

Aus der
Universitäts-Frauenklinik Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Wallwiener

**Untersuchung genetischer Aberrationen am duktal invasiven
Mammakarzinom mittels Laser Capture Microdissection
(LCM) und Comparativer Genomischer Hybridisierung -
Etablierung einer neuen Methode**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Ute Christine Braig
aus
Reutlingen
2002

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter: Professor Dr. D. Wallwiener
2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. h.c. N. Blin

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Das Mammakarzinom	1
1.2. Comparative Genomische Hybridisierung und Laser Capture Microdissection	4
1.3. Fragestellung	7
2. MATERIAL UND METHODEN	9
2.1. Übersicht über die verwendeten Techniken	9
2.2. Die Technik der Laser Capture Microdissection (LCM) und der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH)	10
2.2.1. Die Laser Capture Microdissection	10
2.2.2. Die Comparative Genomische Hybridisierung (CGH)	13
2.3. DNA-Gewinnung	15
2.3.1. Ausgangsmaterial	15
2.3.2. Zellkultur von MCF-7 Zellen	16
2.3.3. Gewebeasservation	17
2.3.4. Kryoschnitte, Fixierung und HE-Färbung für die LCM	17
2.3.5. Mikrodissektion mit der LCM	19
2.3.6. DNA-Isolation aus Tumorproben	20
2.3.7. DNA-Isolation aus MCF-7 Zellen und Plazenta	22
2.4. Polymerasekettenreaktion (PCR) mit degenerierten Primern	23
2.4.1. Degenerate Oligonucleotid Primed-PCR (DOP-PCR)	23
2.4.2. Aufreinigung der DOP-PCR-Produkte	26
2.5. Markierung der Proben in der Nicktranslation	27
2.5.1. Nicktranslation durch indirekte Markierung (Ulmer Protokoll)	27
2.5.2. Nicktranslation durch direkte Markierung (Vysis-Protokoll)	30
2.6. Comparative Genomische Hybridisierung (CGH)	32
2.6.1. Ulmer Protokoll	32
2.6.2. Protokoll nach Vysis	36
2.7. Auswertung der CGH	38
2.7.1. Digitale Bildanalyse	39
2.7.2. Auswertung der Fluoreszenzbilder	40
3. ERGEBNISSE	43
3.1. Laser Capture Microdissection (LCM)	43
3.2. DNA-Isolation	46
3.3. PCR mit degenerierten Primern (DOP-PCR)	46
3.4. Nicktranslation	49
3.5. Comparative Genomische Hybridisierung (CGH)	51
3.5.1. CGH von Tumor-DNA nach LCM	52
3.5.2. CGH von Plazenta-DNA (Negativkontrolle)	58
3.5.3. CGH von MCF-7 (Positivkontrolle)	60
3.5.4. Weitere CGH-Ergebnisse	61
3.5.5. Qualitätsunterschiede der CGH-Ergebnisse	67
4. DISKUSSION	68

4.1. Mikrodissektion.....	68
4.1.1. Verschiedene Mikrodissektionstechniken	69
4.1.2. Die Laser Capture Microdissection (LCM).....	71
4.2. Kritische Wertung der LCM	73
4.2.1. Tumorasservation - Einfluss der Asservationszeiten.....	73
4.2.2. Gewebeaufarbeitung für die LCM (Kryoschnitte und Färbung) – Optimierung der einzelnen Schritte	74
4.2.3. Der Dissektionsvorgang	76
4.2.4. DNA-Aufarbeitung nach LCM	77
4.2.5. LCM an Mammakarzinom.....	78
4.3. Kritische Wertung der DOP-PCR	79
4.3.1. Die Methodik der DOP-PCR.....	79
4.3.2. DOP-PCR nach LCM	80
4.4. Kritische Wertung der CGH.....	80
4.4.1. Die Methodik der Nicktranslation.....	80
4.4.2. Die Technik der CGH – Vorteile und Grenzen.....	82
4.5. Kritische Wertung der Kombination von Mikrodissektion, DOP-PCR und CGH – eigene Erfahrungen und Ergebnisse.....	84
4.5.1. Etablierung der Methoden	84
4.5.2. Interpretation der eigenen CGH-Ergebnisse.....	87
4.6. Kritische Wertung von CGH-Studien am Mammakarzinom – Heterogenität der Literatur.....	89
4.6.1. Die Kombination von Mikrodissektion, DOP-PCR und CGH – Methodische Heterogenität der bisherigen Untersuchungen	89
4.6.2. Vergleich der Ergebnisse von CGH-Untersuchungen am Mammakarzinom.....	91
4.7. Schlussfolgerung und weitere Fragestellungen.....	100
5. ZUSAMMENFASSUNG	102
6. ABKÜRZUNGEN	104
7. LITERATURVERZEICHNIS	106
8. ANHANG	113
8.1. Substanzen.....	113
8.2. Puffer.....	113
8.3. Geräte	115
8.4. Tumorentabelle	115
Danksagung	118
Lebenslauf	119

1. EINLEITUNG

1.1. Das Mammakarzinom

Epidemiologisch ist das Mammakarzinom der häufigste maligne Tumor der Frau in den westlichen Ländern. Seine Inzidenz steigt seit 1930 jährlich (Holford TR, 1991). Nach Schätzungen beträgt das Erkrankungsrisiko in der Bundesrepublik Deutschland 9–10%, wobei das Risiko mit dem Alter zunimmt und der Altersgipfel zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr liegt. Die Heilungsrate liegt weltweit bei 35-45%, bei einer 10-Jahres-Überlebensrate von 30% (Schmidt-Matthiesen et al., 2000). Die Gesamtmortalität beträgt 30%.

Molekulargenetisch gesehen ist das Mammakarzinom eine komplexe, heterogene Erkrankung, die durch größtenteils noch ungeklärte Interaktionen genetischer und nicht genetischer Faktoren entsteht (Blackwood and Weber, 1998). 94% der Mammakarzinome entstehen spontan, nur etwa 6% sind hereditären Ursprungs und mit Mutationen der Tumorsuppressorgene BRCA1, BRCA2 assoziiert (Couch and L., 1998). Nicht genetisch bedingte Risikofaktoren sind Übergewicht im Alter, Gewichtszunahme, Bewegungsarmut, starker Alkoholkonsum, die regelmäßige Einnahme der Pille vor dem 18. Lebensjahr, Östrogensubstitution im Klimakterium über mehr als fünf Jahre und eine übermäßige Strahlenbelastung von Jugendlichen. Außerdem werden eine frühe Menarche, eine späte Menopause und eine späte erste Schwangerschaft als risikosteigernde Faktoren diskutiert (Schmidt-Matthiesen et al., 2000).

Als genetische Faktoren für die spontan entstehenden Karzinome konnten bislang verschiedene somatische Genveränderungen und Proteinprodukte beschrieben werden, deren Amplifikation oder Inaktivierung eine Rolle spielen. So zum Beispiel Amplifikationen (Zugewinn) von Chromosomenabschnitten, die für Onkogene kodieren wie die Genabschnitte 8q24 (kodiert das Proto-Onkogen c-Myc) (Aubele et al., 2000a), 17q12 (kodiert das Onkogen erbB2) (Murphy et al., 1995) bzw. Deletionen (Verlust) von Chromosomenabschnitten wie 11q13 (kodiert das Tumorsuppressorgen Cyclin D).

Ein Sequenzmodell vergleichbar dem Kolonkarzinom (Vogelstein et al., 1988) ausgehend von Precursor-Läsionen wird postuliert, ist aber noch nicht nachgewiesen.

Histopathologisch geht das Mammakarzinom vom Epithel des Drüsengewebes aus und ist damit ein Adenokarzinom. Entstehungsort sind die terminalen Ductuli des Brustdrüsensystems, die durch den Zyklus starken hormonellen Proliferationseinflüssen unterliegen. Im Wesentlichen wird das invasive duktales Karzinom (IDC), das von den Milchgängen ausgeht und 80% der Karzinome ausmacht (Rosen, 1996), vom selteneren invasiven lobulären Karzinom (ILC), das in den Drüsenläppchen entsteht, unterschieden. Das invasive Karzinom ist durch frühzeitige lymphogene Metastasierung in die axillären Lymphknoten und hämatogene Metastasierung in das Knochenmark, sowie Leber, Lunge und Gehirn charakterisiert und wird daher häufig auch als systemische Erkrankung angesehen.

Dem invasiven duktales Karzinom geht eine Precursor-Läsion voraus, das duktales Carcinoma in situ (DCIS), dessen Zellen alle phänotypischen Malignitätskriterien bis auf die Invasion der umgebenden Basalmembran zeigen (Consensus-Conference, 1997).

Die Einschätzung des Tumorstadiums und der Aggressivität eines Tumors mit dem Ziel prädiktiver und prognostischer Schlussfolgerungen erfolgt bislang anhand der folgenden Kriterien:

- Histologisch mit Hilfe der pTNM-Klassifikation (= postoperatives histopathologisches Staging) nach Größe des Primärtumors (T), Lymphknotenbefall (N) und Fernmetastasierung (M)
- Nach Differenzierung der Zellen (Grading)
- Immunhistochemische Unterschiede in der Expression der Hormonrezeptoren für Östrogen und Progesteron
- Hinzugekommen ist seit kurzem die Bestimmung einer evtl. Überexpression des Onkogens HER/2neu (c-erbB2) (immunhistochemischer Nachweis), welches mit einer schlechten Prognose assoziiert, aber mit Trastuzumab (Herceptin) günstig zu beeinflussen ist.

Diese Faktoren haben Einfluss auf die Therapie.

Darüber hinaus werden folgende Parameter bestimmt:

- Unterschiedliche Ploidie (Aneuploidie, Polyploidie) in der Durchflusszytometrie
- Nachweis von EGF-Rezeptoren (Wachstumsfaktor), Kathepsin D (Faktor für invasives Wachstum), p53-Mutationen (Tumorsuppressorgen: ungünstige Prognose), bcl-2 (Apoptosemarker), Mib-1 (Proliferationsindex)
(Schmidt-Matthiesen et al., 2000)

Grundprinzip der *Therapie des Mammakarzinoms* ist die Früherkennung mittels Tastbefund und Mammographie, Sonographie und/oder Magnetresonanztomographie (MRT) mit dem Ziel einer Therapie vor der Bildung klinisch manifester Metastasen. Daraus ergeben sich zwei therapeutische Zielsetzungen: a) lokale Kontrolle des Primärtumors und der ipsilateralen axillären Lymphknoten und b) Bekämpfung klinisch unauffälliger Mikrometastasen. (Harris et al., 1993)

Da es sich beim Mammakarzinom um eine systemische Erkrankung handelt, besteht die Therapie entsprechend aus einer Kombination operativer, strahlentherapeutischer und systemischer Verfahren (Chemotherapie, Hormontherapie). Eine optimale Therapie sollte möglichst individuell gestaltet werden, um aggressive Tumorsubtypen entsprechend intensiv behandeln und bei weniger aggressiven Tumoren schonendere Verfahren einsetzen zu können (Donegan, 1997). Mit den oben aufgeführten zur Zeit zur Verfügung stehenden Kriterien wie Tumorgöße, Lymphknotenbefall, Metastasierung, Differenzierungsgrad und Hormonrezeptorstatus ist dies jedoch nur bedingt möglich. Bei Tumoren >5 mm wird nach heutigem Standard eine axilläre Lymphonodektomie (Level I und II) durchgeführt. Diese Maßnahme ist in vielen Fällen kein kurativer Eingriff, sondern dient in erster Linie dem Staging. Daher wird nach Möglichkeiten gesucht, weniger aggressive Tumoren, z.B. Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen, von aggressiveren Formen bereits vor einer Lymphknotenentfernung unterscheiden zu können. In Studien wird bereits erprobt, ob es sinnvoll ist, durch individuelles Lymphknotenmapping den ersten Lymphknoten („Wächter-Lymphknoten“) des axillären Lymphabflusssystem nach Markierung der Lymphabflussbahn zu entfernen und auf die Entfernung weiterer Lymphknoten zu verzichten, sofern dieser tumorfrei ist (Sentinel-Lymphonodektomie).

Eine wesentliche Verbesserung des aktuellen Therapiestandards setzt die Kenntnis von exakten Markern für die Aggressivität von Tumoren voraus und würde so deren frühzeitige Differenzierung in leichte und schwere Formen ermöglichen. Ein Schritt auf dem Weg zur Identifizierung solcher Marker ist die Untersuchung von Unterschieden in DNA-Veränderungen bei DCIS, invasivem Karzinom und Metastase auf genomischer Ebene. Solche Marker wären eine wesentliche Voraussetzung zur Charakterisierung des Progressionsverhaltens von Tumoren und zur entsprechend individuell gestalteten Therapie. So könnte in einer Vielzahl von Fällen die bislang aus empirischen Gründen durchgeführte Lymphknotenentfernung und nachfolgende Chemotherapie entfallen, und so der Patientin Komplikationen wie Lymphabflussstörung und Nebenwirkungen der Zytostatika erspart bleiben. Patientinnen mit aggressiven Tumoren dagegen könnten gezielt intensiviert behandelt werden.

1.2. Comparative Genomische Hybridisierung und Laser Capture Microdissection

Molekularbiologische Untersuchungsmethoden der Erbinformation

Die Erbinformation ist in der Basensequenz von DNA-Molekülen festgelegt. Die Weitergabe der Erbinformation erfolgt zunächst durch Kopieren der gesamten DNA (=Replikation). Das Ablesen und Umsetzen, die sogenannte Expression der genetischen Information, findet in der Transkription statt, an die sich die Proteinbiosynthese (Translation) anschließt. Genveränderungen von Tumoren können entsprechend der Replikation der DNA, der Transkription und der Proteinbiosynthese auf drei verschiedenen Ebenen molekularbiologisch untersucht werden (Abb.1.1). Auf der genomischen oder Replikationsebene kann die komplette DNA einer Zelle, die genomische DNA, z.B. mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) oder Comparativer Genomischer Hybridisierung (CGH) untersucht werden. Analysetechniken auf Transkriptionsebene sind die Differential-Display-Polymerasekettenreaktion (DD-PCR) oder die Subtraktive Hybridisierung (SSH), mit denen ausschließlich die abgelesenen Abschnitte der DNA, die mRNA (messenger RNA) bzw. die cDNA (copy-DNA)

untersucht werden. Die tatsächlich exprimierten Proteine können mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese untersucht werden.

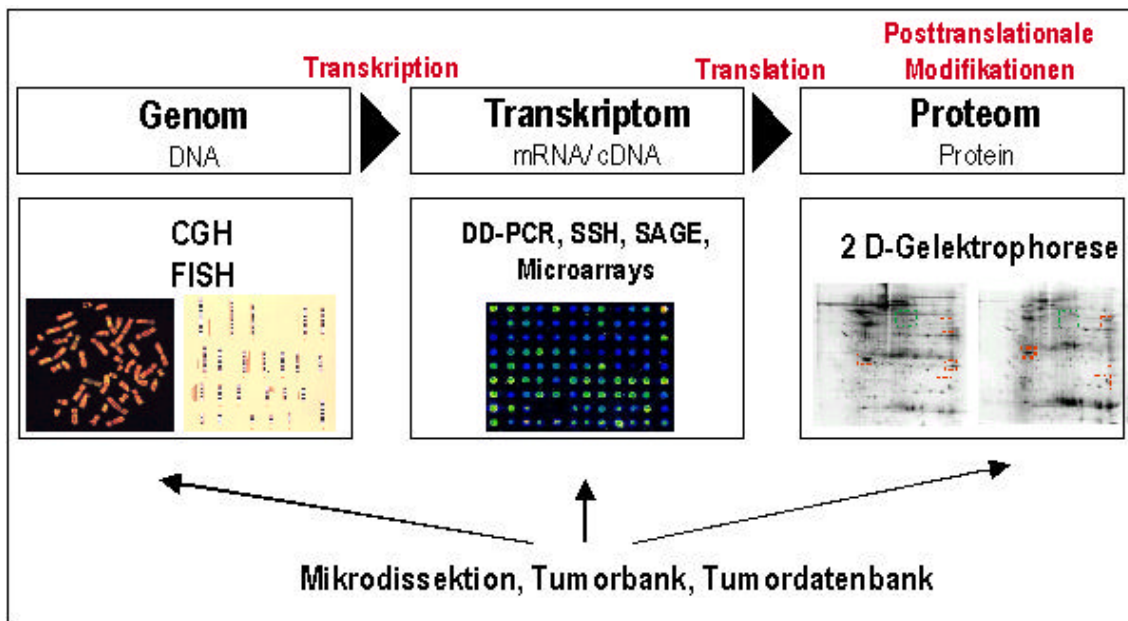


Abb 1.1: Das Schema zeigt verschiedene molekularzytogenetische Untersuchungsmethoden. Je nach Analyseebene (Genom-, Transkriptom-, Proteomebene) kann das genetische Material, das mittels Mikrodissektion aus Proben aus der Tumorbank gewonnen wird, mit verschiedenen Techniken untersucht werden: DNA auf Genomebene mittels Comparativer Genomischer Hybridisierung (CGH) und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), cDNA auf Transkriptomebene mittels Differential-Display-Polymerasekettenreaktion (DD-PCR), Subtraktiver Hybridisierung (SSH), Serial analysis of gene expression (SAGE) oder Microarrays und Proteine mittels 2 D-Gelelektrophorese.

Die Comparative Genomische Hybridisierung (CGH)

Die Comparative Genomische Hybridisierung (CGH) ist eine auf der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) basierende molekularzytogenetische Methode, mit der in einem einzigen Experiment das komplette Genom auf Aberrationen (Zugewinne und Verluste von DNA) untersucht werden kann. Dies ist mittels FISH, bei der mit Hilfe von Sonden nur einzelne, bereits bekannte Gene analysiert werden können, nicht möglich. Bei der CGH handelt es sich um eine differentielle Analyse, d.h. es werden jeweils Aberrationen der Tumor-DNA mit Normal-DNA verglichen. Die CGH wurde 1992 von Kallioniemi et al. und etwa zeitgleich von du Manoir et al. entwickelt (du Manoir et al., 1993; Kallioniemi et al., 1992). Aufgrund unterschiedlicher

Aberrationsmuster im CGH-Experiment von verschiedenen Tumoren, aber auch von verschiedenen Tumorstadien wie Primärtumor und Lymphknotenmetastase kann das Genom einzelner Tumoren genauer charakterisiert werden. Daraus können Rückschlüsse auf funktionale Zusammenhänge bei der Tumorentstehung, Tumorprogression und Metastasierung abgeleitet werden. Ein weiterer Vorteil der CGH gegenüber anderen Methoden liegt in der Verwendung von DNA als Ausgangsmaterial. Durch ihre Stabilität sind auch retrospektive Studien aus Paraffingewebe möglich.

Die Laser Capture Microdissection (LCM) und CGH

Histomorphologisch stellen sich Tumore als äußerst heterogene Gewebe dar. Die interessierenden Tumorzellen liegen im Zellverband umgeben von nicht tumorösen Stroma- und Entzündungszellen. Bei der gängigen Aufreinigung der DNA wird die Tumor-DNA durch DNA von umliegenden nicht tumorösen Zellen „verdünnt“ und damit „kontaminiert“. Für genaue Untersuchungen ist eine hohe Reinheit des untersuchten Materials wesentlich. Dies macht die Anwendung von Mikrodissektionstechniken, mit denen man gezielt nur Tumorzellen isolieren kann, zur wesentlichen Voraussetzung.

Die Laser Capture Microdissection (LCM) ist eine neuartige schnelle lasergestützte Mikrodissektionstechnik, mit der reine Populationen von Tumorzellen für nachfolgende Untersuchungen von Gewebeschnitten entnommen werden können (Bonner et al., 1997). Sie wurde am National Institute of Health (Washington, USA) entwickelt und erstmals 1996 von Emmert-Buck et al. publiziert (Emmert Buck et al., 1996). Seit 1998 stellt die amerikanische Firma Arcturus kommerzielle LCM-Geräte her.

Der Vorteil von Mikrodissektionstechniken liegt im hohen Reinheitsgrad der dissezierten Zellen bei gleichzeitig deutlich geringerer absoluter Ausgangsmenge an Zellmaterial und damit auch an DNA. Der Vorteil der LCM liegt dabei insbesondere in der Beurteilbarkeit des Zielgewebes nach morphologischen Kriterien, da während der LCM die Gewebemorphologie erhalten bleibt.

Die weitere Analyse geringer Mengen mikrodisezierter Zellen macht je nach Fragestellung, beispielsweise im Falle einer sich anschließenden CGH-Untersuchung, eine Amplifikation des kompletten Genoms im Anschluss an die DNA-Isolation

erforderlich. Eine geeignete Methode ist eine PCR mit degenerierten Oligozufallsprimern (DOP-PCR), welche erstmals 1992 von Telenius et al. beschrieben wurde (Telenius et al., 1992b). Dieser Zwischenschritt über die DOP-PCR ist Voraussetzung für die Untersuchung der Erbinformation mit der CGH, da für die Hybridisierung eine Mindestmenge an DNA erforderlich ist, die aus der LCM nicht ausreichend gewonnen werden kann.

1.3. Fragestellung

Die genaue Kenntnis der genetischen Veränderungen der DNA des Mammakarzinoms spielt im Hinblick auf eine verbesserte Diagnostik und eine effektive, individualisierte Therapie eine wichtige Rolle. Aufschluss über Pathogenese und Progressionsverhalten des Mammakarzinoms können differentielle molekularbiologische Gewebeuntersuchungen geben, bei denen Tumor- mit Normalgewebe vergleichend untersucht wird. Die Comparative Genomische Hybridisierung ist hierfür eine auf DNA-Ebene geeignete Methode. Wesentlich für exakte Analysen ist eine hohe Reinheit der genomischen DNA (Kallioniemi et al., 1994b). Dies erfordert die Anwendung von Mikrodissektionstechniken wie der Laser Capture Microdissection. Die Universitäts-Frauenklinik Tübingen verfügt als erste deutsche Institution seit 1999 über ein solches LCM-Gerät der Firma Arcturus (USA). Weltweit sind zur Zeit etwa 25 Geräte im Einsatz.

Infolgedessen liegen bislang nur wenige publizierte Erfahrungen vor. Zwar wurde die Kombination von Mikrodissektion, DOP-PCR und CGH am duktal invasiven Mammakarzinom bereits angewandt (Aubele et al., 2000b; Aubele et al., 1999; Aubele et al., 2000a; Kuukasjarvi et al., 1997b; Waldman et al., 2000; Werner et al., 1999), allerdings setzte keine der Gruppen die LCM ein. Bislang wurde die LCM mit der CGH nur von Jones et al. kombiniert. Sie untersuchten das Aberrationsmuster von myoepitheliale Mammakarzinom (Jones et al., 2000b). Der Einsatz von LCM und CGH am duktal invasiven Mammakarzinom ist bislang in der Literatur nicht beschrieben.

Ziele dieser Arbeit waren daher:

- die Etablierung der Methode der Laser Capture Microdissection und die Optimierung der Probenvorbereitung für die LCM (Asservation, Gewebeaufarbeitung durch Kryoschnitte und Färbung)
- die Etablierung effizienter Isolationsverfahren zur maximalen Ausbeute reiner Tumor-DNA aus mittels LCM gewonnenen mikrodiseziertem Tumorgewebe
- die Anpassung der Technik der DOP-PCR auf die mittels LCM gewonnene DNA
- die Untersuchung von Tumor-DNA von Mammakarzinom aus der Tumorbank mittels Kombination der Techniken LCM, DOP-PCR und CGH im Rahmen einer Pilotstudie, bei der Aberrationsmuster von Primärtumoren duktaler invasiver Mammakarzinome und befallene axilläre Lymphknoten jeweils der selben Patientin verglichen werden sollten .

Studiendesign

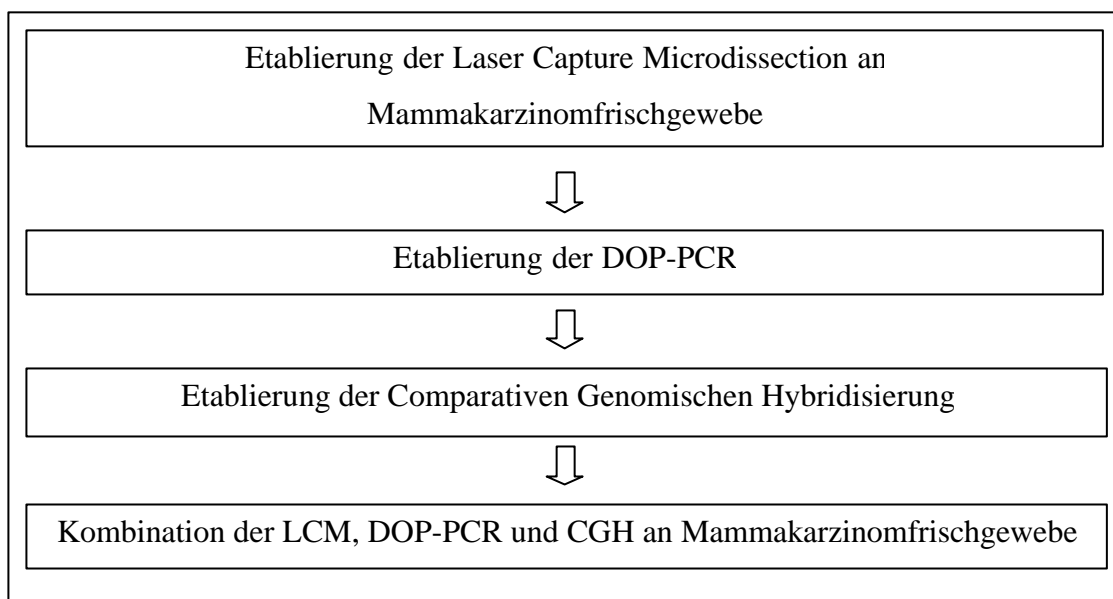


Abb. 1.2: Darstellung des Studiendesigns für die vorliegende Arbeit

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Übersicht über die verwendeten Techniken

Das abgebildete Schema illustriert die Abfolge der verschiedenen Experimente, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden.

