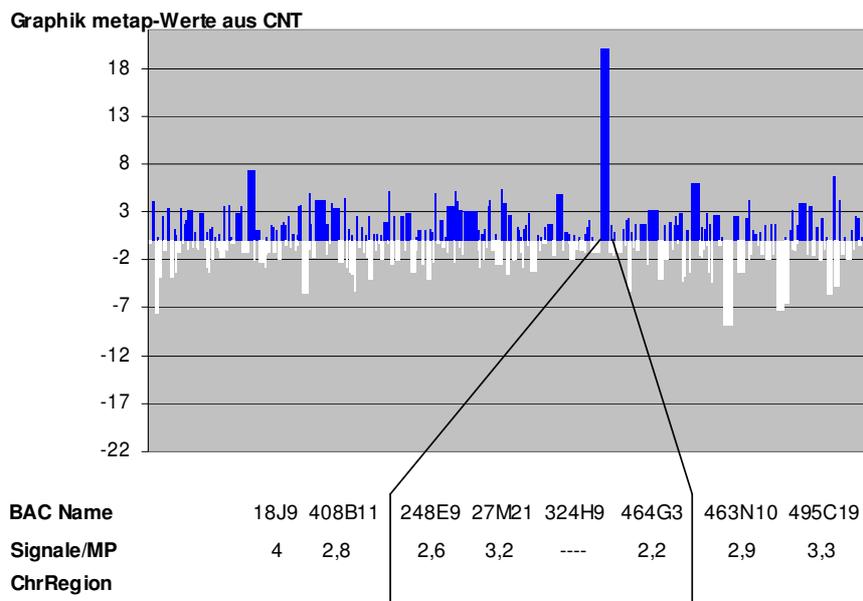


Abbildung 43: BAC-FISH Chromosom 12 der Zelllinie SW1710

Graphischer Zusammenhang zwischen meta-p-Werten des Affymetrix Copynumber-Tools und den hybridisierten BAC-Klonen. Graphik: Y-Achse: meta-p-Werte des Affymetrix Copynumber-Tools; X-Achse: SNPs entsprechend ihrer chromosomalen Position von p zu q Arm, nicht proportional zur physikalischen Distanz; (weiß) SNPs mit negativen meta-p-Werten, d.h. unterrepräsentierte Regionen; (blau) SNPs mit positiven meta-p-Werten, d.h. überrepräsentierte Regionen. Tabelle: (Signale/MP) Mittelwert der gezählten BAC-FISH Signale pro Metaphase; (--) hybridisierter BAC ergab keine auswertbaren Signale; (ChrRegion) chromosomale Region.

C.1.5.5 Chromosom 15 der Zelllinie SW1710

Die Ergebnisse der BAC-Hybridisierung auf Chromosom 15 der Zelllinie SW1710 stimmten weitestgehend nicht mit den Ergebnissen des Affymetrix GeneChip® Mapping Assays überein (Abbildung 44). Die im CNT signifikant erscheinende Deletion in der Region 15q14 und die moderat vermindert erscheinende Region in 15q21.1 (meta-p-Werten von -6,9) ergaben bei der BAC-Hybridisierung Signalzahlen im nahe tetraploiden Bereich. Auch die beiden BACs, die in der im CNT signifikant amplifiziert erscheinenden Region liegen, zeigten keine erhöhte Signalzahlen bei der BAC-FISH.

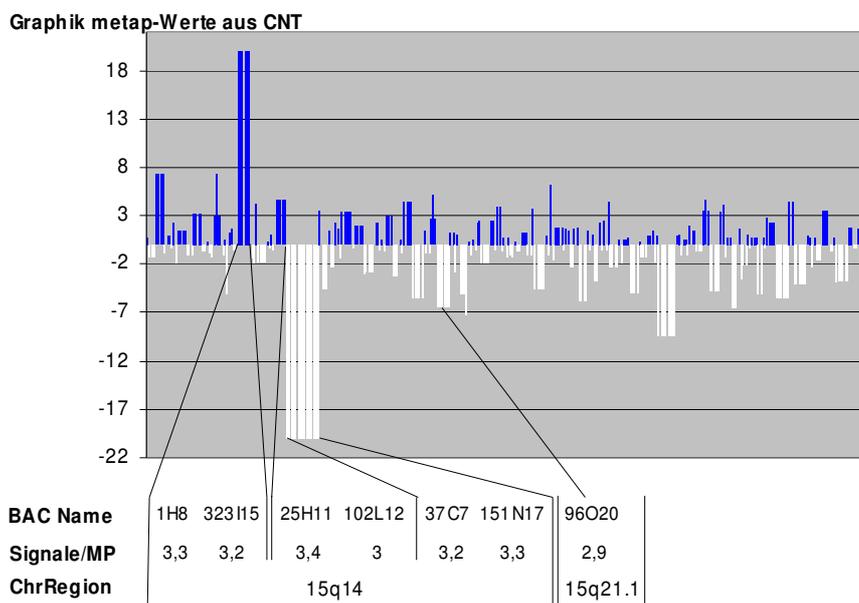


Abbildung 44: BAC-FISH Chromosom 15 der Zelllinie SW1710

Graphischer Zusammenhang zwischen meta-p-Werten des Affymetrix Copynumber-Tools und den hybridisierten BAC-Klonen. Graphik: Y-Achse: meta-p-Werte des Affymetrix Copynumber-Tools; X-Achse: SNPs entsprechend ihrer chromosomalen Position von p zu q Arm, nicht proportional zur physikalischen Distanz; (weiß) SNPs mit negativen meta-p-Werten, d.h. unterrepräsentierte Regionen; (blau) SNPs mit positiven meta-p-Werten, d.h. überrepräsentierte Regionen. Tabelle: (Signale/MP) Mittelwert der gezählten BAC-FISH Signale pro Metaphase; (--) hybridisierter BAC ergab keine auswertbaren Signale; (ChrRegion) chromosomale Region.

C.1.5.6 Chromosom 9 der Zelllinie BC3C

Entsprechend den Ergebnissen des Affymetrix GeneChip® Mapping Assays ist bei Zelllinie BC3C fast das gesamte Chromosom 9 amplifiziert. Nur eine kleine, mindestens 380 kb, maximal 680 kb umfassende Region in 9p21.3 erscheint deletiert. Die Ergebnisse der BAC-Hybridisierung in dieser Region stimmen weitestgehend mit dieser Aussage überein (Abbildung 45). Nur bei einem der hybridisierten BACs ergibt sich eine Abweichung zu den Array-Daten. Während der BAC RP11-145E5 bei der Hybridisierung 3 Signale pro Metaphase ergab, erschien die Region auf dem Chip deletiert. Der BAC RP11-145E5 überspannt die Region von 21,998414-22,155946 bp. Innerhalb dieser Region befinden sich drei verschiedene SNPs, die durch entsprechende Oligonukleotide auf dem Chip repräsentiert sind (Tabelle 17). Der SNP, der sich 3' an den BAC RP11-145E5 anschließt, hat ein positives meta-p-value, d.h. erscheint nicht mehr deletiert (Tabelle 17). Um zu untersuchen, ob der Bruchpunkt innerhalb der von BAC RP11-145E5 überspannten Region und zwischen dem SNP_A1516703 und dem SNP_A1512540 liegt, wurde diese Region mit einem spezifischen PCR Ansatz genauer untersucht (Abschnitt C.1.8).

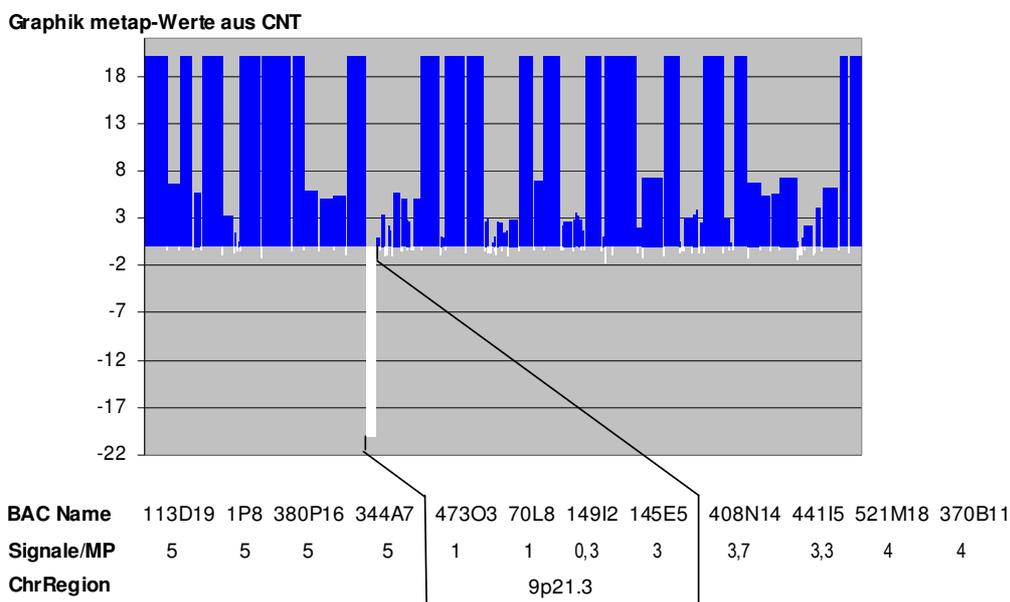


Abbildung 45: BAC-FISH Chromosom 9 der Zelllinie BC3C

Graphischer Zusammenhang zwischen meta-p-Werten des Affymetrix Copynumber-Tools und den hybridisierten BAC-Klonen. Graphik: Y-Achse: meta-p-Werte des Affymetrix Copynumber-Tools; X-Achse: SNPs entsprechend ihrer chromosomalen Position von p zu q Arm, nicht proportional zur physikalischen Distanz; (weiß) SNPs mit negativen meta-p-Werten, d.h. unterrepräsentierte Regionen; (blau) SNPs mit positiven meta-p-Werten, d.h. überrepräsentierte Regionen. Tabelle: (Signale/MP) Mittelwert der gezählten BAC-FISH Signale pro Metaphase; (--) hybridisierter BAC ergab keine auswertbaren Signale; (ChrRegion) chromosomale Region.

Affymetrix SNP Kennung	physikalische Position	meta-p-Werte
SNP_A1513414	21,971583	-20
SNP_A1515857	22,026112	-20
SNP_A1509299	22,026367	-20
SNP_A1516703	22,089568	-20
SNP_A1512540	22,205296	+0,97

Tabelle 17: SNPs und ihre physikalisch Position

In der deletierten Region liegen vier verschiedene Gene, die alle schon im Zusammenhang mit Tumorentstehung beschrieben worden sind (Abbildung 46, Tabelle 18).

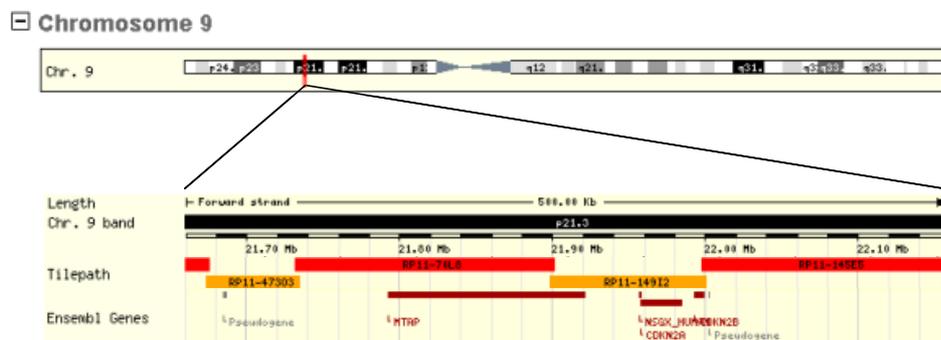


Abbildung 46: Graphischer Zusammenhang von deletierter Region, hybridisierter BACs und Genen
(Graphik aus Ensembl-Tool, www.ensembl.org)

Genname	Funktion
Susceptibility protein NSG-x NSGX_HUMAN	Assoziiert mit Hals-Nasen-Rachen Tumoren
Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor A (CDKN2A) (p16-INK4) (p16-INK4a)	Tumor Suppressor Gen, Zellzyklus-Checkpoint Gen, negative Regulation der Zellproliferation
S-methyl-5-thioadenosine phosphorylase (MTAP)	Polyamine Metabolismus, Enzym fehlt häufig in malignen Zellen (REFERENZ Carrera et al. (1984) (Chilcote et al., 1985)
Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B (CDKN2B) (p14-INK4b) (p15-INK4b)	Tumor Suppressor Gen, Zellzyklus-Checkpoint Gen, negative Regulation der Zellproliferation

Tabelle 18: Gene in der deletierten Region

Da Veränderungen am Chromosom 9 charakteristisch für Harnblasenkarzinome sind (Eble et al., 2004; Stoehr et al., 2005; Wu, 2005) und insbesondere die Region 9p21.3 mit dem Tumorsuppressor Gen p16 häufig deletiert ist (Raschke et al., 2005), wurde diese Region im Folgenden bei allen Zelllinien mit BAC-FISH und qPCR genauer untersucht.

C.1.6 BAC-FISH für p16/CDKN2A Region auf Chromosom 9

Abbildung 47 fasst die Ergebnisse der Hybridisierung von sechs, die p16-Region auf Chromosom 9p21.3 überspannenden BACs, zusammen. Da alle Zelllinien hypertriploid sind (Abschnitt C.1.1), entspricht eine Signalzahl von 3-4 Signalen pro Metaphase der normalen Kopienzahl. Die p16-Region war bei allen untersuchten Zelllinien tendenziell unterrepräsentiert. Bei Zelllinie Cal29 konnten keine verwertbaren BAC-FISH Signale detektiert werden.

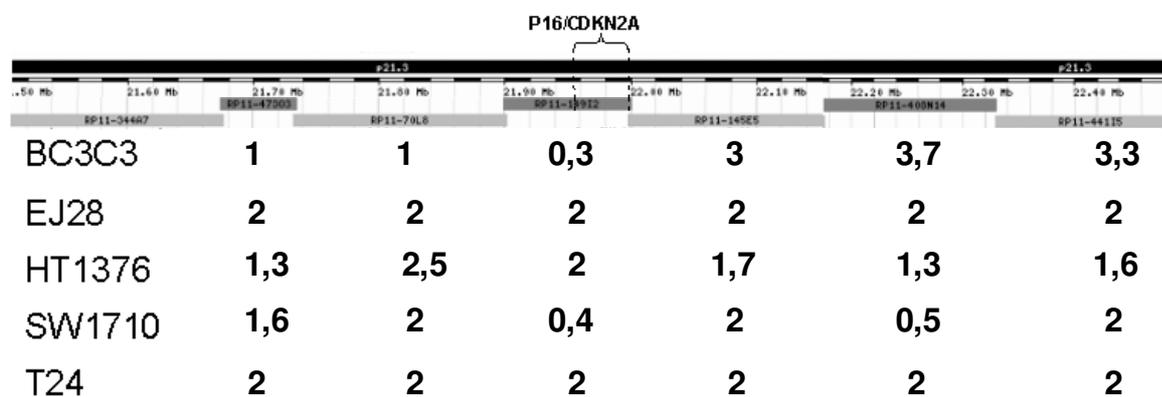


Abbildung 47: Zusammenfassung der BAC-FISH in der p16-Region.

Physikalische Position der hybridisierten BACs (Graphik aus Ensembl-Tool, www.ensembl.org) und Anzahl von Signalen pro Metaphase in den untersuchten Zelllinien.

C.1.7 Verifikation der Affymetrix GeneChip® Mapping Assay Ergebnisse mit qPCR

Die qPCR-Ergebnisse bestätigten, dass die p16 Region bei den untersuchten Harnblasenkarzinom Zelllinien tendenziell unterrepräsentiert ist. Bei Zelllinie BC3C und Cal29 konnten mit der qPCR keine Kopien für das p14 und das p15 Gen detektiert werden; die Region erscheint komplett deletiert (Abbildung 48 und Abbildung 49). Die ermittelten relativen Kopienzahlen für die Zielregionen nach Normalisierung mit GAPDH (Chr. 12p13.31) stimmten weitestgehend mit der ermittelten Kopienzahl nach Normalisierung mit PFK (Chr. 21q22.3) überein. Die p16 Region der Zelllinie T24 erschien nach Normalisierung mit PFK amplifiziert (2,4 Kopien bei T24 vs. 2 Kopie bei Plazenta, Abbildung 48); nach Normalisierung mit GAPDH jedoch unterrepräsentiert (0,4 Kopien bei T24 vs. 2 Kopie bei Plazenta, Abbildung 49). Die BAC-FISH Ergebnisse bestätigten die Tendenz zum Verlust der p16 Region auch für Zelllinie T24 (Abschnitt C.1.6). Es ist wahrscheinlich, dass das PFK-Gen bei der Zelllinie T24 noch stärker unterrepräsentiert ist als die p16 Region und, dass deshalb die p16 Region im Verhältnis zum PFK-Gen überrepräsentiert erscheint. Das Primer/Proben-Set für die qPCR-Analyse des p16 Gens zeigte schon bei der Referenz DNS eine schlechte Amplifikationseffizienz.

Die Ergebnisse aus der Amplifikation des p16 Gens wurden deshalb nicht in die Auswertungen mit einbezogen. Da p14, p15 und p16 in derselben Region liegen und sich z.T. sogar überlappen (Abbildung 50) sind die Ergebnisse für das p14 und das p15 Gen repräsentativ für die p16 Region.

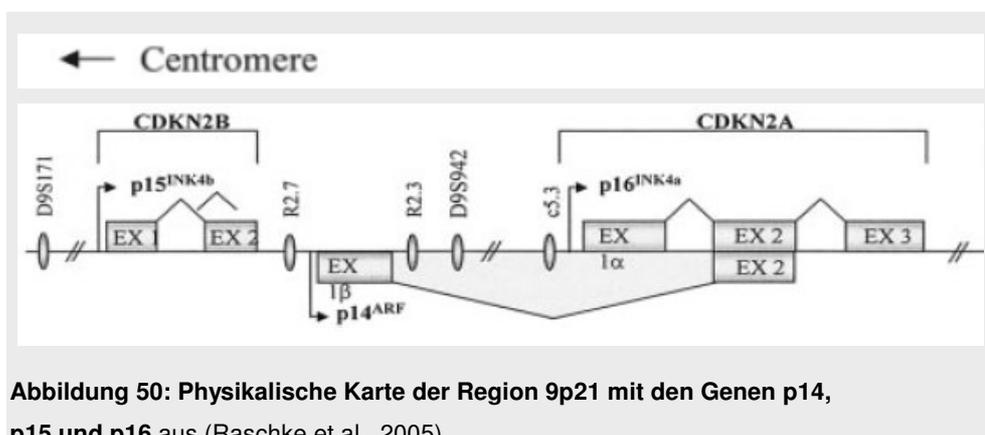
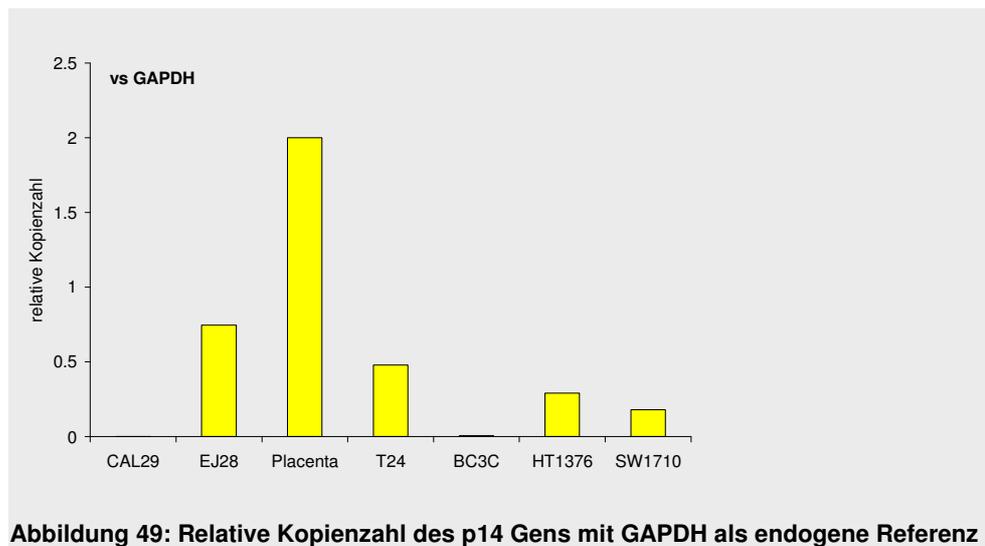
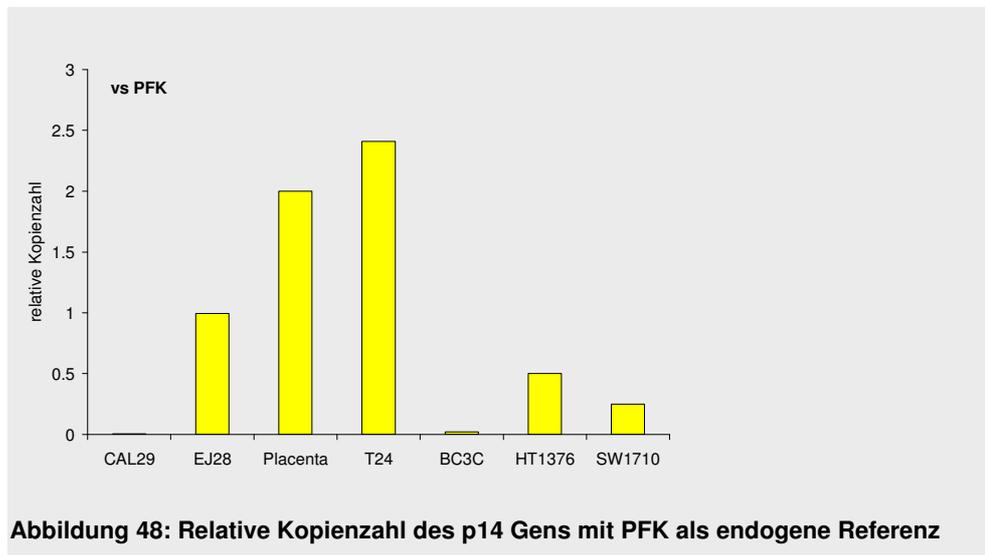


Abbildung 50: Physikalische Karte der Region 9p21 mit den Genen p14, p15 und p16 aus (Raschke et al., 2005).

C.1.8 Verifikation der Affymetrix GeneChip® Mapping Assay Ergebnisse mit spezifischer PCR

Da BAC RP11-145E5 bei der Hybridisierung auf Zelllinie BC3C 3 Signale pro Metaphase ergab, während die korrespondierende Region bei der Analyse mit dem Affymetrix GeneChip® Mapping Assay deletiert erschien (Abschnitt C.1.4.4), wurde diese Region mit einem spezifischen PCR Ansatz genauer untersucht. Dazu wurden vier verschiedene Primerpaare entwickelt, welche alle innerhalb der, von BAC RP11-145E5 überspannten Region lagen. Dabei überspannte das Primerpaar I den SNP_A-1513414, das Primerpaar II überspannte die beiden SNPs SNP_A-1515857 und SNP_A-1509299, Primerpaar III überspannte SNP_A-1516703 und Primerpaar IV lag am äußeren 3'-Ende von BAC RP11-145E5, in einer Region, welche von keinem SNP auf dem Affymetrix GeneChip® Mapping Assay abgedeckt wurde. Für die genauen physikalischen Positionen von Primern, SNPs und BAC und dem Zusammenhang mit den Array Resultaten siehe Tabelle 19.

Nummerierung korrespondierend zu Abbildung 52		physikalische Position	Signale/Metaphase
	BAC RP11-145E5	21,998414-22,155946	3
SNP# Abbildung 52		physikalische Position	meta-p-Werte
1	SNP_A1513414	21,971583	-20
2	SNP_A1515857	22,026112	-20
3	SNP_A1509299	22,026367	-20
4	SNP_A1516703	22,089568	-20
5	SNP_A1512540	22,205296	+0,97
Primer# Abbildung 52	Target Region	physikalische Position	
III	SNP_A1516703	22,089227-22,089691	
IV	3' Ende von BAC RP11-145E5	22,155233-22,155640	

Tabelle 19: Zusammenhang BAC, SNPs und Primer

Mit allen vier Primerpaaren konnten aus Plazenta-DNS und Plasmid-DNS von BAC RP11-145E5 erfolgreich Produkte amplifiziert werden (Abbildung 51), d.h. die Primer sind funktional und auf dem BAC sind alle vier Teilbereiche repräsentiert. Aus DNS der Zelllinie BC3C konnte nur mit dem, am äußeren 3'-Ende von BAC RP11-145E5 liegenden Primerpaar IV, ein Produkt gewonnen werden (Abbildung 51). Mit den Primerpaaren I bis III konnten dagegen aus DNS der Zelllinie BC3C keine Produkte

amplifiziert werden, d.h. die Regionen im Bereich von SNP_A-1513414 (Primerpaar I), SNP_A-1515857/SNP_A-1509299 (Primerpaar II) und SNP_A-1516703 (Primerpaar III) sind deletiert. Die Region am 3' Ende von BAC RP11-145E5 (Primerpaar IV) ist in der Zelllinie BC3C vorhanden.

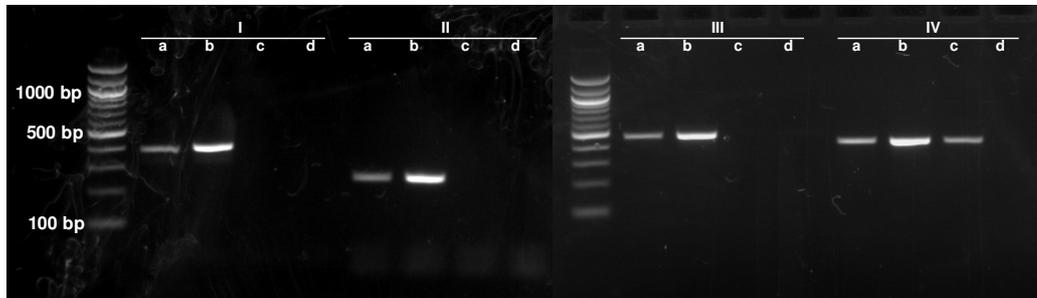


Abbildung 51: Ergebnis der spezifischen PCR.