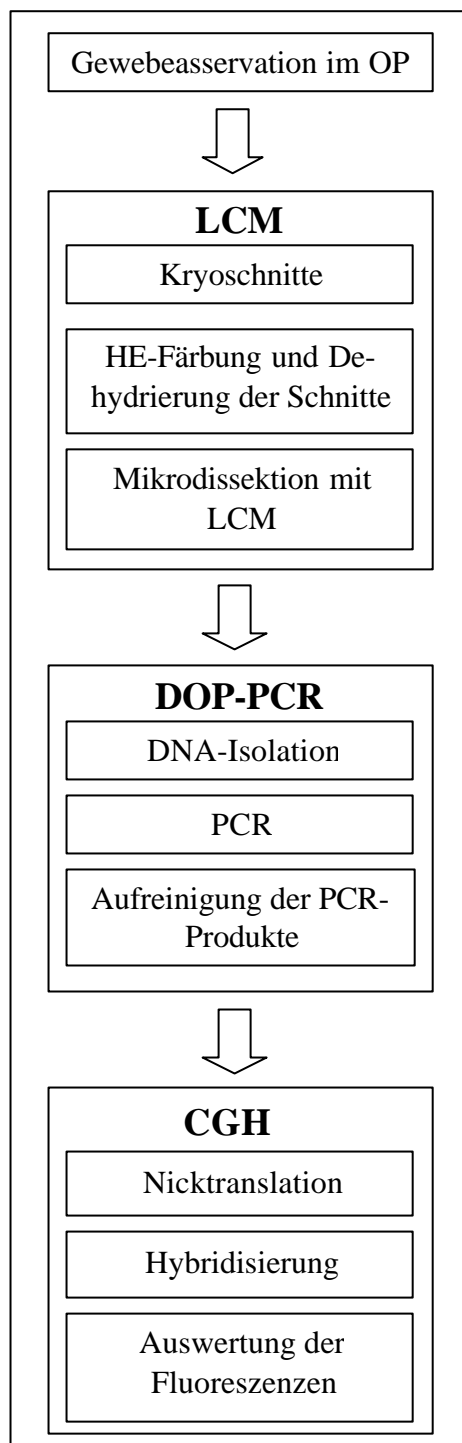


Abb. 2.1: Schematische Übersicht über die verwendeten Methoden

2.2. Die Technik der Laser Capture Microdissection (LCM) und der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH)

2.2.1. Die Laser Capture Microdissection

Die LCM ist eine neue lasergestützte Mikrodissektionstechnik, mit der unter mikroskopischer Sicht in einem einzigen Arbeitsschritt gezielt einzelne Zellen oder Gewebeareale von einem Schnitt abgehoben werden können. Sie wurde Ende der 90er Jahre am NIH (National Institutes of Health, USA) entwickelt und von der Firma Arcturus (USA) in Form des PixCell Systems kommerzialisiert.

Das PixCell II System

Das LCM-System der Firma Arcturus (PXL-200 PixCell Laser Capture Microdissection System) besteht aus einem invertierten binokularen Lichtmikroskop (Olympus IX-50), einer Lasereinheit, einer Videokamera und einem Monitor. An diese Mikrodissektionseinheit ist ein Computer zur Dokumentation der Mikrodissektion angeschlossen (ARC-200 PixCell Image Archiving Workstation) (siehe Abb. 2.2).

Das *Mikroskop* ist mit 10x Okularen und drei Objektiven (4x, 10x, 20x) ausgestattet, so dass sich das Zielareal 40fach, 100fach bzw. 200fach vergrößert darstellen lässt. Des Weiteren befindet sich am Objektisch des Mikroskops eine Vakuumeinheit, mit welcher der Objektträger durch Ansaugen am Tisch fixiert werden kann. Über einen Joystick kann der gesamte Objektisch mit dem angesaugten Objektträger unter dem Objektiv in x-y-Richtung bewegt werden. Mit einem mechanischen Transportarm werden die sog. Caps vom Transportschlitten abgehoben und auf das Gewebe auf dem Objektträger gesetzt, so dass ein steriles Arbeiten ohne Berührung der Caps durch die Hände gewährleistet ist. Mit einem Gewicht wird das Cap beschwert, damit es gleichmäßig auf dem Gewebe aufliegt. Am Transportarm befindet sich ein Diffusionsfilter, der vor der Mikrodissektion zwischen Gewicht und Cap eingebracht werden kann und das Deckglas simuliert, indem er die Brechung verändert.

Der *Laser* (Diodenlaser) erzeugt einen Strahl im Infrarotbereich (Wellenlänge = 980-1064 nm). Es können drei verschiedene Fokuseinstellungen gewählt werden (<7,5 μm , 15 μm , 30 μm). Die Leistung des Lasers (Power) ist variabel von 0-100 mW, die Laserpulsdauer von 10-100 msec. An der Lasereinheit wird die Laserleistung und Laserpulsdauer digital angezeigt. Über einen Handschalter, der mit der Lasersteuereinheit verbunden ist, kann der Laser per Knopfdruck aktiviert werden. Außerdem kann der Laser über die angeschlossene Workstation gesteuert werden. Ein Signalton und ein LED-Laser sind wahrnehmbar, während der Laser aktiviert ist.

Die *Videoeinheit* besteht aus einer CCD-Kamera (Single Chip CCD Camera, Panasonic GP-KR 222) und einem Farbmonitor mit hoher Auflösung (Sony PVM-114N2U).

Funktionsprinzip der LCM:

Ein durchsichtiges Cap mit dem Durchmesser des Deckels eines 500 μl Eppendorfgefäßes, welches mit einem 100 μm dicken Transferfilm aus thermoplastischem Kunststoffpolymer (Ethylvinylacetat) beschichtet ist, wird ohne Deckglas direkt auf einen entwässerten Gewebeschnitt aufgesetzt. Im Mikroskop werden die interessierenden Zellen ausgewählt, in der Mitte des Gesichtsfeldes scharf gestellt und mit einem fokussierten Infrarotlaser beschossen. Der Transferfilm absorbiert den Laserstrahl, erwärmt sich dadurch und verbindet sich mit dem darunter liegenden Zellareal, wobei nur Temperaturen unter 60 °C entstehen. Durch die stärkere Adhäsion zwischen Film und Gewebe im Vergleich zur Adhäsion zwischen Gewebe und Glasoberfläche des Objektträgers haften die gewünschten Zellen an der Filmoberfläche und können mit dem Cap vom Objektträger abgehoben werden. Dabei bleibt die Morphologie sowohl der gelaserten als auch der umliegenden Zellen vollständig erhalten (Bonner et al., 1997; Emmert Buck et al., 1996). Abbildung 2.3 zeigt schematisch das Funktionsprinzip der LCM.

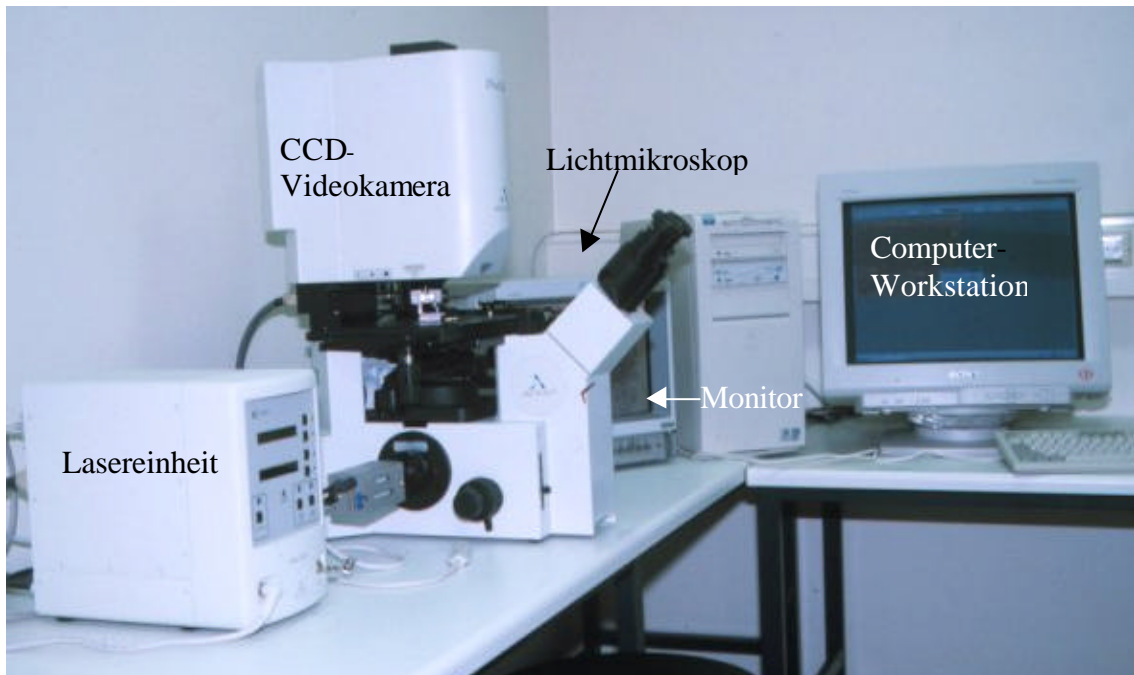


Abb. 2.2: Das Laser Capture Microdissection (LCM) Gerät
Das Pix-Cell-II-System besteht aus invertiertem Lichtmikroskop, Lasereinheit, Videokamera und Monitor. An dieses System ist zur Bilddokumentation die Computer-Workstation angeschlossen.

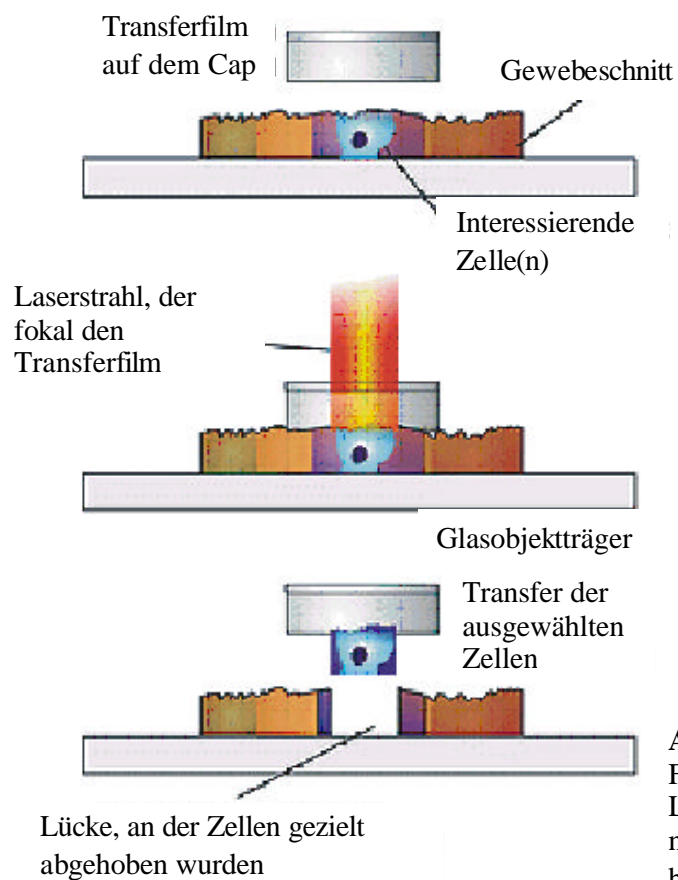


Abb. 2.3: Das Funktionsprinzip der LCM (modifiziert nach Gerätebeschreibung Firma Arcturus)

Dissektionsvorgang

Während der Mikrodissektion wird mit unsterilen Einmalhandschuhen gearbeitet, um Kontaminationen zu vermeiden. Zunächst wird mit Hilfe eines vom Pathologen markierten Referenzschnittes das Tumoreal im Mikroskop eingestellt. Dazu wird ein Cap mit dem Transportarm vom Schlitten abgehoben, auf das Gewebe aufgesetzt und mit dem Gewicht beschwert. Mit dem zwischen Cap und Gewicht eingebrachten Diffusionsfilter lässt sich der Schnitt betrachten und durch Bewegen des Objektträgers mittels Joystick lassen sich die Zielzellen in der Mitte des Gesichtsfeldes einstellen. Befinden sich die zu dissezierenden Zellen in der Mitte, wird der Joystick in Neutralposition gebracht und der Objektträger am Objektisch mittels Vakuum festgesaugt. Um den Laser scharfzustellen, wird zunächst der Diffusionsfilter aus dem Strahlengang herausgezogen und dann mit dem Joystick eine Stelle ohne Gewebe innerhalb des Caps aufgesucht. Man fokussiert den kleinsten Laser an einer gewebefreien Stelle, d.h. man passt ihn gezielt auf diesen Schnitt an. Vor der Dissektion wird ein Bild des Schnittes als „Before Shot“ dokumentiert. Während des Dissektionsvorgangs bewegt man das gewünschte Zellareal unter dem aktiven Laser mit dem Joystick. Bereits gelaserte Bereiche sind am thermoplastisch veränderten Transferfilm zu erkennen. Nach dem Lasern der Zielzellen hebt man das Cap mit dem Transportarm ab, dokumentiert das Gewebe mit den fehlenden Zielzellen als „After Shot“-Bild und macht eine Aufnahme von dem gelaserten Gewebe auf dem Cap, indem man das Cap auf eine gewebefreie Stelle des Objektträgers aufsetzt (siehe Ergebnisse Abb. 3.1-3).

2.2.2. Die Comparative Genomische Hybridisierung (CGH)

Die Comparative Genomische Hybridisierung ist eine molekularzytogenetische Methode, basierend auf einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. Sie wurde 1992 von Kallioniemi et al. und etwa zeitgleich von du Manoir et al. entwickelt (du Manoir et al., 1993; Kallioniemi et al., 1992). Die CGH ermöglicht es, Tumoren auf chromosomaler und subchromosomaler Ebene auf genetische Veränderungen zu screenen, indem durch einen differentiellen Ansatz Tumor-DNA und Referenz-DNA verglichen werden.

Tumor-DNA wird in der Nicktranslation grün und Plazenta-DNA als Referenz-DNA rot markiert. Beide werden für die CGH im Verhältnis 1:1 gemischt und auf normale Metaphasenchromosomen hybridisiert, wo sie um homologe Bindungsstellen konkurrieren (Petersen et al., 1996).

Überwiegen beim Betrachten im Fluoreszenzmikroskop grüne Fluoreszenzsignale, d.h. wird mehr Tumor gebunden, spricht dies für DNA-Zugewinne des Tumors. Stärker rot gefärbte Chromosomenabschnitte deuten auf Verluste von DNA-Sequenzen im Tumor hin.

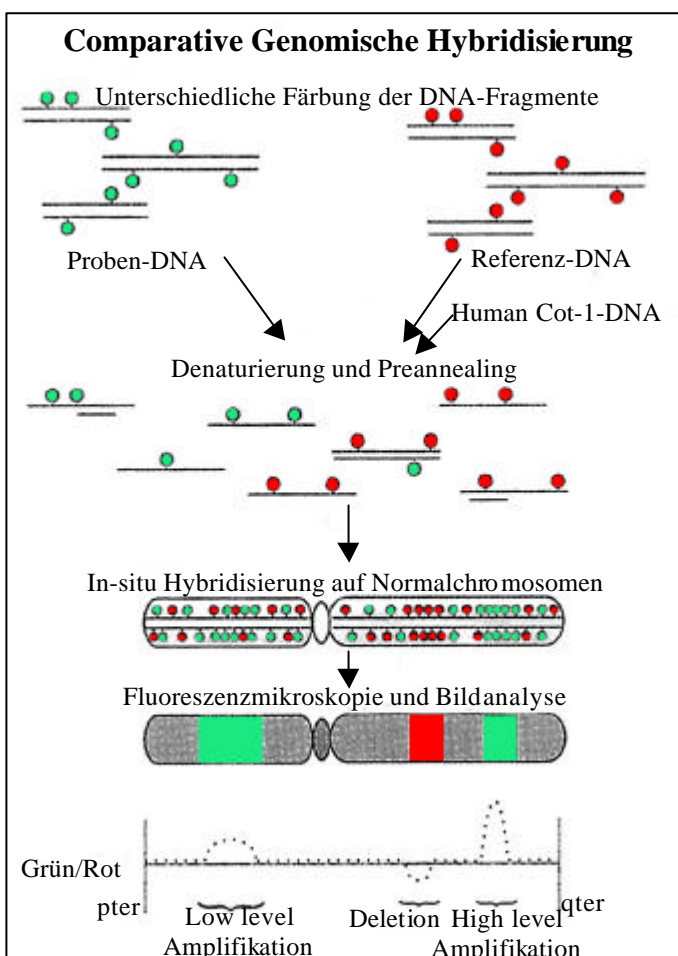


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Technik der CGH.

Proben- und Referenz-DNA werden unterschiedlich markiert (grün bzw. rot) und zusammen auf normale Metaphasenchromosomen hybridisiert. Mittels Fluoreszenzmikroskopie lassen sich die Chromosomen sichtbar machen und Unterschiede in der fluoreszierenden Hybridisierung, die Veränderungen der Proben-DNA im Vergleich zur Referenz-DNA zeigen, kommen entlang der Chromosomen zum Vorschein. Die Analyse der aufgenommenen Bilder ergibt ein Verhältnisprofil, das DNA-Veränderungen der Proben im Vergleich zur Referenz-DNA sichtbar macht.

(Abbildung modifiziert nach Houldsworth et al. (1994))

2.3. DNA-Gewinnung

2.3.1. Ausgangsmaterial

Patientinnen

Das untersuchte Tumorgewebe entstammt der Tumorbank der Universitätsfrauenklinik Tübingen. (Zur Einwilligung der Patientinnen und Asservation des Gewebes siehe 2.3.3.) Auswahlkriterium für die Arbeit sind Tumorart (duktal invasives Mammakarzinom) und das Vorhandensein von mindestens einem befallenen axillären Lymphknoten bei derselben Patientin, da CGH-Untersuchungen von Primärtumor und Lymphknoten jeweils derselben Patientin im Vergleich durchgeführt werden sollen. Als Grundlage der Experimente dient die aus klinischen und pathologischen Daten für die Arbeit zusammengestellte Tumortabelle (siehe Anhang 8.4).

Plazenta für Referenz-DNA

Das Plazentagewebe stammt von einem weiblichen Neugeborenen (46, XX), das im Kreißsaal der Universitätsfrauenklinik zur Welt kam. Nach Einwilligung der Mutter wird ein Gewebestück aus der "frisch geborenen" Plazenta entfernt und bei -80 °C entsprechend den Tumorproben asserviert.

Zelllinie für Positivkontrolle

Als Positivkontrolle dient eine MCF-7 Zelllinie, eine Mammakarzinom-Zelllinie der American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, USA).
(siehe 2.3.2. Zellkultur MCF-7 Zellen)

Andere Gewebe

Weitere für die LCM verwendete Gewebe (Kleinhirn, Leber und Niere) stammen von Ratten, die in Finalexperimenten im Rahmen von Clearance-Studien des

Pharmakologischen Instituts der Universität Tübingen getötet und der Frauenklinik zur Verfügung gestellt werden.

2.3.2. Zellkultur von MCF-7 Zellen

Reagenzien/Material/Geräte:

- Zellkulturflaschen (Costar)
- Pipettus (Qualilab Bender + Hobein)
- Einmalplastikpipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml (Greiner)
- Medium (Biochrom KG)
- Fötale Kälberserum (Gibco BRL)
- Glutamin 200 M (Gibco BRL)
- Penicillin/Streptomycin (Seromed)
- Trypsin-EDTA (Gibco-BRL)
- DMSO (Fluka)
- Zellkulturbank (Heraeus)

Die MCF-7 Zellen werden in Zellkulturmedium, das mit fötalem Kälberserum (FCS), Glutamin und Penicillin versetzt wurde, vermehrt. Das Zellwachstum am Boden der Zellkulturflasche wird im Mikroskop kontrolliert. Sobald die Zellen übereinanderliegen und ein dichter Zellrasen vorliegt (im Schnitt alle 3 Tage), werden die Zellen verdünnt. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgen unter sterilen Bedingungen in der Zellkulturbank. Das alte Medium wird zunächst verworfen, danach werden die Zellen mit Trypsin vereinzelt, indem man 4 ml Trypsin (im Wasserbad auf 37 °C temperiert) gleichmäßig aufpipettiert und für 3 min im 37 °C Inkubator einwirken lässt, bis sich die Zellen durch Klopfen vereinzeln lassen. Da es sich bei Trypsin um ein Zellgift handelt, sollte es nicht zu lange einwirken. Die Zugabe von 8 ml Medium (ebenfalls auf 37 °C temperiert) stoppt die Trypsinwirkung. Anschließend werden die Zellen auf die Zielkonzentration verdünnt, indem man überschüssige Zellsuspension verwirft bzw. einfriert, den Rest mit Medium auf 20 ml auffüllt und dann in den 37 °C Inkubator zurückstellt. Zum Einfrieren der bei der Verdünnung überschüssigen Zellen werden diese entweder pelletiert und als Pellet bei -80 °C tiefgefroren (z.B. zur DNA-Gewinnung für die Positivkontrolle) oder in DMSO eingefroren. Zellen, die in DMSO bei -80 °C gelagert werden, können im Gegensatz zu pelletierten Zellen wieder in Kultur genommen

werden. DMSO verhindert ein Platzen der Zellen beim Einfrieren und Auftauen. Da DMSO ein Zellgift ist, muss das Auftauen zügig erfolgen.

2.3.3. Gewebeasservation

Voraussetzung der Entnahme einer Tumorprobe für die Tumorbank ist die Aufklärung der Patientin und deren Einwilligung. An der Universitätsfrauenklinik Tübingen wurde hierzu in Kooperation mit der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät ein standardisiertes Verfahren entwickelt, bestehend aus einem Aufklärungs- und einem Einwilligungsbogen (AZ 266/99). Die schriftliche Einwilligung erfolgt mit der OP-Aufklärung mindestens 24 h vor der Operation. Im Operationssaal wird die Tumorprobe vom Operateur aus dem Randbereich des Tumors ohne Nekrosen und Fettgewebe steril entnommen, nachdem Material für die Untersuchung des Rezeptorenstatus und für die pathologische Diagnostik entnommen wurde. Das Tumorstück wird sofort in ein 1,5 ml Gefriergefäß (Nunc Cryotubes Vial) gegeben und durch Eintauchen des geschlossenen Kryoröhrchens in flüssigen Stickstoff (mindestens 1 min) noch im OP schockgefroren. Die so asservierten Tumoren werden im Stickstofftank (Messer-Griesheim) bei $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.3.4. Kryoschnitte, Fixierung und HE-Färbung für die LCM

Während der Versuche zur Optimierung der Probenvorbereitung für die LCM werden verschiedene Objektträger verglichen:

- Unbeschichtete Glasobjektträger (R. Langenbrinck)
- Unbeschichtete Glasobjektträger mit Aceton (Merck) abgewischt
- Superfrost-Objektträger (Roth)
- Kunststoffobjektträger (Falcon)

Die Objektträger werden über Nacht bei $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ gebacken, um so RNAsen zu inaktivieren. Die Tumoren werden aus den Stickstofftanks entnommen und auf Trockeneis in das Kryotom (Leica) mit Kammertemperatur $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ transportiert.

Für die LCM werden 6 µm dicke Gefrierschnitte wie folgt angefertigt, wobei während der Optimierung der LCM zunächst die unter 1. beschriebene, später ausschließlich die systematische Einbettung in OCT als optimierte Vorgehensweise (siehe 2.) angewandt werden:

1. Das Tumorstück wird mit Auffriermedium OCT (Leica) direkt aus dem Kryoröhrchen auf den Objekthalter (-24 °C) aufgefroren. Von jedem Tumor und jedem Lymphknoten werden Schnittserien von 10 Schnitten der Dicke 6 µm angefertigt. Von diesen Schnitten wird jeweils der erste und der zehnte Schnitt als Referenzschnitt Standard-HE gefärbt und mit einem Deckglas versehen. Mit Unterstützung eines Pathologen werden die für die LCM interessierenden Tumorareale markiert. Die Schnitte werden bei -80 °C gelagert und erst direkt vor der Mikrodissektion aufgetaut und auf Trockeneis zum LCM-Gerät transportiert.
2. Aus Alufolie wird ein kleines, unten geschlossenes, zylinderförmiges Gefäß geformt und zur Hälfte mit Auffrierklebstoff OCT gefüllt. Darauf gibt man das Tumorstück und bedeckt es vollständig mit OCT. Die Probe wird kurz in flüssigen Stickstoff getaucht, bis sie durchgefroren ist. Nach Entfernen der Alufolie wird der Block im Kryostaten auf einen Objekthalter gefroren und 30 min bei -20 °C temperiert. Danach wird der Block mit einer Rasierklinge angeschnitten. Es werden nur so viele Schnitte angefertigt wie auch disseziert werden sollen, da die Schnitte sofort nach dem Schneiden zur Fixierung in 70% Ethanol gestellt, gefärbt und dehydriert werden. Die Schnitte werden anschließend in einer Trockenkammer zum LCM-Gerät transportiert. Sie dürfen keine Feuchtigkeit ziehen, bevor sie in die LCM eingesetzt werden. Entsprechend wird mit Referenzschnitten verfahren.

Fixierung und Färbung

Für die Lasermikrodissektion werden die Schnitte zunächst in 70% Ethanol auf dem Objektträger fixiert, dann in wässrigem Hämatoxylin und alkoholischem Eosin gefärbt, anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol dehydriert und

luftgetrocknet. Für die LCM müssen die Schnitte absolut dehydriert sein, da sich der Transferfilm nur so mit dem Gewebe verbinden kann.

Reagenzien:

- 70% EtOH, 95% EtOH, 100% EtOH (Universitätsapotheke)
- 100% EtOH p.a. (Merck)
- Haematoxilin Gill 3 (Mayers)
- 0,5% Eosin Y (Sigma) mit 70% EtOH angesetzt
- Xylol (Merck)

Direkt nach dem Auftauen aus $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ und dem Transport auf Trockeneis bzw. nach optimiertem Protokoll direkt nach dem Schneiden und unmittelbar vor der Mikrodisektion werden die Schnitte nach folgendem Protokoll fixiert und gefärbt. Pro Färbegang lassen sich zehn Schnitte färben. Färbelösungen, Alkohol und Xylol werden regelmäßig gewechselt, wobei der Alkohol nach jedem Färbegang erneuert wird.

Tab 2.1: Färbeprotokoll für Gefrierschnitte vor LCM

Fixierung in 70% EtOH	verschiedene Zeiten getestet, (sollte <30 min sein)
Mayers Haematoxilin	1 min 30 sec
Waschen in Bidest	< 5 sec.
70% EtOH	1 min
95% EtOH	1 min
1% Eosin alkoholisch	30 sec
95% EtOH	2 x je 2 min
100% EtOH	2 min
100% EtOH p.a.	2 min
Xylol	2 x je 5 min
Lufttrocknen	15 bis 20 min

2.3.5. Mikrodisektion mit der LCM

Dissektion von Primärtumor und Lymphknotenmetastase von Mammakarzinom

Vorversuche ergaben zuverlässige DOP-PCR Ergebnisse für etwa 1000 Zellen. Daher wurden für die Arbeit mit dem $30\text{ }\mu\text{m}$ Laser ungefähr 70 Schüsse ausschließlich im Tumorbereich abgegeben. So werden etwa 1000 Tumorzellen disseziert, da pro Schuss mit dem $30\text{ }\mu\text{m}$ Spot unter Berücksichtigung von Überlappungen etwa 15 Zellen

abgehoben werden. Die Leistung des Lasers liegt bei 20 mW, die Laserpulsdauer bei 5 msec. Dabei wird der interessierende, mit Hilfe der Referenzschnitte ausgewählte Tumorbereich nicht zwangsläufig am Stück disseziert. Die 70 Schüsse können je nach histomorphologischen Gegebenheiten auch an verschiedenen Stellen des Caps abgeben werden. Wenn möglich disseziert man pro Tumor fünf Proben.

Das Gewebe vor und nach Abheben des gelaserten Areals und die gewünschten Zellen auf dem Cap werden mit Hilfe der Workstation (Arc200 PixCell Image Archiving Workstation, Arcturus) dokumentiert.

Mikrodissektion anderer Gewebe

Um eine mögliche Gewebeabhängigkeit zu untersuchen, werden entsprechend Schnitte von Kleinhirn, Rattenleber und Rattenniere mit der LCM disseziert.

2.3.6. DNA-Isolation aus Tumorproben

Im Laufe der Arbeit werden drei verschiedene Methoden zur Isolation genomischer Tumor-DNA verwendet: Die Isolation in Arcturus-Lysepuffer, die Isolation in PCR-Puffer jeweils mit anschließendem Proteinase K Verdau direkt auf dem Cap und die Isolation mit einem DNA-Isolationskit (Promega).

Tumor-DNA-Isolation mit Arcturus-Lysepuffer und Proteinase K Verdau

Zusammensetzung des Puffers:

- 0,04% Proteinase K
- 10 mM Tris-HCl
- 1 mM EDTA
- 1% Tween 20

Jeweils 20 µl des auf 37 °C vortemperierten Puffers werden in ein 500 µl Eppendorf Gefäß vorgelegt. Nach der Mikrodissektion wird das Cap anstelle des Deckels auf das Gefäß gesteckt und invertiert, so dass der Film vollständig mit Puffer bedeckt ist. Anschließend wird auf dem Cap gevortext. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C

wird 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, die Proteinase K 8 min bei 95 °C inaktiviert und das Lysat entweder bei –20 °C aufbewahrt oder in eine PCR eingesetzt.

Tumor-DNA-Isolation in PCR-Puffer und Proteinase K Verdau

Reagenzien:

- GeneAmp 10x PCR Buffer II ohne MgCl₂ (Perkin Elmer) auf 1x PCR-Puffer mit Nuklease freiem H₂O (Promega) verdünnt
- Proteinase K Solution (14mg/ml) (Roche)

Das Cap, auf dem sich das gelaserte Material befindet, wird anstelle des Deckels auf ein 500 µl Eppendorf Tube gesteckt, in das 40 µl 1x PCR-Puffer II (ohne MgCl₂) und 2 µl Proteinase K (14 mg/ml) vorgelegt wurden. Es wird darauf geachtet, dass der Film vollständig mit Lysepuffer bedeckt ist. Anschließend wird auf dem Cap kräftig gevortext. Die Probe wird über Nacht bei 55 °C im Hybridisierungsofen auf dem Cap inkubiert. Am nächsten Tag wird das Lysat 5 min bei 14.000 rpm herunterzentrifugiert, das Cap verworfen und die Proteinase K 20 min bei 95 °C im Heizblock inaktiviert. Die DNA wird entweder bei –20 °C gelagert oder sofort in eine DOP-PCR eingesetzt.

Tumor-DNA-Isolation mit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega)

Reagenzien:

- Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega)
- Proteinase K (Merck) (Stammlösung 20 mg/ml wird hergestellt)
- Isopropanol (Merck)

Auf das Cap werden 150 µl Zellysepuffer (löst die Zellmembran auf) und 150 µl Nucleolysepuffer (löst die Zellkernmembran) gegeben und kräftig gevortext, bis sich der Ansatz aufgrund der HE-Färbung des Gewebes leicht rosa verfärbt. Auf dem Cap wird 30 min bei 65 °C inkubiert. Mittels Proteinase K Verdau (8 µl Proteinase K [20 mg/ml] pro 500 µl Tube) wird anschließend die DNA von Proteinen befreit. Dies geschieht über 3 h bei 55 °C im Hybridisierungsofen nach wie vor auf dem Cap. Die Proteinase K ist bei dieser Temperatur noch aktiv, während die meisten anderen Enzyme (z.B. DNAsen) unter diesen Bedingungen denaturiert werden, was einen erwünschten Effekt darstellt. Alle 30 min wird kräftig gevortext. Danach wird das Cap

verworfen. Mit der Präzipitationslösung (PL) werden die Proteine gefällt (100 µl PL, vortexen, 5 min auf Eis, 4 min Zentrifugieren bei 14000 rpm). Der Überstand wird in ein Gefäß, in das Isopropanol vorgelegt ist, überführt und invertiert, bis die DNA als Spinnennetz sichtbar wird. Durch Zentrifugieren (10 min bei 14000 rpm) wird die DNA gefällt, der Überstand verworfen und das Pellet in 70% Ethanol gewaschen. Nach Lufttrocknung des Pellets wird dieses über Nacht bei 4 °C in 20 oder 40 µl Rehydrierungslösung resuspendiert und Konzentration und Ratio im Photometer gemessen.

2.3.7. DNA-Isolation aus MCF-7 Zellen und Plazenta

Die DNA von MCF-7 Zellen dient in der DOP-PCR sowie in der CGH als Positivkontrolle. Als gesunde Referenz-DNA wird in allen durchgeführten CGH-Experimenten DNA von Plazenta eines weiblichen Säuglings eingesetzt.

Reagenzien/Material:

- Zellpellet von MCF-7 Zellen
- Frischgewebe von Plazenta eines weiblichen Säuglings
- PBS-Puffer
- Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega)
- Proteinase K (Merck) (Stammlösung 20 mg/ml wird hergestellt)
- Isopropanol (Merck)
- Homogenisator Ultraturax

Man verfährt prinzipiell gleich wie bei der DNA-Isolation mit dem Promega Kit nach der LCM (siehe 2.3.6.). Es unterscheiden sich im Wesentlichen nur die Menge der eingesetzten DNA und die an diese angepassten Volumina der zugegebenen Lösungen.

Aus dem Plazentagewebe wird das Blut mit PBS herausgewaschen. Das Gewebe wird in 1,5 ml Zellysepuffer und 1,5 ml Nukleolysepuffer mit dem Ultraturax homogenisiert. Bei der Isolation aus pelletierten MCF-7 Zellen wird mit einer Spritze durch Auf- und Abziehen homogenisiert. Das Gemisch aus homogenisiertem Gewebe bzw. Zellen und Lysepuffer wird kräftig gevortext, auf 2,2 ml Tubes aufgeteilt und 30 min bei 65 °C inkubiert. Für den Proteinase K Verdau gibt man pro 2,2 ml Tube 50 µl Proteinase K [20 mg/ml] hinzu und inkubiert über 3 h bei 55 °C. Für die Fällung der Proteine pipettiert man 300 µl Präzipitationslösung. Nach Waschen in EtOH und Trocknung des Pellets wird es in 200 µl Rehydrierungslösung resuspendiert. Die Konzentration der

DNA wird photometrisch bestimmt, indem die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen wird.

2.4. Polymerasekettenreaktion (PCR) mit degenerierten Primern

2.4.1. Degenerate Oligonucleotid Primed-PCR (DOP-PCR)

Die DOP-PCR ist eine Polymerasekettenreaktion mit degenerierten Oligonukleotidprimern (DOP) (Telenius et al., 1992a). Sie erlaubt eine Zufallsamplifikation des kompletten Genoms, so dass aus den geringen DNA-Konzentrationen, die man mittels LCM erhält, eine ausreichende Konzentration für die sich anschließende CGH erzeugt wird.

Der DOP-Primer (5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G -3') besteht aus drei Abschnitten: Dem nur 6 bp langen, spezifischen 3'-Ende, einer 6 bp langen degenerierten Sequenz (N) in der Mitte und einer Erkennungssequenz für Restriktionsenzyme am 5'-Ende. Das Prinzip der DOP-PCR (siehe Abbildung 2.5) beruht auf einer zweigeteilten PCR. Zunächst bindet in einer Low-Annealing Phase bei niedrigen Annealing-Temperaturen und niedrig stringenten Bedingungen der Primer mit seinem teilweise degenerierten 3'-Ende an den genomischen Strang. Weil das 3'-Ende kurz ist und die Stringenz niedrig, bindet der Primer nicht in seiner kompletten Länge, dafür aber an vielen Stellen. In den folgenden ersten Zyklen bei nach wie vor niedriger Annealing-Temperatur entstehen in 3'→5' Richtung PCR-Stränge, die am 5'-Ende den kompletten Primer enthalten. Es werden dann für die zweiten Zyklen die Annealing-Temperatur erhöht, die Bedingungen stringenter gemacht, so dass der Primer in seiner kompletten Länge annealen muss und damit wie bei einer herkömmlichen PCR das nach den ersten Zyklen vorliegende Material amplifiziert wird. Dabei stört anscheinend die degenerierte mittlere Primersequenz, die teilweise an eine nicht passende Sequenz bindet, die Reaktion nicht.

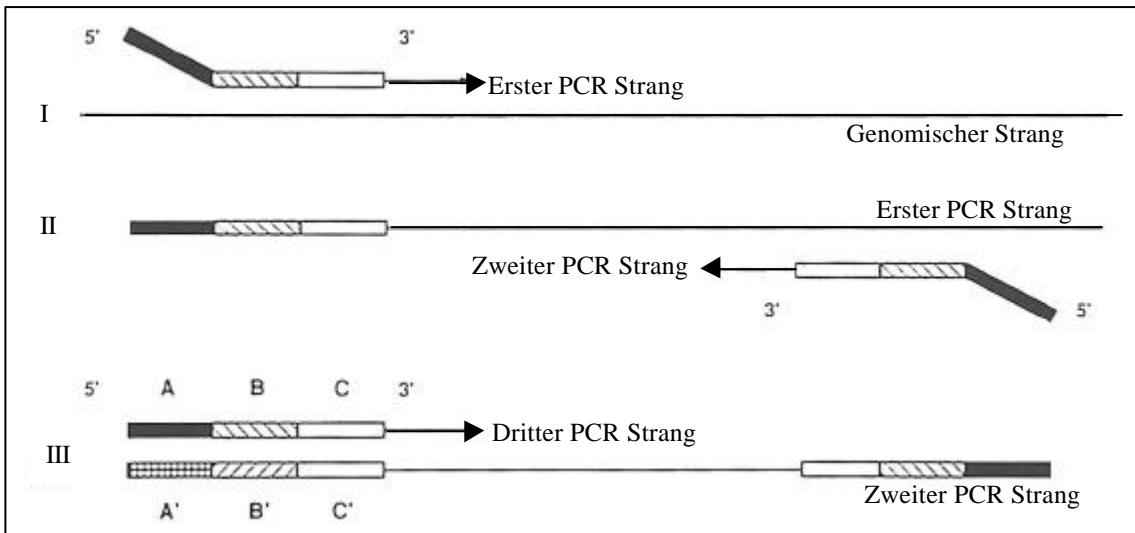


Abb. 2.5: Das Prinzip der DOP-PCR. Der Primer besteht aus drei Teilen: Das 3'-Ende (C) enthält 6 spezifische Basen, die das Primer-Annealing ermöglichen; der mittlere Abschnitt (B) enthält 6 degenerierte Nukleotide; am 5'-Ende (A) sitzt eine Erkennungssequenz für Restriktionsenzyme. In den ersten Zyklen (I) wird die Annealing-Temperatur niedrig gehalten, um dem partiell degenerierten 3'-Ende die Bindung an den genomischen Strang zu ermöglichen. In den folgenden Zyklen (II) (bei nach wie vor niedriger Annealing-Temperatur) entstehen Fragmente, die am einen Ende die vollständige Primersequenz, am anderen Ende eine zum Primer komplementäre Sequenz besitzen. In allen weiteren Zyklen (III) ist die Annealing-Temperatur erhöht, so dass bei höherer Stringenz die volle Primerlänge binden muss. Der degenerierte mittlere Abschnitt stört dabei die Amplifikation nicht.

Abbildung modifiziert nach Telenius (Telenius et al., 1992a).

DOP-PCR Ansatz

Reagenzien:

- GeneAmp 10x PCR Buffer mit 15mM MgCl₂ (Perkin Elmer)
- dNTPs Desoxinukleoside Set (Roche) auf 2mM (=10x) verdünnt
- DOP-Primer (Degenerierte Oligoprimer) (Interactiva):
- Sequenz: 5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G -3'
- Auf 20 µM (=10x) verdünnt
- 25 mM MgCl₂ und PCR-PufferII (Perkin Elmer)
- AmpliTaq Polymerase 5 U/µl (Perkin Elmer)
- Nuklease freies H₂O (Promega)
- DNA von MCF-7 Zellen (Konzentration 1 ng/µl) als Positivkontrolle (DNA-Isolation s. unten)

Die PCR erfolgt nach folgendem Ansatz (modifiziert nach Protokoll von S. Joos, persönliche Mitteilung):

Tab. 2.2: DOP-PCR Ansatz

10x PCR-Puffer (mit 15mM MgCl ₂)	3µl
10x dNTPs (2mM)	5µl
10x DOP-Primer (20µM)	5µl
MgCl ₂ (25mM)	2,2µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,5µl
Nuklease freies H ₂ O	14,3µl (add 50µl)
Probe	20µl
Mastermix	30µl
Gesamtvolumen	50µl

Aus Puffer, dNTPs, DOP-Primer, MgCl₂, Taq-Polymerase und H₂O wird der Mastermix zusammenpipettiert und je 30 µl in PCR-Tubes vorgelegt. Die 40µl DNA-Lysat werden auf zwei Tubes aufgeteilt, je 20 µl zum Mastermix pipettiert. Für den Leerwert werden anstelle der 20 µl Probe 20 µl H₂O pipettiert. Als Positivprobe dient DNA von MCF-7 Zellen in der Konzentration 1 ng/µl. Davon wird 1 µl (= 1 ng) eingesetzt und mit 19 µl Nuclease freiem H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Die Proben werden gevortext und herunterzentrifugiert, bevor sie in den vorgeheizten Cycler gestellt werden.

Tab. 2.3: Cycler-Programm Telenius (Telenius et al., 1992a), modifiziert nach Joos [Joos, persönliche Mitteilung]

Initiale Denaturierung	10 min 93 °C
Low-Annealing-Phase: (niedrige Stringenz)	8x 1 min 94 °C (Denaturierung) 1,5 min 30 °C (Annealing) (in 3 min von 30 °C auf 72 °C) 3 min 72 °C (Elongation)
Haupt-Annealing (hohe Stringenz)	35x 1 min 94 °C (Denaturierung) 1 min 62 °C (Annealing) 3 min 72 °C + 1 sec/Zyklus
Finale Elongation	10 min 72 °C 4 °C for ever

8 µl der amplifizierten DNA werden in eine Gelelektrophorese eingesetzt, die verbleibende Probe wird bis zur Aufreinigung bei 4 °C gelagert.

Gelelektrophorese mit 1% Agarosegel:

Reagenzien/Geräte:

- Agarose (Peqlab)
- 1x TAE-Puffer
- Ethidiumbromid (Konz. 1mg/ml) (Fluka)
- 10x DNA-Ladepuffer
- Längenstandard 16 (250bp ladder) (Roche)
- Gelkammer (OWL)
- Power Supplier (EC 259-90)
- Geldokumentationssystem Fluor-S MultiImager (Bio-Rad)
- Software Quantity One (Bio-Rad)
- Drucker HP LaserJet 6P/6MP (Hewlett Packard)

Es werden 500 mg Agarose in 50 ml TAE-Puffer in der Mikrowelle gekocht. In das handwarme Gel werden 2 µl Ethidiumbromid pipettiert. Nach dem Erkalten wird das Gel mit 1x TAE Puffer überschichtet. Ein Gemisch aus 8 µl PCR-Produkt und 2 µl Ladepuffer wird in die Taschen pipettiert. Auf einer weiteren Bahn lässt man einen Längenstandard aus 2 µl Stocklösung des Standards, 2 µl Ladepuffer und 6 µl Aqua bidest mitlaufen. Die Laufzeit beträgt 45 min bei einer angelegten Spannung von 90 V. Zu erwarten ist, dass die amplifizierte genomische DNA als „Schmier“ in der Länge von 3000-500 bp zu sehen ist.

2.4.2. Aufreinigung der DOP-PCR-Produkte

Reagenzien:

Concert DNA Purification System (Gibco):

- Bindepuffer H1
- Waschpuffer H2
- TE-Puffer
- Säulen

Bei der Aufreinigung der DOP-PCR-Produkte über eine Säule (Gibco) werden Verunreinigungen wie Primerdimere und überschüssige dNTPs entfernt. Um nach der Aufreinigung eine für die CGH ausreichende DNA-Konzentration zu erhalten, werden je zwei identische DOP-Produkte zu 400 µl Bindepuffer (H1) pipettiert, durch Invertieren gemischt und auf die Säule pipettiert. Beim ersten Zentrifugationsschritt

(12000 rpm, 1 min) bleibt die DNA im Gegensatz zu den Verunreinigungen am Filter haften. In einem zweiten Schritt wird die Filtermembran mit einem alkoholischen Puffer (H2) gewaschen. Erneutes Zentrifugieren (2 x 12000 rpm, je 1 min) entfernt den Alkohol. Im Anschluss wird die DNA in 50 µl TE-Puffer rehydriert und die Konzentration photometrisch ermittelt. Für eine 1:10 Verdünnung für die Vermessung werden 8 µl entnommen, so dass für die Nicktranslation noch 42 µl DOP-PCR Produkt zur Verfügung stehen. Man erhält DNA-Konzentrationen von ungefähr 30 bis 90 ng/µl.

2.5. Markierung der Proben in der Nicktranslation

Die Technik der Nicktranslation und der CGH wurde in der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. Martin Bentz (Abteilung für Hämatologie und Onkologie) an der medizinischen Fakultät der Universität Ulm erlernt und nach Ulmer Protokoll an der Frauenklinik etabliert (siehe 2.5.1., 2.6.1.). Neben diesem Protokoll wurde außerdem ein Nicktranslations- und CGH-Kit der Firma Vysis verwendet (siehe 2.5.2., 2.6.2.).

2.5.1. Nicktranslation durch indirekte Markierung (Ulmer Protokoll)

Die Nicktranslation dient der Herstellung von Sonden für die CGH. Nach Ulmer Protokoll wird Tumor-DNA mit Biotin, Plazenta-DNA als Referenz-DNA mit Digoxigenin markiert. Zu einem Mix aus Template-DNA, Puffer, Wasser, Mercaptoethanol und einem dNTP-Mix mit entweder Biotin oder Digoxigenin markierten dUTPs werden die Enzyme DNase I und Polymerase I zupipettiert und der Ansatz in einem 15 °C Wasserbad inkubiert. Die DNase setzt dabei auf einem der beiden DNA-Stränge einen Bruch (Nick), der Doppelstrang bleibt jedoch erhalten. Die Polymerase erkennt diese Nicks und verlängert das freie 3'-Ende, indem sie die markierten Nukleotide einbaut, während sie das 5'-Ende gleichzeitig abbaut. Ziel ist, markierte Fragmente im Längenbereich von 500 bis 2000 bp zu erhalten. Die richtige DNase-Konzentration und Verdauzeit wird ermittelt, indem das Nickprodukt auf ein 1% Agarosegel aufgetragen wird. Liegt der „Schmier“ im Bereich oberhalb von 2000 bis 500 bp, sind die Sonden für die Hybridisierung zu groß. Es wird nochmals DNase

zugegeben und weiterverdaut. Anschließend wird wieder mit Hilfe eines Gels die Länge kontrolliert. Haben die Sonden die richtige Größe, wird die Nicktranslation mit EDTA und 10% SDS gestoppt und die Proben über Sephadex G50 Säulen aufgereinigt. Diese entfernen überschüssige dNTPs und zu kurze DNA-Fragmente (<500 bp).

Reagenzien:

- 10x NT-Puffer (Biolabs DNA-Polymerase I)
- BIO-11 dUTP, 1 mM (Roche) = Proben(Tumor)färbung
- Digoxigenin-11 dUTP, 1 mM (Roche) =Kontroll(Plazenta)färbung
- Nukleotide: 10mM dTTP, 10mM dATP, 10mM dCTP, 10mM dGTP (Promega)
- 0,1 M Mercaptoethanol (Merck)
- Polymerase I (Biolabs)
- DNase (Roche): Herstellen einer Stammlösung: 3 mg/ml in 50 mM NaCl mit 50% Glycerin

- Für den Nickstop: 0,5 M EDTA (pH 8), 10% SDS

- Aufreinigung der Nickprodukte über Sephadex G50 Säulen:
 - 1 ml Insulinspritzen (Zentrallager der Universität)
 - Glaswolle (Serva, silanized, 50 g)
 - Säulenpuffer 10 mM Tris/HCl (pH 8)
1 mM EDTA (pH 8)
0,1% SDS
 - Sephadex G 50 (Sigma): 30 g auf 400 ml Säulenpuffer, bei 37 °C 24 h quellen lassen

Ansatz für die Nicktranslation und Kontrolle über 1% Agarosegel

Tab. 2.4: Nicktranslationsansatz nach Ulmer Protokoll

	Für 1 µg DNA (1 CGH-Experiment)	Für 4 µg DNA:
DNA	1 µg	4 µg
10x NT Puffer	5 µl	20 µl
0,1 M Mercaptoethanol	5 µl	20 µl
Art der Markierung dNTP-Mix	Ziel-DNA: Biotin 5 µl Referenz-DNA: Digoxigenin 5 µl	Biotin/Digoxigenin 20 µl
Polymerase I	1 µl	4 µl
DNase I	Richtwert 0,5 µl (1:12000) aber je nach Länge der DNA- Stücke	Richtwert 2 µl (1:12000) aber je nach Länge der DNA- Stücke
Aqua dest	add 50 µl	add 200 µl
Gesamtvolumen	50 µl	200 µl

Die einzelnen Reagenzien werden pipettiert, zuletzt werden die Enzyme auf Eis dazugegeben. Die Proben werden zunächst für 45 min bis 1 h bei 15 °C inkubiert. Die

Translationsreaktion wird danach vorübergehend gestoppt, indem man die Proben auf Eis stellt, während über ein 1% Agarosegel (Herstellung siehe DOP-PCR 2.4.1.) die Länge der Nickprodukte kontrolliert wird. Dazu werden je 10 µl Probe mit 3 µl 10x DNA-Ladepuffer gemischt, dieser Mix bei 100 °C 3 min denaturiert, damit die DNA als Einzelstrang vorliegt, und in die Taschen pipettiert. Als Längenstandard benutzt man eine 250 bp-Ladder. Nach einer Laufzeit 35 min bei 130 V wird mit Hilfe des Schmiere entschieden, ob die Nicktranslation gestoppt oder ob, evtl. nach nochmaliger Zugabe von DNase, weiterverdaut wird. Liegt der Schmier im Bereich von 2000-500 bp, pipettiert man 1 µl 10% SDS und 2 µl 0,5 M EDTA pro 100 µl Nickansatz, inkubiert 10 min bei 68 °C und inaktiviert so die Enzyme der Nicktranslation endgültig.

Aufreinigung der Nickprodukte über Sephadex G 50 Säulen

Die Aufreinigung dient der Entfernung überschüssiger dNTPs und zu kleiner DNA Fragmente (<500 bp), die die nachfolgende CGH behindern. Pro 100 µl Nickansatz wird zur Aufreinigung der Nickprodukte eine Säule benötigt. Insulinspritzen werden mit Glaswolle bis zur 0,1 Marke gestopft, in 15ml-Falcons gestellt, mit Sephadex G 50 bis zur 1 ml Marke gefüllt (Zentrifugieren mit 3000 rpm, Beschleunigung 3, Bremse 0, jeweils 5 min) und dreimal mit je 150 µl Säulenpuffer gewaschen (Zentrifugieren mit 3000 rpm, Beschl. 5, Bremse 3, zweimal 8 min, einmal 12 min). Die fertigen Säulen werden in 1,5 ml Eppendorftubes ohne Deckel und damit zurück in die Falcontubes gestellt. 100µl Nickansatz wird aufpipettiert und bei 3000 rpm, Beschl. 3, Bremse 5 12 min zentrifugiert. Im Anschluss wird das Eluat identischer Proben gepoolt und die Proben werden bei -20 °C aufbewahrt bzw. sofort in eine CGH eingesetzt. Als Kontrolle der Ausbeute an DNA nach der Nicktranslation und Aufreinigung über Sephadex Säulen wird die DNA in einzelnen Fällen vermessen.

Dot-Blot

Der Dot-Blot dient zur Kontrolle der Markierung der Sonden mit Biotin bzw. Digoxigenin. Es handelt sich um ein vereinfachtes Western-Blot-Verfahren, bei dem das Protein, in diesem Fall die Sonde, direkt auf eine Nitrozellulosemembran aufgetropft

wird (Rapley and Walker, 1998). Ein Antikörper gegen Biotin bzw. Digoxigenin, der mit Streptokinase bzw. alkalischer Phosphatase gekoppelt ist, bindet an die Sonde. Durch eine enzyspezifische Nachweisreaktion wird diese Antikörperbindung als Farb- oder Fotoreaktion sichtbar, vorausgesetzt, die Sonde ist mit Biotin bzw. Digoxigenin markiert.

Reagenzien:

- Hybond N⁺-Membran (Amersham International)
- Puffer 1: 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5)
0,15 M NaCl
(nach dem Ansetzen autoklavieren)
- Puffer 2: 5%ige Proteinlösung: 5 g Magermilchpulver in 33 ml Puffer 1
- Antikörper-Enzymlösung für Digoxigenin: 5 µl FAB-Fragmente mit alkalischer Phosphatase (Roche)
- Antikörper-Enzymlösung für Biotin: Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (Amersham)
- Nachweisreagenz: 200 µl NBT-BCIP Stammlösung
10 ml Tris (pH 9,5)
bzw.
Nachweisreagenz Western Blot Kit (Amersham)

Die Membran wird 5 min in Puffer 1 eingeweicht und anschließend zwischen Filterpapier getrocknet. Es werden 2 µl DNA aufpipettiert und die Membran 5 bis 10 min getrocknet. Dann wird sie 1 min in Puffer 1 gelegt und 30 min in Puffer 2 geschüttelt. Der entsprechende Antikörper wird über die Membran verteilt und unter Schütteln wird 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Waschen in Puffer 1 (3 x 5 min) wird das Nachweisreagens auf die Membran gegeben und der Blot ins Dunkle gestellt. Nach 10 min ist eine Farbreaktion (Digoxigeninmarkierung) bzw. eine Schwärzung eines Filmes (Biotin) sichtbar, sofern die Probe in der Nicktranslation erfolgreich markiert wurde.