(I) PCR mit SNP 1 überspannendes Primerpaar, (II) PCR mit SNP 2 und 3 überspannendes Primerpaar, (III) PCR mit SNP 4 überspannendes Primerpaar, (IV) Primerpaar am äußeren 3' Ende des BACs RP11-145E5; (a) Plazenta DNA, (b) DNA von BAC RP11-145E5, (c) BC3C DNA, (d) negativ Kontrolle

C.1.9 Zusammenfassung der Ergebnisse für die p16 Region auf Chromosom 9 der Zelllinie BC3C

Die spezifische PCR bestätigt sowohl die Ergebnisse des Affymetrix GeneChip® Mapping Assays als auch die Resultate der BAC-FISH Analyse. Der bei Zelllinie BC3C deletierte Bereich endet innerhalb der, von BAC RP11-145E5 überspannten, Region. Da das 3' Ende des BACs noch eine Zielregion in der Zelllinie hat, ergibt die Hybridisierung von BAC RP11-145E5 im Mittel 3 Signale pro Metaphase. Der Rest von BAC RP11-145E5, d.h. die 5' Region mit den zu den Oligonukleotiden auf dem Affymetrix GeneChip® Mapping Assay korrespondierenden Regionen, ist in der Zelllinie BC3C deletiert. Aus diesem Grund erscheint die Region bei der Analyse der Affymetrix GeneChip® Mapping Assay Ergebnisse deletiert. Abbildung 52 fasst die Ergebnisse der Affymetrix GeneChip® Mapping Assay, der BAC-FISH Analyse und der spezifischen PCR zusammen.

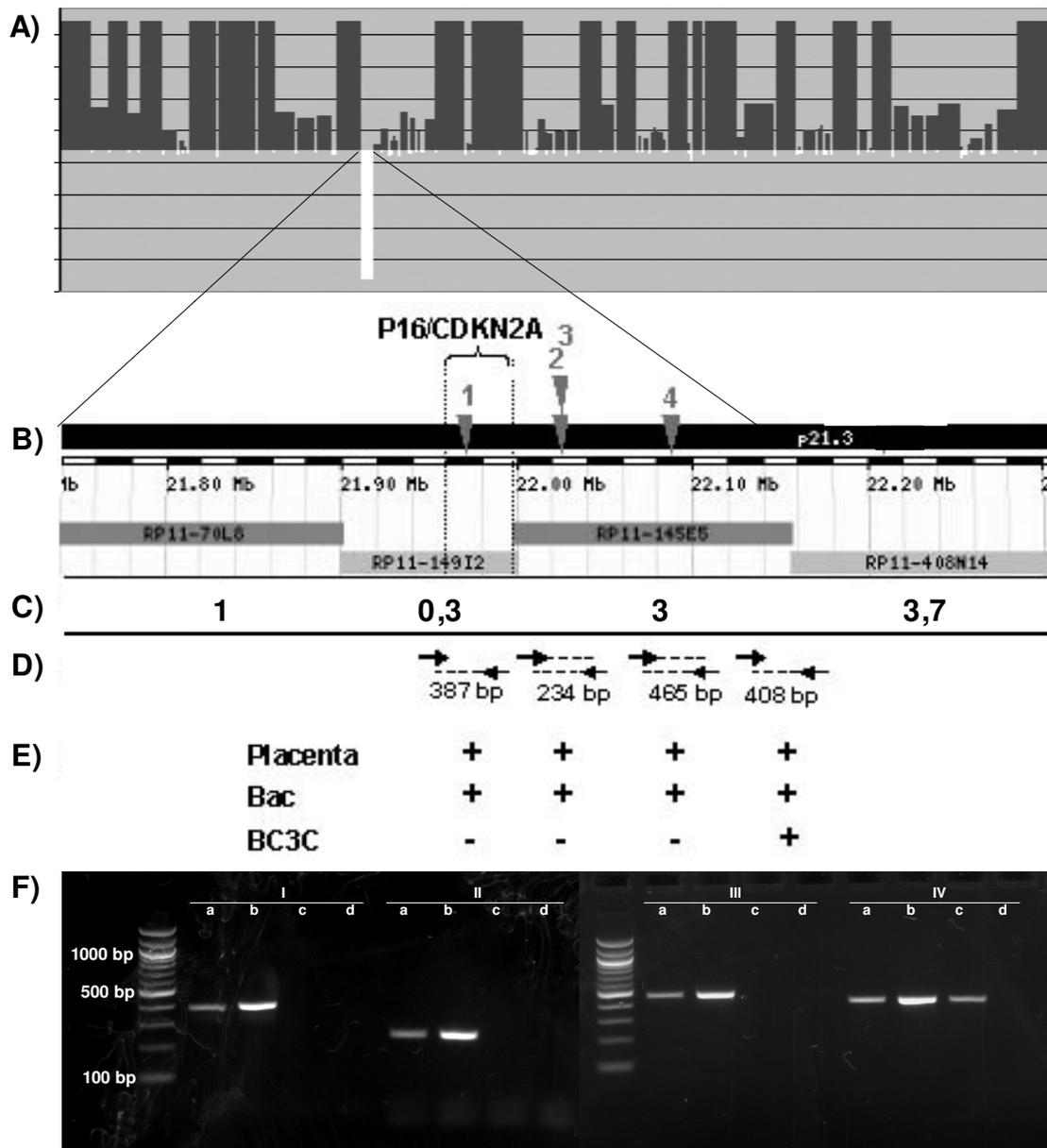


Abbildung 52: Zusammenstellung von Affymetrix GeneChip® Mapping Assay, BAC-FISH und PCR Ergebnissen:

(A) Daten des Affymetrix GeneChip® Mapping Assays; Y-Achse: meta-p-Werte mit einem Bereich von -20 bis +20; X-Achse: SNPs auf Chromosom 9 entsprechend ihrer chromosomalen Position (p->q), N.B. nicht entsprechend ihrer physikalischen Distanz (B) Graphik vom Ensembl-Tool, physikalische Lokalisation der hybridisierten BACs und der SNPs (▼) auf dem Chip. SNP 1-4 (Tabelle 19) haben ein meta-p-value von -20, SNP 5 ein meta-p-value von +0,97. (C) Resultat der BAC-FISH Analyse, Anzahl Signale pro Metaphase (D) Lage der PCR-Primer und Länge der PCR-Produkte, n.b. Abbildung nicht maßstabgetreu (E) Zusammenfassung der PCR-Resultate; (+) erfolgreiche Amplifikation, (-) keine Amplifikation (F) Gelbild der PCR; (I) PCR mit SNP 1 überspannendes Primerpaar, (II) PCR mit SNP 2 und 3 überspannendes Primerpaar, (III) PCR mit SNP 4 überspannendes Primerpaar, (IV) Primerpaar am äußeren 3' Ende des BACs RP11-145E5; (a) Plazenta DNA, (b) DNA von BAC RP11-145E5, (c) BC3C DNA, (d) negativ Kontrolle

C.1.10 Allelverteilung und LOH Analyse bei den Zelllinien EJ28 und T24

Um zu überprüfen, ob die beiden Zelllinien EJ28 und T24 den selben Ursprung haben wurde die Konkordanz in der Allelverteilung zwischen den Zelllinien untersucht. Bei den Zelllinien T24 und EJ28 besitzen 97,47% der untersuchten SNPs das selbe Allel, d.h. haben beide entweder AA, AB oder BB. Die Konkordanzraten der anderen Zelllinien lagen jeweils nur zwischen 54.98% und 58.78%.

	BC3C	Cal29	EJ28	HT1376	SW1710	T24
BC3C	100.00%					
Cal29	56.03%	100.00%				
EJ28	55.39%	55.07%	100.00%			
HT1376	56.03%	56.25%	56.09%	100.00%		
SW1710	55.41%	54.98%	55.81%	55.17%	100.00%	
T24	56.80%	57.10%	97.47%	58.78%	57.67%	100.00%

Tabelle 20: Konkordanz der Allelverteilung zwischen den Zelllinien

Um die Regionen zu identifizieren, in denen sich die Zelllinien EJ28 und T24 in ihrer Allelverteilung unterscheiden, wurde eine LOH Analyse mit dChip durchgeführt (Abbildung 53, gelb-blaue Graphik).

In Abbildung 53 entspricht jede einzelne Zeile einem bestimmten SNP. In Y-Richtung sind die SNPs entsprechend ihrer chromosomalen Position (N.B.: nicht proportional zu ihrer physikalischen Distanz) von p zu q Arm und von Chromosom 1 bis Chromosom X aufgetragen. Die Zahlen links neben der Graphik korrespondieren zu den Chromosomen. Aus Platzgründen wurde die Graphik in zwei Blöcke unterteilt, links werden die Ergebnisse für die Chromosomen 1-7, rechts für die Chromosomen 8-X gezeigt. Bei der Darstellung der mit dChip abgeleiteten LOH Bereiche (gelb-blaue Graphik) repräsentiert jede Spalte die Ergebnisse des paarweisen Vergleichs der Zelllinien EJ28 und T24. Dabei wurde einmal die Zelllinie T24 (jeweils links, „T24 mit EJ28“) und einmal die Zelllinie EJ28 (jeweils rechts, „EJ28 mit T24“) als korrespondierende normale Referenz gewählt. In der Abbildung werden SNPs, bei denen ein LOH stattgefunden hat blau kodiert, SNPs bei denen keine Veränderung stattgefunden hat, werden gelb dargestellt. Bei der Darstellung der Allelverteilung (blau-rot-gelbe Graphik) entspricht jede Spalte dem Ergebnis einer einzelnen Zelllinie (Mit GDAS generierte Calls, Abschnitt B.15.3.1). Homozygote SNPs werden blau (AA), bzw. rot (BB) heterozygote SNPs (AB) gelb und nicht aussagekräftige SNPs (NoCalls) weiß kodiert.

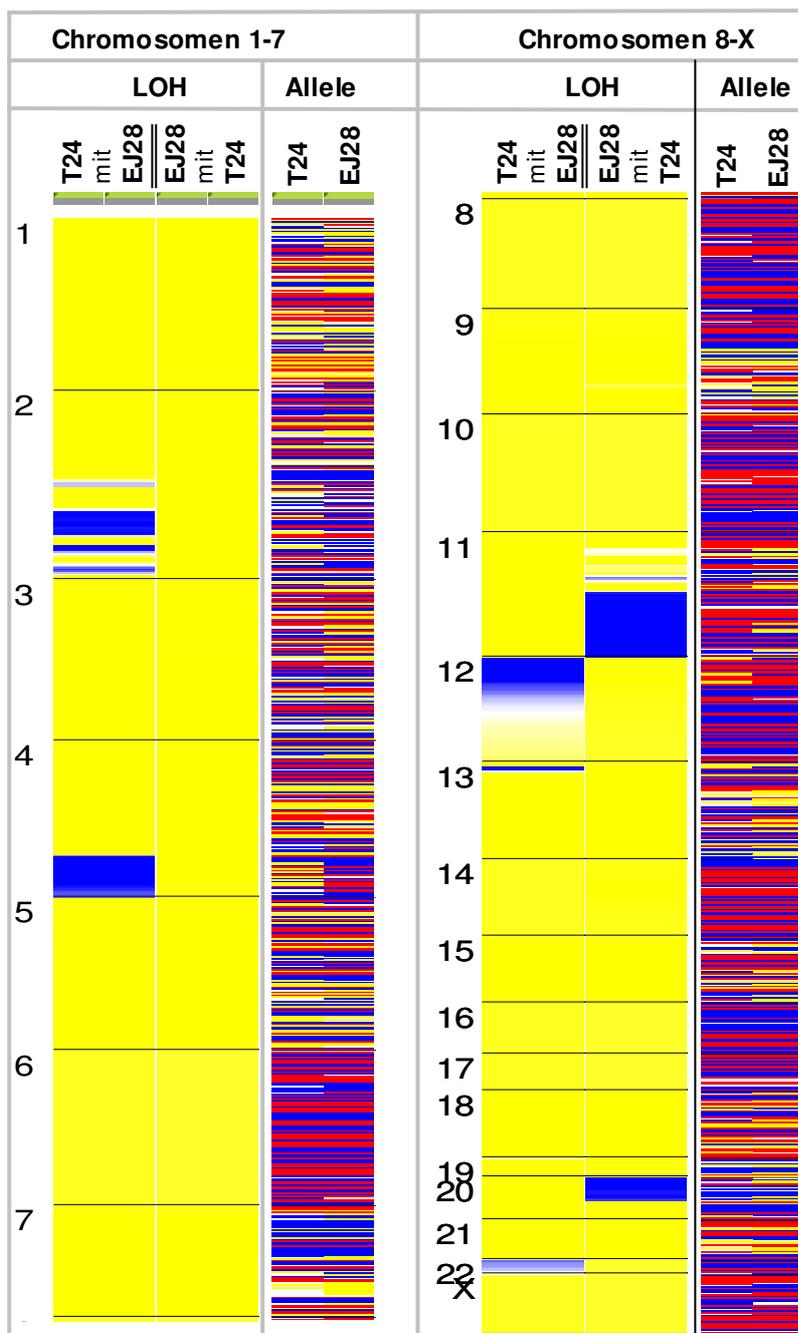


Abbildung 53: Allelverteilung und LOH-Analyse bei Zelllinien EJ28 und T24

Zelllinien EJ28 und T24 zeigten LOH in folgenden Regionen:

mit T24 als korrespondierende normale Referenz:

2q14.1-2q14.2, 2q24.1-2q31.3, 2q33.1-2q33.3, 2q36.1-2q36.3, 4q31.21-4qter, 12pter-12q14.3, 13q12.11-13q12.2, Chromosom 22

mit EJ28 als korrespondierende normale Referenz:

11p11.2, 11q13.3-11qter, 20pter-20q11.21

C.2 Quantifikation und LOH Analyse von Patientenproben mit dem Affymetrix GeneChip® Mapping Assays

C.2.1 Quantifikation und LOH Analyse von Patientenproben mit dem Affymetrix GeneChip® Mapping Assays

C.2.1.1 Hybridisierungsqualität

Wie bei der Auswertung der Harnblasenkarzinom-Zelllinien (Abschnitt C.1) wurden die Patientenproben nach der Hybridisierung auf den Affymetrix GeneChip® Mapping Assay im ersten Schritt mit der GDAS-Software von Affymetrix analysiert und der Genotyp der einzelnen SNPs bestimmt. In einem zweiten Schritt wurden mit der dChip-Software (www.dChip.org) Kopienzahlen berechnet. Da bei den meisten Proben sowohl Normalmaterial (Stroma, S) als auch Tumormaterial (Urothel, U) vorhanden war, konnten darüber hinaus LOH Ereignisse im Tumor bestimmt werden.

Total number of SNP 11560
 Total number of QC f 4
 Probe array type: Mapping10K_Xba131

SNP Performance							
CEL Data	Gender	Called Gender	SNP Call	Signal Detection	AA Call	AB Call	BB Call
CB26_4418Blut2	Unknown	M	89.36%	96.83%	34.01%	32.30%	33.69%
CB27_4423Blut2	Unknown	M	94.51%	99.22%	33.45%	33.01%	33.55%
CB36_18223U	Unknown	M	84.63%	97.34%	38.96%	23.19%	37.85%
CB37_11703S	Unknown	M	84.00%	94.46%	35.84%	28.32%	35.84%
CB38_11703U	Unknown	M	93.46%	98.81%	33.83%	32.12%	34.05%
CB39_13183S	Unknown	M	96.70%	99.42%	33.85%	33.21%	32.94%
CB40_13183U	Unknown	M	94.64%	98.76%	34.11%	32.75%	33.14%
CB41_22926S	Unknown	M	94.88%	98.65%	32.99%	33.83%	33.18%
CB42_22926U	Unknown	M	93.58%	98.36%	33.03%	33.44%	33.53%
CB43_26062S	Unknown	M	96.32%	99.39%	33.26%	33.88%	32.86%
CB47_26062U	Unknown	M	94.31%	99.19%	33.61%	33.15%	33.24%
CB48_19604S	Unknown	F	95.78%	99.06%	33.14%	34.49%	32.37%
CB49_4770S	Unknown	M	81.98%	95.74%	36.21%	26.63%	37.15%
CB50_4770U	Unknown	M	92.37%	98.62%	34.66%	29.85%	35.49%
CB51_13181S	Unknown	M	87.26%	96.63%	35.78%	30.33%	33.90%
CB52_13181U	Unknown	M	77.47%	92.95%	41.68%	17.89%	40.43%
CB53_15130S	Unknown	M	96.48%	99.35%	33.17%	33.70%	33.12%
CB54_15130U	Unknown	M	93.22%	98.34%	33.22%	33.30%	33.48%
CB55_23878S	Unknown	M	96.57%	99.41%	32.87%	34.42%	32.70%
CB56_23878U	Unknown	M	97.43%	99.61%	32.78%	34.55%	32.67%
CB57_27182S	Unknown	M	95.84%	99.02%	32.71%	34.41%	32.88%
CB58_27182U	Unknown	M	95.99%	99.38%	32.41%	34.93%	32.66%

Abbildung 54: GDAS-Report file Patientenproben

Die Qualität der Hybridisierung war bei den Patientenproben sehr gut, die Signalerfassungsrate („Signal Detection“, Abbildung 54) der hybridisierten Arrays lag zwischen 93,0 und 99,9 % und nur bei den Arrays CB52_13181U und CB37_11703S unter 95%. Bei allen Proben, bei denen das Geschlecht der Patienten bekannt war

(Abschnitt B.4, Tabelle 5), wurde durch GDAS das richtige Geschlecht zugeordnet. Die mittlere Signalintensität der Arrays reicht von 262 bis 798 mit einem Median bei 377,5. Die Proben wurden deswegen vor der Analyse gegenüber dem „baseline array“ CB25_4423Blut (mittlere Signalintensität von 352, Abschnitt B.15.3.3) normalisiert.

	Array	Median Intensity (unnormalized)	SNP call %	% Array outlier	% Single outlier	Warning
Patienten-Proben (Harblasenkarzinom: U; Stroma:S; Blut)	CB16_26062S	349	89.8	0.112	0.082	
	CB17_26062U	340	87	0.043	0.013	
	CB18_22452S	376	90.2	0.017	0.026	
	CB19_22452U	330	87.9	0.095	0.013	
	CB20_4418S	293	91.6	0.017	0.021	
	CB21_4418U	386	93.9	0	0.01	
	CB22_4418Blut	265	80	0.476	0.089	
	CB23_4423S	262	91.5	0.009	0.007	
	CB24_4423U	378	94.9	0.035	0.002	
	CB25_4423Blut	352	85.4	0.078	0.087	
	CB36_18223U	424	84.6	5.301	0.309	*
	CB37_11703S	375	84	0.216	0.051	
	CB38_11703U	373	93.5	0.043	0.034	
	CB39_13183S	500	96.7	0	0.01	
	CB40_13183U	482	94.6	0.026	0.025	
	CB41_22926S	476	94.9	0.052	0.016	
	CB42_22926U	436	93.6	0.026	0.039	
	CB43_26062S	653	96.3	0.017	0.006	
	CB47_26062U	798	94.3	0.035	0.004	
	CB48_19604S	557	95.8	0.009	0.008	
	CB49_4770S	573	82	0.605	0.06	
	CB50_4770U	482	92.4	0.061	0.008	
	CB51_13181S	377	87.3	0.069	0.021	
	CB52_13181U	336	77.5	3.796	0.177	
	CB53_15130S	499	96.5	0.017	0.01	
	CB54_15130U	294	93.2	0.208	0.058	
	CB55_23878S	331	96.6	0.035	0.03	
	CB56_23878U	477	97.4	0.017	0.015	
CB57_27182S	367	95.8	0.026	0.014		
CB58_27182U	378	96	0.061	0.022		

Abbildung 55: dChip Report file, Patientenproben

Die Allelbestimmungsrate der Arrays („SNP Call“, Abbildung 54 und Abbildung 55) lag zwischen 77,5 und 97,4%. Nur bei Array CB36_18223U übersteigt der Array-Ausreißer Prozentsatz (%array outlier, Abbildung 55) die 5% Grenze und ergibt deswegen eine Warnung (*, Spalte „warning“, Abbildung 55). Auch bei Array CB52_13181U ist der Prozentsatz an Array-Ausreißer erhöht, liegt aber noch unter 5%. Die Allelverteilung weicht nur bei den Arrays CB36_18223U, CB37_11703S, CB49_4770S, CB50_4770U, CB52_13181U, CB58_27182U von 1/3 Verteilung ab (Abbildung XX). Der Grund für die Verschiebung der Allelverteilung bei Array CB37_11703S und CB52_13181U ist wahrscheinlich die schlechtere „Signal-detection“ Rate. Bei Array CB49_4770S war, laut

Auskunft von Stella Kofou (Universitätsklinikum Aachen, persönliche Korrespondenz), das verwendete Stroma Material sehr wahrscheinlich mit Tumormaterial kontaminiert.

In die folgende Auswertung wurden nur die Proben mit einbezogen von denen es eine gute Hybridisierung von Normal und Tumorgewebe gab.

C.2.1.2 Abgeleitete Kopienzahlen

In den Abbildung 56 und Abbildung 57 sind die mit dem dChip Software ermittelten abgeleiteten Kopienzahlen farbkodiert dargestellt. Jede einzelne Spalte repräsentiert die Ergebnisse einer Patientenprobe. Normale Kopienzahlen erscheinen hellrot, unterrepräsentierte Regionen werden vom Farbton heller bis weiß, amplifizierte Regionen werden im Farbton intensiver bis dunkelrot. In Y-Richtung sind die SNPs entsprechend ihrer chromosomalen Position (N.B.: nicht proportional zu ihrer physikalischen Distanz) von p zu q Arm und von Chromosom 1 bis Chromosom X aufgetragen.

Obwohl es im Stromamaterial (S) keine Kopienzahlveränderungen geben sollte, sieht man nach der Auswertung der Affymetrix GeneChip® Mapping Assay mit dChip eine Vielzahl kleinerer amplifiziert erscheinender Regionen. Je größer die Region ist, die eine Kopienzahlveränderung zeigt, desto wahrscheinlicher ist es, dass es sich um ein reale Veränderung handelt. Die kleinen amplifiziert erscheinenden Regionen bei den Stromaproben scheinen falsch positive Ergebnisse zu sein. Die größeren amplifiziert erscheinenden Regionen, sowie die deletiert erscheinenden Regionen im Stromamaterial CB49_4770S, sind auf Kontamination mit Tumormaterial bei der Präparation der Proben zurückzuführen (Stella Kofou, persönliche Korrespondenz). Es ist wahrscheinlich, dass auch die größeren Amplifikationen am Chromosom 7 bei Stromamaterial CB39_13183S und an Chromosom 8 bei Stromamaterial CB53_15130S durch Kontamination bei der Präparation verursacht wurden. Im Folgenden werden die Amplifikationen und Deletionen in den Tumorproben aufgelistet.

Die visuelle Auswertung der Kopienzahlveränderungen im Tumor ergab folgende Veränderungen:

Amplifikationen:

Sechs der 12 untersuchten Patientenproben zeigten Bereiche mit Amplifikationen im Tumor. Bei zwei der Tumoren waren Regionen am Chromosom 7 (7q11.21-7q36.3 bei CB21_4418U und 7q21.3-7q36.2 bei CB54_15130) und bei zwei weiteren Tumoren Regionen am Chromosom 8 (8q11.21, 8q21.2-8q22.1 und 8q23.2 bei CB50_4770U sowie 8q13.3-8q24.3 bei CB40_13183U) betroffen.