2.5.2. Nicktranslation durch direkte Markierung (Vysis-Protokoll)

Im Gegensatz zum Ulmer Protokoll wird die DNA direkt mit dUTP gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen markiert, so dass die Antikörperfärbung wegfällt. Es muss deshalb bereits bei der Nicktranslation ohne künstliches Licht gearbeitet werden, damit

die Fluoreszenzen nicht ausbleichen. Am 2. Hybridisierungstag werden die Proben nur gewaschen und mit DAPI gegengefärbt.

Reagenzien (Vysis):

- 0,2 mM SpectrumGreen bzw. SpectrumRed dUTP:
10 μ l 1mM dUTP (Vysis) (in 10 μ l Aliquots bei -20°C)
40 μ l Nuclease freies H_2O
- 0,1 mM dTTP:
10 μ l 0,3mM dTTP (Vysis)
20 μ l Nuclease freies H_2O
- 0,1 mM dNTP:
10 μ l 0,3 mM dATP
10 μ l 0,3 mM dCTP
10 μ l 0,3 mM dGTP
- DNA: 0,2-1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Tab. 2.5: Nickansatz Protokoll Vysis

Nuclease-freies H_2O	17,5 - x μl
DNA (1 μg)	x μl
0,2mM dUTP (rot/grün)	2,5 μl
0,1mM dTTP	5 μl
0,1mM dNTP	10 μl
10x Nickpuffer	5 μl
Nick-Enzyme	10 μl
Gesamtvolumen	50 μl

Pro 50 μl Ansatz wird das 1 μg entsprechende Volumen an DNA eingesetzt. Als Positivkontrolle für die CGH dient MPE 600 DNA (Mammakarzinom Zelllinie), die in der Konzentration 200 $\text{ng}/\mu\text{l}$ vorliegt. In die Nicktranslation wird davon 1 μg , also 5 μl eingesetzt. Die einzelnen Substanzen werden in eiskalte 500 μl Tubes pipettiert, gemischt, kurz zentrifugiert und dann zunächst 45 min bei 15°C inkubiert.

Kontrolle der DNA Länge mittels Gelelektrophorese

Entsprechend der Nicktranslation des Ulmer Protokolls wird die Länge der DNA-Fragmente über ein 1% Agarosegel (0,5 g Agarose auf 50 ml TAE-Puffer, 0,01% Ethidiumbromid = 5 μl Ethidiumbromid [1 mg/ml]) kontrolliert. Pro Geltasche werden 9 μl Nickprodukt und 1 μl Ladepuffer aufgetragen. Die angelegte Spannung beträgt 80 V, die Laufzeit in der Regel 45 min. Nach dem Protokoll der Firma Vysis sollen die

Sonden eine Länge von 3000 bis 300 bp erreichen. Liegen die DNA-Fragmente in der gewünschten Länge vor, wird die Nicktranslation endgültig gestoppt, indem man die Proben 10 min bei 70 °C inkubiert, um die Enzyme zu inaktivieren. Die DNA wird nicht aufgereinigt, sondern direkt auf die denaturierten Metaphasen hybridisiert.

2.6. Comparative Genomische Hybridisierung (CGH)

Die CGH wurde überwiegend nach dem Protokoll von M. Bentz (Ulm) durchgeführt (2.6.1). Für einzelne Experimente wurde das CGH Protokoll der Firma Vysis (2.6.2.) angewendet.

2.6.1. Ulmer Protokoll

Material/Reagenzien:

- Normal (46, XY) Metaphase CGH Target Slides (Vysis)
- Formamid (Merck)
- Resin 501x8 (Bio-Rad)
- 20x SSC
- 0,5 M NaPhosphat
- Ethanol 70%, 90%, 100%
- Humane Cot1DNA (Gibco BRL, 500µg, 1mg/ml)
- 3 M NaAcetat (pH 5,2) bei RT
- Dextransulfat (Merck)
- Deckgläser 18x18 (R. Langenbrinck)
- Fixogum (Marabu)
- feuchte Kammer
- Hybridisierungsmix 10 ml: 2 ml 20x SSC (pH 7,0)
4 ml 50% Dextransulfat (oder 2 g)
1 ml 0,5 M NaPhosphat (pH 7,0)
3 ml Aqua dest
Dextransulfat in Wärme (50 °C Heizplatte) unter Rühren lösen
und Mix steril filtrieren
Aliquots bei -20 °C lagern
- Denaturierungslösung: 49 ml Formamid (mittels Resin deionisieren: Leitfähigkeit <0,5 mSiemens)
7 ml 20x SSC, 7 ml NaPhosphatpuffer
7 ml Aqua bidest
pH 7,0
- Wasch A: 150 ml Formamid (Merck)
30 ml 20x SSC

- 120 ml Aqua bidest
auf pH 7,0 mit 1M HCl einstellen
- Wasch B: 0,1x SSC (25 ml 20x SSC/l)
mit 1M HCl einstellen auf pH 7,0
 - Blocklösung: 6 ml 20x SSC
24 ml Aqua dest
900 mg BSA (Sigma)
BSA auf Flüssigkeit fallen lassen
pH auf 7,3 einstellen, steril filtrieren, Aliquots bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
lagern
 - Detektionsmix: 6 ml 20x SSC
30 μl Tween
24 ml Aqua bidest
0,3 g BSA
Steril filtrieren, Aliquots bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagern
 - Anti-Dig-Rhodamin (Roche):
in 1 ml Aqua bidest lösen
5 min zentrifugieren bei 13000 rpm
Überstand aliquotieren, bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ wegfrieren
 - Fluorescein-Avidin-DCS (FITC) (Vector):
Zentrifugieren 5' bei 13000 rpm
Überstand aliquotieren, bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ wegfrieren
 - Wasch C: 4x SSC, 0,1% Tween 20, pH 7,3
 - Kernfärbung DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindole) (Sigma):
Stocklösung: 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Gebrauchslösung: 200 ng/ml (1:1000 Verdünnung in 2x SSC
(pH 7,0) in Küvette: 80 ml 2x SSC und 80 μl DAPI)
 - Wasch D: 2x SSC
0,05% Tween 20
pH 7,0

Probenvorbereitung (Tag 1)

1 μg Biotin markierte Tumor-DNA und 1 μg Digoxigenin markierter Plazenta-Referenz-DNA werden gemischt. Dazu wird humane Cot1-DNA im Überschuss gegeben. Die Cot1-DNA fängt hochrepetitive Sequenzen im Bereich des Heterochromatins ab. Repetitive DNA Abschnitte, wie z.B. in Zentromernähe vorkommend, verursachen durch eine unterschiedliche Hybridisierungskinetik ein unverhältnismäßig starkes Fluoreszenzsignal und würden ohne Zugabe von Cot1-DNA die erwünschten Fluoreszenzsignale überstrahlen.

Untersucht wird DNA von Primärtumoren und Lymphknoten von duktal invasivem Mammakarzinom, DNA von MCF-7 Zellen (Positivkontrolle), DNA von MPE 600 Zellen, eine weitere Mammakarzinom-Zelllinie, und DNA von Plazenta (Negativkontrolle). Als Referenz-DNA dient DNA aus Plazenta eines weiblichen Säuglings (46, XX). Das Geschlecht der Plazenta muss immer mit dem Geschlecht der Proben-DNA identisch sein, da sonst die DNA der Geschlechtschromosomen schon von vornherein nicht in gleichem Verhältnis vorliegt.

Tab. 2.6: Ansatz für die DNA-Fällung

Proben-DNA	Plazenta-DNA	Cot-DNA (1 mg/ml)	3M NaAcetat	100% Ethanol (-20 °C)
50 µl (1 µg)	50 µl (1 µg)	70 µl	8,5 µl	450 µl
bzw. Volumen, das 1 µg DNA entspricht	bzw. Volumen, das 1 µg DNA entspricht	immer 70 µl	1/20 (Proben-DNA + Plazenta-DNA + Cot- DNA)	2,5 x (Proben- DNA + Plazenta- DNA + Cot-DNA + NaAcetat)

Der Ansatz (Tab. 2.6) wird pipettiert, durch Invertieren gemischt und die DNA bei -80 °C für 30 min gefällt. Anschließend wird bei 14000 rpm und 4 °C 20 min zentrifugiert. Das Pellet wird in 500 µl 70% EtOH (-20 °C) gewaschen, anschließend wird nochmals 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet im SpeedVac getrocknet. Die Rehydrierung der DNA erfolgt zunächst mit 6 µl Formamid. Durch Vortexen wird das Pellet gelöst und anschließend 30 min in einem 37 °C Thermoschüttler inkubiert. Danach werden weitere 6 µl Hybridisierungsmix zugegeben und nochmals für 30 min im Thermoschüttler inkubiert. Bevor die Proben auf die Metaphasenslides hybridisiert werden, werden sie bei 75 °C 5 min denaturiert, damit die DNA als Einzelstrang vorliegt. Nur so kann sie an homologe Stellen auf den Trägermetaphasen binden. Direkt vor der Hybridisierung wird die DNA für 20 min bei 37 °C vortemperiert (Preannealing).

Vorbereitung und Denaturierung der Metaphasen

Die käuflich erworbenen Metaphasen (Vysis) stammen von Lymphozyten gesunder Spender. Laut Produktbeschreibung werden Phytohemagglutinin stimulierte Lymphozyten für 48-72 h in Kultur genommen, 14-18 h mit Thymidin inkubiert, gewaschen und

anschließend nochmals 5 h in Kultur genommen, bevor pro Objektträger drei Tropfen aufgebracht werden.

Vor Gebrauch werden die Objektträger (Lagerung bei -20 °C) für mindestens 1 h im Kühlschrank auf 4 °C vortemperierte. In einem Phasenkontrastmikroskop werden dann die Chromosomen auf ihre Qualität untersucht. Für die Karyotypisierung bei der Auswertung ist wichtig, dass die Chromosomen einzeln, nicht überlappend und möglichst gestreckt liegen. Sie dürfen nicht zu stark kondensiert sein (klein und dick), aber auch nicht zu wenig (lang und schmal). Unter diesen Kriterien wird der beste Tropfen ausgewählt und auf der Unterseite des Objektträgers mit einem Diamantschneider markiert.

Während der Hybridisierung muss die Träger-DNA als Einzelstrang vorliegen, damit das Gemisch aus Proben- und Referenz-DNA binden kann. Deshalb müssen die Metaphasenobjektträger denaturiert werden. Vor der Denaturierung werden die Slides im Hybridisierungsöfen auf 60 °C vortemperierte, um die Denaturierungslösung nicht zu stark abzukühlen. Die Denaturierungslösung besteht aus 49 ml Formamid, welches mittels Resin deionisiert wurde (Leitfähigkeit $< 0,5\text{ mSiemens}$), 7 ml 20x SSC, 7 ml NaPhosphatpuffer und 7 ml Aqua bidest. Der pH der Lösung wird auf 7,0 eingestellt und die Lösung im Wasserbad auf 70 °C erwärmt. Maximal zwei Slides gleichzeitig werden nun je 2 min bei exakt 70 °C denaturiert und anschließend jeweils 5 min in eiskaltem Alkohol dehydriert (aufsteigende Alkoholreihe 70%, 90%, 100%) und luftgetrocknet.

Hybridisierung

12 μl DNA-Mix werden auf den markierten Tropfen des Metaphasenobjektträgers pipettiert, mit einem 18x18 Deckglas luftblasenfrei abgedeckt und mit Fixogum umrandet. Die so präparierten Objektträger werden nun für 48-72 h in einer feuchten Kammer bei 37 °C hybridisiert.

Waschen und Färben nach der Hybridisierung (Tag 2)

Tab. 2.7: Protokoll Hybridisierung Tag 2

Waschschritt	Zusammensetzung	Temperatur	Zeit
4 x Wasch A	(s. oben)	Fixogum abnehmen 42 °C Schüttlerwasserbad (A1 mit Deckglas, A2-A4 ohne)	A1 10 min A2 5 min A3 5 min A4 5 min
3 x Wasch B	(s. oben)	Vorwärmen auf 60 °C waschen bei 42 °C	3 x 5 min
Block	200 µl/slide	in feuchter Kammer 37 °C	30 min – 1 h
Detektion	200 µl/slide + 1 µl FITC/200 µl +3 µl Rhodamin/200 µl	Ab diesem Schritt wird lichtgeschützt gearbeitet in feuchter Kammer 37 °C	exakt 30 min
3 x Wasch C	Braune Küvette, Rest in Flasche	Schüttlerwasserbad 42 °C	3 x 5 min
DAPI-Färbung	in Küvette: 80 ml 2x SSC, 80 µl DAPI	Schüttler bei RT	10 min
Wasch D	(siehe oben)	Schüttler bei RT	3 min

Die Objektträger werden nach oben stehendem Protokoll gewaschen und gefärbt. Nach Zugabe von Blocklösung bzw. dem Detektionsmix wird der markierte Bereich für die Inkubation mit Parafilm bedeckt. Im Anschluss an den Wasch D werden die Objektträger luftgetrocknet, 1 Tropfen Vectorshield wird als Schutz gegen Ausbleichung der Fluoreszenzfarbstoffe aufpipettiert und die Slides werden luftblasenfrei mit einem 18x24 mm Deckglas eingedeckelt. Lichtgeschützt werden die Objektträger bei 4 °C gelagert.

2.6.2. Protokoll nach Vysis

Reagenzien (Vysis)

- 20x SSC (pH 5,3): 66 g 20x SSC in 200ml reinem Wasser lösen
Auf 250 ml auffüllen
Auf pH 5,3 mit konz. HCl
- Denaturierungslösung: 49 ml Formamid (deionisiert, molecular biology grade)
7 ml 20x SSC (pH 5,3)
14 ml reines Wasser
pH 7,0-7,5
zugedeckt lagern, nach 7 Tagen verwerfen
- Alkohol: 100%, 85%, 70%

- 0,4x SSC/0,3% NP40: 20 ml 20x SSC
950 ml reines Wasser
3 ml NP40
Gründlich mischen, bis NP40 gelöst
Mit reinem Wasser auf 1000 ml auffüllen
pH 7,0-7,5 mit NaOH
- 2x SSC/0,1% NP40: 100 ml 20xSSC
850 ml reines Wasser
1 ml NP40
Mit reinem Wasser auf 1000ml auffüllen
pH 7,0-7,5 mit NaOH

Tab. 2.8: Vorbereitung der Proben für die CGH

Bezeichnung der Probe	Proben-DNA (grün)	Plazenta-DNA (rot)	Cot-DNA (1µg/µl)	3M NaAcetat (pH 5,5)	100% EtOH (aus -20°C)
Eigene Proben	200 ng 10 µl	200 ng 10 µl	10 µg 10 µl	0,1x Volumen 3 µl	2,5x Volumen 75 µl
	400 ng 20 µl	400 ng 20 µl	20 µg 20 µl	6 µl	150 µl
MPE 600 (von Vysis markiert) 300 ng/µl	300 ng 1 µl	300 ng 15 µl	15 µg 15 µl	3,1 µl	77,5 µl

Die in Tabelle 2.8 genannten Substanzen werden in 1,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert, kurz gemischt und zentrifugiert. Die DNA wird 15 min bei -80 °C gefällt, 30 min (12.000 rpm, 4 °C) zentrifugiert, der Überstand wird verworfen und das Pellet 10 bis 15 min in Vakuum bei Raumtemperatur getrocknet. Die Rehydrierung der DNA erfolgt in 3 µl reinem Wasser und 7 µl Hybridisierungspuffer. Es wird so lange gevortext, bis das Pellet gelöst ist. Anschließend werden die Proben in einem 73 °C Wasserbad 5 min denaturiert, damit die DNA für die Hybridisierung als Einzelstrang vorliegt.

Denaturierung der Metaphasen und Hybridisierung

Die Metaphasenchromosomen werden wie im Ulmer Protokoll (siehe 2.6.1.) ausgewählt, die Metaphasen-DNA wird entsprechend denaturiert und 10 µl Probe werden auf den zuvor markierten Tropfen pipettiert. Hybridisiert wird ebenfalls bei 37 °C für 48 bis 72 h.

Waschen der Objektträger (2. Hybridisierungstag)

Tab 2.9: Waschprotokoll 2. Hybridisierungstag

Waschlösung	Zeit	Temperatur
0,4x SSC/0,3% NP40	1-3sec. auf- und abbewegen 2 min stehen lassen	74 °C (30 min temperieren)
2x SSC/0,1% NP40	1-3sec. auf- und abbewegen 5 sec bis 1 min stehen lassen	Raumtemperatur
Lufttrocknen		

Die Objektträger werden nach oben stehendem Protokoll gewaschen. Pro Objektträger werden 10 µl DAPI-Kernfärbungslösung auf den markierten Tropfen markiert, bevor dieser mit einem 18x23 Deckglas eingedeckelt wird. Die Objektträger werden bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

2.7. Auswertung der CGH

Geräte:

- Fluoreszenzmikroskop (Olympus) 100 W Lampe
Okularvergrößerung 10x
Objektive 4x, 40x (Ölimmersion), 100x (Ölimmersion)
- Farbfilter für DAPI, Rhodamin und FITC
- CCD (charge coupled device) Kamera
- Rechner (Macintosh)
- PathVision Software (Vysis)
- CGH/Karyotyper Software (Vysis)
- CGH Interpreter Software (Vysis)

Nach dem Waschen werden die Metaphasenobjektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop durch die entsprechenden Farbfilter betrachtet.

Die Auswertung der Fluoreszenzintensitäten erfolgt auf verschiedenen Ebenen: Zum einen visuell unter dem Fluoreszenzmikroskop, zum anderen über eine digitale Bildanalyse. Das Betrachten der Metaphasenchromosomen durch das Fluoreszenzmikroskop dient der Auswahl der Metaphasen, die mittels CCD Kamera aufgenommen

werden. Da für das bloße Auge nur hochgradige Amplifikationen sichtbar werden, sind für die Beurteilung aller Imbalancen im Tumorgenom digitalisierte Bilder erforderlich.

2.7.1. Digitale Bildanalyse

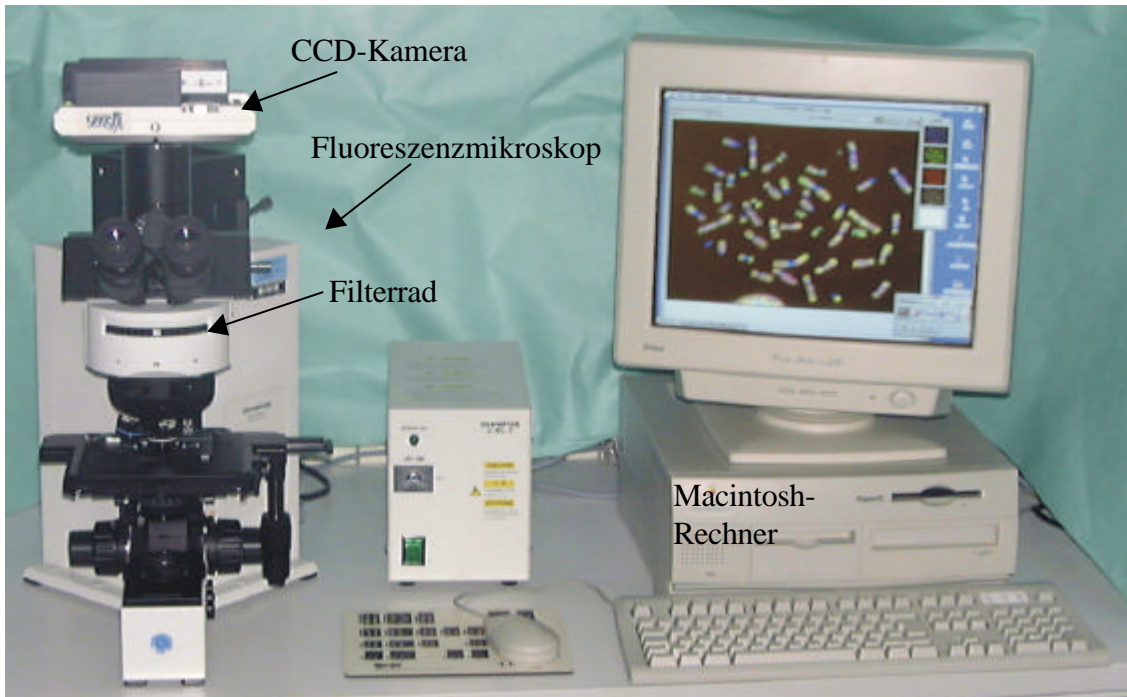


Abb 2.6: Das CGH-System

Unter dem Fluoreszenzmikroskop werden die Objektträger mit verschiedenen Farbfiltern für die jeweilige Färbung (FITC, Rhodamin, Dapi) betrachtet, die geeigneten Metaphasen ausgewählt und über die angeschlossene CCD-Kamera mit Hilfe der PathVision Smart Capture Software (Vysis) aufgenommen. Anschließend erfolgt die Bildanalyse mittels CGH Karyotyper und Interpreter Software (Vysis) am Macintosh Rechner.

Über die an das Fluoreszenzmikroskop angeschlossene gekühlte CCD-Kamera wird für jeden Farbstoff (FITC, Rhodamin, DAPI) mit einem geeigneten Farbfilter ein digitales Fluoreszenzbild mit Hilfe der FISH-Software PathVision Smart Capture Software (Vysis) in 100facher Vergrößerung aufgenommen. Pro Metaphasenobjektträger eines Tumors werden mindestens 5 Metaphasen aufgenommen und ausgewertet. Vom Computer werden die Fluoreszenzsignale als Graustufenbild kodiert. Für den Betrachter sind die Chromosomen als Falschfarbenbilder blau, rot bzw. grün sichtbar. Die einzelnen Bilder werden als „Merge“-Bild übereinander gelagert (siehe Abb. 2.7 (a)).

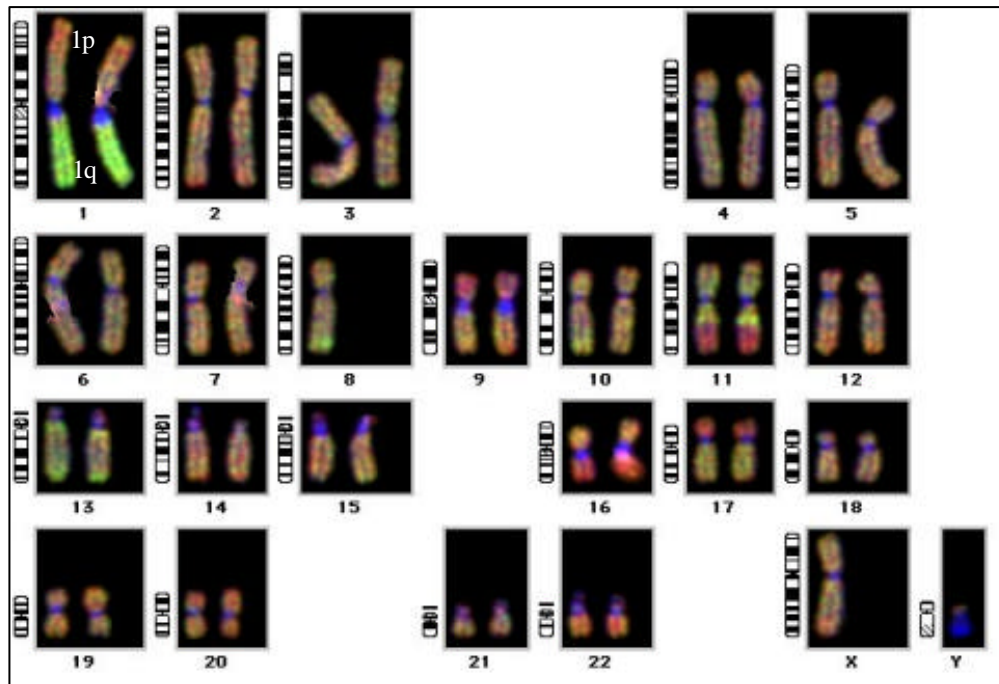
DNA-Zugewinne sind am Überwiegen der grünen Farbe, Verluste an stärker rot gefärbten Chromosomenabschnitten zu erkennen.

2.7.2. Auswertung der Fluoreszenzbilder

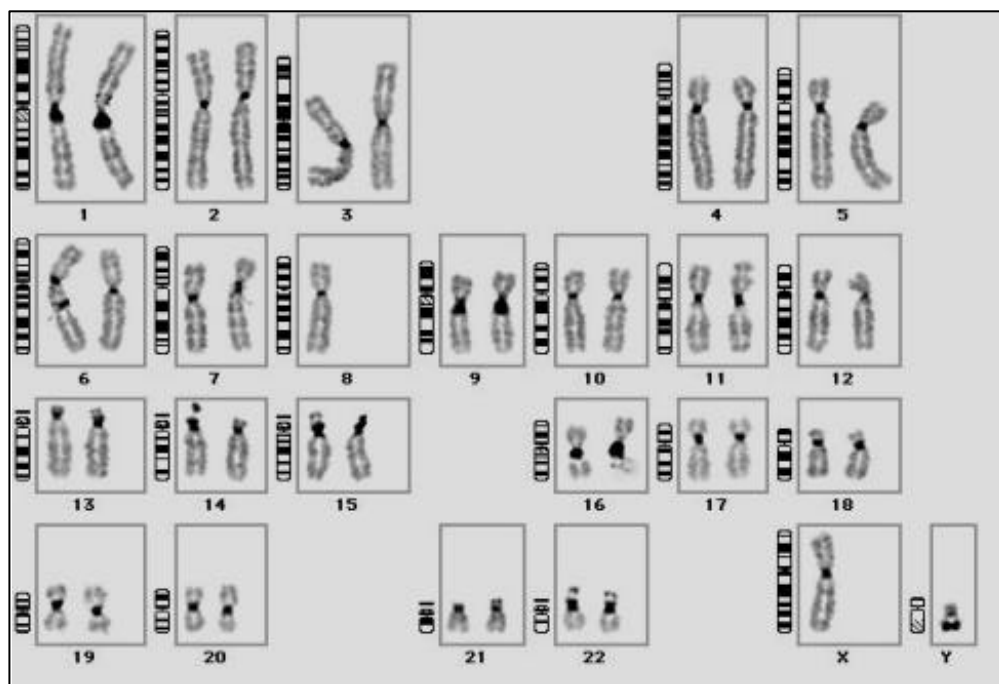
Um ein CGH-Experiment auswerten zu können, werden die Chromosomen zunächst sortiert (karyotypisiert). Hierfür werden die FISH-Bilder in die CGH-Software CGH Karyotyping/Analysis (Vysis) kopiert. Mit diesem Programm werden die Chromosomen von Hand vereinzelt und mit Hilfe ihrer Größe, Lage des Zentromers und Bänderungsmuster in der DAPI-Kernfärbung sortiert. Exemplarisch ist in Abbildung 2.7 dieser Arbeitsschritt anhand einer Standardpositivkontrolle (MPE 600) der Firma Vysis dargestellt.

Die Software wertet dann entlang der Chromosomen die Intensität der Fluoreszenzsignale quantitativ aus und berechnet die Imbalancen. Die Ergebnisse werden als Ratio-Profile dargestellt (siehe Abb. 2.8), wobei Abweichungen von der Mittellinie nach rechts aus einer verstärkten Grünfärbung entstehen und einer Tumor-DNA-Vermehrung entsprechen, Abweichungen nach links aus einer verstärkten Rotfärbung resultieren und einem Verlust an DNA im Tumor entsprechen. Die grüne Parallele rechts der Mittellinie symbolisiert den im Computer festgelegten Grenzwert (Cut-off-Linie) für eine Amplifikation (grüne Fluoreszenzintensität:rote Fluoreszenzintensität $> 1,2$), die rote Parallele links markiert den Grenzwert für eine Deletion (grün:rot $< 0,8$). Neben den Profilen stellt sich ein Zugewinn an Tumor-DNA als grüner Balken rechts des symbolisierten Chromosoms dar, ein Tumor-DNA-Verlust als roter Balken auf der linken Seite.

Mit dem Programm CGH Interpretation (Vysis) werden die Profile von mehreren Metaphasen eines Tumors übereinandergelegt und ein Summenprofil (siehe Ergebnisse CGH 3.5) erstellt. Der Mittelwert der Einzellinien wird vom Computer errechnet und als blaue Profillinie dargestellt.



a



b

Abb. 2.7: Die Abbildung zeigt die sortierten (= karyotypisierten) Chromosomen der oben gezeigten Metaphase des MPE 600-CGH-Experimentes. In diesem Fall muss ein Chromosom 8 aussortiert werden, alle anderen Chromosomen können zugeordnet werden. (a) zeigt das „Merge-Bild“, bei dem auf Chromosom 1q eine starke Amplifikation als Grünfärbung, auf den Chromosomen 9p, 11q, 16q und 22 starke Deletionen als Rotfärbung bereits mit bloßem Auge zu erkennen sind. (b) zeigt das Bänderungsbild dieser Metaphase, auf dem die für die jeweiligen Chromosomen typischen Bänderungsmuster zu erkennen sind, und welches Voraussetzung für das Sortieren der Chromosomen ist.

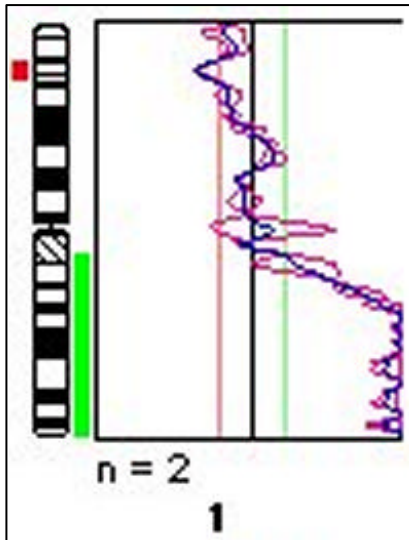


Abb 2.8: Die Abbildung zeigt beispielhaft das Einzelprofil für Chromosom 1 der in 2.7 dargestellten Metaphase. Die grüne Parallele rechts der Mittellinie stellt den Grenzwert (Cut-off Linie) für eine Amplifikation, die rote Parallele links den Grenzwert für eine Deletion dar. Zu sehen sind zwei Einzelprofilinien ($n = 2$) für Chromosomen 1 (rosa) und deren Mittelwert (blau). Auf dem kurzen Arm (1p) befindet sich eine Deletion (roter Balken links der Chromosomenskizze), auf dem langen Arm (1q) eine starke Amplifikation (grüner Balken).

Nicht alle CGH-Experimente sind auswertbar. Kriterien für die Auswertbarkeit beschreibt Kallioniemi et al. (1994) wie folgt:

1. Alle Metaphasen weisen eine glattbegrenzte, gleichmäßig intensive Hybridisierung auf. Ein körniges Aussehen ist ein häufiges Problem. Solche Chromosomen werden nicht ausgewertet.
2. Die Verteilung der grünen und roten Fluoreszenz zwischen den beiden Schwesterchromatiden, sowie zwischen den beiden homologen Chromosomen und den gleichen Chromosomen verschiedener Metaphasen ist gleichmäßig.
3. Die Hintergrundfluoreszenz ist schwach und gleichmäßig.
4. Die Bindung der markierten Tumor- bzw. Referenz-DNA an Zentromer und heterochromatische Abschnitte ist gering.
5. Die Chromosomen zeigen eine intensive DAPI-Färbung mit sichtbaren Banden, erforderliche Längen und wenig Überlappungen.

Die Auswertung in der vorliegenden Arbeit orientiert sich an diesen Vorgaben. Ein CGH-Experiment ist auswertbar, wenn mindestens fünf Metaphasen eines Objektträgers ausgewertet werden können.

3. ERGEBNISSE

3.1. Laser Capture Microdissection (LCM)

Als Ausgangsmaterial dienten Gefrierschnitte von kryoasserviertem Mammakarzinomgewebe aus der Tumorbank der Tübinger Frauenklinik. Hierbei wurden jeweils Primärtumor und axilläre Lymphknotenmetastase derselben Patientin disseziert. Neben diesen beiden Gewebetypen wurde die LCM außerdem an Rattenleber und Rattenniere angewandt, da die Zuverlässigkeit der LCM in Bezug auf eine eventuelle Gewebeabhängigkeit über die zwei eingesetzten Gewebe (Primärtumor und Lymphknoten) hinaus untersucht werden sollte. Dabei konnte keine systematische Eignung/Nichteignung eines Gewebes festgestellt werden, vielmehr hing die Zuverlässigkeit der LCM von der Vorbereitung der Schnitte ab (siehe unten).

Die Abfolge der Abbildungen 3.1-3 beschreibt exemplarisch den Verlauf einer LCM. Vor der Mikrodissektion wurde das Tumoreal, das abgehoben werden sollte, im Zentrum des Blickfeldes eingestellt (Abb. 3.1). Die Tumorzellen stellten sich als Nester unterschiedlich großer Zellen mit atypischen, meist großen Zellkernen dar, im Gegensatz zum streifig angeordneten umliegenden Bindegewebe, das in H.E.-Färbungen rosafarben erscheint.

Abbildung 3.2 zeigt denselben Schnitt nach Mikrodissektion und Abheben des Caps, an dem die dissezierten Tumorzellen haften blieben (Abb.3.3). Um die LCM und damit auch die DNA-Menge zu standardisieren, wurden jeweils ca. 70 Pulse mit dem 30 µm Laser abgegeben. Auszählen der Zellen innerhalb eines 30 µm „Spots“ ergab im Durchschnitt 15 Zellen pro „Spot“. Überlappungen der einzelnen Schüsse wurden berücksichtigt. Auf diese Weise wurden pro Cap ungefähr 1000 Zellen disseziert, wobei nahezu ausschließlich Tumorzellen abgehoben wurden und die Morphologie sowohl der dissezierten als auch der umliegenden Zellen intakt blieb.

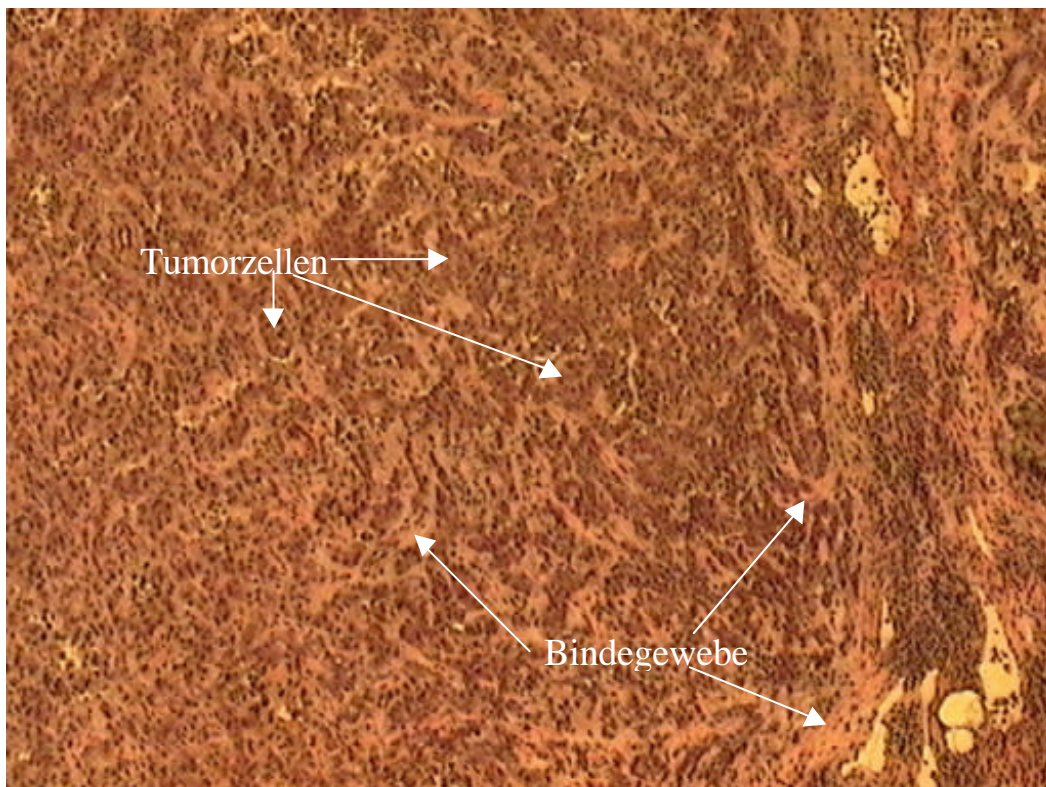


Abb. 3.1 Die Abbildung zeigt einen 6 µm dicken Gefrierschnitt von Mammakarzinom # TÛ 57a (nach H.E.-Färbung) vor der Mikrodissektion. Die Tumorzellen stellen sich als dunkle Zellnester mit stark variierender Zell- und Kerngröße dar und liegen umgeben von hellrot gefärbtem Bindegewebe.

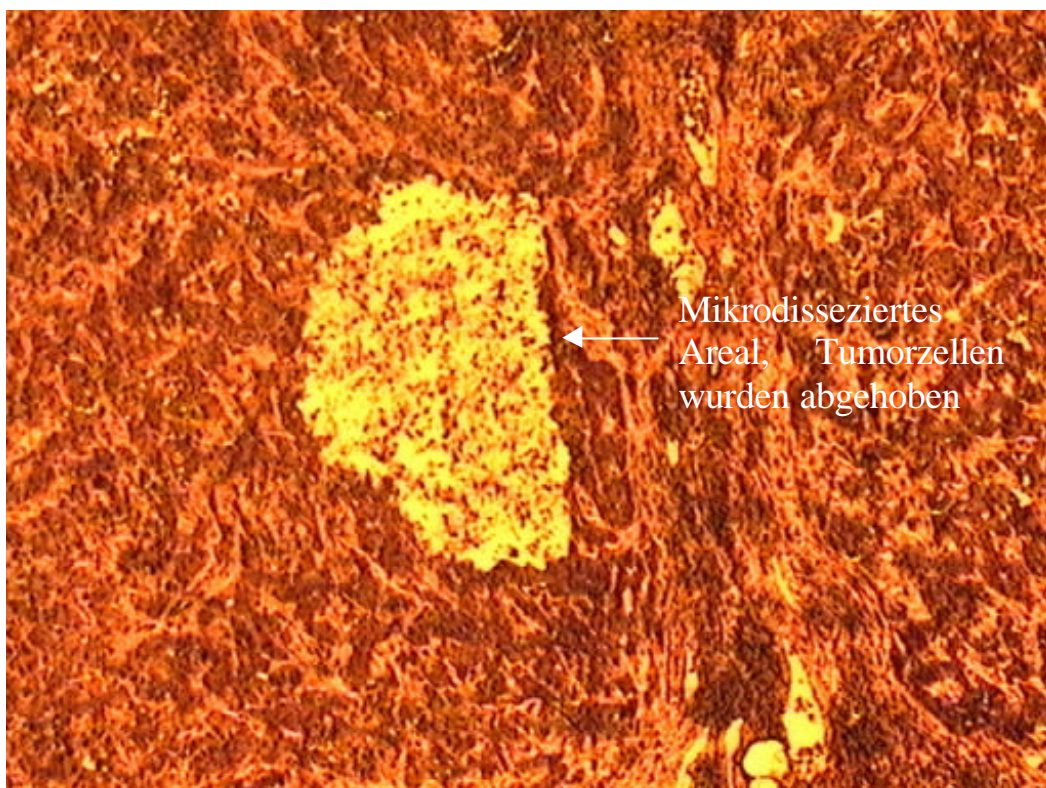


Abb. 3.2 Die Abbildung zeigt denselben Ausschnitt des Tumors wie Abb. 3.1 nach Mikrodissektion und Abheben des Caps. Die Mikrodissektion war erfolgreich, was an den fehlenden Tumorzellen in der Bildmitte zu erkennen ist. Die Morphologie des umliegenden Gewebes ist intakt.

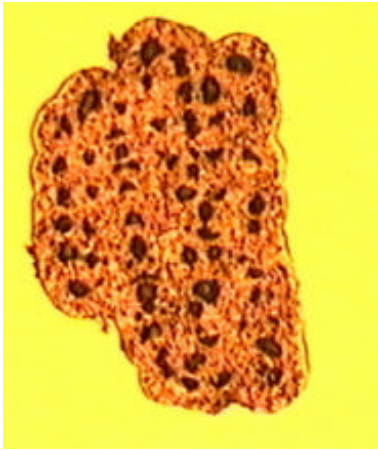


Abb. 3.3 Zu sehen ist das Cap, an dem die dissezierten Tumorzellen haften. Das Cap wurde vom Schnitt abgehoben und auf eine freie Stelle auf dem Objektträger aufgesetzt wurde. Die dunklen Verfärbungen entstehen durch das „Verschmelzen“ von Transferfilm und Gewebe.

Optimierung der Kryoschnitte und des Färbeprotokolls

Im Rahmen der Arbeit trat das Problem mangelnder Zuverlässigkeit der LCM auf. Verschiedene Schnitte derselben Tumorprobe ließen sich nicht reproduzierbar dissezieren, ebenfalls konnten nicht alle Areale eines Schnittes gleich gut abgehoben werden. Als Ursachen wurden verschiedene Punkte in Erwägung gezogen (siehe 4.2.2). Zur Lösung dieses Problems wurden Veränderungen des Protokolls vorgenommen, wovon folgende zur Optimierung der Probenaufbereitung für die LCM beitrugen und eine höhere Zuverlässigkeit der Lasermikrodissektion bewirkten:

1. Gewebestücke ließen sich besser schneiden, wenn sie zuvor in OCT eingebettet wurden.
2. Einbettung der Tumoren bzw. Gewebestücke in OCT erbrachte bei der LCM eine wesentlich höhere Zuverlässigkeit.
3. Die direkte Aufeinanderfolge von Schneiden, Fixieren, Färben, Dehydrieren und LCM ohne zwischenzeitliches Einfrieren der ungefärbten Schnitte und Transport der Schnitte auf Trockeneis, wie im ursprünglichen Protokoll, erwies sich als vorteilhaft.
4. Die Fixierungszeit der Schnitte in 70% Ethanol sollte < 30 min betragen.
5. Die Herstellung von Referenzschnitten, auf denen das interessierende Tumorareal vom Pathologen markiert wurde, erwies sich als wichtig.

3.2. DNA-Isolation

Die DNA-Isolation in 1x PCR-Puffer und Proteinase K Verdau erbrachte im Vergleich zur Isolation in Arcturus Lysepuffer bessere Ergebnisse in der DOP-PCR (kein DNA-„Schmier“ aus den Taschen).

Die aufwendigere Isolation mit Fällung und Proteinpräzipitation (Wizard Genomic DNA-Purification Kit, Promega) lieferte zwar reinere DNA, ging aber mit hohen Verlusten während der einzelnen Aufreinigungsschritte einher und war nur beim Einsatz größerer Zellmengen ($> \frac{1}{2}$ Cap) anwendbar. Sie eignete sich daher nicht für die LCM geringer Zellzahlen.

3.3. PCR mit degenerierten Primern (DOP-PCR)

Ausgangsmaterial für die DOP-PCR war DNA-Lysat von Primärtumor und Lymphknoten von Mammakarzinom aus LCM-Proben, Plazenta-DNA und DNA von MCF-7 Zellen nach Isolation der genomischen DNA aus Frischgewebe bzw. Zellpellet.

Exemplarisch sind zwei 1% Agarosegele nach DOP-PCR gezeigt: In Abbildung 3.4 eine DOP-PCR von Tumorproben (jeweils Primärtumor # TÛ 57 und # TÛ 70 und die entsprechenden Lymphknoten # TÛ 57a und # TÛ 72) nach LCM und DNA-Lyse in PCR-Puffer und Proteinase K Verdau. Abbildung 3.5 zeigt das Gel einer DOP-PCR von Plazenta-DNA (eingesetzt wurde jeweils 1 µl einer Plazenta-DNA-Verdünnung mit der Konzentration 1 ng/µl = 1 ng) nach Isolation mit dem Wizard DNA Purification Kit (Promega) und Verdünnung.

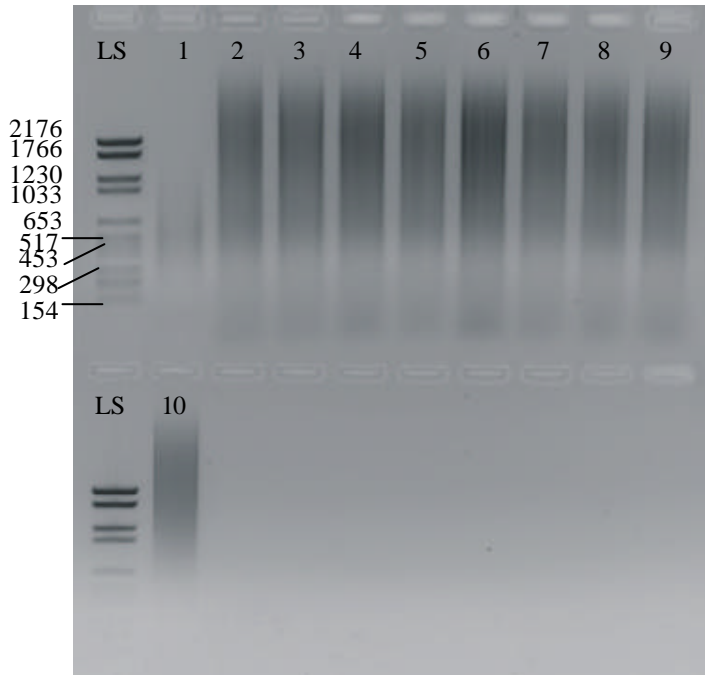


Abb. 3.4: 1% Agarosegel nach DOP-PCR

Längenstandard (LS), **1** Leerwert (LW) aus H₂O, **2-10** Tumorproben nach LCM: **2, 3** # TÜ 57; **4, 5** # TÜ 57a; **6, 7** # TÜ 70; **8, 9** # TÜ 72; **10** Positivkontrolle: DNA von MCF-7-Zellen aus Zellkultur. Der Leerwert ist nahezu rein, der „DNA-Schmier“ der Tumoren liegt entsprechend dem der Positivkontrolle im gewünschten Bereich zwischen ca. 3000 und 500 Basenpaaren (bp).

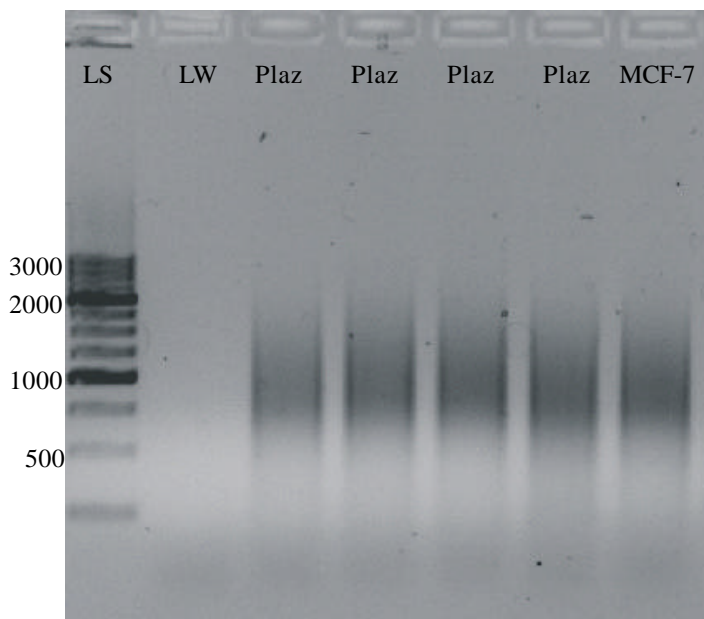


Abb. 3.5 zeigt ein 1% Agarosegel einer DOP-PCR von Plazentaprobe. Von links nach rechts: Längenstandard (LS), Leerwert (LW) aus H₂O, Plazentaprobe, Positivkontrolle mit DNA von MCF-Zellen. Der Leerwert ist frei von Kontaminationen, der „DNA-Schmier“ der Plazentaprobe sowie der MCF-7 Zellen liegt zwischen 2000 und 500 bp, also im gewünschten Bereich.

Die Laufzeit der Gele betrug 35 bzw. 45 min bei einer angelegten Spannung von 90 V. Als Leerwert diente H₂O, als Positivkontrolle MCF-7 DNA (1µl einer 1 ng/µl Verdünnung = 1 ng). Eine gleichmäßige Amplifikation der genomischen DNA der eingesetzten LCM-Proben bzw. Plazenta-DNA zeigte sich im Agarosegel nach der DOP-PCR in beiden dargestellten Fällen als gleichmäßig verteilter „Schmier“ über eine Länge von etwa 3000 bis 500 bp. In der DOP-PCR der Tumorproben lagen im

Vergleich zur Plazenta-DOP-PCR verhältnismäßig mehr längere DNA-Abschnitte vor, da die DNA aber nicht aus den Geltaschen (oben im Bild) „schmierte“, kann davon ausgegangen werden, dass sie nicht denaturiert war. Denaturierte DNA würde durch Aneinanderlagerung von vielen kurzen DNA-Fragmenten zu großen DNA-Fragmenten führen, die als „Schmier“ aus den Taschen im hohen Basenpaarbereich sichtbar würden. In der Negativkontrolle war kein „Schmier“ zu sehen, was dafür spricht, dass keine Kontaminationen vorlagen. Da degenerierte Primer unspezifisch amplifizieren, kam es bei der DOP-PCR häufig zu leichten Verunreinigungen des Leerwertes. Sofern der Leerwert deutlich von einem positiven „Schmier“ zu unterscheiden war, wurden die Proben weiterverarbeitet.

Aufreinigung über Gibco Säulen

Zwei jeweils identische, auf zwei PCR-Tubes verteilte Tumorproben wurden über eine Säule aufgereinigt. Mittels photometrischer Vermessung bei 260 und 280 nm erhielt man nach Aufreinigung die in Tabelle 3.1 aufgelistete DNA-Konzentrationen und Ratios (Absorption bei 260 nm/Absorption bei 280 nm). Aus den Konzentrationswerten wurde die DNA-Menge berechnet, die pro Tube vorlag, um so einen Anhaltspunkt für die maximal einsetzbare Menge in der Nicktranslation zu erhalten:

Tab. 3.1: DNA-Konzentrationen, Ratio (260/280 nm) und berechnete absolute DNA-Menge in 42 µl TE-Rehydrierungspuffer nach Aufreinigung der DOP-PCR Produkte über Gibco Säulen

Tumor/Plazenta	DNA-Konz.	Ratio (260 nm/280 nm)	Absolute DNA-Menge in 42 µl TE-Puffer
DOP-PCR Tumoren			
# TÛ 57	74,5 ng/µl	1,9	3,36 µg
# TÛ 57a	78,5 ng/µl	1,92	2,71 µg
# TÛ 70	84,0 ng/µl	1,88	2,67 µg
# TÛ 72	70,0 ng/µl	1,82	2,44 µg
DOP-PCR Plazenta			
Bahn 2 + 3	113,5 ng/µl	2,00	4,76 µg
Bahn 4 + 5	125,5 ng/µl	1,98	5,27 µg
Bahn 6 + 7	89,0 ng/µl	1,98	3,74 µg
Bahn 8 + 9	95,5 ng/µl	1,96	4,01 µg

In den dargestellten Fällen erhielt man durch die DOP-PCR und nach Aufreinigung eine ausreichende Menge an genomischer DNA für die nachfolgende Nicktranslation und CGH, da nach Ulmer Protokoll pro CGH-Experiment 1 µg DNA benötigt wird.

3.4. Nicktranslation

Mittels LCM gewonnene Tumorproben-DNA und DNA aus MCF-7 Zellen wurden nach DOP-PCR und Aufreinigung in die Nicktranslation eingesetzt. Plazenta-DNA wurde sowohl direkt nach DNA-Isolation (Wizard Kit, Promega) als auch nach Amplifikation (DOP-PCR) in der Nicktranslation markiert.

In der Nicktranslation wurden Tumor-DNA, MCF-7-DNA und Plazenta-DNA (Negativkontrolle) als Ziel-DNA mit dUTP gekoppeltem Biotin (grün), Plazenta-Referenz-DNA mit dUTP gekoppeltem Digoxigenin (rot) markiert. Die Länge der markierten DNA wurde während der Nicktranslation in der Regel mehrmals über ein 1% Agarosegel kontrolliert. Der erste Inkubationsschritt des Nickansatzes konnte auf 45 min Verdau bei 15 °C mit 2 µl DNase pro 4 µg DNA bzw. 200 µl standardisiert werden. Die Verdünnung der DNase lag in den meisten Fällen zwischen 1:9000 und 1:18000 einer 3 mg/ml Stammlösung. Danach lag der „Schmier“ im Agarosegel zumeist noch in einem zu großen Basenpaarbereich. Es wurde dann in 30 min Schritten unter Zugabe von je 1 µl DNase (Verdünnung jeweils wie bei erster Inkubation) weiter verdaut bis die DNA im Agarosegel zwischen 2000 und 500 bp sichtbar wurde. Im Mittel wurden 1 bis 2 h Verdauzeit benötigt. Eine Mindestverdauzeit von 45 min schien notwendig, um zu gewährleisten, dass ausreichend markierte dNTPs in die Sonden-DNA eingebaut wurden.