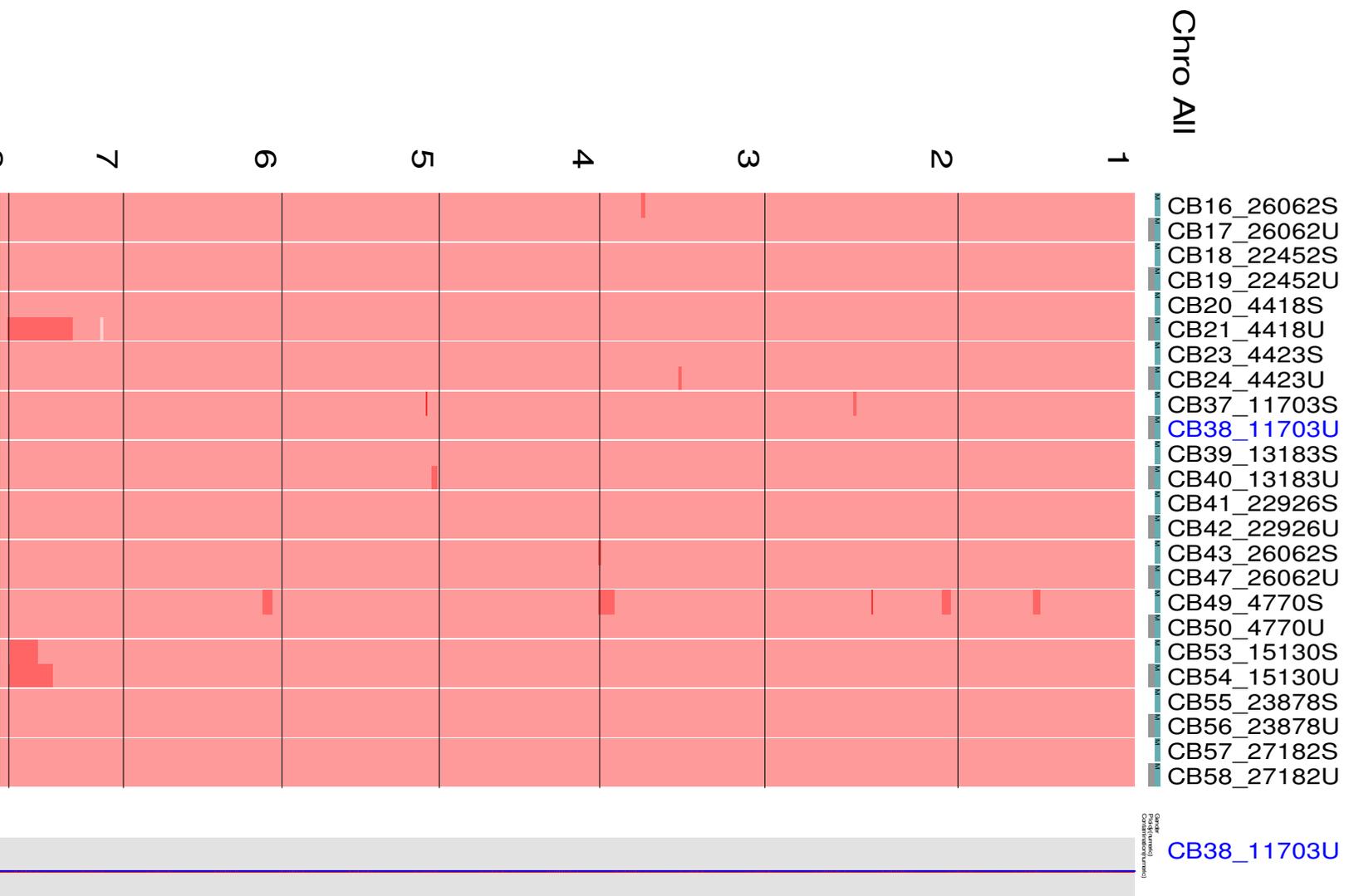


Abbildung 56: Abgeleitete Kopienzahl (dChip) der Patientenproben, Chromosomen 1-7

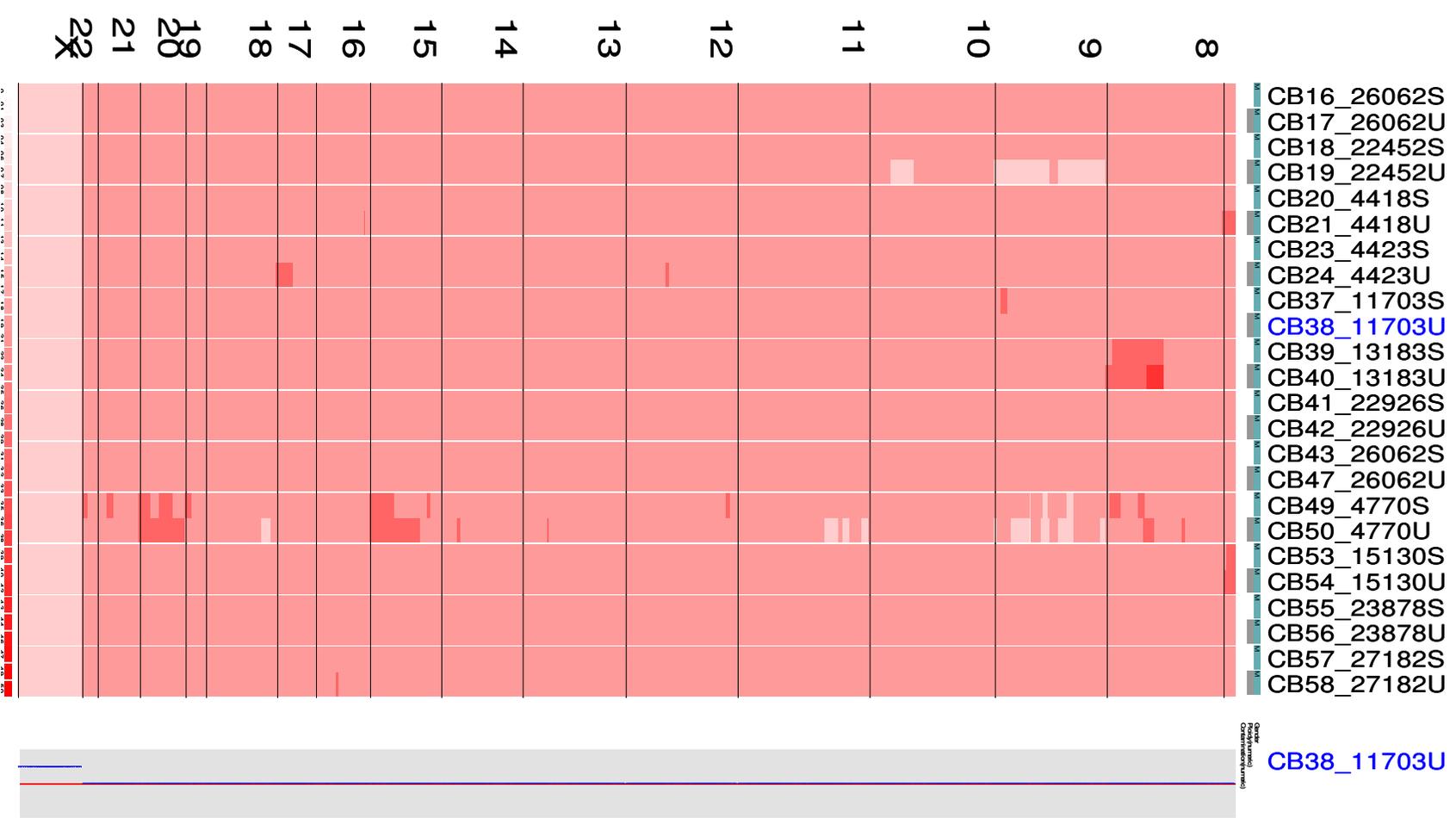


Abbildung 57: Abgeleitete Kopienzahl (dChip) der Patientenproben, Chromosomen 7-X

Größere amplifizierte Regionen gab es außerdem noch bei Tumorprobe CB50_4770U am Chromosom 15 (15q21.1-15q26.3) und am Chromosom 20 (20p13-20q13.33). Kleinere amplifizierte Regionen waren 3q11.2-3q12.11 und 17q21.33-17q25.3 bei Tumor CB24_4423U, 6p24.3, 13q31.3, 14q31.3 und 19q13.2-19q13.43 bei Tumor CB50_4770U, 5p15.33-5p15.32 bei Tumor CB40_13183U und 16q21 bei Tumor CB58_27182U.

Deletionen:

Drei der 12 untersuchten Patientenproben zeigten Bereiche mit Deletionen im Tumor. Bei zwei der Tumoren sind Regionen am Chromosom 9 deletiert (9p24.3-9p24.2, 9p21.3-9p21.1, 9q22.33-9q33.1, 9q34.11-9q34.3 bei Tumor CB50_4770U und 9p24.3-9p21.1, 9q13-9q34.3 bei CB19_22452U). Bei Tumor CB50_4770U sind darüber hinaus Regionen am Chromosom 11 (11p15.5-11p15.4, 11p15.1-11p14.3, 11p13-11p12), und Chromosom 18 (18p11.31-18p11.21), bei Tumor CB19_22452U Regionen am Chromosom 10 (10q23.1-10q25.1) deletiert. Bei Tumor CB21_4418U ist die Region 7p15.3-7p15.2 deletiert.

C.2.1.3 LOH Analyse

In Abbildung 58 bis Abbildung 61 sind die mit der dChip Software ermittelten LOH-Bereiche graphisch dargestellt. Jede einzelne Spalte repräsentiert die Ergebnisse des paarweisen Vergleichs von Normalmaterial und Tumormaterial eines Patienten. Jede einzelne Zeile entspricht einem bestimmten SNP. In Y-Richtung sind die SNPs entsprechend ihrer chromosomalen Position (N.B.: nicht proportional zu ihrer physikalischen Distanz) von p zu q Arm und von Chromosom 1 bis Chromosom X aufgetragen. Abbildung 58 und Abbildung 59 zeigt die beobachteten LOH-Werte, Abbildung 60 und Abbildung 61 die mit dem HMM abgeleiteten LOH-Werte. In den Abbildungen werden SNPs bei denen ein LOH stattgefunden hat blau kodiert, SNPs bei denen keine Veränderung stattgefunden hat, werden gelb dargestellt. Bei den beobachteten Kopienzahlen gibt es darüber hinaus nicht informative SNPs (weiß), d.h. SNPs die sowohl im Tumor als auch im Normalgewebe homozygot sind, SNPs, bei denen entweder im Tumor oder im Normalgewebe ein NoCall zugeordnet wurde (grau) und SNPs, bei denen im Tumor ein heterozygoter Zustand und im Normalgewebe ein homozygoter Zustand ermittelt wurde (rot). Das Profil am Rand der Graphik zeigt die mittlere Wahrscheinlichkeit für einen LOH in der analysierten Patientengruppe. Der Schwellenwert (rote Linie) liegt bei 0,25.

Beobachtete LOH-Werte:

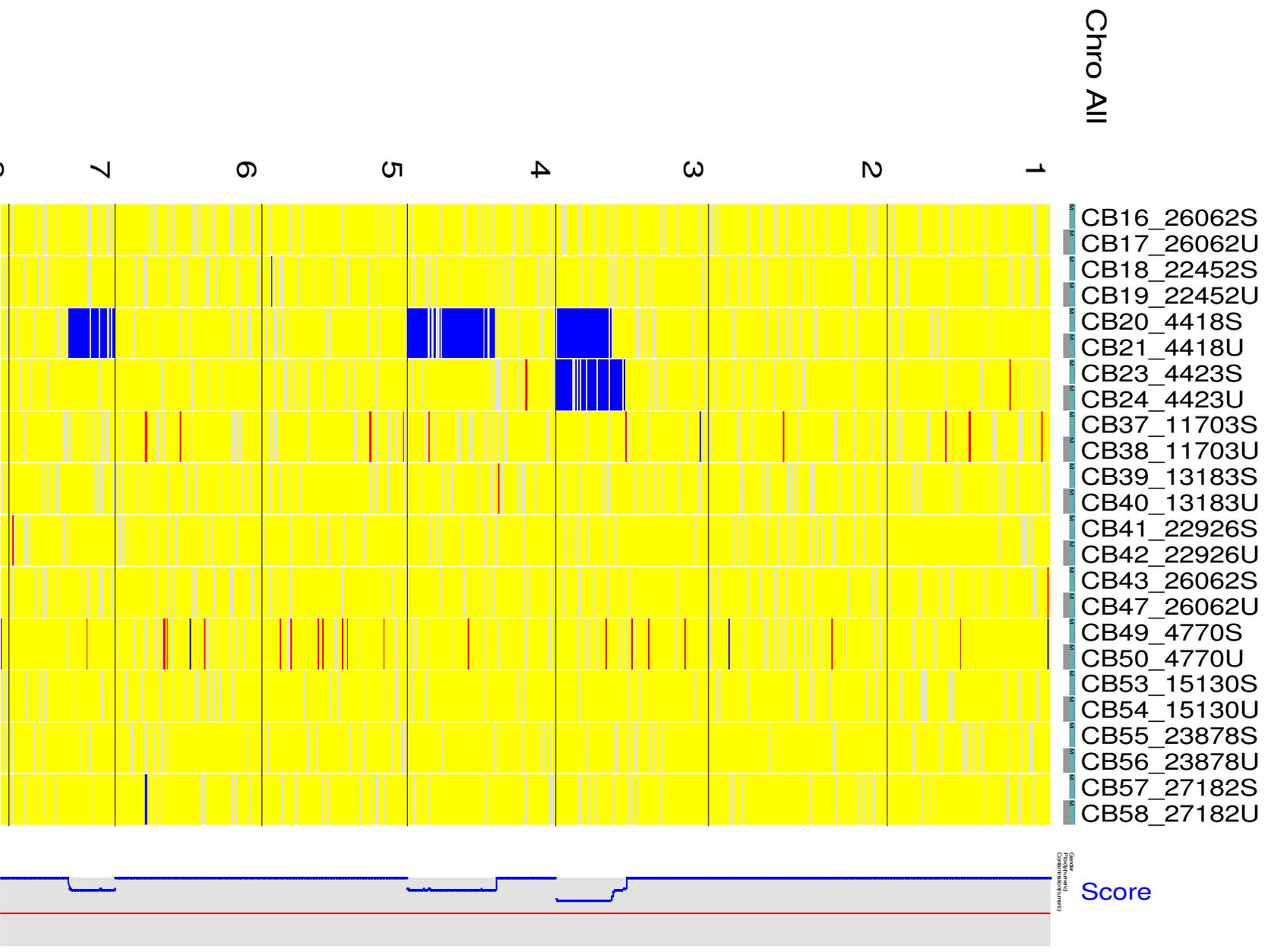


Abbildung 58: LOH Analyse der Patiententproben, Chromosomen 1-7

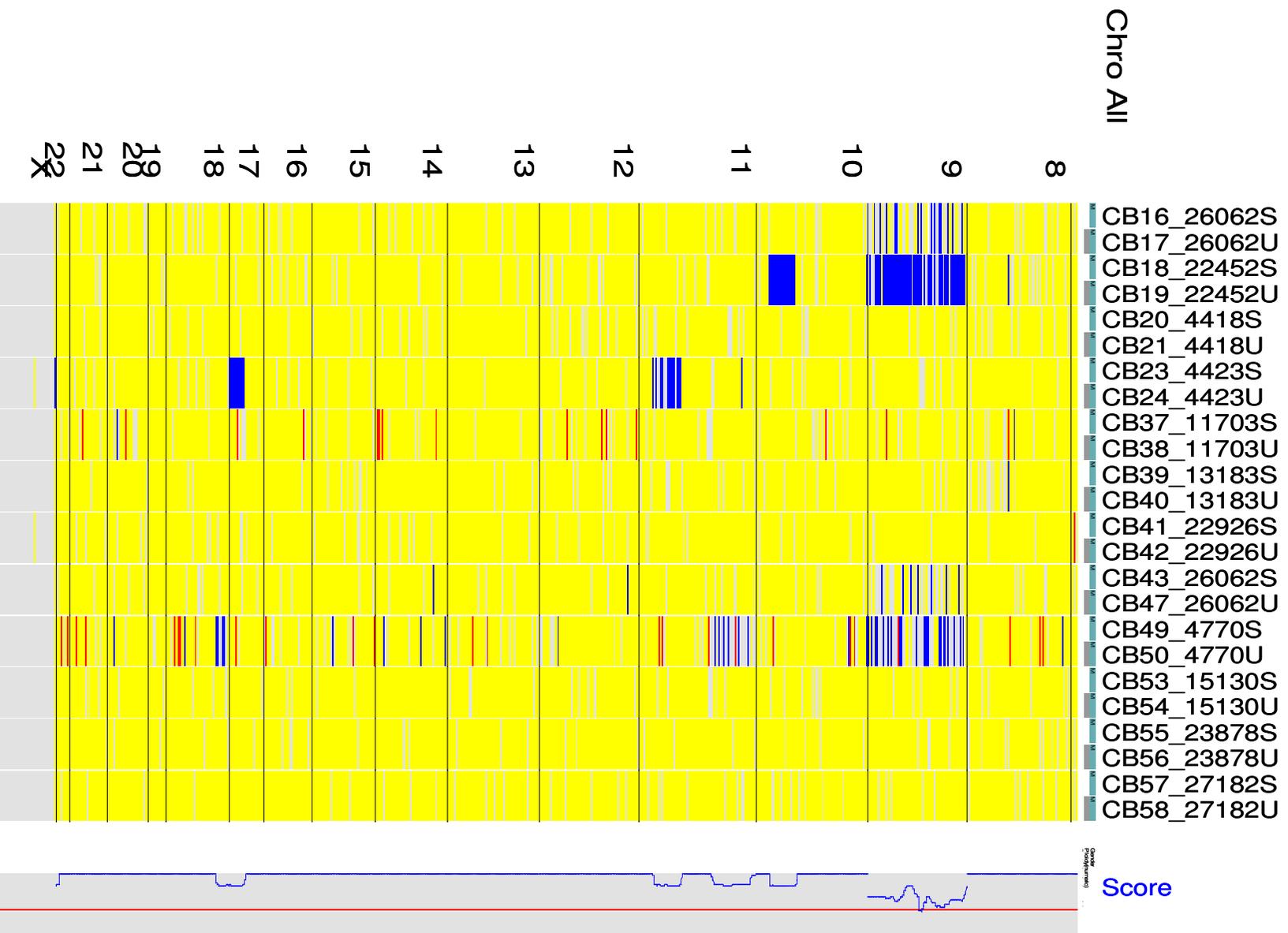


Abbildung 59: : LOH Analyse der Patientenproben, Chromosomen 7-X

Abgeleitete LOH-Werte:

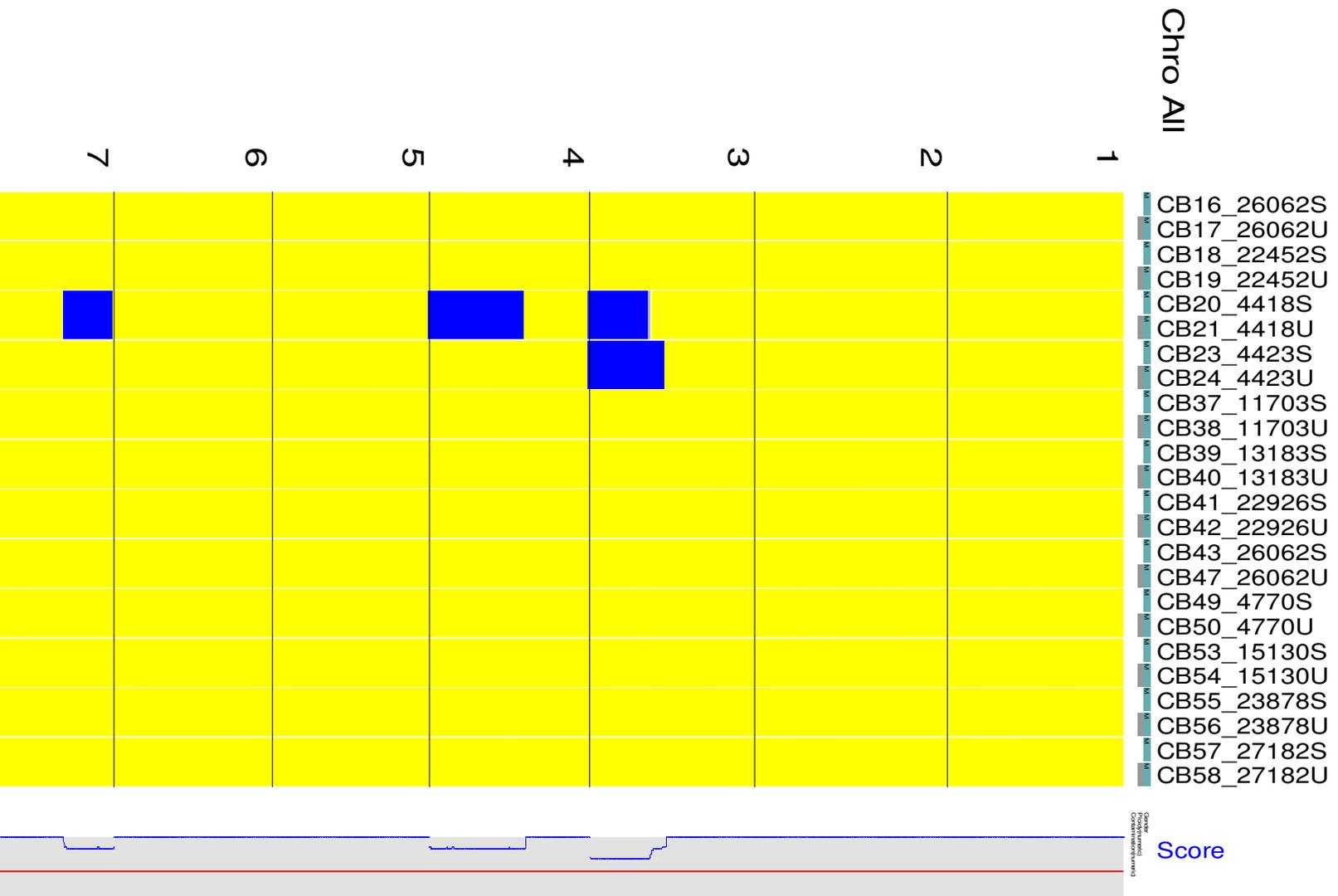


Abbildung 60 : LOH Analyse der Patientenproben, Chromosomen 1-7

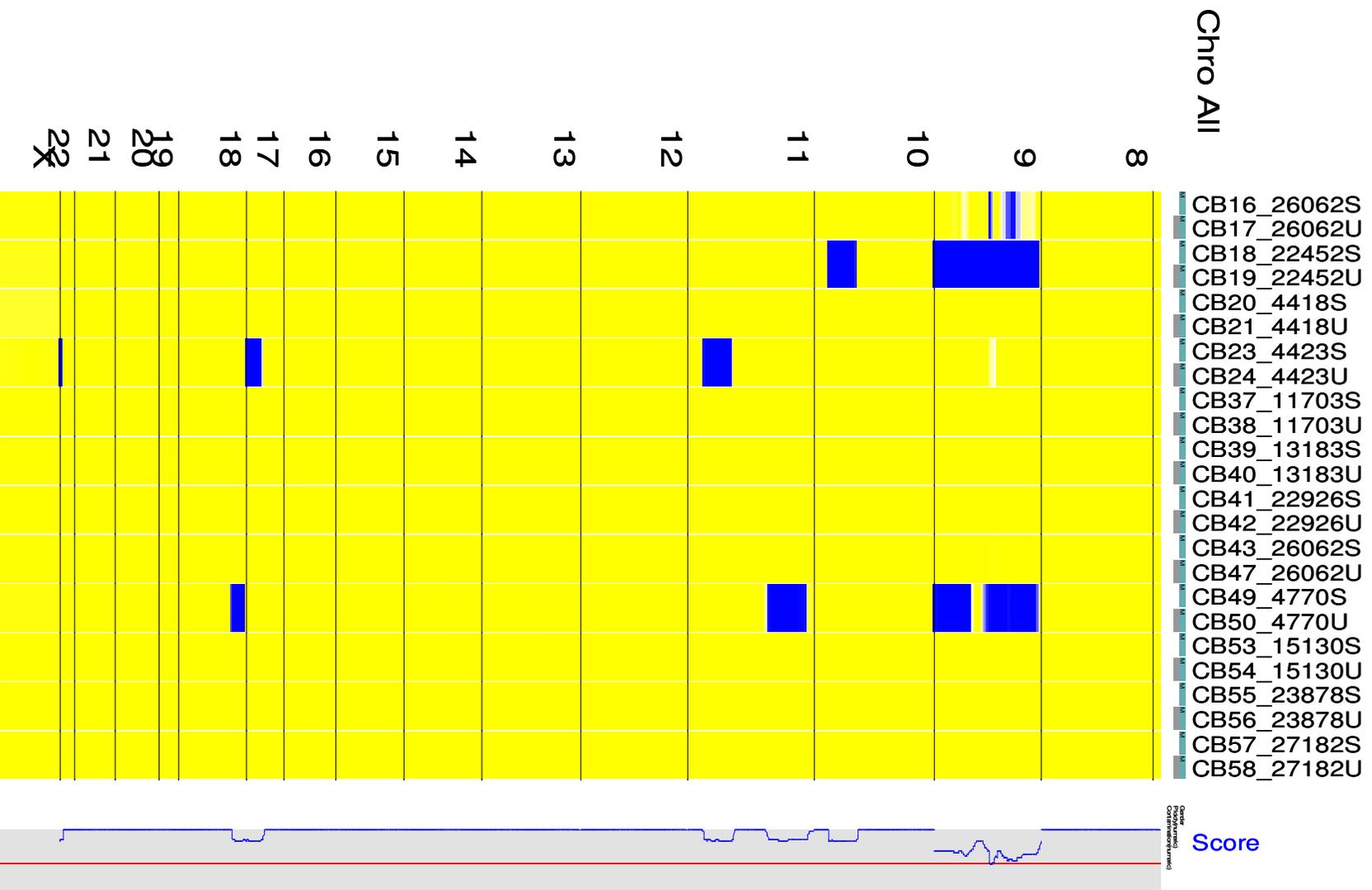


Abbildung 61: : LOH Analyse der Patientenproben, Chromosomen 7-X

Auswertung der LOH-Analyse:

Fünf der 12 untersuchten Patientenproben zeigen Bereiche mit LOH im Tumor. Am häufigsten betroffen war Chromosom 9, mit insgesamt fünf verschiedenen LOH Regionen bei drei verschiedenen Tumoren (9p23-9p21.2 und 9p13.3-9q13 bei CB17_26062U, 9p24.3-9q34.3 bei CB19_22452U, 9p24.3-9q21.33, 9q21.12-9q34.3 bei CB50_4770U). Zwei der Tumore mit LOH am Chromosom 9 besaßen noch weitere LOH Regionen auf anderen Chromosomen (10q23.1-10q25.3 bei CB19_22452U, 11p15.4-11p11.2 und 18p11.32-18p11.21 bei CB50_4770U). Die zwei Tumore ohne LOH am Chromosom 9 (CB21_4418U und CB24_4423U) besaßen eine große LOH-Region am q-Arm des Chromosom 3 (3q21.1-3q29 bei CB21_4418U und 3q13.11-3q29 bei CB24_4423U). Tumor CB21_4418U besaß darüber hinaus noch LOHs auf Chromosom 4 (4q21.21-4q35.2) und Chromosom 7 (7p22.3-7q11.21), Tumor CB24_4423U zeigte LOH-Regionen auf den Chromosomen 11 (11q21-11q23.3), 17(17q21.31-17q25.3) und 22 (22q12.3-22q13.33).