Bei den mit DOP-PCR amplifizierten Proben wurde in der Regel eine geringere DNase Konzentration und kürzere Verdauzeit als bei direkt isolierter DNA benötigt. Plazenta-DNA, die nicht DOP-PCR behandelt war, musste in den meisten Fällen entsprechend länger verdaut werden.

Innerhalb der verschiedenen mit DOP-PCR amplifizierten Proben konnte kein systematischer Unterschied des Nickergebnisses in Abhängigkeit vom Ausgangsmaterial beobachtet werden: Mittels LCM gewonnene DNA von Primärtumoren und

Lymphknoten und direkt isolierte DNA von MCF-7 Zellen verhielt sich in der Nicktranslation gleich.

Beispielhaft werden die Kontrollgele einer Nicktranslation von Plazenta-DNA, MCF-7-Zell-DNA und DNA der Tumoren # TÜ 70 und 72 gezeigt (genauere Beschreibung dieser Nicktranslation unter 3.5.1. CGH von # TÜ 70).

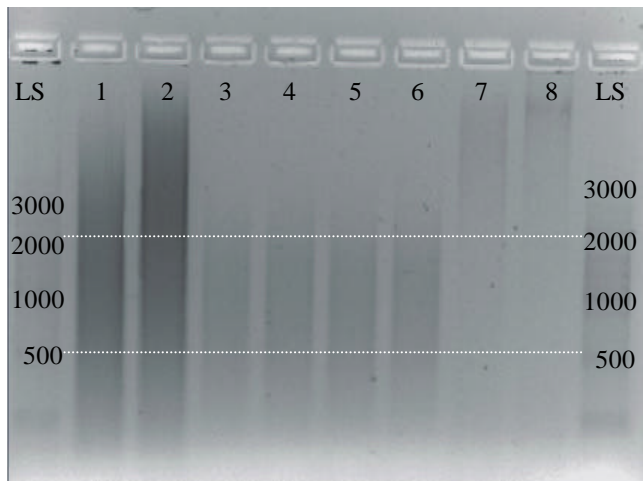


Abb. 3.6 zeigt ein 1% Agarosegel einer Nicktranslation von Plazenta-DNA (1, 2) (ohne DOP-PCR), MCF-7-Zell-DNA (3-6) und DNA der Tumoren # TÜ 70 (7) und # TÜ 72 (8) nach 60 min Verdauzeit. Für die MCF-7 lag der „DNA-Schmier“ zwischen 2000 und 500 bp, die Nicktranslation wurde gestoppt. Plazenta- und Tumor-DNA wurden weitere 30 min verdaut. Die gestrichelten Linien markieren den optimalen Bereich zwischen 2000 und 500 bp. (LS = Längenstandard)

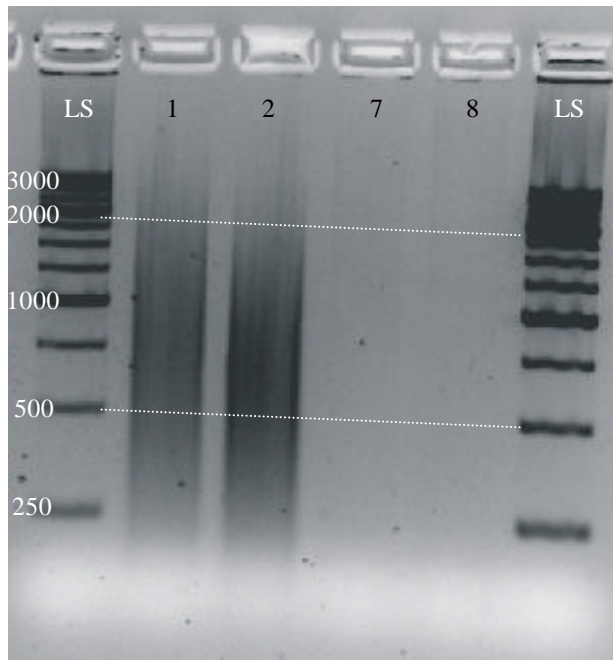


Abb. 3.7 zeigt das 2. Nickgel nach insgesamt 90 min Verdau. 1, 2 Plazenta; 7 #TÜ 70; 8 #TÜ 72 Die Verkürzung der Fragmente durch den Weiterverdau ist für die Plazenta-Proben deutlich zu erkennen, die DNA der Tumorproben ist extrem schwach (führte aber dennoch zu einem auswertbaren CGH-Experiment). Die gestrichelten Linien markieren den optimalen Bereich zwischen 2000 und 500 bp.

Kontrolle der Markierung mittels Dot-Blot

Bei den ersten durchgeführten Nicktranslationen wurde die Biotin- bzw. Digoxigenin-Markierung zusätzlich über einen Dot-Blot kontrolliert, um zu überprüfen, ob überhaupt eine Markierung stattfand. Erfolgreich markierte Sonden sind nach Antikörpergegenfärbung auf der Membran als farbiges Signal wie in Abbildung 3.8 sichtbar.

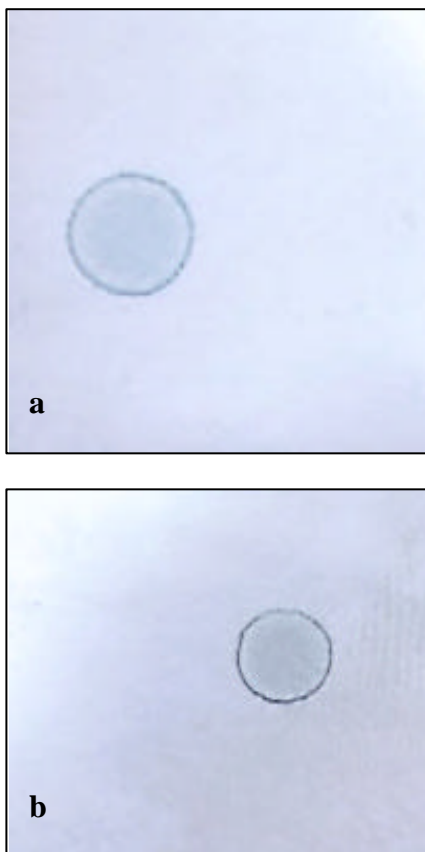


Abb. 3.8: Dot-Blot zur Kontrolle der Digoxigenin-Markierung der DNA-Sonden nach Nicktranslation. Gezeigt werden zwei Membranen mit positiver Antikörperreaktion: Antikörper gegen Digoxigenin, gekoppelt mit dem Enzym alkalische Phosphatase, haben an die DNA gebunden und die Markierung der DNA mit Digoxigenin durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht.

(a) Plazenta-Referenz-DNA nach DOP-PCR

(b) Plazenta-Referenz-DNA ohne DOP-PCR

3.5. Comparative Genomische Hybridisierung (CGH)

Damit die Ergebnisse eines CGH-Experiments auswertbar sind, müssen bestimmte Kriterien der Auswertbarkeit (siehe Auswertung der CGH unter 2.7.2.) erfüllt sein, was bei den im Folgenden dargestellten Ergebnissen der Fall war. Gezeigt werden die CGH-Ergebnisse einer Tumorseite nach LCM (siehe 3.5.1.), der Negativkontrolle (Hybridisierung von Plazenta-DNA mit Plazenta-DNA) (3.5.2.) und der Positivkontrolle (MCF-7 Zellen) (siehe 3.5.3.), die nach Ulmer Protokoll erhalten wurden. Die unter Punkt

3.5.4. gezeigten Ergebnisse entstanden unter Verwendung des Protokolls der Firma Vysis.

3.5.1. CGH von Tumor-DNA nach LCM

Am Beispiel des Tumors # TÛ 70 ist die komplette Abfolge der einzelnen Experimente mit Zwischenergebnissen (DOP-PCR-Gel, Nicktranslation) dokumentiert. Zugrunde lag das Ulmer Protokoll. In der *LCM* wurden ungefähr 1000 Tumorzellen disseziert. In der *DOP-PCR* wurden DNA-Fragmente im erforderlichen Bereich von 3000-300 bp amplifiziert, wie es das Agarosegel in Abbildung 3.4 zeigt.

Die DNA-Konzentration nach *Aufreinigung über Gibco Säulen* betrug 84 ng/µl bei einer Ratio (260 nm/280 nm) von 1,88 (erwünschte Ratio für DNA 1,8) (siehe Tab. 3.1). Es wurden 3 µg aufgereinigtes DOP-Produkt (entsprechend 35,7 µl) in die *Nicktranslation* eingesetzt (Gesamtansatz 150 µl, 3 µg DNA ausreichend für zwei bis drei CGH-Experimente). Die Verdauzeit betrug insgesamt 90 min, von der DNase (1:192000 Verdünnung) wurden je Verdauerschritt 1,5 µl (= 0,5 µl pro 1 µg DNA, insgesamt 3 µl) eingesetzt. Nach 60 min Verdau wurde die Nicktranslation reversibel gestoppt und das in Abbildung 3.6. gezeigte Nickgel angefertigt. In diesem 1. Kontrollgel waren die DNA-Fragmente noch zu lang und es war fraglich, ob die DNA direkt aus den Taschen „schmiert“. Nach weiteren 30 min Verdau und Zugabe von 1,5 µl DNase war im 2. Gel nach 90 min keine DNA zu erkennen. Daher wurde die Nicktranslation gestoppt und die Probe ohne Sicherheit über die Fragmentlänge in die CGH eingesetzt. Die *Plazenta-Referenz-DNA* wurde analog zur Ziel-DNA mit *DOP-PCR* amplifiziert (eingesetzte Menge in die PCR 1 ng). Diese PCR lieferte amplifizierte Plazenta-DNA im Bereich von etwa 2200 bis 300 bp. Die DNA-Konzentration nach Aufreinigung betrug 168 ng/µl (Ratio 2,1). Es wurde ein 700 µl Nickansatz gemacht mit entsprechend 14 µg aufgereinigter Plazenta-DNA (= 83 µl). Es wurden 7 µl DNase (1:18000 Verdünnung) eingesetzt (= 0,5 µl DNase pro 1 µg DNA). Die *Nicktranslation* (siehe Abb. 3.9) dauerte 45 min. Im Nickgel war die Plazenta-DNA extrem schwach zu sehen, daher diente in diesem Fall der parallel laufende Nickansatz für MCF-7 DNA mit entsprechender DNase Verdünnung als Referenz. Nach 45 min Nickverdau begann der „Schmier“ der MCF-7 DNA bei ca. 1000 bp, die Nicktranslation wurde gestoppt.

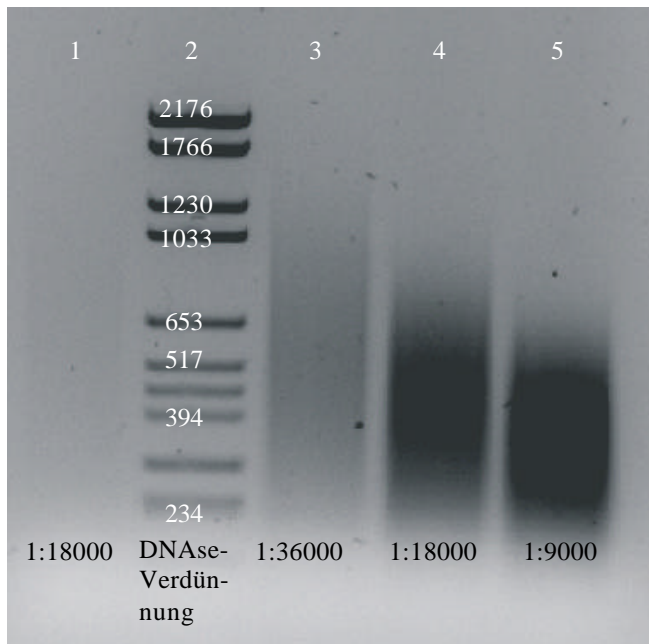


Abb. 3.9 zeigt das Nickgel der Digoxigenin markierten Plazenta-DNA, die im nachfolgenden CGH-Experiment des Tumors # TÜ 70 als Referenz-DNA diente. **1** Plazenta-Referenz-DNA extrem schwach, **2** Längenstandard, **3-5** MCF-7 (in unterschiedlicher DNase Konzentration), die als Referenz zur Abschätzung der Verdauzeit diente.

In die *CGH* wurde jeweils 1 µg Biotin markierte Tumor- bzw. Digoxigenin markierte Plazenta-DNA eingesetzt. Obwohl sowohl Tumor-DNA als auch Plazenta-DNA im Nickgel kaum zu sehen waren, erbrachte das Experiment die folgenden Ergebnisse in der CGH: Zu sehen sind in Abbildung 3.10 zunächst die mit der SmartCapture Software aufgenommenen Einzelbilder einer ausgewählten Metaphase: rot die Plazenta-DNA (Rhodamin), grün die Tumor-DNA (FITC) und blau die DAPI-Kernfärbung der Metaphasenchromosomen. Darunter das Überlagerungsbild der drei Einzelbilder, das vom Computer erstellt wurde.

Nach manueller Karyotypisierung mit der CGH-Karyotyper Software (Vysis) ergab sich für die ausgewählte Metaphase das in Abbildung 3.11 gezeigte Karyogramm. Stark gekrümmte oder überkreuzt liegende Chromosomen wurden nicht karyotypisiert. In dieser Metaphase konnten alle Chromosomen karyotypisiert werden, so dass alle Chromosomen in die Profilauswertung einfließen (Abb. 3.12).

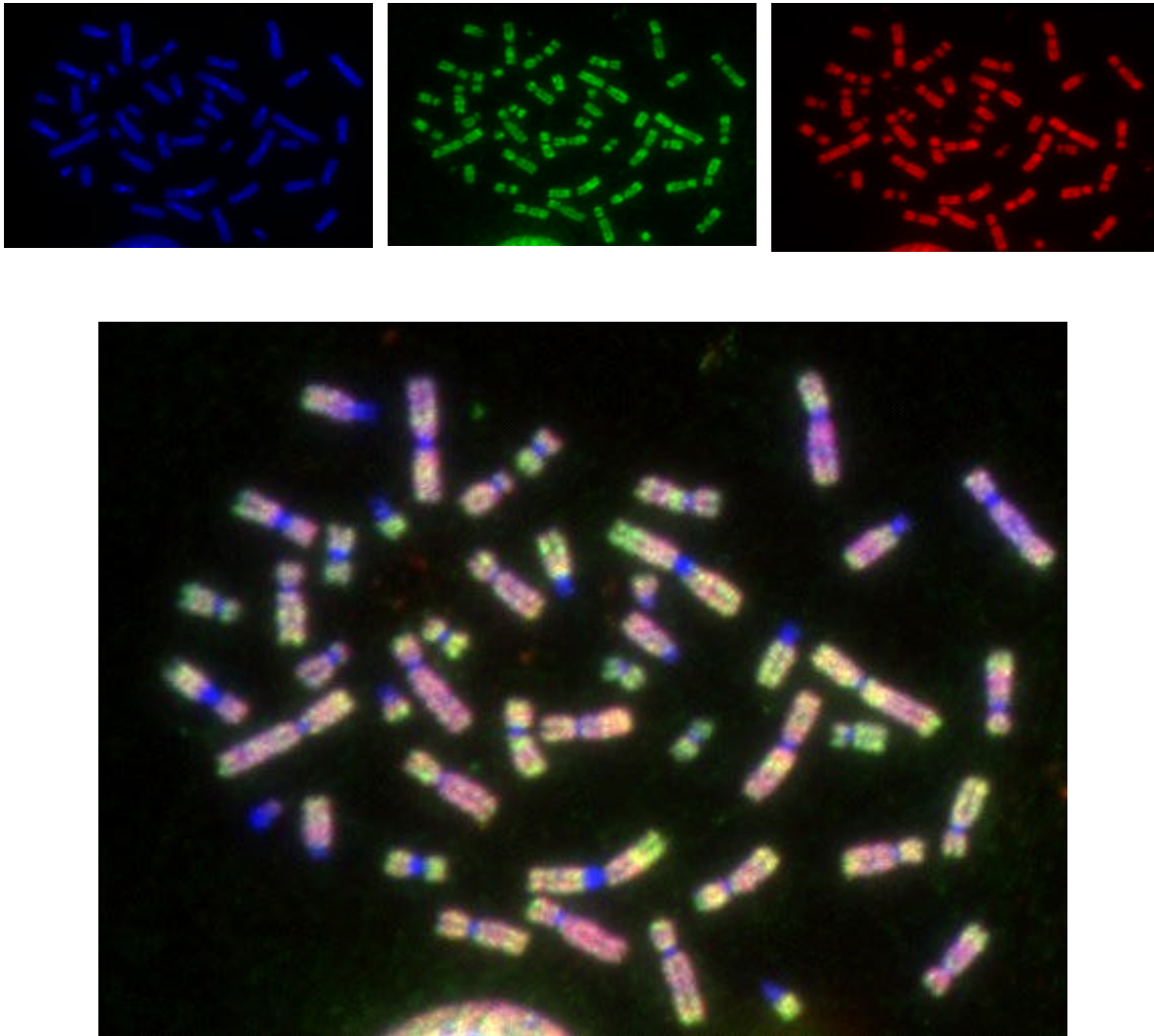


Abb. 3.10 zeigt eine Metaphase des CGH-Experiments von Tumor # TÛ 70. Einzelbilder obere Reihe: links Dapi-Kernfärbung, Mitte FITC-gefärbte Tumor-DNA, rechts rhodamin-gefärbte Plazenta-DNA. Darunter das vom Computer generierte Überlagerungsbild der Einzelbilder.

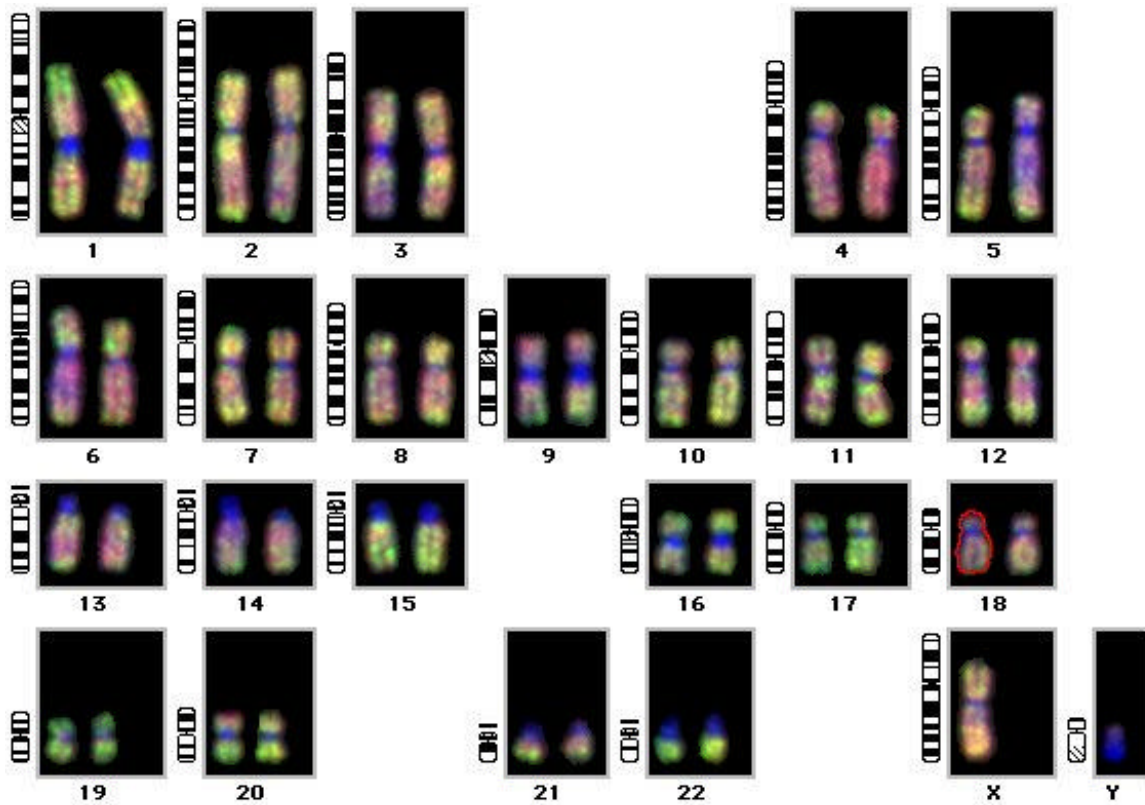


Abb. 3.11: Karyogramm der in Abb. 3.10 gezeigten Metaphase nach Sortieren der Chromosomen. Chromosom 18 ist als letztes bewegt worden und daher noch rot markiert.

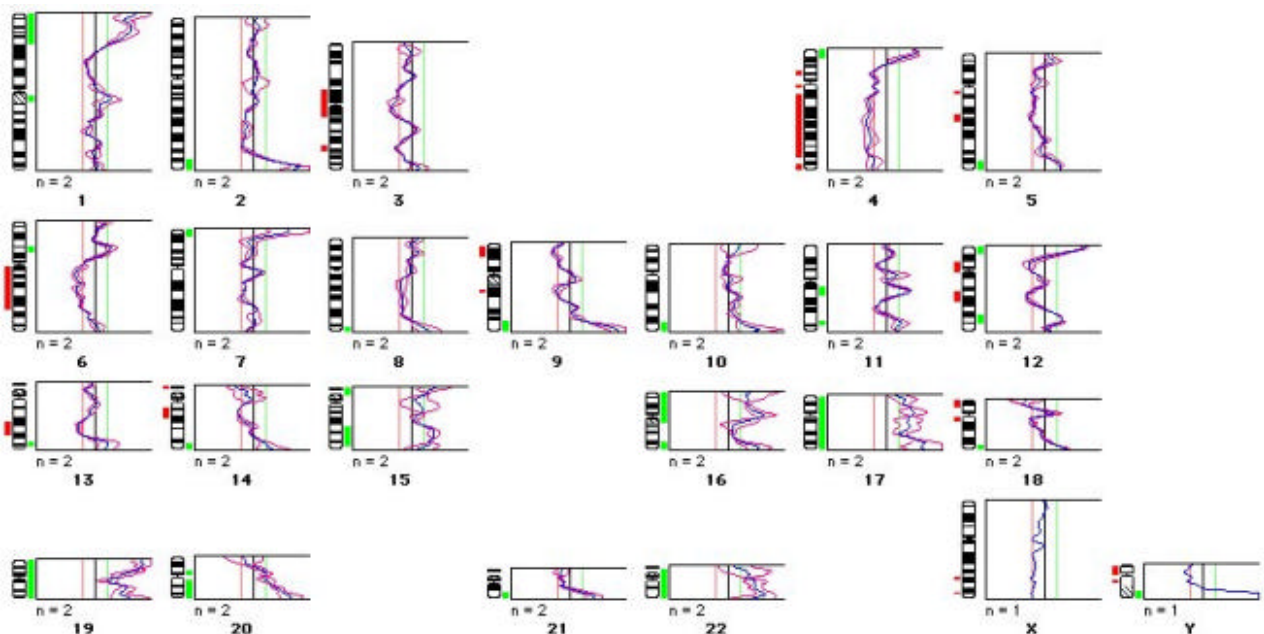


Abb. 3.12: Profil der in Abb. 3.10 und 3.11 gezeigten Metaphase

Es wurde kein Chromosom aussortiert, für alle 46 Chromosomen konnte ein Profil erstellt werden (n = Zahl der am Profil beteiligten Chromosomen = zwei). Abweichungen der Profillinie nach rechts, die über die grüne senkrechte Linie (Treshold 1,20) hinausreichen zeigen Amplifikationen (grüner Balken rechts der skizzierten Chromosomenskizze), Abweichungen nach links, die über die rote senkrechte Linie hinausreichen (Treshold 0,80) stellen entsprechend Deletionen dar (roter Balken). Die blaue Profillinie stellt den Mittelwert der beiden rosa Einzelprofile der einzelnen Chromosomen dar.

Abweichung von der vertikalen Mittellinie nach rechts wiedergegeben und steht für eine Amplifikation (Zugewinn an DNA) auf dem entsprechenden Chromosomenabschnitt, entsprechend entsteht eine Abweichung nach links aus dem Überwiegen der roten Fluoreszenz und entspricht einer Deletionen (Verlust an DNA). Der Grenzwert (Cut-off Linie), der aus dem Verhältnis grüne Fluoreszenzintensität:rote Fluoreszenzintensität gebildet wird, wurde für eine Amplifikation auf $> 1,2$ für eine Deletion auf $< 0,8$ festgelegt.

Amplifikationen fanden sich in dieser Metaphase auf Chromosom 1p, 15q, 16, 17, 19, 20q und 22, Deletionen auf Chromosom 4q, 5q, 6q, 12q, 13q und 14q. Schwache Aberrationen in Zentromernähe und an den distalen Chromosomenabschnitten wurden aufgrund der repetitiven Sequenzen an diesen Stellen vernachlässigt. Für korrekt karyotypisierte Chromosomen sollten die Profillinien der homologen Chromosomen möglichst parallel verlaufen, wie das im Beispiel bei den meisten Chromosomen mit Ausnahme von Chromosom 15, 16, 17 und 22 der Fall war.

Durch Überlagerung von 9 Einzelprofilen (9 Metaphasen von einem Metaphasenobjektträger) aus dem beschriebenen CGH- Experiment wurde das vorliegende Summenprofil (Abb. 3.13) der Aberrationen des Tumors # TÛ 70 erstellt (CGH-Karyotyper-Interpretation Software, Vysis).

Das X-Chromosom wurde nicht ausgewertet, da Ziel- und Referenz-DNA einen weiblichen Chromosomensatz vorwies (46, XX), im Gegensatz zu den männlichen Metaphasen (46, XY), auf die hybridisiert wurde. n steht für die Zahl der im Summenprofil übereinander gelegten Chromosomen. $n = 18$ (z.B. für Chromosom 2) bedeutet, dass alle 18 Chromosomen der 9 übereinander gelagerten Metaphasen in das Summenprofil eingingen, $n = 15$ (z.B. für Chromosom 1), dass drei Chromosomen aus der Auswertung herausfielen, z.B. wegen zu starker Krümmung oder Überlagerung durch ein anderes Chromosom.