C.2.1.4 Zusammenfassung der mit dem Affymetrix GeneChip® Mapping Assays detektierten Veränderungen in frühen papillären Harnblasenkarzinomen (pTaG1)

In Abbildung 62 bis Abbildung 67 werden die Ergebnisse der Kopienzahl- und der LOH-Analyse zusammengefasst. Die vier möglichen Ereignisse, d.h. Amplifikation ohne LOH, Amplifikation mit LOH, Deletion ohne LOH und Deletion mit LOH werden, entsprechend folgendem Schema, farbkodiert dargestellt.

-  Verlust
-  Verlust+LOH
-  Gewinn
-  Gewinn+LOH
-  nur LOH

Wie die Zusammenfassung zeigt, fielen LOH Ereignisse und Deletionen häufig in dieselben Regionen. Bei den untersuchten Tumoren waren v.a. Regionen auf Chromosom 9 betroffen. Darüber hinaus gab es aber auch einige Regionen, in denen es zu einem LOH gekommen war, ohne dass sich die Kopienzahl verändert hatte. Besonders auffällig sind die großen LOH-Regionen auf 3q bei den Tumoren CB21_4418U und CB24_4423U. Tumor CB21_4418U besaß außerdem eine Region auf Chromosom 17, die amplifiziert war und gleichzeitig einen LOH zeigte.

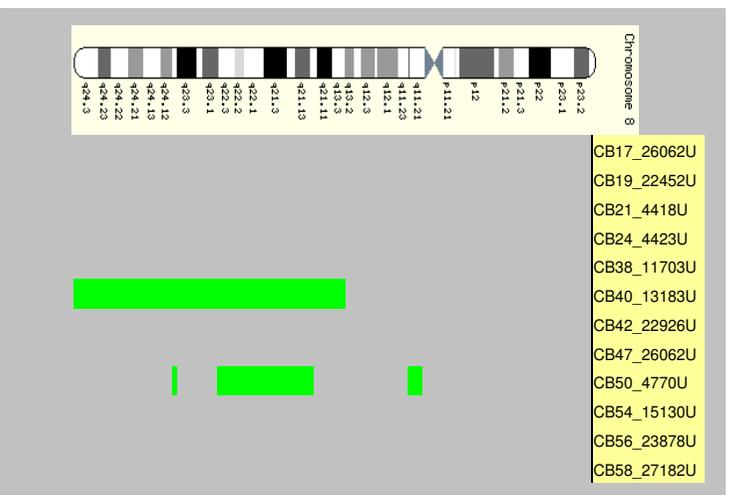
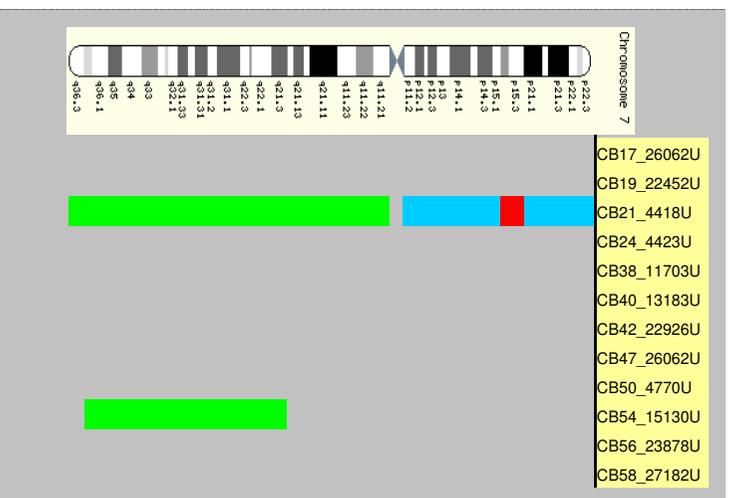
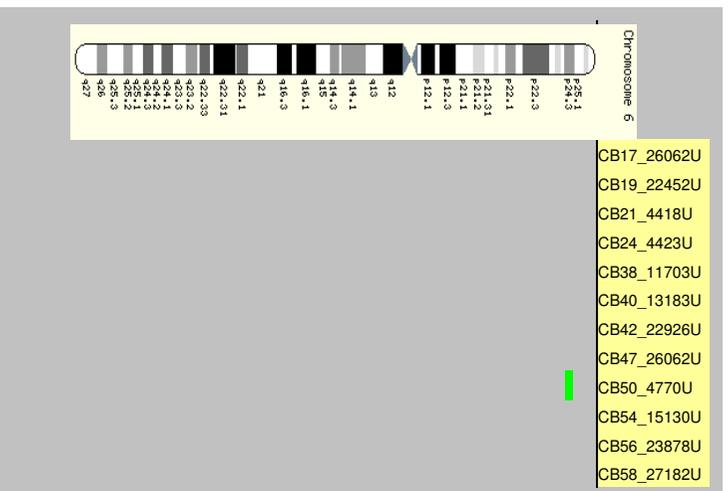
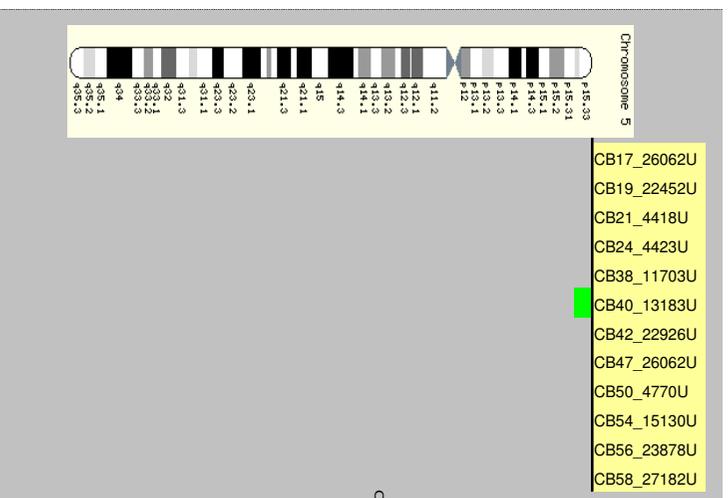


Abbildung 63: LOH und Kopienzahlveränderungen am Chromosom 5, 6, 7 und 8

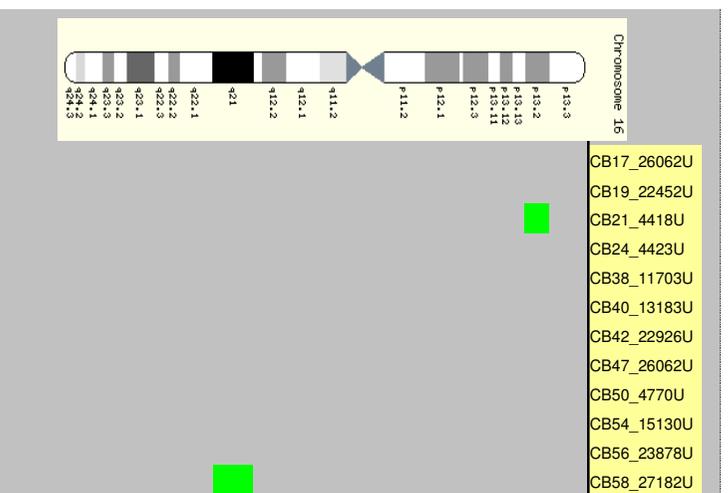
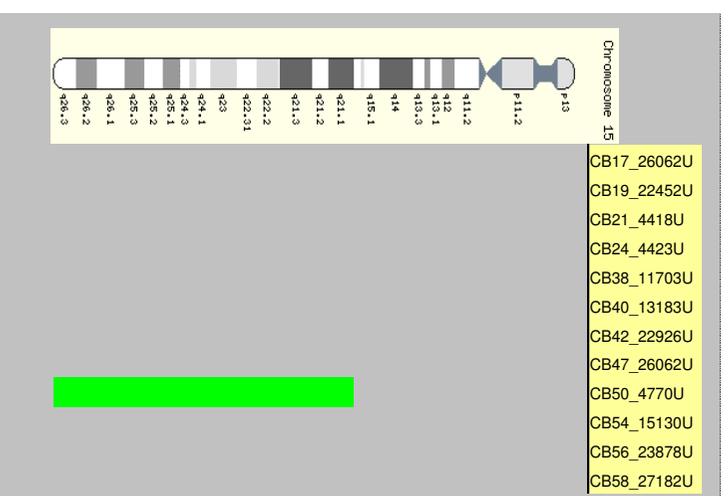
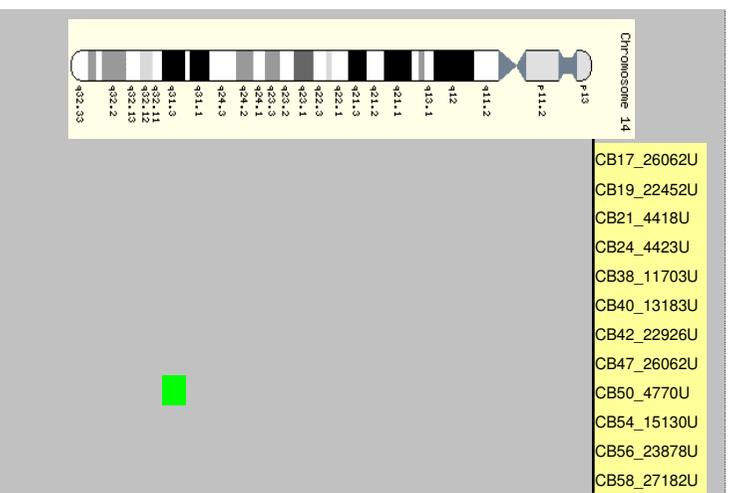
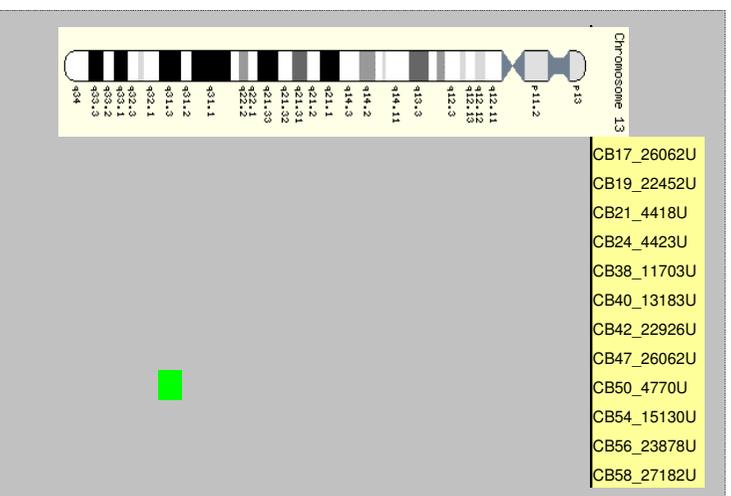


Abbildung 65: LOH und Kopienzahlveränderungen am Chromosom 13, 14, 15 und 16

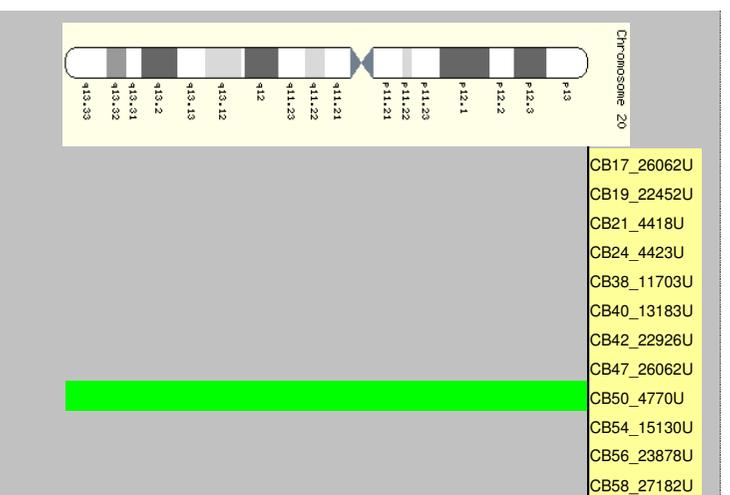
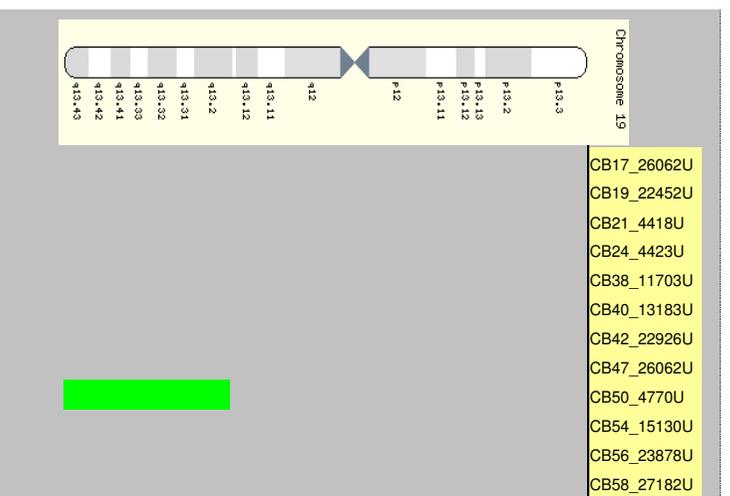
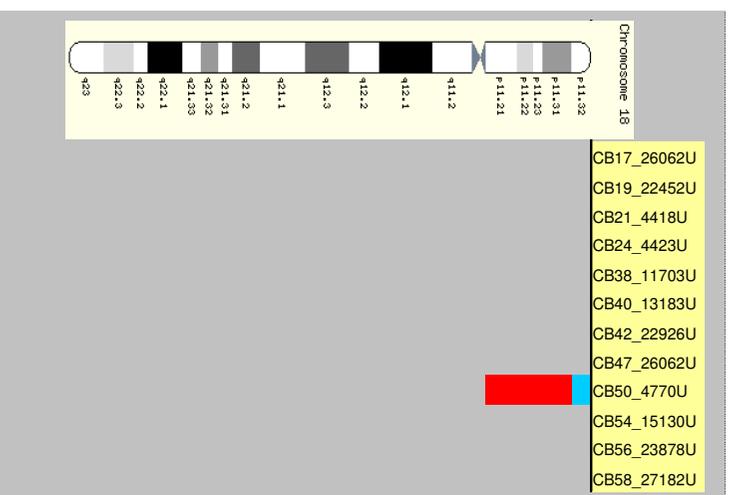
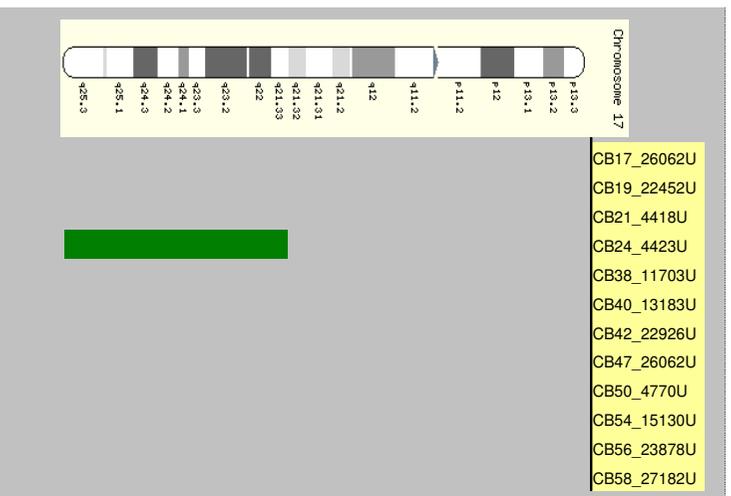


Abbildung 66: LOH und Kopienzahlveränderungen am Chromosom 17, 18, 19 und 20

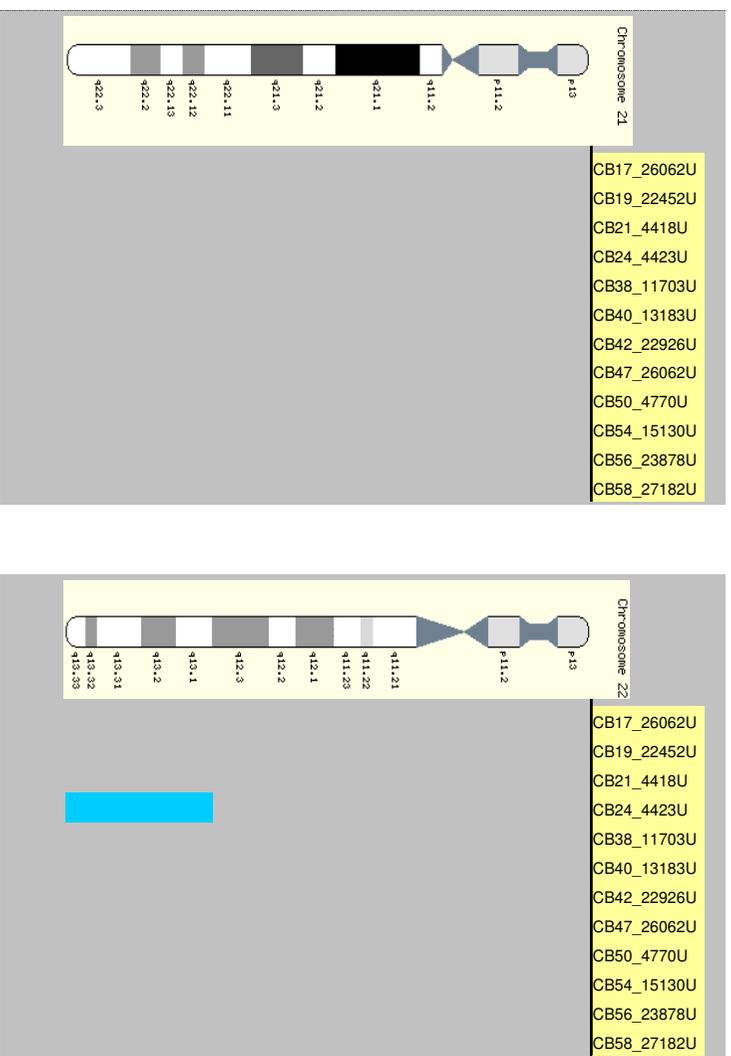


Abbildung 67: LOH und Kopienzahlveränderungen am Chromosom 21 und 22

C.2.2 Relative Quantifizierung einiger Patientenproben mit CGH

Da bei den Gewebeproben das Ploidielevel nicht bekannt war, wurde für die Analyse der CGH-Profile die Schwellenwerte für diploide Proben (oberer Schwellenwert bei 1,25, unterer Schwellenwert bei 0,75) gesetzt. Ist bei einer diploiden Probe ein Chromosom einfach überrepräsentiert ergibt sich ein Verhältnis von 3:2, d.h. 1,5. Ist ein Chromosom einfach unterrepräsentiert ergibt sich ein Verhältnis von 1:2, d.h. 0,5. Die Schwellenwerte werden generell so gewählt, dass eine einfache Über-, bzw. Unterrepräsentierung in 50% aller Zellklone detektiert werden kann, d.h. bei einer diploiden Probe 1,25 und 0,75.

C.2.2.1 Gewebeprobe CB17_26062U

Bei dem CGH-Profil von Gewebeprobe CB17_26062U war die Chromosomenregionen 9p12-9q21.3, 9q22.3 und 9q31-9q34.3 unterrepräsentiert.

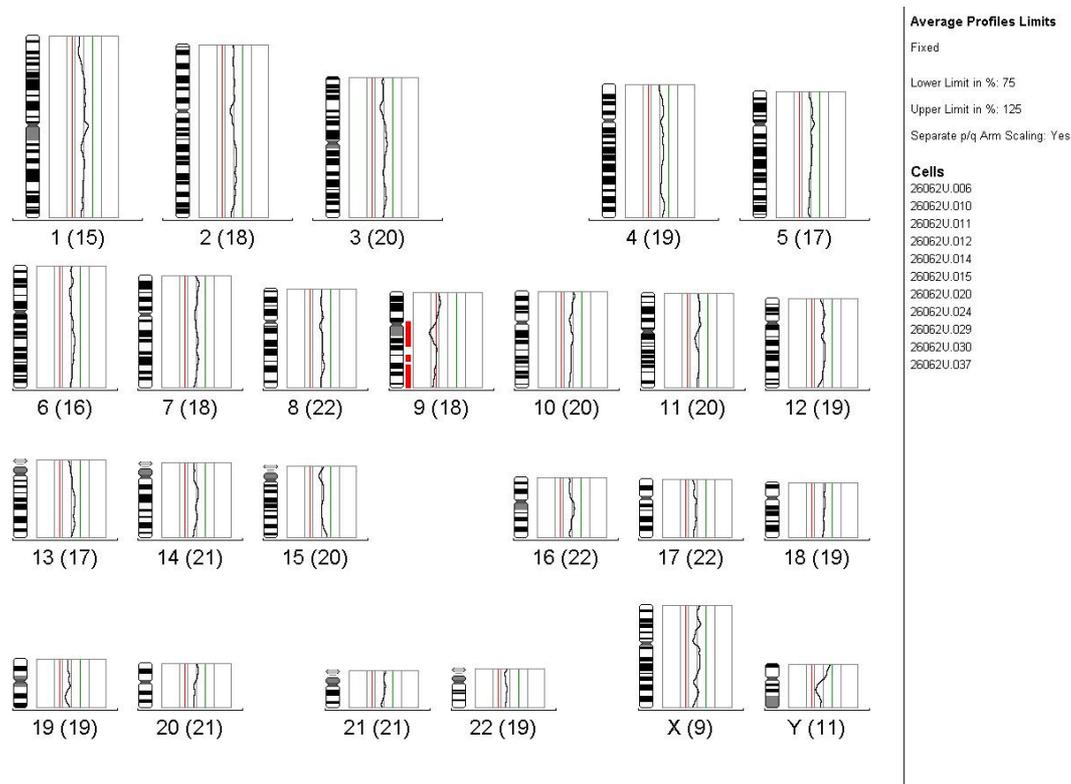


Abbildung 68: CGH-Profil de Gewebeprobe CB17_26062U, frühes Harnblasenkarzinom (pTaG1)

Diese Verminderung der Kopienzahl konnte durch die Array Daten bestätigt werden, wenn diese mit dem Affymetrix CNT ausgewertet wurden (Daten werden nicht gezeigt). Wurden die Array Daten der Gewebeprobe CB17_26062U dagegen mit dem in dChip implementierten HMM ausgewertet, war eine Verringerung der Kopienzahl am Chromosom 9 nicht sichtbar Abbildung 57.

C.2.2.2 Gewebeprobe CB21_4418U

Bei dem CGH-Profil von Gewebeprobe CB21_4418U war die Chromosomenregionen 7p15-7p13 amplifiziert und die Chromosomenregionen 7q21-7q35 unterrepräsentiert. Beide Veränderungen wurden durch die Auswertung der Array Daten mit dem in dChip implementierten HMM erfolgreich detektiert Abbildung 57.

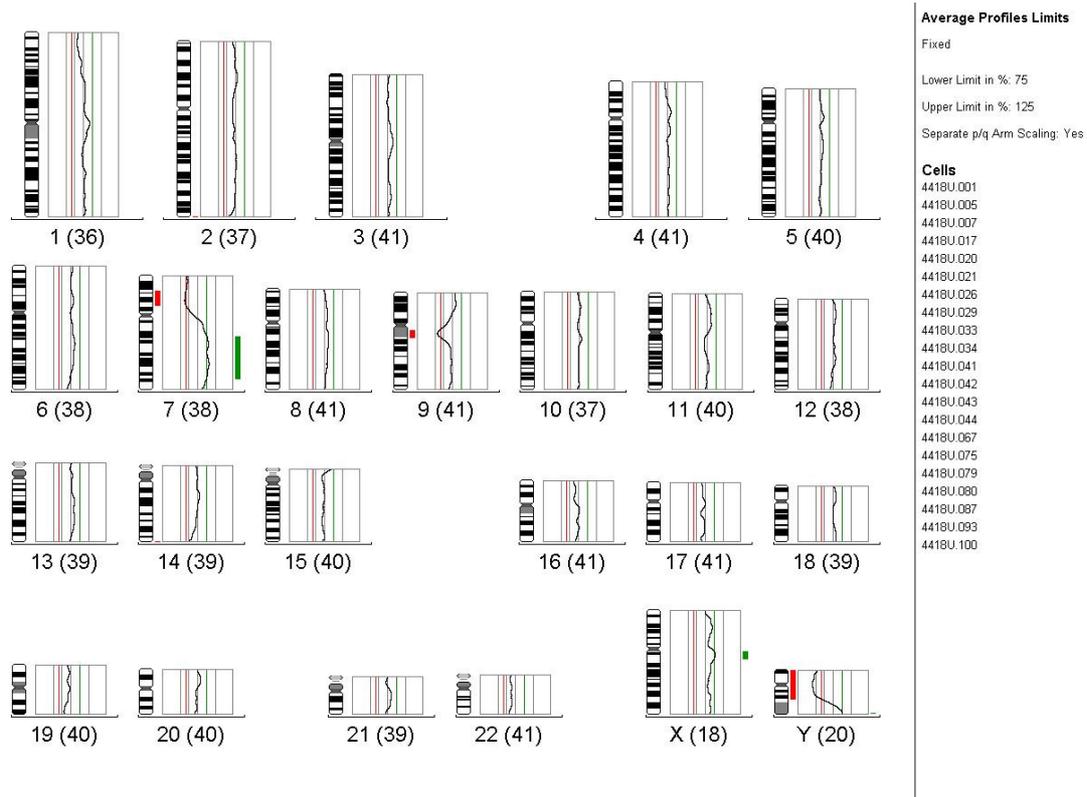


Abbildung 69: CGH-Profil de Gewebeprobe CB21_4418U, frühes Harnblasenkarzinom (pTaG1)

C.2.2.3 Gewebeprobe CB24_4423U

Bei dem CGH-Profil von Gewebeprobe CB24_4423U war die Chromosomenregionen 9p13-9q21.1, 9q21.3-9q31, 9q31-9q34.3 und 10q23.3-10q24.1 unterrepräsentiert.

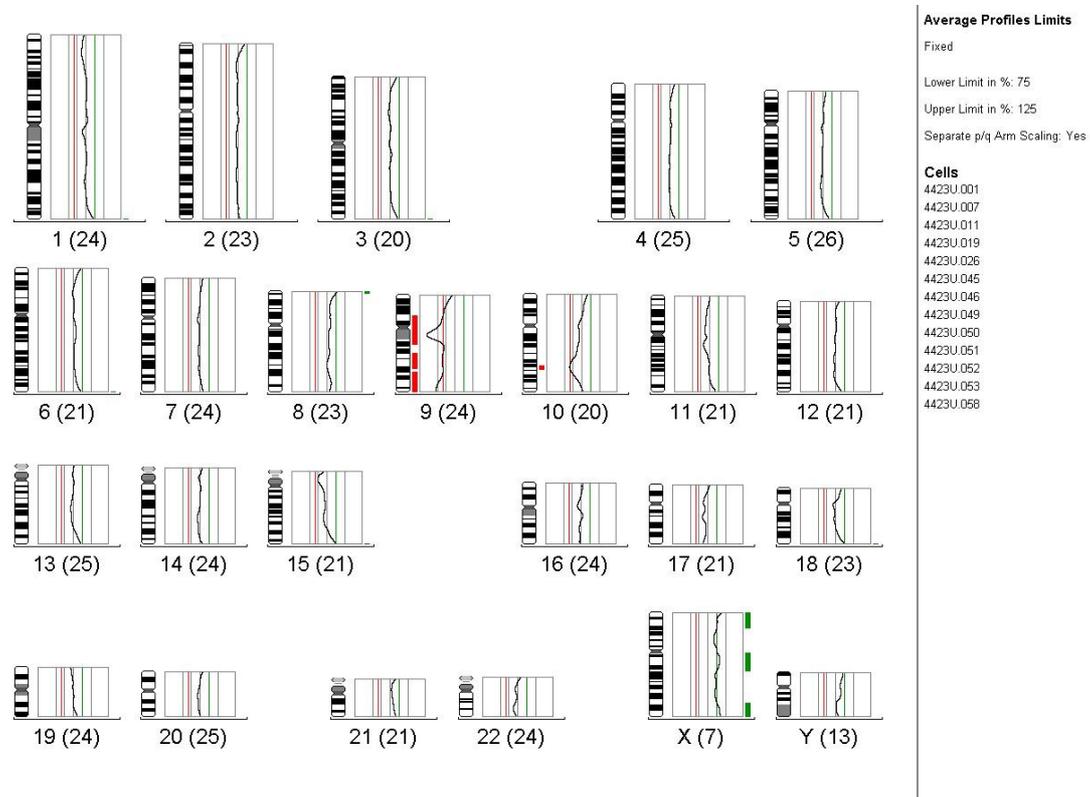


Abbildung 70: CGH-Profil der Gewebeprobe CB24_4423U, frühes Harnblasenkarzinom (pTaG1)

Die Auswertung der Array Daten mit dem CNT (Daten werden nicht gezeigt) und mit dem in dChip implementierten HMM (Abbildung 57) bestätigten übereinstimmend die Verminderung der Kopienzahl an den Chromosomen 9 und 10.

D: Diskussion

Durch Kopienzahlveränderungen im Genom einer Zelle können Onkogene aktiviert oder Tumorsuppressorgene inaktiviert werden. Diese Gene spielen meist Schlüsselrollen in Signalübertragungswegen und regulieren dadurch Zellwachstum, Proliferation, Apoptose und Metastasierung (Hanahan and Weinberg, 2000). Hinweise auf die chromosomale Lokalisation von Tumorsuppressorgenen lieferten oft homozygote Deletionen in dem entsprechenden Bereich des Tumorgenoms (Friend, 1994; Kamb et al., 1994). Onkogene wurden häufig in Regionen, welche in Tumoren amplifiziert waren, gefunden (Di Fiore et al., 1987; Little et al., 1983). Deletionen und Amplifikationen wurden oft mit zytogenetischen Methoden wie Bänderungsanalysen, M-FISH, Interphase-FISH, Chromosomen- oder Array-CGH detektiert (Speicher and Carter, 2005). Tumorsuppressorgene wurden darüber hinaus oft durch LOH-Screening von Tumor und Normalproben mit Mikrosatelliten PCR gefunden (Hoque et al., 2003). Mit Hilfe neuer hochauflösender Methoden zum Screenen von Tumoren auf tumorspezifische Kopienzahlveränderungen und tumorspezifische LOH-Regionen könnten Kandidatenregionen für neue Tumorsuppressor- und Onkogene identifiziert und diese tumorrelevanten Gene anschließend genauer charakterisiert werden (Fitzgibbon et al., 2005; Zhao et al., 2004; Zhao et al., 2005). Dadurch würde sich das Verständnis der molekularen Basis von Tumorentstehung und –progression verbessern. Wären die funktionelle Veränderungen, welche für die Transformation einer Zelle zur Tumorzelle notwendig sind, bekannt, könnte dieses Wissen zur Entwicklung einer verbesserten und früheren Diagnostik und einer zielgerichteteren Therapie genutzt werden. Neue Tumorsuppressorgene und Onkogene könnten möglicherweise sogar eine Angriffstelle für Therapeutika sein und eine bessere Therapie von Karzinomen ermöglichen.

In Harnblasenkarzinomen sind numerische Aberrationen weit verbreitet. Bisher wurden bei Harnblasenkarzinomen Aneusomien, Deletionen und Amplifikationen in beinahe allen Chromosomen beschrieben (Reznikoff et al., 2000; Wu, 2005), www.progenetix.com). Für Harnblasenkarzinome charakteristisch sind Deletionen am Chromosom 9 (Eble et al., 2004). Veränderungen am Chromosom 9 findet man schon bei sehr frühen Tumorstadien und sogar in morphologisch normal erscheinendem Urothel (Reznikoff et al., 2000; Stoehr et al., 2005; Wu, 2005). Man geht davon aus, dass die Veränderungen am Chromosom 9 die Zelle für weitere genetische Veränderungen prädispositioniert (Wu, 2005) und dadurch die Tumorprogression begünstigt. Da jedoch noch zu wenig über die genetischen Veränderungen, welche mit

den verschiedenen morphologischen Formen des Harnblasenkarzinoms assoziiert sind, bekannt ist, war es bislang noch nicht möglich eine gegebene Aberration mit Sicherheit als Ursache oder Konsequenz in der Entstehung des Harnblasenkarzinoms zu etablieren oder bestimmte Veränderungen eindeutig mit einem spezifischen Weg der Tumorgenese in Verbindung zu bringen (Wu, 2005). Zwar können mit dem UroVision-Kit von der Firma Vysis schon Zellen aus Spülurin auf numerische Veränderungen am Chromosomen 3, 7, 17 und in der Chromosomenregion 9p21 untersucht werden, die Ergebnisse aus dieser nicht invasiven Untersuchung sind bisher jedoch noch nicht aussagekräftig genug, um den Tumor genau zu klassifizieren und werden deshalb hauptsächlich für die Verlaufskontrolle nach einer Tumorresektion verwendet (Eble et al., 2004). Könnten, durch ein hochauflösendes Screenen von numerische Aberrationen und LOH-Ereignissen im Genom von Harnblasentumoren, die für die Entstehung charakteristischen Veränderungen genauer charakterisiert werden, dann könnte die invasive Diagnostik, d.h. die Resektion und anschließenden histologischen Klassifikation des Tumors, möglicherweise in Zukunft durch eine nicht-invasive Diagnostik an Zellen aus Spülurin ersetzt werden. Dem Patienten würden dadurch Unannehmlichkeiten bei der Diagnostik erspart. Wäre es darüber hinaus noch möglich, die Veränderungen im Tumorgenom mit der Tumorprogression in Zusammenhang zu bringen, dann könnte die nachfolgende Therapie genauer auf die Bedürfnisse des Patienten abgestimmt werden. Eine angepasste Therapie hätte im besten Fall sowohl weniger Nebenwirkungen als auch eine deutlich bessere therapeutische Wirkung, als die bisherigen Verfahren.

Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit mit dem Affymetrix GeneChip® Mapping Assays Harnblasenkarzinom-Zelllinien und Gewebeproben von frühen Formen des Harnblasenkarzinoms (pTaG1) auf Kopienzahlveränderungen im Genom untersucht. Der Affymetrix GeneChip® Mapping Assay wurde ursprünglich für großangelegte Kopplungs- und Assoziationsstudien entwickelt, wurde aber schon zur Analyse genomischer Imbalancen verwendet (Bignell et al., 2004; Rauch et al., 2004; Zhao et al., 2005). Bei den Gewebeproben von frühen papillären Harnblasenkarzinomen (pTaG1) wurde durch den Vergleich von Normalmaterial und Tumormaterial eines Patienten zusätzlich analysiert, ob LOH-Ereignisse bei der Tumorentstehung eine Rolle spielen.

D.1 Harnblasenkarzinom Zelllinien

Kopienzahlgewinne und -verluste bei Harnblasenkarzinom Zelllinien konnten in dieser Arbeit erfolgreich mit Hilfe des Affymetrix GeneChip® Mapping Assays detektiert werden. Die mit der Chromosomen CGH ermittelten, allgemeinen Trends zum Verlust, bzw. Gewinn in den einzelnen Zelllinien stimmten gut mit den Affymetrix GeneChip® Mapping Assay Ergebnissen überein. Zum Teil konnten die veränderten Regionen durch die Daten des Affymetrix GeneChip® Mapping Assays genauer eingegrenzt werden. In einigen Fällen wurden mit dem GeneChip® veränderte Regionen detektiert, welche durch die konventionellen Chromosomen CGH übersehen wurden.

Detektion großer genetischer Veränderungen

So wurden am Chromosom 4 bei allen Zelllinien Kopienzahlverluste über die gesamte Länge des Chromosoms (BC3C, Cal29, SW1710 und T24) oder bei einzelnen Regionen (4q27-4q35 bei EJ28, 4q33-4q35 bei HT1376) festgestellt. Bei der Zelllinie Cal29 konnte mit dem Array ein leichter Verlust des gesamten Chromosom 4 detektiert werden, welcher durch die Chromosomen CGH nicht angezeigt wurde. Die Auswertung der Array Daten von Zelllinie Cal29 mit dem CNT zeigte, dass das gesamte Chromosom 4 unterrepräsentiert war. Die distale 4q-Region und eine kleine Region im p-Arm schienen stärker unterrepräsentiert zu sein als der Rest des Chromosoms. Die M-FISH Analyse der Zelllinie bestätigte zum einen, dass in den untersuchten Metaphasen ganze Kopien von Chromosom 4 verloren gegangen waren, zum anderen, dass bei den verbleibenden Chromosomen 4 häufig die Region 4q31 bis 4q35 deletiert war, d.h. dass diese Region stärker unterrepräsentiert war als der Rest von Chromosom 4. Mit der Chromosomen CGH wäre bei Zelllinie Cal29 dagegen nur ein Verlust an den Chromosomenenden detektiert worden. Das CGH-Profil überschritt den Schwellenwert für eine Deletion in mindestens 50% der Zellen (du Manoir et al., 1995) nur an den Chromosomenenden (4p und 4q27-4q35), war jedoch über die gesamte Länge des Chromosoms nach links verschoben. Man kann also davon ausgehen, dass bei Zelllinie Cal29 die Kopienzahl über die ganze Länge des Chromosom 4 vermindert ist aber nur in der Region 4q mehr als 50% der Zellklone von dem Verlust betroffen sind. Bei Zelllinie Cal29 konnte also durch den Affymetrix GeneChip® Mapping Assay eine Deletion in weniger als der Hälfte der Zellklone detektiert werden, welche durch die CGH Analyse übersehen worden wäre.

Auch bei Zelllinie HT1376 konnte mit dem Affymetrix GeneChip® Mapping Assay ein Verlust am Chromosom 8 detektiert werden, welcher in weniger als 50% der Zellklone

vorkommt. Das CGH-Profil überschritt auch in diesem Fall den Schwellenwert für eine Amplifikation, bzw. Deletion über die ganze Länge des Chromosom 8 nicht. Die Array Daten lieferten jedoch den Hinweis, dass bei Zelllinie HT1376 der p-Arm von Chromosom 8 unterrepräsentiert ist und darüber hinaus eine Region zwischen 8q11 und 8q24 amplifiziert ist. Bei genauer Betrachtung wird deutlich, dass das CGH-Profil in diesen Bereichen jeweils leicht nach links (Deletion, 8p), bzw. rechts (Amplifikation, 8q11-8q24) verschoben ist; d.h. die allgemeinen Tendenzen der Array und CGH Daten stimmen auch in diesem Fall gut miteinander überein. Die Veränderungen wären jedoch mit der CGH alleine nicht erkannt worden. Leider lieferte die M-FISH Analyse in diesem Fall keine eindeutige Aussage über mögliche Gewinne oder Verluste von Chromosom 8 Material. Bei Zelllinie HT1376 konnten in jedem Klon eine große Vielzahl verschiedener struktureller Umbauten, oft mit Beteiligung von Chromosom 8 Material, detektiert werden. Das Chromosom 8 Material konnte bei diesen Umbauten meist nicht eindeutig einer bestimmten chromosomalen Region zugeordnet werden. Die M-FISH Analyse zeigt aber, dass die Zelllinie HT1376 eine sehr heterogene Tumorzelllinie ist, welche sich aus vielen verschiedenen Klonen zusammensetzt und keine dominierenden strukturellen Aberrationen besitzt. Deswegen ist es sehr wahrscheinlich, dass der durch die Array Daten angezeigte Verlust von 8p und der Gewinn von 8q11 bis 8q24 in weniger als 50% der Zellen stattgefunden haben und deswegen nicht mit der CGH detektiert werden konnten.

Außer den Veränderungen am Chromosom 8 konnte bei Zelllinie HT1376 durch die Auswertung der Affymetrix GeneChip[®] Mapping Assays mit dem CNT ein moderater Verlust in der Region 9p detektiert werden. Das CGH-Profil ist auch in diesem Fall leicht nach links, d.h. Richtung Deletion verschoben, überschreitet jedoch den Schwellenwert nicht. Durch BAC-Hybridisierung konnte eine Verminderung der Kopienzahl in der Region 9p21.3 bestätigt werden. Auch in diesem Fall konnte mit dem Gene Chip eine Veränderung detektiert werden, welcher durch die Chromosomen CGH übersehen worden wäre.

Die Chromosomen CGH besitzt einige methodische Limitationen, die durch die Hybridisierung auf einen Oligonukleotid-Array umgangen werden, so dass das gesamte Genom mit sehr hohem Auflösungsvermögen auf Veränderungen untersucht werden kann. Es können z.B. mit der CGH numerische Veränderungen in der Nähe von heterochromatin-reichen Bereichen, wie z.B. dem Zentromer und dem Telomer, oft nicht zuverlässig charakterisiert werden, da das CGH Profil oft einen Knick macht (du Manoir et al., 1995). Bei dem Vergleich von Array Daten und CGH Daten fällt auf, dass gerade bei Veränderungen in der Nähe von Zentromer, bzw. Telomer die Grenze der

Veränderungen mit dem Gene Chip deutlich besser bestimmt werden konnte. So wurde z.B. am Chromosom 8 der Zelllinie EJ28 durch Chromosomen CGH nur ein relativer Verlust des p-Arms festgestellt. Die Analyse der Array Daten zeigte, dass der deletierte Bereich größer war als von der CGH angegeben und, dass zusätzlich zum p-Arm der Zentromer nahe Bereich des q-Arms unterrepräsentiert war. Mit dem Affymetrix GeneChip[®] Mapping Assays konnte die genaue Grenze der Veränderung in der Bande 8q12 lokalisiert werden.

Auf der anderen Seite ist die Chromosomen CGH eine gut etablierte Methode und liefert sehr reproduzierbare Daten, d.h. sehr zuverlässige Ergebnisse. Wenn man die CGH Daten mit den Array Daten vergleicht, fällt auch auf, dass bei der Auswertung der Array Daten mit dChip teilweise große Blöcke mit Veränderungen nicht eindeutig festgestellt werden konnten. Während die CGH deutlich eine große veränderte Region detektierte, wurden mit dem Array in einigen dieser Bereiche nur mehrere kleine veränderte Regionen gefunden (Darstellung der abgeleitete Kopienzahlen, dChip), so z.B. bei dem verminderten Bereiche am Chromosom 4 bei Zelllinie SW1710 und HT1376, sowie diversen Regionen bei Zelllinie T24. Bei Zelllinien BC3C, Cal29 und EJ28 stimmen CGH und Array Daten in den große veränderten Bereichen dagegen weit besser überein. Untersuchungen von Mamakarzinom Proben mit Array CGH haben zwar gezeigt, dass sich in einer 2 Mb großen Region in der Bande 20q13.2 zum Teil mehrere kleine Amplifikationsregionen mit tumorrelevanten Genen befinden können (Albertson et al., 2000). Es wäre also denkbar, dass bei den mit in dieser Arbeit untersuchten Harnblasenkarzinom Zelllinien durch den Array aufgrund seines besseren Auflösungsvermögen kleinere deletierten Blöcke erkannt werden können, während bei der CGH kann der Unterschied nicht mehr aufgelöst werden kann.

Bei den, in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien ist es jedoch wahrscheinlicher, dass es sich bei der Unterteilung großer veränderter Regionen in kleinere Blöcke um Artefakte handelt, die durch die Auswertung der Daten eingeführt werden. Die Hybridisierungsqualität selber scheint dabei nicht ausschlaggebend zu sein, da z.B. die „Signal-Detektion“-Rate von Zelllinie T24 höher war, als die von Zelllinie EJ28 (Abbildung 29). Trotz der z.T. besseren Hybridisierungsqualität erscheint das Rauschen der ermittelten Kopienzahlen bei den Arrays der Zelllinien HT1376, SW1710 und T24 höher als bei den anderen Zelllinien (Ansicht beobachtete Kopienzahl, dChip und CNT). Da bei der Analyse der Daten mit dem „Hidden Markov Model“ (beobachtete Kopienzahlen, dChip) auch die Kopienzahlen der Nachbar-SNPs mit berücksichtigt werden (HMM, Abschnitt B.15.3.3) zerfällt bei einem starken Rauschen der Daten eine große veränderte Region in mehrere kleine Regionen. Bei den

Zelllinien HT1376, SW1710 und T24, fällt auf, dass sie alle einen Array-Ausreißer Prozentsatz von 3,0-4,8% (Abschnitt C.1.3.2) haben, während er bei den Arrays der anderen Zelllinien unter 1% liegt. Es wäre also möglich, dass die Array Ausreißer die Auswertung der Daten beeinflussen und zu dem starken Rauschen der Daten führen. Offensichtlich sind die Software Tools für die Auswertung der Affymetrix GeneChip® Mapping Assay Daten noch nicht gut genug an die Bedürfnisse einer Kopienzahlanalyse angepasst.

dChip vs. Affymetrix CNT

Ein weiterer Beleg für die Verbesserungswürdigkeit der Analyse Software ist, dass die Auswertung der Array Daten mit dChip zum Teil ganz andere Resultate lieferte, als die Auswertung der Daten mit dem CNT und der CGH. In der Ansicht der abgeleitete Kopienzahlen (dChip) bei Zelllinie Cal29 erschien z.B. nur eine kleine Region in 4q unterrepräsentiert. Bei der Auswertung mit dem CNT erschien dagegen das gesamte Chromosom unterrepräsentiert und die Chromosomenenden stärker unterrepräsentiert als die Chromosomenmitte, was gut mit den Ergebnissen der CGH übereinstimmt (s.o.).

Während es bei der Zelllinie Cal29 nur in wenigen Regionen die Kopienzahl mit dem CNT besser bestimmt werden konnte als mit dChip, stimmten bei Zelllinie T24 die mit dChip ermittelten Tendenzen zu Kopienzahlgewinnen und –verlusten an fast allen Chromosomen nicht mit den CNT und CGH Ergebnissen überein. Bei der Auswertung der Arraydaten mit dChip scheint es zu einem systematischen Fehler gekommen zu sein. Bei Zelllinie T24 erschienen Regionen nach der Analyse mit dem HMM von dChip im Allgemeinen amplifiziert (z.B. 8q, 9q) obwohl sie bei der Auswertung mit dem CNT und in der CGH übereinstimmend als normal repräsentiert detektiert wurden. Bei CGH und CNT unterrepräsentierte Regionen erschienen bei der beobachteten Kopienzahl (dChip) normal repräsentiert zu sein (z.B. 8p, Chromosom 4, 9p). Amplifizierte Regionen erschienen bei beiden Auswertungen amplifiziert, wobei das CNT noch zwischen schwach amplifizierten und stark amplifizierten Regionen unterschied, dChip jedoch nicht (z.B. Chromosom 20 p- vs. q-Arm). D.h. die von dChip ermittelten Kopienzahlen scheinen bei der Zelllinie T24 systematisch zu hoch bestimmt worden zu sein.

Da sowohl das Affymetrix CNT als auch das dChip Programm auf dieselben Rohdaten zurückgreifen um die Kopienzahlen abzuleiten, scheint der Grund für den Fehler bei der Analyse der Array Daten von Zelllinie T24 nicht in einer mangelhaften Qualität der Array Daten zu liegen. Die beiden Programme unterscheiden sich jedoch in der Art und

Weise, wie sie die Array Daten auswerten. Während bei dem Affymetrix CNT z.B. die Rohdaten mit den 133 Referenzhybridisierungen von Affymetrix verglichen werden, können bei dChip vom Benutzer individuell zusammengestellte Referenz-Datensätze für den Vergleich verwendet werden (www.dchip.org). Verschiedene Arbeitsgruppen haben unabhängig voneinander die Erfahrung gemacht, dass die verwendeten Referenzen einen ganz entscheidenden Einfluss auf die Qualität der Kopienzahlanalyse haben. Deswegen verwenden einige Arbeitsgruppen für die Analyse mit dChip nur Referenzdatensätze, die am selben Tag hybridisiert wurden wie die zu testenden Arrays (Michael Speicher, persönliche Korrespondenz). Aus Zeit und Kostengründen kann in diesem Fall aber nur ein sehr kleiner Referenzdatensatz für die Analyse benutzt werden, was wiederum die Analyse weniger solide macht. Außer den unterschiedlichen Referenzdatensätzen, nutzen beide Programme auch unterschiedliche Algorithmen, um die Kopienzahl abzuleiten. Bei dem Affymetrix CNT werden die Kopienzahlen mit einer Gradengleichung abgeleitet, in welche die Signalintensität des SNPs und der Mittelwert des Referenzdatensatzes, sowie eine empirisch ermittelte Steigung und ein empirisch ermittelter Y-Abschnitt eingehen (Huang et al., 2004). Bei dChip werden die Daten in einem ersten Schritt gegeneinander normalisiert, wobei die unterschiedlichen Signalintensitäten der Arrays ausgeglichen werden. Die Normalisierungsfunktion wird dabei für jeden Array individuell bestimmt und zwar basierend auf einzelnen Probensets, die sich im Vergleich zum „baseline array“ im selben Bereich befinden (Zhao et al., 2004). Für die Kopienzahlanalyse wird danach, mit Hilfe der vom Benutzer festgelegten Referenzhybridisierungen, eine Signalintensität für zwei Kopien ermittelt. Die beobachtete Kopienzahl eines SNPs wird aus dem Verhältnis von Signalintensität von Test zu Mittelwert der Referenz ermittelt. In die Berechnung der abgeleiteten Kopienzahlen bei dChip geht außerdem die Standardabweichung der Referenzen mit ein, sowie die Kopienzahl der Nachbar-SNPs (Zhao et al., 2004). Da sowohl die mit dChip beobachteten Kopienzahlen, als auch die abgeleiteten Kopienzahlen bei Zelllinie T24 den systemischen Fehler aufweisen, die Kopienzahlen der anderen Zelllinien mit dChip aber zum Großteil gut bestimmt werden konnten, scheint der Fehler bei der Analyse der Array Daten von Zelllinie T24 durch die Normalisierung der Daten zustande gekommen zu sein.

Möglicherweise kommt diese Problem bei dChip daher, dass das Programm eigentlich für die Analyse von Expressionsarrays entwickelt wurde. Mapping Array und Expressionsarray unterscheiden sich jedoch in einigen wesentlichen Punkten. So zielen die Oligonukleotidsonden des Expressionsarrays z.B. auf komplett

unterschiedliche Regionen innerhalb eines Gens, während die Oligonukleotidsonden des Mapping Arrays alle auf dieselbe, den SNP überspannende Region zielen. Die Hybridisierung der einzelnen, zu einem Gen korrespondierenden Oligonukleotide geschieht deswegen beim Expressionsarray unabhängig voneinander, während die Reaktionen der 40 zu einem SNP korrespondierenden Oligonukleotide beim Mapping Array voneinander abhängig passieren (Jürgen Cox, persönliche Korrespondenz). Unter anderem haben dadurch Kreuzhybridisierungen einen viel stärkeren Einfluss auf die Mapping Array Daten, als auf die Daten der Expressionsarrays. Außerdem wird bei den Mapping Arrays, um die Komplexität des Genoms zu reduzieren und unspezifische Hybridisierung zu minimieren, durch Xba-Verdau und Größen-selektiver PCR eine Repräsentation des Genoms hergestellt und nur diese auf den Array hybridisiert. Bei den Expressionsarrays ist es nicht notwendig, sozusagen künstlich, eine Repräsentation herzustellen, da die exprimierten Sequenzen im Genom schon für sich eine natürliche Auswahl darstellen und es daher nicht zu einem Problem mit repetitiven Sequenzen kommen kann. Bei der Mapping Array Hybridisierung kann es zu Artefakten kommen wenn die Zusammensetzung der Genomrepräsentation beim Mapping Array verändert wird. So konnten Sebat und Kollegen z.B. bei dem selben Individuum verschiedene Kopienzahlveränderungen detektieren, indem sie unterschiedliche Restriktionsenzyme verwendeten, dadurch unterschiedliche Genomrepräsentationen herstellten und diese anschließend auf einen Oligonukleotid Array hybridisierten (Sebat et al., 2004). In situ kann die Zusammensetzung der Genomrepräsentation z.B. beeinflusst werden, indem durch strukturelle Umbauten im Genom Xba-Schnittstellen verloren gehen oder dazu gewonnen werden und dadurch einzelne Fragmente bei der Größen-selektiven PCR nicht mehr oder zusätzlich amplifiziert werden. Beim Expressionsarray spiegelt ein Unterschied in der Zusammensetzung der Sequenzen, die hybridisiert werden, dagegen den aktuellen Zustand der Zelle wieder.