Obwohl die Nicktranslation sowohl für die Tumor-DNA als auch für die Plazenta-Referenz-DNA nicht eindeutig zu interpretieren waren, konnte das CGH-Experiment mit diesen Proben ausgewertet werden.

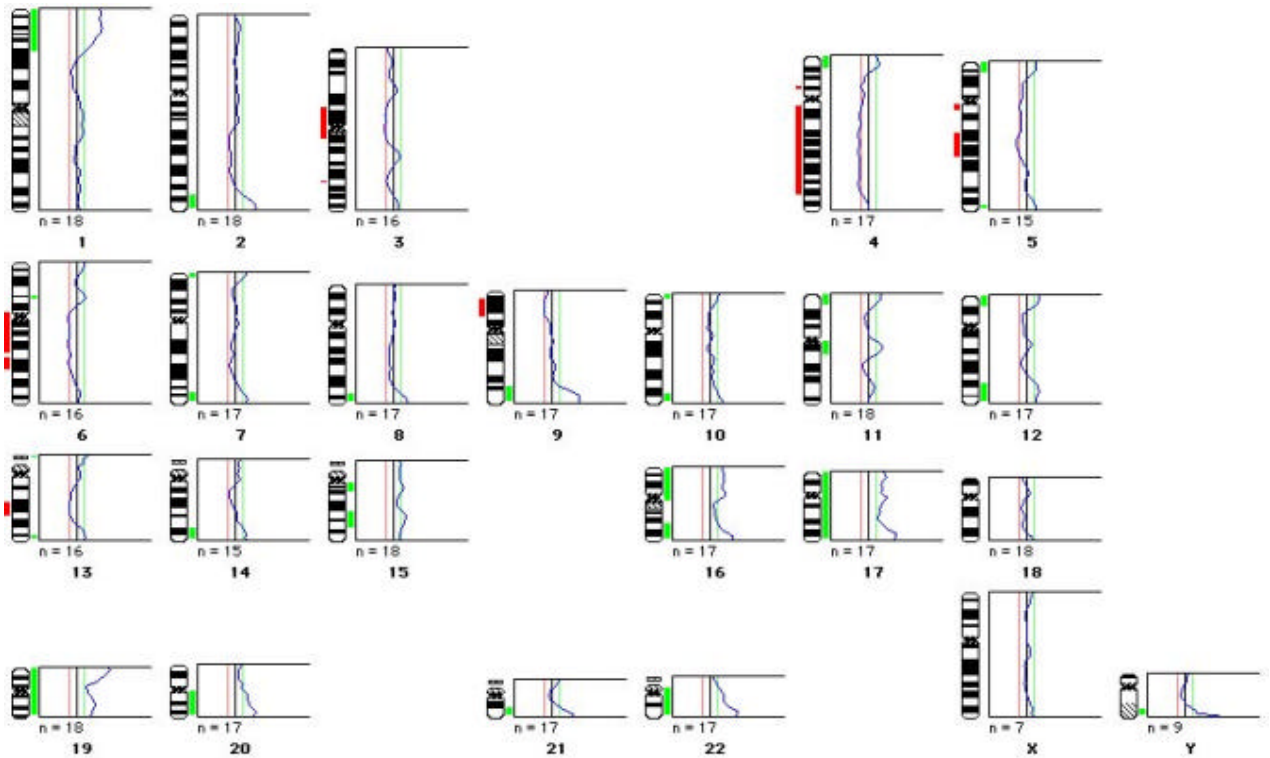


Abb. 3.13: Summenprofil für Tumor # TÛ 70. Im Fall dieses Experiments wurden 9 Metaphasen ausgewertet und überlagert. Abweichungen der Profillinie nach rechts zeigen Amplifikationen (grüner Balken rechts der skizzierten Chromosomenskizze), Abweichungen nach links stellen entsprechend Deletionen dar (roter Balken). (n = Zahl der am Summenprofil beteiligten Chromosomen, bei 9 Metaphasen maximal 18). Gefundene Aberrationen: siehe **Tab. 3.2**.

Aus diesem Summenprofil ergaben sich folgende *Aberrationen des Tumors # TÛ 70*:

Tab. 3.2: Ergebnis des CGH-Experiments für Tumor # TÛ 70

DNA-Zugewinne # TÛ 70	DNA-Verluste # TÛ 70
1p, 2q, 9q, 11q, 16p, 16q, 17p, 17q, 19p, 19q, 20q, 21q, 22p, 22q.	4q, 5q, 6q, 9p, 13q

3.5.2. CGH von Plazenta-DNA (Negativkontrolle)

Als Negativkontrolle wurde Biotin markierte Plazenta-DNA gegen Digoxigenin markierte Plazenta-DNA derselben Gewebeprobe hybridisiert. Eingesetzt wurde Ziel-DNA, die direkt nach der Isolation mit dem Wizard Kit (Promega) in die *Nicktranslation* eingesetzt wurde (keine DOP-PCR Amplifikation). Die Konzentration der DNA (ermittelt durch photometrisches Vermessen) betrug 415 ng/ μ l. In die Nicktranslation wurden 4 μ g (= 9,7 μ l) eingesetzt. Nach Zugabe von 2 μ l DNase (1:9000 Verdünnung) wurde 60 min verdaut. Im Nickgel war die DNA nur schwach zu erkennen.

In die *CGH* wurde jeweils 1 μ g Biotin markierte und Digoxigenin markierte Plazenta-DNA (Ergebnisse der DOP-PCR und Nicktranslation für die Referenz-DNA siehe 3.5.1.) eingesetzt. In Abbildung 3.14 sind die Einzelbilder, sowie das übereinander gelagerte Bild exemplarisch für eine Metaphase dargestellt. Bereits mit bloßen Auge lässt sich erkennen, dass sich die Fluoreszenzen von Ziel-DNA (Biotin Plazenta; grün) und Referenz-DNA (Digoxigenin-Plazenta; rot) in ihren Intensitäten etwa entsprechen, was auch an der Blaufärbung im Überlagerungsbild zu sehen ist.

Das Summenprofil in Abbildung 3.15 setzt sich aus den Einzelprofilen von 10 Metaphasen eines Objektträgers zusammen. Die Profillinien weichen kaum von der senkrechten Achse ab. Dies bedeutet, dass keine Amplifikationen bzw. Deletionen vorliegen und entspricht dem erwarteten Ergebnis der Negativkontrolle von gesundem Gewebe.

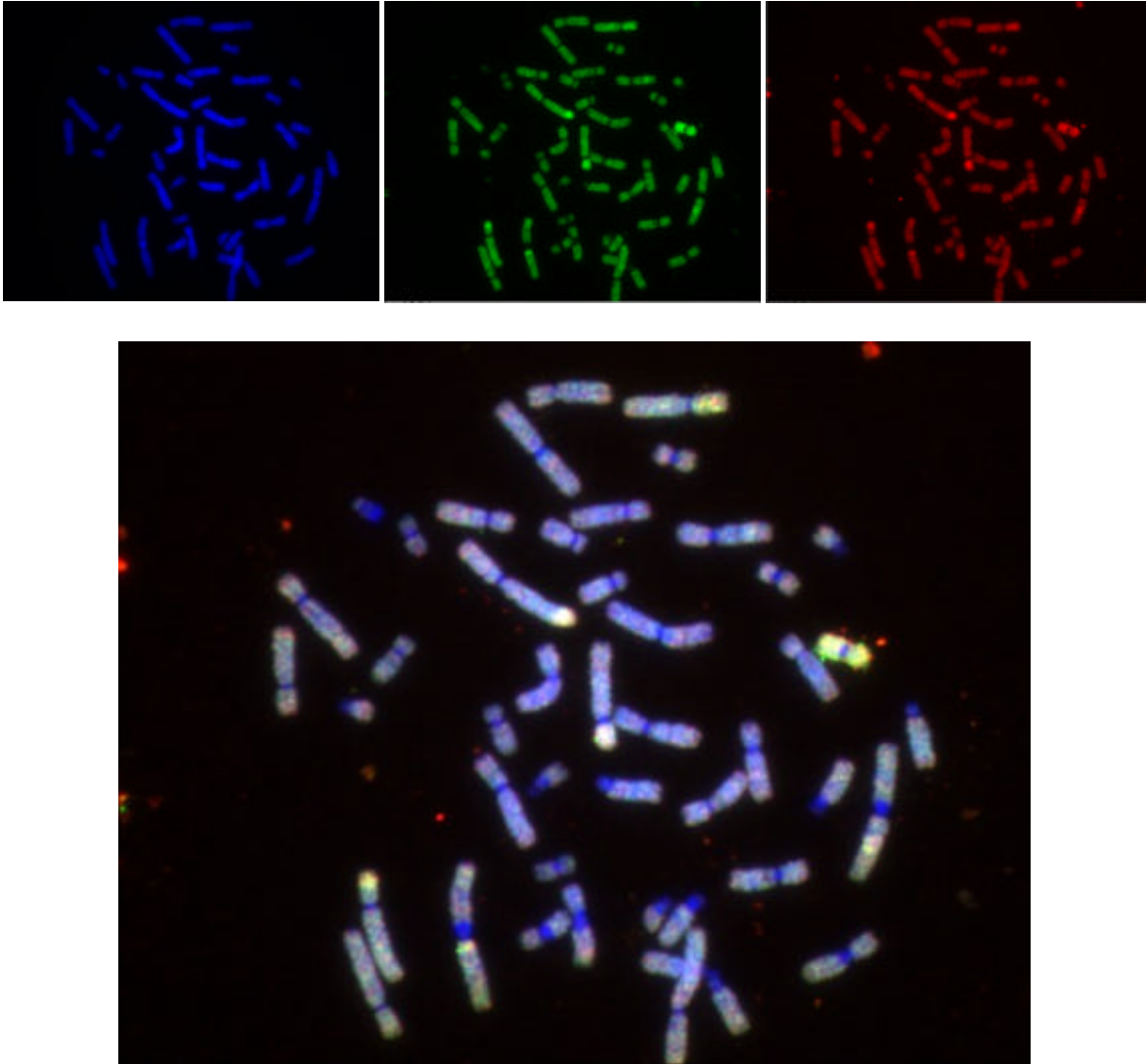


Abb. 3.14: Einzelbilder (oben links Dapi-Kernfärbung, Mitte FITC- Färbung der Proben-Plazenta-DNA, rechts Rhodamin-Färbung der Referenz-Plazenta-DNA) und Überlagerungsbild einer Metaphase der Negativkontrolle, bei der Plazenta-Proben-DNA (Biotin markiert) mit Plazenta-Referenz-DNA (Digoxigenin markiert) hybridisiert wurde. Es sind keine Aberrationen zu erkennen.

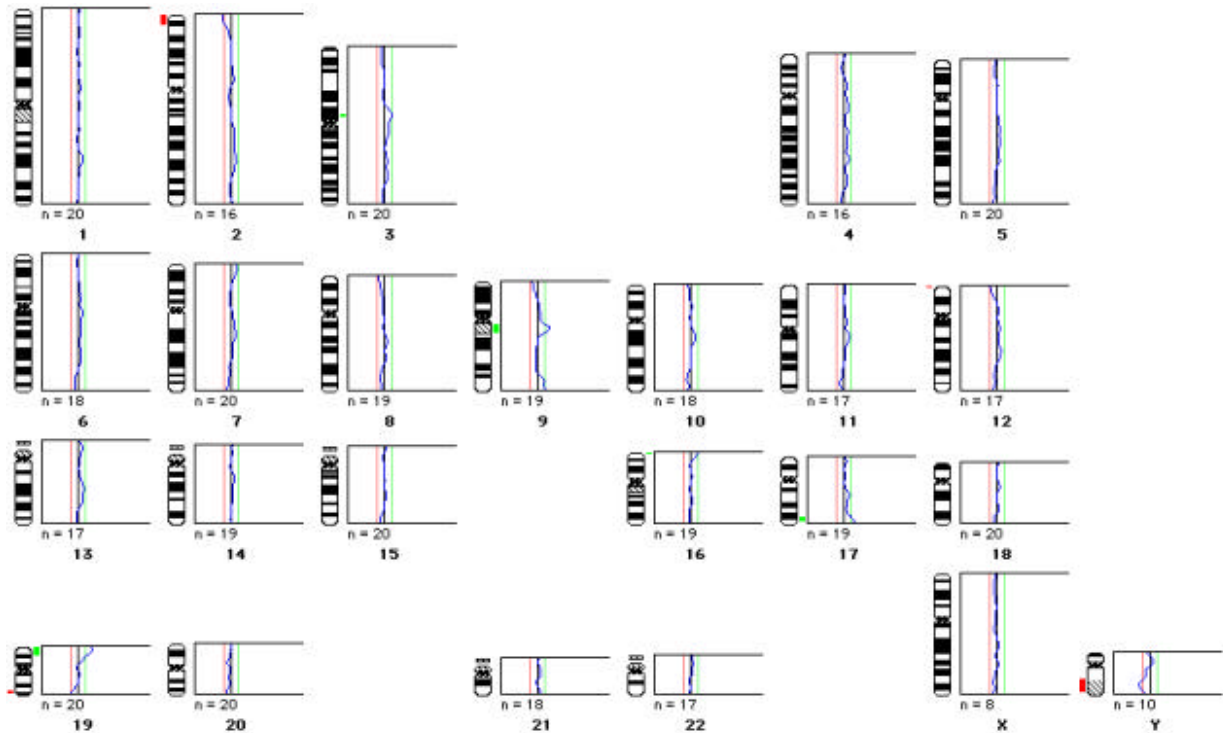


Abb. 3.15: Summenprofil Negativkontrolle Plazenta

Die Einzelprofile von 10 Metaphasen wurden überlagert. Es zeigen sich wie erwartet keine Aberrationen.

3.5.3. CGH von MCF-7 (Positivkontrolle)

Als Positivkontrolle der CGH-Experimente, die nach Ulmer Protokoll durchgeführt wurden, diente DNA von MCF-7 Zellen, die nach Amplifikation in der DOP-PCR in der Nicktranslation mit biotinylierten dUTPs markiert wurde. Das DOP-PCR Gel entsprach den Positivkontrollen in vorausgegangenen Gelen. In die Nicktranslation wurden 2,4 µg bzw. 1,9 µg DNA eingesetzt. Nach 60 min Verdau mit einer 1:9000 verdünnten DNase lag die markierte DNA im Bereich von ungefähr 1200 bis 200 bp (Daten nicht gezeigt). Als Referenz-DNA wurde mittels DOP-PCR amplifizierte Plazenta-DNA eingesetzt.

Durch Überlagerung von 14 auswertbaren Metaphasen ergab sich das in Abbildung 3.16 dargestellte Summenprofil.

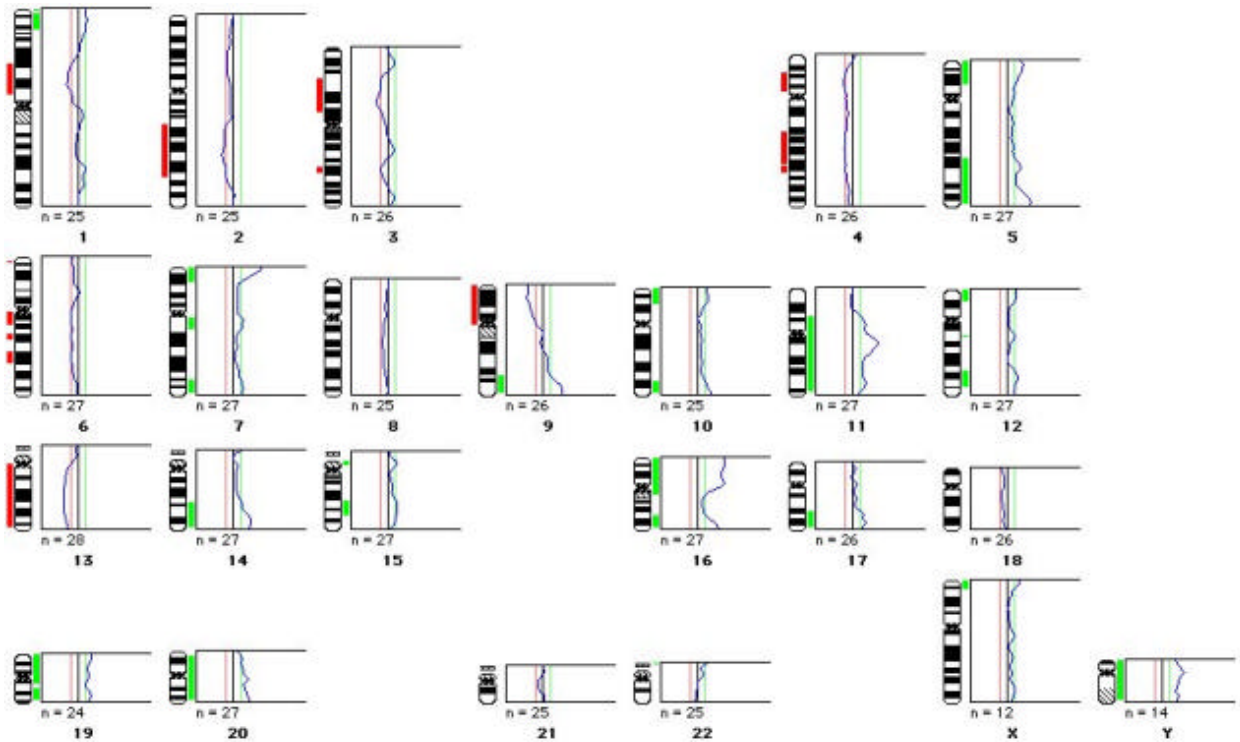


Abb. 3.16 zeigt das Summenprofil der Positivkontrolle mit DNA von MCF-7-Zellen nach Überlagerung von 14 Metaphasen. Es zeigen sich deutliche Aberrationen (siehe **Tab. 3.3**).

Es ergaben sich folgende Aberrationen:

Tab. 3.3: Ergebnis des CGH-Experiments der Positivkontrolle MCF-7

DNA-Zugewinne MCF-7	DNA-Verluste MCF-7
1p, 5p, 5q, 7p, 7q, 9q, 10p, 10q, 11q, 12p, 12q, 14q, 15q, 16p, 16q, 17q, 19p, 19q, 20p, 20q	1p, 2q, 3p, 3q, 4p, 4q, 6q, 9p, 13q

3.5.4. Weitere CGH-Ergebnisse

Die folgenden CGH-Untersuchungen wurden mit dem Vysis-Protokoll durchgeführt (siehe 2.5.2. und 2.6.2.). Dargestellt werden die Ergebnisse für die Tumoren # TÛ 71 (Primärtumor) und # TÛ 73 (Lymphknoten), für eine Negativkontrolle (Plazenta) und eine Positivkontrolle (MPE 600 Mammakarzinom-Zelllinie).

CGH mit Tumor-DNA nach LCM

Die *DOP-PCR* nach Mikrodissektion ergab DNA-Fragmente der Länge 3500 bis 500 bp. Nach Aufreinigung erhielt man DNA der Konzentration 85 ng/ μ l für # TÛ 71 und 68,5 ng/ μ l für # TÛ 73.

In die *Nicktranslation*, während der nach Vysis Protokoll die Proben direkt fluoreszenzmarkiert werden, wurde jeweils 1 μ g DNA eingesetzt, für # TÛ 71 entsprach dies 11,8 μ l, für # TÛ 73 14,6 μ l der aufgereinigten rehydrierten DNA. Pro 50 μ l Nickansatz wurden 10 μ l Nickenzyme zugegeben. Von direkt isolierter Plazenta (keine *DOP-PCR*, Konz. 600 ng/ μ l) als Referenz-DNA wurden jeweils 1,7 μ l (= 1 μ g) auf 50 μ l Nickansatz eingesetzt. Die *Nicktranslation* für den Tumor TÛ #71 und Lymphknoten TÛ # 73 wurde nach 45 min gestoppt, da die DNA bereits im Bereich von 1500 bis 500 bp lag. Die Plazenta-Referenz-DNA wurde 30 min weiter verdaut nach nochmaliger Zugabe von 10 μ l Enzymmix bis sich die meisten DNA-Fragmente zwischen 2000 und 500 bp zeigten. (Daten von *DOP-PCR* und *Nicktranslation* nicht gezeigt).

Für die *CGH* wurden 45 μ l des Nickansatzes (etwa 1 μ g DNA) der Tumor-DNA und etwas weniger als 45 μ l (aufgrund des 2. Nickgels stand weniger Volumen zur Verfügung) Referenz-Plazenta DNA (< 1 μ g) mit je 45 μ l Cot1-DNA (1 μ g/ μ l) kombiniert. Von # TÛ 71 wurden 12 Metaphasen, von # TÛ 73 9 Metaphasen ausgewertet (Tab. 3.4 und Abb. 3.17).

Tab. 3.4: Ergebnis des *CGH*-Experiments für Tumor # TÛ 71 und Lymphknoten # TÛ 73. Schwache Veränderungen sind in Klammern angegeben. Geringe Veränderungen in den Telomer- und Zentromerregionen wurden nicht berücksichtigt.

Tumor	DNA-Zugewinne	DNA-Verluste
Primärtumor # TÛ 71	1p, 2q, 8q, 9q, 10q, 11p, 12q, 16p, 16q, 17p, 17q, 19q, 20q, 21q, 22q.	(2q, 4q, 5q, 6q, 9p, 12q), 13q
Lymphknoten # TÛ 73	1p, 2p, 2q, 4p, (8q), 9q, 10q, 11q, 12q, (14q), 16p, 16q, 17p, 17q, 19q, 20q, 22q	(4q, 5q, 6q, 12q), 13q



Abb. 3.17: Oben im Bild das Summenprofil von Primärtumor # TÜ 71 (Überlagerung von 12 Metaphasen), unten das Summenprofil des dazugehörigen Lymphknotens # TÜ 73 (Überlagerung von 9 Metaphasen).

CGH mit Plazenta-DNA (Negativkontrolle Vysis)

Hierfür wurde grün markierte Proben-Plazenta-DNA mit rot markierter Referenz-Plazenta-DNA auf Metaphasenchromosomen hybridisiert. Die DNA wurde in derselben *Nicktranslation* wie die Tumoren # TÛ 71 und 73 fluoreszenzmarkiert. Die Proben-Plazenta-DNA wurde nach 45 min Verdau unter Zugabe von 5 µl Enzymmix weiterverdaut. Die Referenz-Plazenta-DNA entsprach der aus dem Experiment für die Tumoren # TÛ 71 und 73, wurde also nicht mittels DOP-PCR amplifiziert. Das in Abbildung 3.18 dargestellte Summenprofil zeigt die Auswertung von 12 überlagerten Metaphasen.

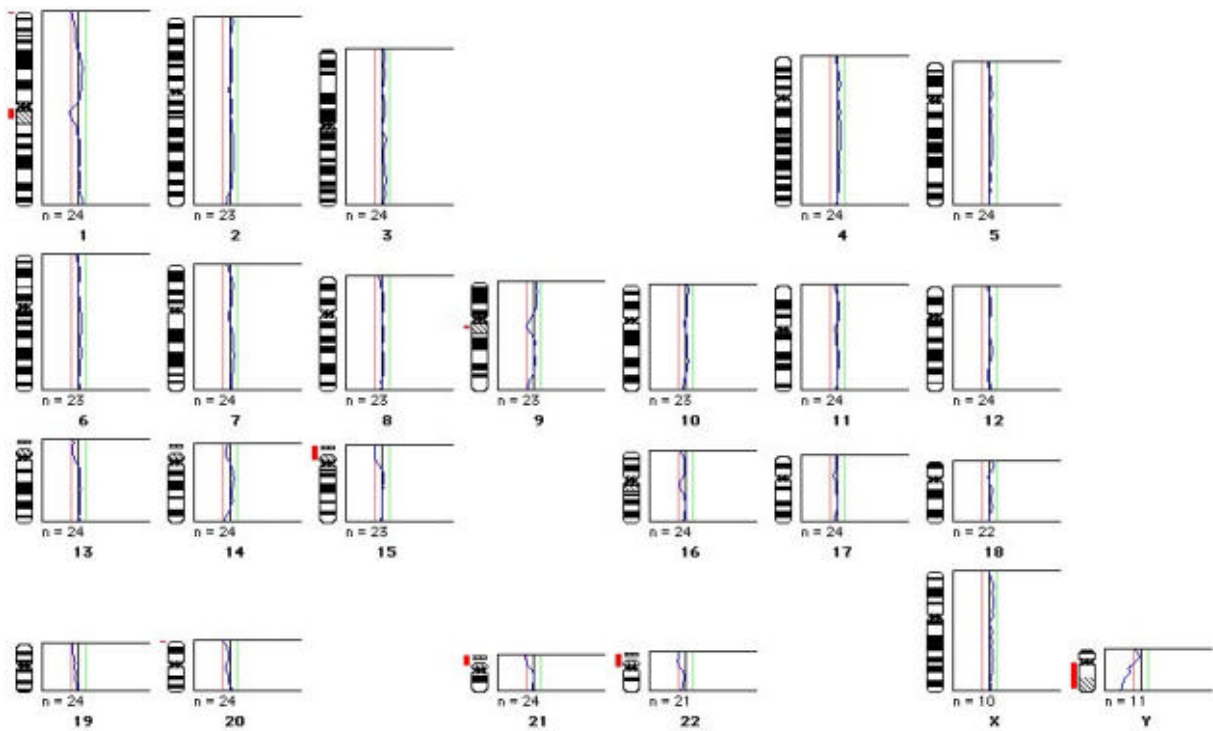


Abb. 3.18 zeigt das Ergebnis der Negativkontrolle (Hybridisierung von Plazenta-Proben- mit Plazenta-Referenz-DNA). Aberrationen sind nicht zu erkennen, wie für gesunde Plazenta-DNA zu erwarten. (Geringe Veränderungen in Telomerregionen wurden nicht berücksichtigt.)

Positivkontrolle mit MPE 600 DNA

In die *Nicktranslation* wurden ebenfalls je 1 µg MPE 600-DNA und Referenz-Plazenta-DNA (jeweils ohne DOP-PCR) pro 50 µl Nickansatz eingesetzt. Es wurden jeweils 10 µl Nickenzyme zugegeben und 45 min verdaut. Sowohl die MPE 600-DNA als auch die Plazenta-Referenz-DNA wurden nach dem 1. Nickgel unter Zusatz von 5 µl bzw. 10 µl Enzymmix jeweils 30 min weiterverdaut bis der „DNA-Schmier“ zwischen 2000 und 500 bp lag (siehe Abb. 3.19).