Die Zusammensetzung der Genomrepräsentation, welche auf den Array hybridisiert wird, kann auch durch natürlich vorkommende Keimbahn Polymorphismen beeinflusst werden (Sebat et al., 2004). Durch Polymorphismen kann die Länge der zwischen den Restriktionsschnittstellen liegenden Regionen verändert werden, so dass bei der Größen-selektiven PCR einzelne Fragmente nicht mehr oder zusätzlich amplifiziert werden. Das Ausmaß von natürlich vorkommenden Keimbahn Polymorphismen ist bisher noch nicht bekannt. Aktuelle Studien belegen jedoch, dass Polymorphismen im Genom weit verbreitet sind und ihre Anzahl bisher deutlich unterschätzt wurde (Iafraite et al., 2004; Sebat et al., 2004; Sharp et al., 2005; Tuzun et al., 2005). Diese natürlich

vorkommenden Kopienzahlvariationen sind wahrscheinlich mit Unterschieden im Phänotyp und möglicherweise sogar mit der Prädisposition für verschiedene Krankheiten assoziiert (Speicher and Carter, 2005).

Trotz der bisher erwähnten Schwierigkeiten bei der Auswertung der Array Daten mit dChip, besitzt das Programm einige wesentliche Vorteile gegenüber dem Affymetrix CNT. So besitzt dChip u.a. deutlich bessere Möglichkeiten die Daten graphisch darzustellen. So können z.B. die Array Daten im Zusammenhang mit einem Ideogramm der Chromosomen darstellen und so der direkte graphischen Bezug zu den Chromosomenbanden hergestellt werden. Darüber hinaus können mit dChip die Array Daten nicht nur einzeln sondern ganze Datensätze gleichzeitig dargestellt werden. Dadurch können die Ergebnisse verschiedener Hybridisierungen überblickt und miteinander verglichen und z.B. gemeinsame Veränderungen bei verschiedenen Patienten sichtbar gemacht werden. Mit dem Affymetrix CNT sind auch keine weiterführenden statistischen Analysen und kein direkter Vergleich von Tumor und Normalmaterial möglich. Es wäre wünschenswert, die statistischen Tools weiter zu entwickeln und sie noch besser auf die Bedürfnisse der Kopienzahlanalyse mit dem Affymetrix GeneChip[®] Mapping Assays abzustimmen.

Detektion kleiner genetischer Veränderungen

Jedoch konnten in dieser Arbeit durch den Affymetrix GeneChip[®] Mapping Assay auch mit den bisher verfügbaren Analysetools kleine Regionen mit numerischen Aberrationen erfolgreich detektiert werden. Bei Zelllinie BC3C konnte z.B. eine maximal 680 kb große Deletion am Chromosom 9 detektiert werden. Der Verlust der Region 9p21.3 mit dem Tumorsuppressorgen p16 konnte mit der konventionellen Chromosomen-CGH nicht festgestellt werden. Die genauere Analyse dieser Region mit BAC-FISH und qPCR bestätigte, dass die Region 9p21.3 bei der Zelllinie BC3C deletiert ist. Weil einer der hybridisierten BACs jedoch ein widersprüchliches Resultat lieferte, da er 3-4 Signale pro Metaphase ergab, obwohl er laut Gen Chip in der deletierten Region lag, wurde die Region mit einem spezifischen PCR Ansatz genauer untersucht. Dadurch konnte gezeigt werden, dass das Ende der deletierten Region innerhalb des BACs liegt, d.h. in diesem Fall konnte mit dem Mapping Array eine kleine deletierte Region sogar genauer eingegrenzt werden als mit der Hybridisierung eines BAC-Klons.

Veränderungen am Chromosom 9 sind charakteristisch für frühe Harnblasenkarzinome und sogar schon in morphologisch normal erscheinendem Urothel (Reznikoff et al., 2000; Stoehr et al., 2005; Wu, 2005) gefunden worden. Besonders Veränderungen in

der Region 9p21.3 mit dem bekannten Tumorsuppressorgen p16/CDKN2A prädispositionieren die Zelle für weitere genetische Veränderungen, d.h. begünstigen die Tumorprogression (Wu, 2005). Deshalb wurde diese Region auch bei den anderen Zelllinien mit BAC-FISH und qPCR genauer analysiert. Die Resultate zeigten übereinstimmend, dass diese Region bei allen untersuchten Zelllinien tendenziell unterrepräsentiert war. Bei Auswertung der Array Daten mit dem CNT wurde die Tendenz zum Verlust in allen Zelllinien bestätigt. Bei der Darstellung der, aus den Array Daten abgeleiteten Kopienzahlen (dChip), war die Deletion nur bei Zelllinie Cal29 deutlich zu erkennen. Bei Zelllinie BC3C war die Deletion scheinbar so klein, dass sie durch die Analyse mit dem HMM, d.h. wenn auch die Kopienzahlveränderungen der Nachbar-SNPs berücksichtigt wurden, nicht detektiert werden konnte. Bei der Darstellung der beobachteten Kopienzahlen (dChip) ist die Deletion bei Zelllinie BC3C aber deutlich als blau gefärbter Bereich zu erkennen. Auch bei den anderen Zelllinien (ausgenommen T24 wegen fehlerhafte Normalisierung s.o.) konnte bei der Darstellung der beobachteten Kopienzahlen (dChip) die Tendenz zum Verlust der Region 9p21.3 sichtbar gemacht werden. Bei der Darstellung der abgeleiteten Kopienzahlen (dChip) endete bei Zelllinie EJ28 die deletierte Region vor der Region 9p21.3, bei Zelllinie SW1710 wurden zwar mehrere kleine deletierte Blöcke in 9p angezeigt, die p16 Region selbst erschien aber normal repräsentiert. Bei Zelllinie T24 erschien die eigentlich deletierte Region aufgrund des beschriebenen systemischen Fehlers bei der Normalisierung mit dChip (s.o.) als normal repräsentiert. Dieses Beispiel macht deutlich, dass bei der Analyse der Array Daten mit dem HMM von dChip die Grenzen der Veränderungen teilweise nicht ganz optimal und sehr kleine Veränderungen teilweise gar nicht detektiert werden. Der Vorteil einer Analyse mit dem HMM ist aber, dass dadurch das Rauschen vermindert und die Auswertung der Resultate objektiver wird. Die Auswertung der Daten mit dem in dChip implementierten HMM könnte verbessert werden, indem die Zahl der Referenzen erhöht würde.

Auch bei Zelllinie EJ28 konnte mit dem Gene Chip Mapping Array eine kleine Kopienzahlveränderung detektiert werden, welche unterhalb des Auflösungsvermögen der CGH lag. Bei Zelllinie EJ28 war zum einen die Region 10p15.3-p11.22 deletiert. Die Deletion umfasste 33 Mb und konnte mit der konventionellen Chromosomen CGH detektiert werden. M-FISH Experimente zeigten, dass das Chromosom 10 der Zelllinie EJ28 häufig an Translokationen beteiligt war und im Falle einer Translokation die 10p Region deletiert war. Zusätzlich zu der Deletion konnte mit dem Chip noch eine Amplifikation in der Bruchpunktregion von 10p11.22-p11.21 detektiert werden. Die Amplifikation war nur 3,78 kbp lang. BAC-FISH Experimente bestätigten auch in

diesem Fall die Array Ergebnisse. Bei Hybridisierung in der Amplifikations-Region war deutlich ein einheitlicher gefärbter Block zusätzlich zu zwei normalen Hybridisierungssignalen zu erkennen (Abschnitt C.1.5.1, Abbildung 39, Abbildung 40). Intrachromosomale homogen gefärbte Blöcke sind eine typische zytogenetische Manifestation von Onkogen-Amplifikationen (Tsuchida et al., 1996). Der einheitlich gefärbte Block am Chromosom 10 der Zelllinie EJ28 befand sich nicht auf einem normalen, sondern auf einem derivativen, translozierten Chromosom. Speleman und Kollegen beschreiben, dass kleine Deletionen, welche an amplifizierte Regionen angrenzen, oft ein Hinweis auf einen Translokationsbruchpunkt sind (Spelemann et al., 2004). Andere Beispiele zeigen, dass auch Amplifikationen im Zusammenhang mit Translokationen stehen können (Nadine Van Roy, 2005). Durch die Kombination von BAC-FISH und Mapping Array Analyse konnten Van Roy und Kollegen z.B. detektieren, dass bei der Entstehung einer Amplifikation des MYC-Onkogens in einer Neuroblastom Zelllinie zuerst eine reziproken Translokation stattfindet. Darauf folgen weitere strukturelle Rearrangements, in deren Verlauf das MYC-Onkogen amplifiziert wird und andere Genomabschnitte verloren gehen (Nadine Van Roy, 2005), d.h. auch eine kleine Amplifikation kann ein Hinweis auf eine Translokation sein. Die Kombination von struktureller und numerischer Aberration kann sogar die Tumorprogression beeinflussen (Barr et al., 1996). Barr und Kollegen beobachteten, wie bei der Entstehung eines alveolären Rhabdomyosarcom durch eine Translokation ein Fusionsgen mit Onkogen-Aktivität entstand, welches im weiteren Verlauf amplifiziert wurde (Barr et al., 1996). Da auch in der amplifizierten Region auf Chromosom 10 der Zelllinie Gene lagen, die entweder in Zellzyklusregulation, Transkriptionsregulation oder Angiogenese involviert sind, d.h. mögliche Onkogene darstellen, wäre es denkbar, dass die entscheidende, für die Tumorprogression wichtige Veränderung am Chromosom 10 der Zelllinie EJ28 die kleine Amplifikation in 10p11.22-p11.21 war und nicht die deutlich sichtbare Deletion. Mit der Chromosomen CGH wäre nur die Deletion, nicht aber die Amplifikation detektiert worden.

Schwellenwert und Auflösungsvermögen

Rauch und Kollegen konnten mit dem Affymetrix GeneChip® Mapping Assay bei 20 Patienten bekannte numerische Aberrationen im Genom detektieren, wenn sie als Schwellenwert für signifikante numerische Veränderungen einen meta-p-Werte (CNT) größer 8 wählten (Rauch et al., 2004). Bei der Auswertung der Array Daten der Zelllinie SW1710 wurde zwar eine generell gute Übereinstimmung mit der Chromosomen CGH gefunden, viele der kleineren Veränderungen mit einem meta-p-Wert (CNT) größer 8 konnten aber durch anschließende BAC-FISH Experimente nicht verifiziert werden

(Abschnitt C.1.5.3 und Abschnitt C.1.5.4). Möglicherweise eignet sich der Schwellenwert von meta-p-Wert (CNT) größer 8 gut für die Analyse einiger weniger numerischer Veränderungen bei Patienten mit einem diploiden Genom. Bei Tumorzellen sind dagegen strukturelle und numerische Veränderungen meist viel häufiger und oft auch das gesamte Genom polyploid. Dadurch wird natürlich auch die Zusammensetzung der Repräsentation, die auf den Mapping Array hybridisiert wird, viel stärker beeinflusst, als das bei diploiden Proben mit wenigen kleinen numerischen Veränderungen der Fall ist. Dementsprechend ist nicht zu erwarten, dass der von Rauch und Kollegen beschriebene Schwellenwert von einem meta-p-Wert (CNT) größer 8 bei Tumorproben anwendbar ist (Rauch et al., 2004). Darüber hinaus fällt bei Zelllinie SW1710 auf, dass die Signaldetektionsrate und die Rate für die Allelerkennung bei zwei aufeinanderfolgenden unabhängigen Hybridisierungen sehr niedrig waren (nur 82 bzw. 67%). Bei der visuellen Auswertung der CNT-Ergebnisse erkennt man ein deutlich höheres Rauschen, im Vergleich zu den Ergebnissen aus den anderen Hybridisierungen. Wie bereits beschrieben, kann zwar durch die Auswertung der Array Daten mit dem HMM von dChip das Rauschen ausgeglichen werden, dadurch wird aber auch das Auflösungsvermögen deutlich vermindert. Damit Unterschiede in der Hybridisierungsqualität und der Einfluss von einer veränderten Zusammensetzung der Genomrepräsentation nicht mehr so stark ins Gewicht fallen, wäre es wichtig, durch eine, auf die Bedürfnisse des Mapping Arrays angepasste Normalisierungsfunktion, das Rauschen zu minimieren. Alternativ könnten die Daten mit einer Methode analysiert werden, welche die Daten unabhängig von vorgegebenen Schwellenwerten klassifiziert (z.B. „Support Vector Machine“-Tools, (Byvatov et al., 2003; Byvatov and Schneider, 2003). Die Untersuchung von Rauch und Kollegen stellte darüber hinaus fest, dass das Auflösungsvermögen des Mapping Arrays entscheidend durch die SNP Dichte einer bestimmten Region beeinflusst wurde. Kleine Deletionen konnten nicht detektiert werden, wenn zu wenige zu SNPs korrespondierende Oligonukleotide auf dem Array repräsentiert waren (Rauch et al., 2004). Durch die Einführung der 100k, bzw. 500k wird die Anzahl der SNPs, welche gleichzeitig analysiert werden können 10, bzw. 50 mal höher und der Abstand zwischen den SNPs entsprechend kleiner. Zur Zeit scheinen diese Arrays sich zwar noch nicht so gut für die Kopienzahlanalyse zu eignen wie der 10k Array (Michael Speicher, persönliche Korrespondenz). Es ist aber bestimmt nur eine Frage der Zeit, bis diese Limitationen im Auflösungsvermögen des Affymetrix GeneChip® Mapping Assay überwunden werden können.

Zusammenfassung Kopienzahlanalyse

Zusammenfassend kann man sagen, dass mit dem Affymetrix GeneChip[®] Mapping Assays numerische Veränderungen detektiert werden können und, dass die Veränderungen durch den Gene Chip detaillierter charakterisiert werden können als mit herkömmlichen zytogenetischen Methoden. Die große Stärke des Gene Chips ist, dass mit ihm das gesamte Genom in einem einzigen Arbeitsschritt und mit einem sehr guten Auflösungsvermögen analysiert werden kann. Da die zu den SNPs korrespondierenden Oligonukleotide auf dem Array im Mittel nur 100 kb voneinander entfernt sind (Abbildung 2, Abschnitt A.2), ist das theoretische Auflösungsvermögen des Affymetrix GeneChip[®] Mapping Assays 100 kb. Im Vergleich dazu, liegt das empirisch ermittelte Auflösungsvermögen der Chromosomen CGH bei 2 Mb für Amplifikationen (Joos et al., 1992; Piper et al., 1995) und 10 Mb für Deletionen (du Manoir et al., 1995; Kallioniemi et al., 1992). Das Auflösungsvermögen der konventionellen Chromosomen CGH ist damit 20-100 mal geringer als das theoretisch mögliche Auflösungsvermögen des Affymetrix GeneChip[®] Mapping Assays. Durch die Untersuchungen an Harnblasenkarzinom Zelllinien konnte experimentell bestätigt werden, dass kleine Amplifikationen und Deletionen, wie z.B. die 3,78 kbp große Amplifikation am Chromosom 10 der Zelllinie EJ28 und die 680 kbp kleine Deletion in der Region 9p21.3 der Zelllinie BC3C, mit dem Affymetrix GeneChip[®] Mapping Assay detektiert werden konnten, mit der Chromosomen CGH dagegen nicht.

Durch die Untersuchungen an Harnblasenkarzinom Zelllinien konnte die Tauglichkeit von dem Affymetrix GeneChip[®] Mapping Assay zur DNS-Kopienzahlanalyse erfolgreich validiert werden. Sie zeigten aber auch, dass die Software zur Kopienzahlanalyse der Gene Chip Daten noch besser auf die Bedürfnisse der Mapping Arrays abgestimmt werden muss, um zuverlässige Resultate zu erhalten.

Allelbestimmung

Da der Affymetrix GeneChip[®] Mapping Assay ursprünglich für Assoziationsstudien entwickelt wurde, kann neben den Kopienzahlen auch der Allelzustand (AA, AB oder BB) der SNPs bestimmt werden. Die Zuordnung der Allele erfolgt mit der Affymetrix GDAS Software (Abschnitt B.15.3.1). Obwohl bei den Tumorzelllinien keine Kontamination der Proben-DNS vorlag und die Hybridisierung gut, d.h. die „Signal Detection“ hoch war, war die Allelerkennungsrate („Allel Call“) niedrig (Abschnitt C.1.3.1). Wie in Abschnitt B.15.3.1 genauer erläutert wird der Genotyps eines SNPs ermittelt, indem die Signalintensitäten der PM_A -Oligonukleotide zu den

Signalintensitäten der PM_B-Oligonukleotide ins Verhältnis gesetzt werden, und bestimmt wird, in welche „Call-Zone“ (AA, AB oder BB) die so berechneten RAS-Werte („relative allele signals“-Werte) fallen. Die „Call-Zonen“ Bereiche für diesen Abgleich wurden von Affymetrix empirisch durch die Hybridisierung von 133 normalen, diploiden Referenzen ermittelt (Abschnitt B.15.3.1). Wie aus den M-FISH und CGH-Experimenten ersichtlich, waren alle verwendeten Zelllinien aneuploid. Bei den Tumorzelllinien waren deshalb die Verhältnisse der Allele und damit der Signalintensitäten der PM-Oligonukleotide zueinander verschoben. Während bei einer diploiden Probe das Allele A nur im Verhältnis 2:0, 1:1 oder 0:2 zum Allel B vorkommen kann, sind bei einer tetraploiden Probe theoretisch die Verhältnisse 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 und 0:5 möglich. Deswegen konnten die für die Tumorzellen ermittelten RAS-Werte nicht immer eindeutig in die drei, durch die Referenzhybridisierungen ermittelten „Call-Zonen“ eingeteilt werden. In diesem Fall wurde dem SNP kein Genotyp zugeordnet; er wurde zum „NoCalls“. Trotz hoher Signal-Detection Rate kommt es also bei aneuploiden Zellen dazu, dass die Call-Rate niedrig ist, obwohl keine DNS-Kontamination vorliegt.

Zuordnung des Geschlechts

Mit der Affymetrix GDAS Software wird aus den Array Daten auch das Geschlecht einer Probe abgeleitet. Bei der Auswertung der Affymetrix GeneChip® Mapping Assay Hybridisierungen wurde aber nur bei der Zelllinie Cal29 ein weiblicher Karyotyp (Abschnitt C.1.3.1, Abbildung 29, „Called Gender“, F: female) festgestellt. Dabei stammten alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien von weiblichen Spendern ab (Abschnitt B.4, Tabelle 5). Die Zelllinien BC3C, EJ28, HT1376 und SW1710 wurden durch die GDAS-Software fälschlicherweise als männlich klassifiziert (Abschnitt C.1.3.1, Abbildung 29, „Called Gender“, M: maskulin). Wie in Abschnitt B.15.3.2 genauer beschrieben, befinden sich auf dem Array keine zum Y-Chromosom korrespondierenden SNPs. Das Geschlecht einer Probe wird mit der GDAS-Software indirekt, über das Verhältnis der Anzahl an heterozygoten SNPs auf dem X-Chromosom zu der Anzahl an homozygoten SNPs auf dem X-Chromosom, bestimmt. Bei der Zelllinie Cal29 sind 21% der SNPs auf dem X-Chromosom heterozygot (Abschnitt C.1.3.1, Tabelle 14). Zelllinien BC3C, EJ28, HT1376 und SW1710 haben keinen einzigen heterozygoten SNP auf dem X-Chromosom (Abschnitt C.1.3.1, Tabelle 14). Durch die M-FISH Analyse ist bekannt, dass bei allen Zelllinien X-Chromosomen verloren gegangen waren. Da bei Zelllinie Cal29 noch heterozygote SNPs auf dem X-Chromosom detektiert wurden, müssen noch beide Kopien des X-Chromosoms, d.h. das maternale und das paternale, vorhanden sein. Bei den Zelllinien BC3C, EJ28,

HT1376 und SW1710 scheint es zu einem selektiven Verlust von nur einer der beiden Kopien gekommen zu sein. Die falsche Zuordnung des Geschlechts durch GDAS entspricht sozusagen einem LOH am X-Chromosom bei den Zelllinien BC3C, EJ28, HT1376 und SW1710. Durch die Analyse der Affymetrix GeneChip® Mapping Assay Daten mit GDAS wurde gezeigt, dass der durch M-FISH detektierte Verlust von X-Chromosomen bei der Zelllinie Cal29 nur quantitativ, dagegen bei den Zelllinien BC3C, EJ28, HT1376 und SW1710 auch qualitativ ist.

Bestimmung von Verwandtschaft

Bei der Zelllinie EJ28 gibt es in der Literatur einen Hinweis, dass es sich um einen Subklon der Zelllinie T24 handelt (Fujiyama et al., 2001). Durch den paarweisen Vergleich der Allelverteilung der untersuchten Zelllinien konnte diese Vermutung bestätigt werden. Die beiden Zelllinien EJ28 und T24 haben in 97,47% der untersuchten SNPs identische Allele, während die Konkordanz bei allen anderen Zelllinien unter 60% lag. Eine Übereinstimmung des Genotyp zu mehr als 70% ist ein deutlicher Hinweis, dass zwei Zelllinien vom selben Individuum abstammen oder aber Subpopulationen einer Ursprungszelllinie sind³.

Haben die Zelllinien den selben Ursprung, dann kann der Unterschied in ihrer Allelverteilung nur durch einen Verlust von Heterozygotität zustande gekommen sein. Wäre die Zelllinie EJ28 also ein direkter Subklon von Zelllinie T24 müsste es durch diese Selektion zum LOH in 2,53% der untersuchten SNPs gekommen sein. Durch den paarweisen Vergleich der Zelllinien konnten entsprechend auch einige LOH-Regionen identifiziert werden. Interessanterweise wurden jedoch nicht nur dann Bereiche mit LOH gefunden, wenn davon ausgegangen wurde, dass T24 die Ursprungszelllinie ist, d.h. wenn T24 als normale Referenz für die Analyse gewählt wurde. Auch wenn die Zelllinie EJ28 als normale Referenz gewählt wurde, d.h. unter der Annahme, dass die Zelllinie T24 ein Subklon der Zelllinie EJ28 wäre, wurden LOH-Regionen gefunden. Zelllinie EJ28 ist deswegen kein direkter Subklon der, in dieser Arbeit untersuchten Zelllinie T24. Die wahrscheinlichste Erklärung ist, dass die ursprüngliche Zelllinie T24 sich im Laufe der Jahre verändert hat und die Zelllinie EJ28 ein Subklon dieser ursprünglichen Zelllinie T24 ist. Es wäre jedoch auch denkbar, dass beide Zelllinien Subklone einer gemeinsamen Ursprungszelllinie sind.

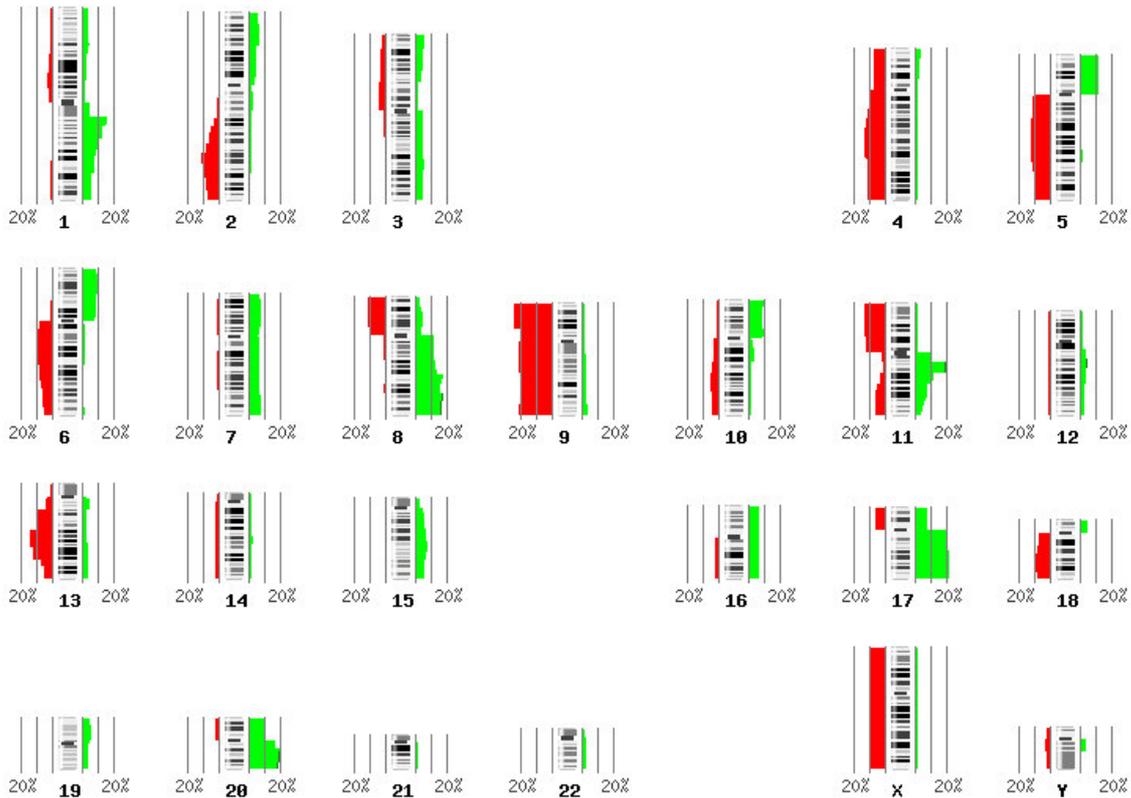
Wären die Zelllinien nur mit den herkömmlichen zytogenetischen Methoden untersucht worden, wäre die Verwandtschaft der Zelllinien EJ28 und T24 übersehen worden. Zwar

³ Cell Line Identity Typing, Cancer Genome Project, Sanger Institute, UK (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/Genotyping/synlinestable.shtml>)

lieferten CGH und M-FISH Analyse Hinweise auf gemeinsame numerische, bzw. strukturelle Veränderungen zwischen den Zelllinien EJ28 und T24, jedoch hätte es sich dabei auch um, für das Harnblasenkarzinom charakteristische gemeinsame Veränderungen handeln können. Bei dem Vergleich der CGH Profile fällt z.B. auf, dass nur die Veränderung in der Region 10p12-10p15 exklusiv bei den Zelllinien EJ28 und T24 auftreten. Und auch Stefford und Kollegen sehen in den Gemeinsamkeiten im M-FISH Karyogramm der Zelllinien T24 und EJ28 keinen Hinweis auf eine Verwandtschaft der beiden Zelllinien, sondern werten die gemeinsamen Veränderungen als Hinweis auf Regionen, die eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Harnblasenkarzinomen spielen (Stefford et al., 2002). Da der Affymetrix GeneChip® Mapping Assay nicht nur hochauflösende Information über die Kopienzahl, sondern auch über die Allelverteilung an den untersuchten SNPs liefert, konnte durch den paarweisen Vergleich die Verwandtschaft der Zelllinien EJ28 und T24 detektiert werden.

D.2 Tumorproben

Bei Harnblasenkarzinomen wurden Aneusomien, Deletionen und Amplifikationen bisher schon in beinahe allen Chromosomen beschrieben (Reznikoff et al., 2000; Wu, 2005, <http://www.progenetix.com>). Abbildung 71 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse aus 210 verschiedenen Publikationen (<http://www.progenetix.com>, Progenetix Datenbank, Stand September 05). In der Abbildung werden vor allem Ergebnisse von CGH-Analysen, array CGH und matrix CGH Analysen, zu einem geringen Teil jedoch auch Ergebnisse von Giemsa-Bänderung, SKY und MFISH zusammengefasst, ohne die unterschiedlichen Limitationen, bzw. das unterschiedliche Auflösungsvermögen der verwendeten zytogenetischen Methoden, zu berücksichtigen. Darüber hinaus wurde für die Darstellung nicht zwischen den einzelnen Typen des Harnblasenkarzinoms unterschieden. Die Abbildung gibt deswegen nur einen sehr groben Überblick über alle im Harnblasenkarzinom bisher beschriebenen numerischen Veränderungen.



210 cases

Abbildung 71: Zusammenfassung numerischer Aberrationen bei Harnblasenkarzinomen (<http://www.progenetix.com>)

Die genaue Charakterisierung von Harnblasenkarzinomen zeigt jedoch, dass sich die histologisch unterschiedlichen Formen des Harnblasenkarzinoms bezüglich ihrer genetischen Stabilität deutlich voneinander unterscheiden (Eble et al., 2004; Reznikoff et al., 2000; Wu, 2005). Bei nicht invasiven, niedriggradigen papillären Blasenepithelneoplasien (pTaG1-2) wurden mit herkömmlichen zytogenetischen Methoden bisher nur wenige genetische Veränderungen (Eble et al., 2004) charakterisiert, so z.B. der Verlust von Chromosom 9 und Mutationen im FGFR3-Gen oder HRAS-Gen (Wu, 2005). Gen Amplifikationen und TP53 Mutationen wurden selten und Aneuploidien der gesamten DNS in weniger als 50% der nicht invasiven niedriggradigen papillären Harnblasenkarzinome detektiert (Eble et al., 2004). Dagegen kommen numerische Veränderungen bei hochgradigen, nicht-invasiven, papillären Urothelkarzinomen (pTaG3), CIS und invasiv wachsenden (pT1-4) Karzinomen deutlich häufiger vor (Eble et al., 2004). Im Durchschnitt werden 7-10 Veränderungen pro Zelle detektiert (Eble et al., 2004). Da numerische Veränderungen bei pTaG1-Stadien selten sind, wurden mit den herkömmlichen zytogenetischen Methoden v.a. spätere Tumorstadien charakterisiert. Bei pTaG1-Stadien wurden meist nur einzelne Regionen, z.B. mit Mikrosatelliten PCR oder durch Sequenzierung, genauer untersucht (Wu, 2005). Dabei

stellen die niedriggradigen, papillären Tumore mit einem Anteil von 70-80% zum Zeitpunkt der Erstdiagnose die häufigste Gruppe der Harnblasenkarzinome dar. Da der Affymetrix GeneChip® Mapping Assay ein deutlich besseres Auflösungsvermögen besitzt als herkömmliche Verfahren und darüber hinaus zwei verschiedene Ereignisse, d.h. Kopienzahlveränderung und LOH gleichzeitig analysieren kann, wurde er in dieser Arbeit eingesetzt um Veränderungen im Genom von niedriggradigen, papillären Harnblasenkarzinomen (pTaG1) zu charakterisieren. Mit Hilfe des Gene Chips konnten auch kleine numerische Veränderungen und bisher kryptische Regionen mit Verlust von Heterozygotität detektiert werden.

Chromosom 9, p16/CDKN2A

Wie erwartet wurden insgesamt verhältnismäßig wenige Veränderungen im Genom der pTaG1-Tumore detektiert. In Übereinstimmung mit den bisher bekannten Daten war das Chromosom 9 am häufigsten, nämlich bei drei von zwölf Tumoren (25%), von Veränderungen betroffen. In allen drei Tumoren war die Region 9p21.3 mit dem bekannten Tumorsuppressorgen p16/CDKN2A deletiert. In den deletierten Regionen wurde häufig auch ein LOH detektiert. Deletionen am Chromosom 9 sind jedoch nicht charakteristisch für frühe nicht invasive Harnblasenkarzinome. Sie kommen auch bei invasiven Harnblasenkarzinomen und sogar in morphologisch normal erscheinendem Urothel vor (Reznikoff et al., 2000; Stoehr et al., 2005; Wild et al., 2005). Man geht aber davon aus, dass diese Veränderungen mit einer Tumorentstehung und Tumorprogression assoziiert sind, indem sie die Zelle allgemein für weitere genetische Veränderungen prädispositionieren (Wu, 2005).

Chromosom 8, FABP4

Bei zwei der zwölf analysierten Tumore (17%, CB40_13183U, CB50_4770U) waren Regionen am q-Arm von Chromosom 8 amplifiziert. Bei beiden Tumoren war übereinstimmend die Region 8q21.13 mit dem Onkogen FABP4 amplifiziert (Wild et al., 2005). Durch Expressionsanalysen konnte FABP4 als Marker für die Progression von frühen nicht invasiven Formen des Harnblasenkarzinoms zu invasiven Tumorformen identifiziert werden (Wild et al., 2005). Der funktionelle Zusammenhang zwischen FABP4 (Fatty acid-binding protein)-Überexpression und Tumorprogression ist bisher nicht bekannt. Bei Patient 4770 war der klinische Verlauf leider nicht bekannt. Bei Patient 13183 wurde jedoch sechs Monate nach der Resektion des untersuchten pTaG1 Tumors ein weiterer Tumor detektiert und resektiert. Die histologische Klassifikation ergab, dass es sich wieder um ein nicht invasives differenziertes

papilläres Urothelkarzinom im Tumorstadium pTaG1 handelte, d.h. bei diesen Patienten war die Amplifikation von FABP4 zwar nicht mit einer Progression zum invasiven Tumor aber mit einem Wiederauftreten des Tumors assoziiert. Es ist jedoch bekannt, dass wieder auftretende papilläre Harnblasenkarzinome ein deutlich höheres Risiko haben sich zu invasiven Tumoren weiter zu entwickeln, als Tumore die nicht wieder auftreten. Der weitere klinische Verlauf muss deshalb abgewartet werden, um einen Zusammenhang mit FABP4 Amplifikation zu bestätigen oder zu widerlegen. Darüber hinaus wäre es hilfreich, wenn eine größere Zahl an pTaG1 Tumoren mit dem Affymetrix GeneChip® Mapping Assay untersucht würden und die Daten mit dem klinischen Verlauf der Patienten korreliert würden.

Uniparentale Disomien

Da bei zwölf der hybridisierten Tumorproben auch korrespondierendes Normalmaterial verfügbar war, konnten in dieser Arbeit, durch die genomweite Analyse von SNP-Genotypen, verschiedene Bereiche mit uniparentaler Disomie im Genom von nicht invasiven, niedriggradigen, papillären Harnblasenkarzinomen detektiert werden. Als uniparentale Disomie wird der Verlust der Heterozygotität (LOH) in einem bestimmten Bereich eines Chromosoms oder über die gesamte Länge des Chromosoms bezeichnet, ohne dass es dabei zu einem Kopienzahlverlust kommt. Uniparentale Disomien entstehen durch somatische Rekombination (Fitzgibbon et al., 2005). Sie stellen wahrscheinlich einen Mechanismus dar, der zusätzlich zu Kopienzahlveränderungen im Genom, zur Tumorgenese und –progression beiträgt (Teh et al., 2005). Durch uniparentale Disomie können z.B. funktionierende Kopien eines Tumorsuppressorgens verloren gehen oder die Dosis von Onkogenen erhöht werden. Da die Kopienzahl dabei nicht verändert wird, können uniparentale Disomien mit herkömmlichen zytogenetischen Methoden, wie z.B. der CGH, nicht detektiert werden.

Bei zwei von zwölf (17%) in dieser Arbeit untersuchten Tumorproben (4418U/S, 4423U/S) konnten uniparentale Disomien im q-Arm des Chromosoms 3 detektiert werden. Die Analyse der Affymetrix GeneChip® Mapping Assay Daten mit dChip lieferte keinen Hinweis auf eine Kopienzahlveränderung am Chromosom 3. Durch vergleichende Analyse von Tumormaterial Daten und korrespondierenden Normalmaterial Daten mit dChip wurde festgestellt, dass es bei der Tumorentstehung zu einem Verlust der Heterozygotität (LOH) in der Region 3q gekommen ist (Abbildung 60). Die CGH Analyse der Tumore 4418U, 4423U bestätigte, dass das Chromosom 3 in beiden Fällen normal repräsentiert war (Abbildung 69, Abbildung 70), d.h. dass es

sich um Bereiche mit uniparentaler Disomie handelt. Der Verlust der Heterozygotität ist somit bei der Rekombination entstanden und wäre mit den herkömmlichen zytogenetischen Methoden übersehen worden. Fitzgibbon und Kollegen zeigten, dass bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie uniparentaler Disomie in 20% der untersuchten Lymphozyten vorkommt (Fitzgibbon et al., 2005). Mit den herkömmlichen zytogenetischen Methoden wäre der Karyotyp dieser Patienten ohne Befund gewesen. Darüber hinaus gelang es Fitzgibbon und Kollegen zu zeigen, dass bei 7 von 13 Patienten mit uniparentaler Disomie in den homozygoten Regionen mutierte Gene lagen. Sie werten dies als Beweis, dass es bei der Entstehung der akuten myeloischen Leukämie in einem ersten Schritt zu Mutationen in tumorrelevanten Genen gekommen ist. In einem zweiten Schritt kam es durch die mitotische Rekombination, zum Verlust der Heterozygotität, wodurch das Wildtyp Allele gegen ein mutiertes Allele ausgetauscht wurde (Fitzgibbon et al., 2005). Veränderungen am Chromosom 3 wurden bisher selten im Zusammenhang mit Harnblasenkarzinomen beschrieben (Abbildung 71, (Eble et al., 2004), (Wu, 2005). Unsere Untersuchungen an frühen papillären Harnblasenkarzinomen (pTaG1) geben einen ersten Hinweis, dass Veränderungen am Chromosom 3 möglicherweise eine Rolle in der Tumorentstehung spielen oder charakteristisch für nicht invasive niedriggradige papilläre Blasenneoplasien (pTaG1) sind. Da die Veränderungen durch uniparentale Disomie entstanden sind und dieser Mechanismus mit den herkömmlichen zytogenetischen Methoden nicht nachgewiesen werden konnte, wäre es möglich, dass durch die Untersuchung einer größeren Zahl an Tumorproben die Theorie bestätigt werden könnte.

LOH und Amplifikation

Am Chromosom 17 der Tumorprobe CB24_4423U wurde eine amplifizierte Region detektiert (17q21.32-17q25.3), in welcher gleichzeitig ein Verlust der Heterozygotität (LOH) stattgefunden hat. Im Allgemeinen werden LOHs mit Deletionen gleichgesetzt (Strachan and Read, 2004). Man geht davon aus, dass sie einen Mechanismus darstellen, um Tumorsuppressorgene zu aktivieren. In diesem Fall scheint es wahrscheinlicher, dass in dem amplifizierten Bereich Gene mit Onkogen-Eigenschaften liegen. Die Amplifikation könnte z.B. über einen Gene-Dosage Effekt zur Aktivierung der Onkogene beigetragen haben.

LOH Analyse für nicht invasive Diagnostik

Bereits in früheren Studien wurde die Information über LOH bei Harnblasenkarzinomen für eine nicht invasive Diagnostik genutzt (Catto et al., 2004; Little, 2003; Mao, 2000;

Steiner et al., 1997). Dazu wurde mit Mikrosatelliten PCR der Allelstatus verschiedener Markerregionen detektiert. Obwohl diese Untersuchungen auf einige wenige Regionen limitiert waren, war die Spezifität größer als 90% (Catto et al., 2004; Little, 2003; Mao, 2000; Steiner et al., 1997). Damit war die Mikrosatelliten PCR die vielversprechendste nicht invasive Methode zur Diagnostik von Harnblasenkarzinomen. Das Auflösungsvermögen der Mikrosatelliten PCR wird durch die Zahl der Marker, d.h. der Zahl der untersuchten Regionen, limitiert. Da Veränderungen am Chromosom 9 zu den bekannten frühen Veränderungen zählen (Eble et al., 2004; Wu, 2005), wurden bei den meisten Untersuchungen auch Mikrosatellitenmarker für Regionen am Chromosom 9 eingesetzt (Catto et al., 2004; Little, 2003; Mao, 2000; Steiner et al., 1997). Weil Veränderungen am Chromosom 9 jedoch auch schon bei normalen Urothel beschrieben wurden (Stoehr et al., 2005), ist es nicht verwunderlich, dass mit der Mikrosatelliten PCR sogar Tumore detektiert wurden, die bei der durchgeführten Zytoskopie selbst nicht festgestellt werden konnten, sondern erst bei der Nachuntersuchung (ein Jahr später) sichtbar wurden (Little, 2003). Veränderungen am Chromosom 9 prädisponieren die Zelle für weitere Veränderungen, sind aber nicht charakteristisch für eine bestimmte Entwicklung, d.h. invasiv, bzw. nicht invasiv (Wu, 2005). Es ist möglich, dass durch die Untersuchung von den verschiedenen Formen des Harnblasenkarzinoms mit dem Affymetrix GeneChip® Mapping Assay neue Marker identifiziert und mit einem bestimmten klinischen Verlauf korreliert werden könnten, so dass neue aussagekräftigere Marker für eine nicht invasive Diagnostik mit Mikrosatelliten PCR eingesetzt werden können. Der Einsatz von Affymetrix GeneChip® Mapping Assay für die Routinediagnostik wäre zur Zeit noch viel zu kostspielig. Der Zeit- und Kostenaufwand für eine Mikrosatelliten PCR ist dagegen sehr gering (Little, 2003).

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mit dem Affymetrix GeneChip® Mapping Assay bei nicht invasiven, niedriggradigen, papillären Blasenneoplasien (pTaG1) erfolgreich Kopienzahlgewinne und -verluste analysiert werden. Darüber hinaus konnten durch vergleichende Analyse des Genotyps von Tumor- und Normalgewebe Regionen mit Heterozyositätsverlust (LOH) festgestellt werden. Teilweise waren diese LOHs nicht mit einer Veränderung in der Kopienzahl assoziiert und wären deshalb bei der Untersuchung mit herkömmlichen zytogenetischen Methoden nicht identifiziert worden.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Veränderungen korrelieren gut mit den bereits publizierten Veränderungen bei frühen, nicht invasiven Harnblasenkarzinomen (pTaG1). So wurden in 25% der Tumore Deletionen und assoziierte LOHs am Chromosom 9, insbesondere in der Region 9p21.3 mit dem Tumorsuppressorgen p16, und in 17% der Tumore Amplifikationen am Chromosom 8, insbesondere in der Region 8q21.13 mit dem Onkogen FAB4, gefunden.

Darüber hinaus wurden am Chromosom 3 bei 17% der Tumore uniparentale Disomien, d.h. Regionen mit einem Verlust der Heterozygotität ohne Beeinträchtigung der Kopienzahl, gefunden. Da Veränderungen am Chromosom 3 im Zusammenhang mit Harnblasentumoren noch kaum beschrieben wurden, sind uniparentale Disomien am Chromosom 3 möglicherweise ein neuer und bei der Tumorentstehung entscheidender Mechanismus.

In einem nächsten Schritt wäre es sinnvoll die Anzahl an untersuchten Tumoren zu erhöhen, um eine größere Sammlung an möglichen Veränderungen in frühen nicht invasiven Harnblasenkarzinomen (pTaG1) zu erhalten und die Signifikanz der Auswertung dadurch zu erhöhen. Darüber hinaus wäre es auch sinnvoll wiederauftretende Tumore bei den einzelnen Patienten zu untersuchen, um den klinischen Verlauf besser mit den genomischen Daten korrelieren zu können. Dadurch könnten Markerregionen identifiziert werden, die zum einen für frühe nicht invasive Harnblasenkarzinome charakteristisch sind, zum anderen eine Information über die Tumorprogression liefern. Mit einfachen und nicht kostenintensiven Methoden, wie der Mikrosatelliten PCR oder der FISH, könnte die Aussagekraft dieser Markeregionen durch Tests an einer großen Zahl von Tumorproben überprüft werden. Aussagekräftige Markerregionen könnten letztendlich verwendet werden, um eine nicht invasive Diagnostik aus Zellen von Spülurin zu etablieren.

E: Literaturverzeichnis

- Albertson, D. G., Ylstra, B., Seagraves, R., Collins, C., Dairkee, S. H., Kowbel, D., Kuo, W.-L., Gray, J. W., and Pinkel, D. (2000). Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *25*, 144-146.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* *215*, 403-410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* *25*, 3389-3402.
- Artandi, S. E., Chang, S., Lee, S. L., Alson, S., Gottlieb, G. J., Chin, L., and DePinho, R. A. (2000). Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature* *406*, 641-645.
- Artandi, S. E., and DePinho, R. A. (2000). A critical role for telomeres in suppressing and facilitating carcinogenesis. *Curr Opin Genet Dev* *10*, 39-46.
- Aveyard, J. S., and Knowles, M. A. (2004). Measurement of relative copy number of CDKN2A/ARF and CDKN2B in bladder cancer by real-time quantitative PCR and multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Mol Diagn* *6*, 356-365.
- Barr, F. G., Nauta, L. E., Davis, R. J., Schafer, B. W., Nycum, L. M., and Biegel, J. A. (1996). In vivo amplification of the PAX3-FKHR and PAX7-FKHR fusion genes in alveolar rhabdomyosarcoma. *Hum Mol Genet* *5*, 15-21.
- Berggren, P., Kumar, R., Sakano, S., Hemminki, L., Wada, T., Steineck, G., Adolfsson, J., Larsson, P., Norming, U., Wijkstrom, H., and Hemminki, K. (2003). Detecting homozygous deletions in the CDKN2A(p16(INK4a))/ARF(p14(ARF)) gene in urinary bladder cancer using real-time quantitative PCR. *Clin Cancer Res* *9*, 235-242.
- Bichler, K.-H., Becker, G., Bockemeyer, C., Braunwald, H., Buck, G., Dammann, F., Feil, G., Krause, F. S., Lahme, S., Nelde, H. J., *et al.* (2000). Harnblasenkarzinom. In *Therapieempfehlungen*, H. Braunwald, K.-E. Grund, and K.-H. Bichler, eds. (Tübingen, Interdisziplinäres Tumorzentrum Tübingen am Klinikum der Eberhad-Karls-Universität).
- Bignell, G. R., Huang, J., Greshock, J., Watt, S., Butler, A., West, S., Grigorova, M., Jones, K. W., Wei, W., Stratton, M. R., *et al.* (2004). High-resolution analysis of DNA copy number using oligonucleotide microarrays. *Genome Res* *14*, 287-295.
- Braakhuis, B. J., Tabor, M. P., Kummer, J. A., Leemans, C. R., and Brakenhoff, R. H. (2003). A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res* *63*, 1727-1730.
- Byvatov, E., Fechner, U., Sadowski, J., and Schneider, G. (2003). Comparison of support vector machine and artificial neural network systems for drug/nondrug classification. *J Chem Inf Comput Sci* *43*, 1882-1889.
- Byvatov, E., and Schneider, G. (2003). Support vector machine applications in bioinformatics. *Appl Bioinformatics* *2*, 67-77.
- Cahill, D. P., Lengauer, C., Yu, J., Riggins, G. J., Willson, J. K. V., Markowitz, S. D., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* *392*, 300-303.
- Catto, J. W., Meuth, M., and Hamdy, F. C. (2004). Genetic instability and transitional cell carcinoma of the bladder. *BJU Int* *93*, 19-24.
- Dey, P. (2004). Aneuploidy and malignancy: an unsolved equation. *J Clin Pathol* *57*, 1245-1249.
- Di Fiore, P. P., Pierce, J. H., Kraus, M. H., Segatto, O., King, C. R., and Aaronson, S. A. (1987). erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* *237*, 178-182.
- du Manoir, S., Schrock, E., Bentz, M., Speicher, M. R., Joos, S., Ried, T., Lichter, P., and Cremer, T. (1995). Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* *19*, 27-41.
- Eble, J. N., Sauter, G., Epstein, J. I., and Sesterhenn, I. A. (2004). Pathology and Genetics - Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. In *World Health Organization Classification of Tumours*, J. N. Eble, G. Sauter, J. I. Epstein, and I. A. Sesterhenn, eds. (Lyon, International Agency for Reserach on Cancer Press).

- Eils, R., Uhrig, S., Saracoglu, K., Satzler, K., Bolzer, A., Petersen, I., Chassery, J., Ganser, M., and Speicher, M. R. (1998). An optimized, fully automated system for fast and accurate identification of chromosomal rearrangements by multiplex-FISH (M-FISH). *Cytogenet Cell Genet* *82*, 160-171.
- Fauth, C., and Speicher, M. R. (2001). Classifying by colors: FISH-based genome analysis. *Cytogenetic and Genome Research* *93*, 1-10.
- Fauth, C., Zhang, H., Harabacz, S., Brown, J., Saracoglu, K., Lederer, G., Rittinger, O., Rost, I., Eils, R., Kearney, L., and Speicher, M. (2001). A new strategy for the detection of subtelomeric rearrangements. *Human Genetics* *109*, 576-583.
- Fischer, A. H., Young, K. A., and DeLellis, R. A. (2004). Incorporating pathologists' criteria of malignancy into the evolutionary model for cancer development. *J Cell Biochem* *93*, 28-36.
- Fitzgibbon, J., Smith, L. L., Raghavan, M., Smith, M. L., Debernardi, S., Skoulakis, S., Lillington, D., Lister, T. A., and Young, B. D. (2005). Association between acquired uniparental disomy and homozygous gene mutation in acute myeloid leukemias. *Cancer Res* *65*, 9152-9154.
- Friend, S. (1994). p53: a glimpse at the puppet behind the shadow play. *Science* *265*, 334-335.
- Fujiyama, C., Jones, A., Fuggle, S., Bicknell, R., Cranston, D., and Harris, A. (2001). Human bladder cancer invasion model using rat bladder in vitro and its use to test mechanisms and therapeutic inhibitors of invasion. *British Journal of Cancer* *84*, 558-564.
- Hafner, C., Knuechel, R., Stoehr, R., and Hartmann, A. (2002). Clonality of multifocal urothelial carcinomas: 10 years of molecular genetic studies. *Int J Cancer* *101*, 1-6.
- Hafner, C., Knuechel, R., Zanardo, L., Dietmaier, W., Blaszyk, H., Chevillat, J., Hofstaedter, F., and Hartmann, A. (2001). Evidence for oligoclonality and tumor spread by intraluminal seeding in multifocal urothelial carcinomas of the upper and lower urinary tract. *Oncogene* *20*, 4910-4915.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.
- Hoque, M. O., Lee, C.-C. R., Cairns, P., Schoenberg, M., and Sidransky, D. (2003). Genome-Wide Genetic Characterization of Bladder Cancer: A Comparison of High-Density Single-Nucleotide Polymorphism Arrays and PCR-based Microsatellite Analysis. *Cancer Res* *63*, 2216-2222.
- http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3_code.html. Primer3 Software.
- http://www.affymetrix.com/support/technical/datasheets/10k_datasheet.pdf 10k_Datasheet.
- http://www.affymetrix.com/support/technical/datasheets/10k_datasheet.pdf (2003). 10k_Datasheet.
- <http://www.ensembl.org/> Ensembl Genome Browser.
- <http://www.sanger.ac.uk/>. Wellcome Trust Sanger Institute (Hinxton, UK).
- Huang, J., Wei, W., Zhang, J., Liu, G., Bignell, G. R., Stratton, M. R., Futreal, P. A., Wooster, R., Jones, K. W., and Shaper, M. H. (2004). Whole genome DNA copy number changes identified by high density oligonucleotide arrays. *Hum Genomics* *1*, 287-299.
- Iafate, A. J., Feuk, L., Rivera, M. N., Listewnik, M. L., Donahoe, P. K., Qi, Y., Scherer, S. W., and Lee, C. (2004). Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* *36*, 949-951.
- Jallepalli, P. V., and Lengauer, C. (2001). Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. *Nat Rev Cancer* *1*, 109-117.
- Jichlinski, P., Forrer, M., Mizeret, J., Glanzmann, T., Braichotte, D., Wagnieres, G., Zimmer, G., Guillou, L., Schmidlin, F., Graber, P., *et al.* (1997). Clinical evaluation of a method for detecting superficial surgical transitional cell carcinoma of the bladder by light-induced fluorescence of protoporphyrin IX following the topical application of 5-aminolevulinic acid: preliminary results. *Lasers Surg Med* *20*, 402-408.
- Joos, S., Haluska, F. G., Falk, M. H., Henglein, B., Hameister, H., Croce, C. M., and Bornkamm, G. W. (1992). Mapping chromosomal breakpoints of Burkitt's t(8;14) translocations far upstream of c-myc. *Cancer Res* *52*, 6547-6552.
- Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J. W., Waldman, F., and Pinkel, D. (1992). Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* *258*, 818-821.
- Kamb, A., Gruis, N. A., Weaver-Feldhaus, J., Liu, Q., Harshman, K., Tavtigian, S. V., Stockert, E., Day, R. S., 3rd, Johnson, B. E., and Skolnick, M. H. (1994). A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* *264*, 436-440.
- Kato, T., Ishikawa, K., Nemoto, R., Senoo, A., and Amano, Y. (1978). Morphological characterization of two established cell lines, T24 and MGH-U1, derived from human urinary bladder carcinoma. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* *124*, 339-349.

- Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159-170.
- Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997). Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386, 761, 763.
- Kraus, J., Cohen, M., and Speicher, M. R. (2003). Multicolour FISH fine mapping unravels an insertion as a complex chromosomal rearrangement involving six breakpoints and a 5.89 Mb large deletion. *J Med Genet* 40, e60.
- Langer, S. (2002) Etablierung neuer Vielfarben-Fluoreszenz in situ Hybridisierungs (FISH)-Ansätze zum Einsatz in der prä- und postnatalen Diagnostik, Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians Universitaet Muenchen, Muenchen.
- Li, C., and Hung Wong, W. (2001). Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biol* 2, RESEARCH0032.
- Lichter, P., Cremer, T., Borden, J., Manuelidis, L., and Ward, D. C. (1988). Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet* 80, 224-234.
- Lin, C., Lin, J., and Prout, G., Jr (1985). Establishment and characterization of four human bladder tumor cell lines and sublines with different degrees of malignancy
Cancer Res 45, 5070-5079.
- Little, B. (2003). Non-invasive methods of bladder cancer detection. *Int Urol Nephrol* 35, 331-343.
- Little, C. D., Nau, M. M., Carney, D. N., Gazdar, A. F., and Minna, J. D. (1983). Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature* 306, 194-196.
- Liu, W. M., Di, X., Yang, G., Matsuzaki, H., Huang, J., Mei, R., Ryder, T. B., Webster, T. A., Dong, S., Liu, G., *et al.* (2003). Algorithms for large-scale genotyping microarrays. *Bioinformatics* 19, 2397-2403.
- Loeb, L. A. (2001). A Mutator Phenotype in Cancer. *Cancer Res* 61, 3230-3239.
- Mao, L. (2000). Microsatellite analysis. Applications and pitfalls. *Ann N Y Acad Sci* 906, 55-62.
- Nadine Van Roy, J. V., Björn Menten, Helén Nilsson, Els De Smet, Mariano Rocchi, Anne De Paepe, Sven Pålman, Frank Speleman, (2005). Translocation-excision-deletion-amplification mechanism leading to nonsyntenic coamplification of MYC and ATBF1. *Genes, Chromosomes and Cancer* 9999, NA.
- O'Toole, C. M., Povey, S., Hepburn, P., and Franks, L. M. (1983). Identity of some human bladder cancer cell lines. *301*, 429-430.
- Piper, J., Rutovitz, D., Sudar, D., Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Waldman, F. M., Gray, J. W., and Pinkel, D. (1995). Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 19, 10-26.
- Raschke, S., Balz, V., Efferth, T., Schulz, W. A., and Florl, A. R. (2005). Homozygous deletions of CDKN2A caused by alternative mechanisms in various human cancer cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 42, 58-67.
- Rauch, A., Ruschendorf, F., Huang, J., Trautmann, U., Becker, C., Thiel, C., Jones, K. W., Reis, A., and Nurnberg, P. (2004). Molecular karyotyping using an SNP array for genomewide genotyping. *J Med Genet* 41, 916-922.
- Reznikoff, C. A., Sarkar, S., Julicher, K. P., Burger, M. S., Puthenveetil, J. A., Jarrard, D. F., and Newton, M. A. (2000). Genetic alterations and biological pathways in human bladder cancer pathogenesis. *Urol Oncol* 5, 191-203.
- Rozen, S., and Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132, 365-386.
- Sambrook, J., and Russel, D. w. (2001). *Molecular Cloning- A Laboratory Manual*, 3 edn (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Schrock, E., du Manoir, S., Veldman, T., Schoell, B., Wienberg, J., Ferguson-Smith, M. A., Ning, Y., Ledbetter, D. H., Bar-Am, I., Soenksen, D., *et al.* (1996). Multicolor Spectral Karyotyping of Human Chromosomes. *Science* 273, 494-497.
- Sebat, J., Lakshmi, B., Troge, J., Alexander, J., Young, J., Lundin, P., Maner, S., Massa, H., Walker, M., Chi, M., *et al.* (2004). Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 305, 525-528.
- Sharp, A. J., Locke, D. P., McGrath, S. D., Cheng, Z., Bailey, J. A., Vallente, R. U., Pertz, L. M., Clark, R. A., Schwartz, S., Segraves, R., *et al.* (2005). Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. *Am J Hum Genet* 77, 78-88.

- Simon, R., Eltze, E., Schafer, K. L., Burger, H., Semjonow, A., Hertle, L., Dockhorn-Dworniczak, B., Terpe, H. J., and Bocker, W. (2001). Cytogenetic analysis of multifocal bladder cancer supports a monoclonal origin and intraepithelial spread of tumor cells. *Cancer Res* 61, 355-362.
- Speicher, M. R., and Carter, N. P. (2005). The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet* 6, 782-792.
- Speicher, M. R., Gwyn Ballard, S., and Ward, D. C. (1996). Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 12, 368-375.
- Speicher, M. R., Petersen, S., Uhrig, S., Jentsch, I., Fauth, C., Eils, R., and Petersen, I. (2000). Analysis of chromosomal alterations in non-small cell lung cancer by multiplex-FISH, comparative genomic hybridization, and multicolor bar coding. *Lab Invest* 80, 1031-1041.
- Speicher, M. R., and Ward, D. C. (1996). The coloring of cytogenetics. *Nat Med* 2, 1046-1048.
- Spelemann, F., Vandesopele, J., Nielsson, H., Menten, B., De Smet, E., De Paepe, A., Pahlman, S., and Van Roy, N. (2004). Combined FISH and SNP array analysis of a translocation - excision - amplification process in the formation of complex amplicons (complicons). Paper presented at: First Marie Curie Conference on array CGH and Molecular Cytogenetics (Hixton, UK).
- Steiner, G., Schoenberg, M. P., Linn, J. F., Mao, L., and Sidransky, D. (1997). Detection of bladder cancer recurrence by microsatellite analysis of urine. *Nat Med* 3, 621-624.
- Stoehr, R., Zietz, S., Burger, M., Filbeck, T., Denzinger, S., Obermann, E. C., Hammerschmied, C., Wieland, W. F., Knuechel, R., and Hartmann, A. (2005). Deletions of chromosomes 9 and 8p in histologically normal urothelium of patients with bladder cancer. *Eur Urol* 47, 58-63.
- Strachan, T., and Read, A. P. (1999). *Human Molecular Genetics*, 2 edn (Oxford, UK, BIOS Scientific Publishers Ltd).
- Strachan, T., and Read, A. P. (2004). *Human Molecular Genetics*, 3 edn (London, Garland Science).
- Strefford, J. C., Lillington, D. M., Steggall, M., Lane, T. M., Nouri, A. M. E., Young, B. D., and Oliver, R. T. D. (2002). Novel chromosome findings in bladder cancer cell lines detected with multiplex fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 135, 139-146.
- Tanke, H. J., Wiegant, J., van Gijlswijk, R. P., Bezrookove, V., Pattenier, H., Heetebrij, R. J., Talman, E. G., Raap, A. K., and Vrolijk, J. (1999). New strategy for multi-colour fluorescence in situ hybridisation: COBRA: COmbined Binary RAtio labelling. *Eur J Hum Genet* 7, 2-11.
- Teh, M. T., Blaydon, D., Chaplin, T., Foot, N. J., Skoulakis, S., Raghavan, M., Harwood, C. A., Proby, C. M., Philpott, M. P., Young, B. D., and Kelsell, D. P. (2005). Genomewide single nucleotide polymorphism microarray mapping in basal cell carcinomas unveils uniparental disomy as a key somatic event. *Cancer Res* 65, 8597-8603.
- Telenius, H., Pelmear, A. H., Tunnacliffe, A., Carter, N. P., Behmel, A., Ferguson-Smith, M. A., Nordenskjold, M., Pfragner, R., and Ponder, B. A. (1992). Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer* 4, 257-263.
- Tsuchida, Y., Hemmi, H., Inoue, A., Obana, K., Yang, H. W., Hayashi, Y., Kanda, N., and Shimatake, H. (1996). Genetic clinical markers of human neuroblastoma with special reference to N-myc oncogene: amplified or not amplified?--An overview. *Tumour Biol* 17, 65-74.
- Tuzun, E., Sharp, A. J., Bailey, J. A., Kaul, R., Morrison, V. A., Pertz, L. M., Haugen, E., Hayden, H., Albertson, D., Pinkel, D., *et al.* (2005). Fine-scale structural variation of the human genome. *Nat Genet* 37, 727-732.
- Wild, P. J., Herr, A., Wissmann, C., Stoehr, R., Rosenthal, A., Zaak, D., Simon, R., Knuechel, R., Pilarsky, C., and Hartmann, A. (2005). Gene expression profiling of progressive papillary noninvasive carcinomas of the urinary bladder. *Clin Cancer Res* 11, 4415-4429.
- Wu, X. R. (2005). Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nat Rev Cancer* 5, 713-725.
- Zhao, X., Li, C., Paez, J. G., Chin, K., Janne, P. A., Chen, T.-H., Girard, L., Minna, J., Christiani, D., Leo, C., *et al.* (2004). An Integrated View of Copy Number and Allelic Alterations in the Cancer Genome Using Single Nucleotide Polymorphism Arrays. *Cancer Res* 64, 3060-3071.
- Zhao, X., Weir, B. A., LaFramboise, T., Lin, M., Beroukhir, R., Garraway, L., Beheshti, J., Lee, J. C., Naoki, K., Richards, W. G., *et al.* (2005). Homozygous Deletions and Chromosome Amplifications in Human Lung Carcinomas Revealed by Single Nucleotide Polymorphism Array Analysis. *Cancer Res* 65, 5561-5570.
- Zumbrägel, A., Bichler, K. H., Krause, F. S., Feil, G., and Nelde, H. J. (2003). The photodynamic diagnosis (PDD) for early detection of carcinoma and dysplasia of the bladder. *Adv Exp Med Biol* 539, 61-66.

F: Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichniss:

Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
C	Cytosin, Kohlenstoff
CNT	Affymetrix® GeneChip® Chromosom Copy Number Analysis
Tool	
Cy-3	5,5'-Disulfo-1,1'-di(χ -carbopentynyl)-3,3,3',3' tetramethyindol-Cy 3.18-Derivat, N-hydroxysuccimidester
Cy-5	5,5'-Disulfo-1,1'-di(χ -carbopentynyl)-3,3,3',3' tetramethyindol-Cy 5.18-Derivat, N-hydroxysuccimidester
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Deoxyribonuklease
DNS	Deoxyribonukleinsäure
ds	double stranded, doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et. al.</i>	<i>et alteri</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol unvergällt
FA	Formamid
FITC	5,(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccimidester
g	Fallbeschleunigung, Gramm
G	Guanin
HSR	Homogenous Staining Region
μ	Mikro (10^{-6})
m	Milli (10^{-3}), Meter
M	Molar
MP	Metaphase
N.B.	nota bene, lat. "merke wohl"
min	Minute
ml	Milliliter
n	Nano (10^{-9})
N	Normal
OD _x	optische Dichte, gemessen bei einer Wellenlänge von x nm
p.a.	pro analysi
PBS	Phosphat-gepufferte-Saline- Lösung
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase Kettenreaktion
RT	Raumtemperatur
ss	single stranded, einzelsträngig
T	Thymin
Taq	DNS abhängige DNS Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	units, Uracil
Upm	Umdrehungen pro Minute
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumenanteile
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Notwendige Schritte für die Transformation einer Zelle zur Tumorzelle 8

Abbildung 2: Verteilung der SNPs auf dem Affymetrix 10k Mapping Assay über das Humane Genom..... 11

Abbildung 3: Schema zur TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms (nach (Bichler et al., 2000) 14

Abbildung 4: Entwicklung von Harnblasenkarzinomen;..... 15

Abbildung 5: Zwei verschiedene Wege zur Entstehung und Progression des Harnblasenkarzinoms..... 17

Abbildung 6: Amplifikationsgraphen für das GAPDH-Gen. 38

Abbildung 7: $\Delta\Delta$ Ct-Methode zur Berechnung der relativen Konzentration eines Gens 38

Abbildung 8: Markierungsschema für 7-Fluorochrom M-FISH 41

Abbildung 9: Überblick über die Funktionsweise des Affymetrix GeneChip Mapping Assays 51

Abbildung 10: Gelkontrolle der PCR-Produkte für den Affymetrix GeneChip Mapping Assay 53

Abbildung 11: Schema zur Elution bei der Aufreinigung der PCR-Produkte für den Affymetrix GeneChip Mapping Assays 54

Abbildung 12: Spezifische Hybridisierung auf dem Affymetrix GeneChip Mapping Assay 58

Abbildung 13: Verteilung von RAS-Werten verschiedener Proben für einen bestimmten SNP 59

Abbildung 14: Medoid und Call Zone; 60

Abbildung 15: Berechnung des Call-Zonen Wertes („Distance to Radius ratio“, DTR). 61

Abbildung 16: MPAM (Modified Partitioning Around Medoids) Mapping Analysis Fenster:..... 62

Abbildung 17: Karyogramm der Zelllinie BC3C in den Klassifizierungsfarben 68

Abbildung 18: Karyogramm der Zelllinie Cal29 in den Klassifizierungsfarben 69

Abbildung 19: Karyogramm der Zelllinie EJ28 in den Klassifizierungsfarben..... 70

Abbildung 20: Karyogramm der Zelllinie HT1376 in den Klassifizierungsfarben 71

Abbildung 21: Karyogramm der Zelllinie SW1710 in den Klassifizierungsfarben 72

Abbildung 22: Karyogramm der Zelllinie T24 in den Klassifizierungsfarben..... 73

Abbildung 23: CGH-Profil Zelllinie Cal29 74

Abbildung 24: CGH-Profil Zelllinie EJ28..... 75

Abbildung 25: CGH-Profil Zelllinie HT1367 76

Abbildung 26: CGH-Profil Zelllinie SW1710 77

Abbildung 27: CGH-Profil Zelllinie T24..... 78

Abbildung 28: CGH-Profil Zelllinie BC3C 79

Abbildung 29: GDAS-Report der Zelllinien-Arrays 81

Abbildung 30: Affymetrix GeneChip Mapping Assay Hybridisierungsbilder der Zelllinien 83

Abbildung 31: Kopienzahl Analyse mit dChip; Darstellung der beobachteten Kopienzahl 85

Abbildung 32: Kopienzahl Analyse mit dChip, Darstellung der abgeleiteten Kopienzahl 87

Abbildung 33: Unterschiede in der Kopienzahlanalyse verursacht durch Array-Ausreißer am Chromosom 9 89

Abbildung 34: Zusammenfassung Array Daten und CGH für Chromosom 4 91

Abbildung 35: Zusammenfassung Array Daten und CGH für Chromosom 8 93

Abbildung 36: Zusammenfassung Array Daten und CGH für Chromosom 20 96

Abbildung 37: Zusammenfassung Array Daten und CGH für Chromosom 9 99

Abbildung 38: BAC-FISJ Chromosom 10 der Zelllinie EJ28 101

F: Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 39: Hybridisierung auf Zelllinie EJ28 mit BACs, die in die deletierte, bzw. amplifizierte Region fallen. Signale sind mit Pfeilen markiert.	102
Abbildung 40: Hybridisierung auf Zelllinie EJ28 mit BACs, die in die deletierte, bzw. amplifizierte Region fallen. Signale sind mit Pfeilen markiert	103
Abbildung 41: BAC-FISH Chromosom 8 der Zelllinie SW1710.....	104
Abbildung 42: BAC-FISH Chromosom 11 der Zelllinie SW1710.....	105
Abbildung 43: BAC-FISH Chromosom 12 der Zelllinie SW1710.....	106
Abbildung 44: BAC-FISH Chromosom 15 der Zelllinie SW1710.....	107
Abbildung 45: BAC-FISH Chromosom 9 der Zelllinie BC3C.....	108
Abbildung 46: Graphischer Zusammenhang von deletierter Region, hybridisierter BACs und Genen	109
Abbildung 47: Zusammenfassung der BAC-FISH in der p16-Region.....	110
Abbildung 48: Relative Kopienzahl des p14 Gens mit PFK als endogene Referenz	111
Abbildung 49: Relative Kopienzahl des p14 Gens mit GAPDH als endogene Referenz	111
Abbildung 50: Physikalische Karte der Region 9p21 mit den Genen p14, p15 und p16 aus (Raschke et al., 2005).	111
Abbildung 51: Ergebnis der spezifischen PCR.....	113
Abbildung 52: Zusammenstellung von Affymetrix GeneChip [®] Mapping Assay, BAC-FISH und PCR Ergebnissen:.....	114
Abbildung 53: Allelverteilung und LOH-Analyse bei Zelllinien EJ28 und T24	116
Abbildung 54: GDAS-Report file Patientenproben.....	117
Abbildung 55: dChip Report file, Patientenproben.....	118
Abbildung 56: Abgeleitete Kopienzahl (dChip) der Patientenproben, Chromosomen 1-7	120
Abbildung 57: Abgeleitete Kopienzahl (dChip) der Patientenproben, Chromosomen 7-X.....	121
Abbildung 58: LOH Analyse der Patientenproben, Chromosomen 1-7.....	123
Abbildung 59: : LOH Analyse der Patientenproben, Chromosomen 7-X	124
Abbildung 60: : LOH Analyse der Patientenproben, Chromosomen 1-7.....	125
Abbildung 61: : LOH Analyse der Patientenproben, Chromosomen 7-X	126
Abbildung 62: LOH und Kopienzahlveränderungen am Chromosom 1, 2, 3 und 4	129
Abbildung 63: LOH und Kopienzahlveränderungen am Chromosom 5, 6, 7 und 8	130
Abbildung 64: LOH und Kopienzahlveränderungen am Chromosom 9, 10,11 und 12	131
Abbildung 65: LOH und Kopienzahlveränderungen am Chromosom 13, 14, 15 und 16	132
Abbildung 66: LOH und Kopienzahlveränderungen am Chromosom 17, 18, 19 und 20	133
Abbildung 67: LOH und Kopienzahlveränderungen am Chromosom 21 und 22	134
Abbildung 68: CGH-Profil de Gewebeprobe CB17_26062U, frühes Harnblasenkarzinom (pTaG1).....	135
Abbildung 69: CGH-Profil de Gewebeprobe CB21_4418U, frühes Harnblasenkarzinom (pTaG1)	136
Abbildung 70: CGH-Profil de Gewebeprobe CB24_4423U, frühes Harnblasenkarzinom (pTaG1)	137
Abbildung 71: Zusammenfassung numerischer Aberrationen bei Harnblasenkarzinomen (http://www.progenetix.com)	154

Gleichungen:

Gleichung 1: Berechnung der RAS-Werte:.....	58
Gleichung 2: Berechnung der „Heterozygous Call Ration Boundary“ zur Geschlechtsbestimmung.....	61
Gleichung 3: Berechnung der Kopienzahl mit Affymetrix CN-Tool	62
Gleichung 4: Beobachtete Kopienzahl, dChip	67

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Verwendete Fluorochrome	21
Tabelle 2: Verwendete Technische Geräte	22
Tabelle 3: Hybridisierte Bacterial Artificial Klone	23
Tabelle 4: Verwendete Zelllinien	24
Tabelle 5: Verwendete Gewebeproben.....	26
Tabelle 6: Verwendete Nährmedien.....	27
Tabelle 7: Empfohlene Nährmedien.....	28
Tabelle 8: Verwendete PCR.....	32
Tabelle 9: Primer und Proben für die qPCR.....	36
Tabelle 10: Herstellung von Mastermix	37
Tabelle 11: Verwendete Referenz-DNS für Affymetrix GeneChip □ Mapping Assay.....	65
Tabelle 12: Mittlere Signalintensitäten, SNP-Call Rate und Outlier der hybridisierten Mapping Arrays	66
Tabelle 13: Häufigkeit von numerischen Aberrationen (keine Unterscheidung in Deletion oder Amplifikation) bei den sechs untersuchten Zelllinien in Bezug auf die einzelnen Chromosomenarme.	80
Tabelle 14: Allelverteilung der 307 SNPs auf dem X-Chromosom.....	82
Tabelle 15: Mittlere Signalintensitäten, SNP-Call Rate und Outlier der hybridisierten Zelllinien	82
Tabelle 16: Gene in der amplifizierten Region auf Chromosom 10p11.22-p11.21 der Zelllinie EJ28	102
Tabelle 17: SNPs und ihre physikalisch Position	109
Tabelle 18: Gene in der deletierten Region.....	109
Tabelle 19: Zusammenhang BAC, SNPs und Primer.....	112
Tabelle 20: Konkordanz der Allelverteilung zwischen den Zelllinien	115

G: Anhang

G.1: Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. med. Thomas Cremer für die Möglichkeit, diese interessante Arbeit an seinem Institut durchführen zu können und für die Übernahme des Gutachtens.

Herrn PD Dr. med. Michael Speicher für die Betreuung und Finanzierung der Doktorarbeit, für die fachliche Unterstützung und die Möglichkeit in seinem Labor so viel dazu zu lernen.

Frau PD Dr. Gisela Keller vom Institut für Pathologie des Klinikums r.d. Isar für das Bereitstellen von Gewebeproben und ihrer Mitarbeiterin Dr. Karin Mailänder für ihre Freundschaft und die konstruktive Zusammenarbeit beim Einarbeiten in die Affymetrix GeneChip® Mapping Assay Technologie.

Herrn Dr. Matthias Prucha von der Fa. Affymetrix für die zuverlässige Unterstützung und die Beantwortung vieler Fragen rund um die Affymetrix GeneChip® Mapping Assays.

Frau Prof. Dr. med. Ruth Knüchel vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Aachen und ihrer Mitarbeiterin Dipl.-Biochem. Stella Kofou für die Einführung in die Pathologie der Harnblasenkarzinome und die Bereitstellung gut charakterisierter Tumorproben.

Dr. Sabine Langer für ihr Beispiel an Loyalität und Zuverlässigkeit.

meinen Kolleginnen Dipl.-Biol. Katrin Pfleghaar und Dipl.-Biol. Simone Brero, ohne die diese Arbeit nie ein Ende gefunden hätte. Ein ganz besonders herzliches Dankeschön an dieser Stelle!

den „Mädels von der Diagnostik“, für ihr jederzeit offenes Ohr. Corinna Keri und Gaby Lederer darüber hinaus für Rat und Hilfe bei der Zellkultur und dem Erstellen von Karyogrammen und Doris Sollacher für DNS in Mengen.

Marion Fürst und Melanie Odenigbo für die angenehme Zusammenarbeite und die freundliche und entspannte Atmosphäre im Labor.

G.2 Lebenslauf, akademisch

Besuchte Schulen und Hochschulen:

1981-1985	Grundschule an der Ostpreußenstrasse, München, Deutschland
1985-1994	Städtisches St. Anna Gymnasium, München, Deutschland
1995-1998	Studium der Biologie an der Ludwig Maximilians Universität, München, Deutschland
1998-1999	Studium der Biologie an der Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA
1999-2001	Studium der Biologie an der Technischen Universität München, Freising, Deutschland
2001-2002	Promotion am Lehrstuhl für Mikrobiologie an der Technischen Universität München, Freising, Deutschland
2002-heute	Promotion am Lehrstuhl für Humangenetik an der Technischen Universität München, München, Deutschland

Schulabschlüsse:

Mai 1994	Allgemeine Hochschulreife, Abitur
Mai 1998	Vordiplom Biologie
August 2001	Diplom Biologie

Auslandsaufenthalt/Stipendium:

1998-1999	Fulbrightstipendium für ein Studienjahr in den USA
-----------	--

G.3 Erklärung

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, Cora Beier, die vorliegende Arbeit, selbständig und nur unter Verwendung der zugelassenen Hilfsmittel angefertigt zu haben.