Für die *CGH* wurden 400 ng MPE 600 mit entsprechend 400 ng Plazenta DNA im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Cot1-DNA Menge betrug 20 µg. Für die Positivkontrolle ergab sich aus 10 ausgewerteten Metaphasen das in Abbildung 3.20 dargestellte Profil.

Es zeigten sich folgende Aberrationen:

Tab. 3.5: Ergebnis des CGH-Experiments für die Positivkontrolle MPE 600 nach Vysis-Protokoll und Angaben der Firma Vysis. Schwache Veränderungen sind in Klammern angegeben. Geringe Veränderungen in den Telomer- und Zentromerregionen wurden nicht berücksichtigt.

	DNA-Zugewinne	DNA-Verluste
Experiment	1q, 8q, 11q, 13q	1p, 9p, 11q, (14p, 15p), 16q, 17p
Angaben der Firma Vysis	1q	1pter, 9p, 11q (distal), 16q

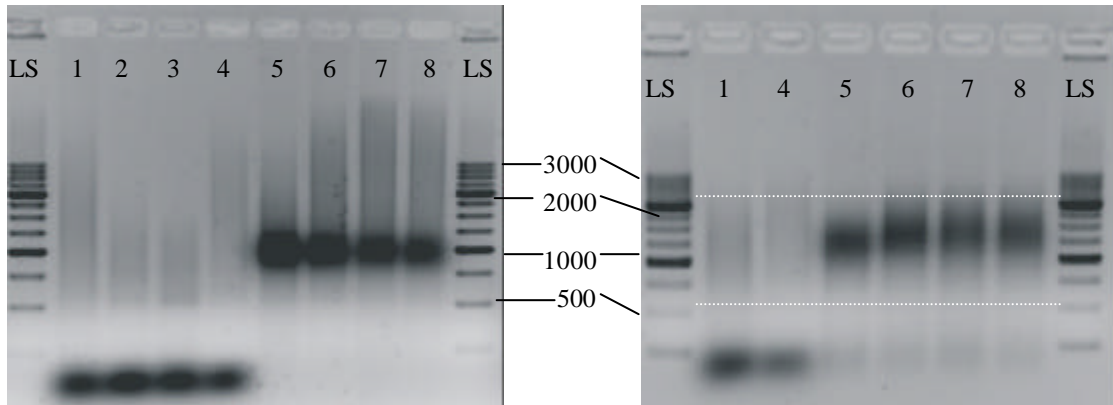


Abb. 3.19: Nicktranslation für MPE 600-DNA (Positivkontrolle) (4) und Plazenta-Referenz-DNA (8) nach Vysis-Protokoll.

Links: 1. Gel nach 45 min Verdau. Rechts: 2. Gel nach weiteren 30 min. Die DNA-Fragmente sind im 2. Gel deutlich kürzer als im 1. und liegen im Zielbereich zwischen 2000 und 500 bp (gestrichelte Linie). LS Längenstandard; 1-4 Proben-DNA (grüne Fluoreszenz): 1 Plazenta, 2 MCF-7, 3 # TÜ 53, 4 MPE 600; 5-8 Plazenta-Referenz-DNA (rote Fluoreszenz).

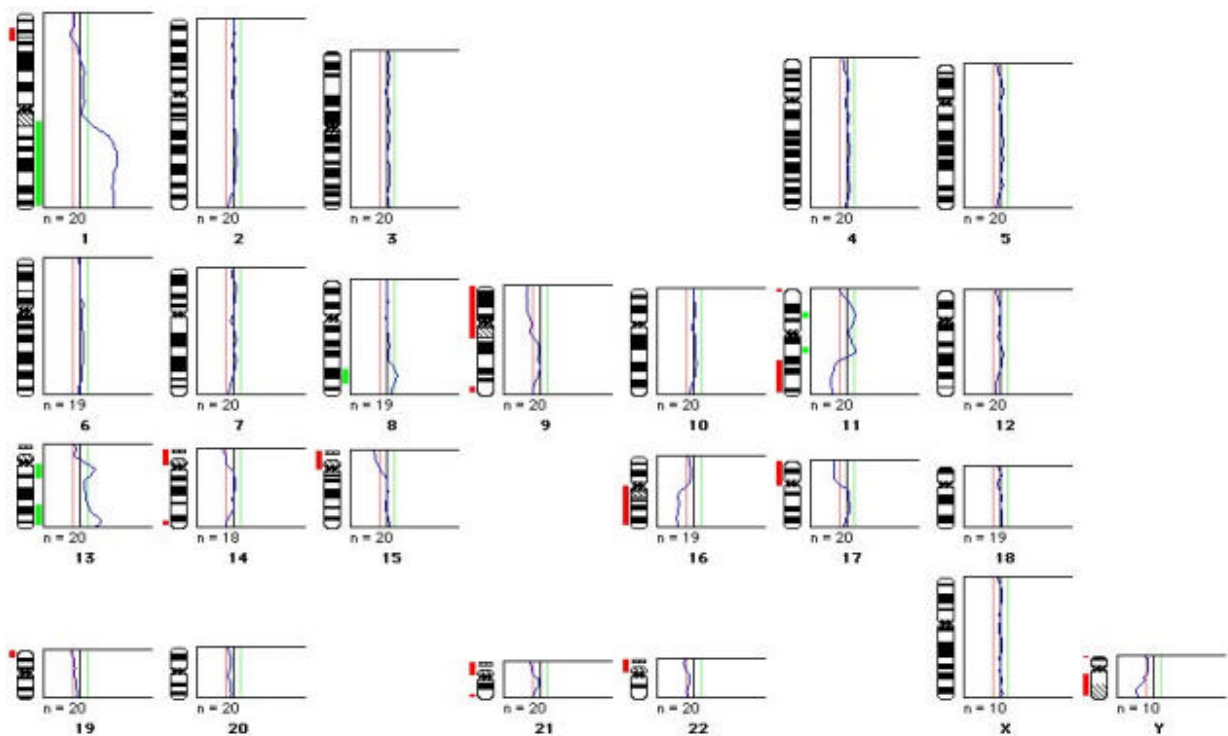


Abb. 3.20 zeigt das Summenprofil für die Positivkontrolle MPE 600. Dargestellt ist der Mittelwert der Aberrationen durch Überlagerung von 10 Metaphasen.

3.5.5. Qualitätsunterschiede der CGH-Ergebnisse

Deutliche Qualitätsunterschiede ergaben sich für die Auswertbarkeit der CGH-Ergebnisse, die unter folgenden Gesichtspunkten zusammengefasst werden können:

1. Entstehung körniger Bilder: In diesem Fall stellten sich die Chromosomen und der Hintergrund als fluoreszierende Pünktchen dar.
2. Die Intensität der fluoreszengefärbten Chromosomen war in solchen Fällen im Vergleich zum Hintergrund zu schwach.
3. Überstrahlung durch eine Farbe: Durch das Überwiegen einer Fluoreszenz (meist rot) entstand in solchen Fällen ein rot- bzw. grünstichiges Überlagerungsbild.
4. Die Metaphasen lagen auf einem milchigen Proteinfilm (Bovines Serumalbumin), der zum Teil rissig und löchrig war. Dadurch wurden einzelne Metaphasen zertrennt.

Solche CGH-Experimente wurden nicht ausgewertet.

4. DISKUSSION

Brustkrebs entsteht durch einen aus vielen Schritten bestehenden Prozess aus komplexen DNA-Veränderungen ausgehend von normalen Zellen über hyperplastische, prämaligne Veränderungen, das Carcinoma in situ bis hin zum invasiven Karzinom und dessen Metastasierung. Die Kenntnis molekularer zytogentischer Zusammenhänge bei der Entstehung, Progression und Metastasierung des Mammakarzinoms ist Voraussetzung für neue Präventions- und Therapiestrategien (Beckmann et al., 1997). Neue Marker könnten als Prädiktionsmarker Aussagen über das Ansprechen der Therapie und als Prognosemarker Aussagen über die Überlebenswahrscheinlichkeit einer Patientin ermöglichen.

Zusätzlich zu klinischen Kriterien wie Tumorgröße und Lymphknotenstatus wurden in den letzten Jahren Parameter wie der Hormonrezeptor-Status für Östrogen/Progesteron, die Amplifikation des Protoonkogens c-erbB-2 (HER/2neu) und definierte Mutationen auf Tumorsuppressorgenen wie z.B. p53 festgelegt, die mit dem klinischen Verlauf korrelieren (Ried et al., 1995). Im Vergleich zum kolorektalen Karzinom (Vogelstein et al., 1988) ist der genetische Progressionsprozess beim Mammakarzinom aber noch immer wesentlich schlechter verstanden (Gray et al., 1994).

Von großem Interesse ist die Untersuchung der Korrelation von DNA-Veränderungen der Tumorzellen mit dem Tumorstadium. Diese Vergleiche von Genexpressionsmustern mehrerer Patienten bzw. eines Patienten in verschiedenen Krankheitsstadien können Hinweise auf die Tumorentstehung bzw. Progression geben und Diagnostik- und Therapieentscheidungen beeinflussen (Simone et al., 1998).

4.1. Mikrodissektion

Notwendigkeit der Mikrodissektion

Für Untersuchungen zu Entstehung und Progressionsverhalten von Tumoren ist ein hoher Reinheitsgrad der interessierenden Zellen erforderlich, da die Verunreinigung durch DNA von nicht neoplastischen Zellen die Genauigkeit molekulargenetischer Untersuchungen erheblich verschlechtert und teilweise sogar unmöglich macht. Einen

limitierenden Faktor hierfür stellt die Heterogenität des Gewebes dar, in dem Tumorzellen umgeben von Stroma- und Entzündungszellen vorliegen. Wie Kallioniemi et al. (1994) für die Methode der CGH zeigten, bewirkt eine Verdünnung der Tumor-DNA durch DNA von Normalzellen einen deutlichen Qualitätsverlust. Mit steigendem Anteil an kontaminierender Normal-DNA werden die Fluoreszenzintensitäten abgeschwächt, die Profillinien für Zugewinne und Verluste flacher und damit schwieriger zu interpretieren. Am Beispiel einer Verdünnungsreihe von MCF-7 Zellen konnten sie zeigen, dass Aberrationen bei einer Verdünnung der Tumor-DNA mit 60% Normal-DNA nicht mehr nachgewiesen werden konnten (Kallioniemi et al., 1994b). Dieser Zusammenhang zwischen Reinheit der Tumor-DNA und Qualität der CGH macht besonders genaue Methoden zur Aufreinigung der Tumorzellen erforderlich. Mögliche Verfahren hierbei sind FACS-Analyse (Durchflusszytometrie zur Isolierung von spezifischen Zellen mittels fluoreszenzmarkierten Antikörpern), Microbeam-Aufreinigung und Mikrodissektion, wobei ausschließlich die Mikrodissektion eine Beurteilung nach morphologischen Kriterien ermöglicht.

Die Mikrodissektion ist daher erforderlich, um unter Erhalt der Gewebemorphologie ausschließlich interessierende Zellen aus komplexen Geweben zu entnehmen und reines Ausgangsmaterial für weitere molekularbiologische Untersuchungen zu gewinnen.

Der Begriff *Mikrodissektion* ist in der Literatur nicht klar definiert. Es werden zahlreiche Mikrodissektionstechniken beschrieben, die sich sowohl im Bezug auf die Dissektionstechnik als auch bezüglich der dissezierten Zellzahl stark unterscheiden (Ansari-Lari et al., 1996; Baisse et al., 2000; Bonner et al., 1997; Conia et al., 1997; Emmert Buck et al., 1996; Going and Lamb, 1996; Gupta et al., 1997; Kuukasjarvi et al., 1997b; Kuukasjarvi et al., 1997c; Moskaluk and Kern, 1997; Shibata, 1994; Shibata, 1993; Shibata, 1998; Simone et al., 1998; Turbett et al., 1996; Zhuang et al., 1995).

4.1.1. Verschiedene Mikrodissektionstechniken

Eine Einteilung der bislang zur Mikrodissektion publizierten Arbeiten kann wie folgt vorgenommen werden:

Manuelle mechanische Mikrodissektion: Gewebeareale können von Hand beispielsweise mit einer Pasteurpipette mit extrem feiner Spitze unter lichtmikroskopischer Sicht vom Schnitt abgekratzt werden (Zhuang et al., 1995). Dabei werden Zellen in einem Areal $< 1\text{mm}^2$ (entspricht < 100 Zellen) entnommen. Going et al. (1996) beschreiben die Verwendung einer Nadel aus Wolframdraht, die über einen mechanischen Mikromanipulator geführt wird. Mit dieser Technik wurden Gewebesausschnitte von 2-3 mm^2 Durchmesser bis zu einzelnen Drüsenacini der Brust entnommen (Going and Lamb, 1996). Kuukasjärvi et al. verwendeten sterile Nadeln. Sie amplifizierten die DNA mittels DOP-PCR, um sie in eine CGH einzusetzen (Kuukasjarvi et al., 1997b; Kuukasjarvi et al., 1997c). Gupta et al. verwendeten eine Skalpellklinge. Über die entnommene Zellzahl wurde keine Aussage gemacht (Gupta et al., 1997). Ansari-Lari et al. isolierten RNA aus mittels Skalpellklinge und Nadel dissezierten Mammakarzinom-Zellen von einer Fläche von 1 bis 2 mm^2 (Ansari-Lari et al., 1996). Mit einer in einen Mikromanipulator eingespannten Nadel konnten Gewebeareale mit Durchmesser $< 0,1$ mm entnommen werden (Moskaluk and Kern, 1997). Auch das Abheben von 1 mm^2 Zellarealen durch Auftropfen eines Papierklebers (Bestandteile: v.a. Kornblumenstärke) wird beschrieben (Turbett et al., 1996). Oder es kann das nicht erwünschte Gewebe abgekratzt werden, so dass nur die Zielzellen auf dem Objektträger zurückbleiben. Die Zahl der dissezierten Zellen wurde nicht erwähnt (Baisse et al., 2000).

Selective Ultraviolet Radiation Fractionation (SURF): Diese Methode beruht auf der Zerstörung nicht erwünschter Zellen durch UV-Bestrahlung. Auf einem Gewebeschnitt werden die interessierenden Zellen durch das Auftragen eines Tintetropfens markiert. Die DNA aller nicht durch Tinte geschützten Zellen wird zerstört. Die Tropfen werden ausgeschnitten und aus diesen Zellen wird die DNA isoliert. Dabei bedeckt ein Tropfen 50 bis 300 Zellen (Shibata, 1994; Shibata, 1993; Shibata, 1998).

Von diesen Techniken sind die *Laserdissektionstechniken* abzugrenzen, die in zwei Arten unterschieden werden können:

Zum einen die *manuelle Laserdissektion*, bei der sog. „Laser-Pinzetten“ und „Laser-Scheren“, wie sie im OP bereits verwendet werden, auf ein Lichtmikroskop aufgesetzt

werden. Das Prinzip dieser selbstgebauten CO₂-Laser basiert auf der Ablation des umliegenden Gewebes. Die mittels Laser dissezierten Zellen werden dann mit einer Mikropipette aufgenommen (Conia et al., 1997).

Demgegenüber stehen Lasermikrodissektionstechniken, bei denen Lasermikrodissektions-Seriengeräte eingesetzt werden: Die Microbeam Microdissection (LMM) und Laser Pressure Catapultation (LPC) (P.A.L.M., Wolfratshausen) und die Laser Capture Microdissection (Arcturus, USA).

Microbeam Microdissection (LMM) und Laser Pressure Catapultation (LPC)(P.A.L.M., Wolfratshausen): Durch die hohe Photonendichte eines UV-Lasers (Wellenlänge 337 nm, Nitrogenlaser) wird das nicht erwünschte Gewebe photolysiert. Dabei trennt der Laserstrahl die erwünschten von den umliegenden Zellen. Anschließend wird das dissezierte Areal mit der LPC auf ein Cap katapultiert (Becker et al., 1996; Schutze et al., 1998).

4.1.2. Die Laser Capture Microdissection (LCM)

Charakteristika der LCM

Die LCM eignet sich insbesondere zur Mikrodissektion kleiner Läsionen (Banks et al., 1999; Bonner et al., 1997; Emmert Buck et al., 1996). Der Vorteil der LCM ist die schnelle Mikrodissektion von ausgewählten Zellen aus einem komplexen, heterogenen Gewebeschnitt in einem einzigen Schritt unter lichtmikroskopischer Sicht (Emmert Buck et al., 1996; Fend et al., 2000). Sie erfordert keine manuelle Mikrodissektion, was zur Minimierung der Kontaminationsgefahr beiträgt. Die Gewebemorphologie bleibt im Gegensatz zu manuellen Techniken oder der SURF-Technik erhalten. Unter dem Mikroskop kann die Spezifität des dissezierten Areals auf dem Cap überprüft werden, was z.B. bei Abkratzen des Gewebes nicht möglich ist. Die Benutzung steriler Caps ist wichtig für weiterreichende Analysen auf PCR-Basis. Bei der LCM fängt der stark absorbierende thermoplastische Transferfilm die Laserenergie ab, so dass das unter dem Film liegende Gewebe nur noch einem geringen Teil der Laserstrahlung und nur kurz am Schmelzpunkt des Filmes (60 °C) Temperaturspitzen ausgesetzt ist. Dabei kommt es

nicht zu chemischen Veränderungen an Gewebe, DNA und RNA. Proteine werden nicht zerstört (Banks et al., 1999; Bonner et al., 1997; Simone et al., 1998).

Die nachfolgenden molekularbiologischen Untersuchungen können direkt mit dem dissezierten Material auf dem Cap ausgeführt werden. Nach einer Dissektion bleibt das angrenzende Gewebe intakt und steht für weitere Experimente zur Verfügung (Bonner et al., 1997; Emmert Buck et al., 1996).

Die LCM im Vergleich zu anderen Mikrodissektionstechniken

In den genannten Punkten ist die LCM der SURF-Technik überlegen, da letztere durch das manuelle Auftragen des Tintetropfens wesentlich ungenauer ist und die Gefahr der Zerstörung der Ziel-DNA besteht, sobald die Markierung mit Tinte nicht komplett ist. Außerdem kann die Tinte nachfolgende Untersuchungen wie z.B. eine PCR behindern (Turbett et al., 1996). Ein weiterer Nachteil ist die relativ große Fläche des dissezierten Areals mit ungenauer Dissektionsgrenze. Oligo- oder Einzelzelldissektion ist im Gegensatz zur LCM nicht möglich.

Ebenfalls erreicht keine der oben genannten manuellen Techniken die Genauigkeit und Effektivität der LCM. Die Präzision kann zwar hoch sein, die verschiedenen Techniken sind aber wenig komfortabel, zeitaufwendiger, erfordern viel manuelles Geschick, sind damit stark von der dissezierenden Person abhängig und für die molekulare Routinediagnostik nicht geeignet (Emmert Buck et al., 1996; Simone et al., 1998).

Ähnlich einfach und komfortabel zu bedienen ist außer dem LCM-Gerät nur das P.A.L.M.-Gerät: Es wird ebenfalls unter mikroskopischer Sicht gearbeitet und die Kontaminationsgefahr ist gering, da keine manuelle Manipulation erforderlich ist. Wie mit der LCM können sowohl Paraffin- und Kryoschnitte als auch Zellausstriche (PAP) untersucht werden. Der Fokusbereich ist mit 1 bis 15 μm im Vergleich zu den Laserspotgrößen der LCM (7,5, 15 und 30 μm) etwas geringer. Areale von < 700 nm bis mehrere 100 μm Durchmesser können disseziert werden. Diese Zahl ist geringer als der Minimaldurchmesser bei der LCM (kleinster Laser < 7,5 μm), allerdings bedeutet dies für die Einzelzelldissektion keinen Unterschied, da Zellen in der Regel einen Durchmesser von 5-50 μm (z.B. Erythrozyten 7,5 μm) aufweisen, sich also mit beiden Methoden einzelne Zellen gewinnen lassen. RNA, DNA und Proteine werden ebensowenig wie bei der LCM zerstört (Schutze et al., 1998). Aussagen über thermische

Schädigungen im Randbereich des dissezierten Gewebes konnten in der Literatur nicht gefunden werden.

Anwendungen der LCM

Die LCM hat ein breites Anwendungsspektrum: Neben der DNA-Gewinnung für Genexpressionsanalysen wie die CGH, kann DNA aus mittels LCM gewonnenen Zellen auch kloniert und sequenziert werden. Außerdem wurde die LCM bereits für RNA-Analysen (Erstellen von cDNA-Bibliotheken (Peterson et al., 1998), Microchip Microarrays oder Differential Display PCR (Sgroi et al., 1999) und für Proteinanalysen mit zweidimensionaler Gelelektrophorese (1D/2D-PAGE) (Banks et al., 1999; Craven and Banks, 2001; Ornstein et al., 2000; Simone et al., 2000b; Wulfkuhle et al., 2001) eingesetzt.

4.2. Kritische Wertung der LCM

Die LCM ist eine komfortable schnelle Mikrodisektionsmethode (siehe 4.1.), die neue Möglichkeiten für molekularbiologische Untersuchungen bietet. Da es sich bei der LCM um eine neue Technologie handelt (Emmert Buck et al., 1996), liegen bislang nur wenige Erfahrungen vor. Als erste deutsche Institution schaffte die Universitätsfrauenklinik 1999 das LCM-Gerät Pix-Cell-II an. Aufgrund fehlender Vorerfahrungen liegt daher ein Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Darstellung der eigenen Erfahrungen mit der LCM und der kritischen Auseinandersetzung mit den Voraussetzungen für eine erfolgreiche Mikrodisektion. Es zeigte sich, dass insbesondere die Schnittpräparation einen wesentlichen Einfluss auf den Erfolg der LCM hat (siehe 4.2.2.). Aber auch bereits die Asservation des Gewebes im OP scheint eine wichtige Rolle zu spielen (siehe 4.2.1).

4.2.1. Tumorasservation - Einfluss der Asservationszeiten

Im Rahmen eines Vorversuchs wurde der Einfluss der Asservationszeiten auf die Ausbeute an genetischem Material am Beispiel des Nachweises von RNA aus

Rattenleber untersucht. Nach der RNA-Isolation wurde β -Actin, ein sog. Homing-Gen, das in jeder Zelle zu finden ist, mittels PCR nachgewiesen. Es zeigte sich, dass in Abhängigkeit von der Asservationszeit t , die zwischen Organentnahme und Schockfrierung in flüssigem Stickstoff verging, eine unterschiedliche Ausbeute an RNA zu verzeichnen war: Für $t = 0$ min, d.h. sofortiges Schockfrieren nach Organentnahme, ergab sich im PCR-Gel eine wesentlich deutlichere Bande als für $t = 45$ min (Daten nicht gezeigt). Die abnehmende Stärke der Bande kann als Maß für die zunehmende Degeneration der RNA betrachtet werden. Überträgt man dieses Ergebnis auf die Asservation von Mammakarzinomgewebe im OP, wird deutlich, wie wichtig eine standardisierte kurze Asservationszeit ist, da die Qualität der RNA ebenso wie die der stabileren DNA bereits in diesem ersten Arbeitsschritt vermindert werden kann und so die Ergebnisse der nachfolgenden Untersuchungen verändert.

4.2.2. Gewebeaufarbeitung für die LCM (Kryoschnitte und Färbung) – Optimierung der einzelnen Schritte

Im Laufe der Experimente für die Arbeit zeigte sich, dass der Erfolg der LCM stark von der Probenaufarbeitung, insbesondere von der Gefrierschnittpräparation, aber auch von der Färbung und vom Transfer zum LCM Gerät abhing. Ohne systematisches Einbetten der Schnitte in OCT (siehe 2. unter 2.3.4.) konnte das Gewebe in der Anfangsphase nicht zuverlässig bei jedem Experiment abgehoben werden, d.h. die Adhäsion des Schnittes an der Objektträgeroberfläche war stärker als die Adhäsion des Gewebes am Transferfilm. Als Ursachen hierfür wurden zunächst erwogen und untersucht:

Gewebeabhängige Adhärenz am Objektträger

Neben Mammakarzinom wurde auch Rattenleber und Rattenniere mit Hilfe der LCM disseziert. Sowohl Mammakarzinom-Schnitte als auch Rattenleber und Rattenniere ließen sich teilweise dissezieren, teilweise konnte das gelaserte Areal nicht abgehoben werden. Dieser Gewebevergleich deutete eher auf Unterschiede in der Schnittherstellung als auf eine generell LCM-geeignete bzw. -ungeeignete Gewebebeschaffenheit hin. Ebenso wenig konnten systematische Unterschiede zwischen der Eignung von Primärtumor und Lymphknoten von Mammakarzinom beobachtet werden. Es kann

daher davon ausgegangen werden, dass die LCM gewebeunabhängig funktioniert. Diese Beobachtung wird auch von Emmert-Buck et al. (1996) beschrieben, der Nierenglomerula, Alzheimer Plaques in Hirnschnitten, in situ Mammakarzinome, atypische duktale Hyperplasien der Brust, intraepitheliale Neoplasien der Prostata und Lymphfollikel untersuchte. Auch zwischen dem Einsatz von Gefrierschnitten, Paraffinschnitten, immungefärbten Schnitten und zytologischen Zellpräparationen sind keine Unterschiede beschrieben (Bonner et al., 1997; Emmert Buck et al., 1996; Fend et al., 1999).

Beschaffenheit der Objektträgeroberfläche

Der Einfluss unterschiedlicher Oberflächenbeschaffenheit der Objektträger auf die Adhäsion zwischen Gewebe und Objektträger wurde erwogen. Beim Testen verschiedener Materialien (Standardobjektträger aus normalem Glas mit/ohne Abwischen mit Aceton, Superfrost-Objektträger mit negativer Ladung, Kunststoffobjektträger) konnten keine systematischen Unterschiede festgestellt werden, die auf die besondere Eignung einer der Objektträgerarten hindeuteten.

Schnittherstellung am Kryotom

Die Schnitte dürfen keine Unebenheiten und Scharten aufweisen, sondern müssen plan auf dem Objektträger aufliegen. Bei der Herstellung der Schnitte handelt es sich um einen manuellen Schneidevorgang am Kryotom. Die Qualität der Schnitte ist daher stark von der ausführenden Person abhängig und erfordert Übung, um die genannten Bedingungen zu erfüllen.

Schneideeigenschaft und Stabilität des Schnittes

OCT bewirkt, indem es sich in die Poren des Gewebestückes setzt, eine Stabilisierung des Gewebeblocks. Dieser lässt sich so für alle Tumoren identisch einspannen und trimmen, so dass eine einheitliche Dicke von 6 µm im gesamten Schnitt erreicht werden kann. Da nach standardisierter Einbettung in OCT die LCM systematisch besser funktionierte, ist davon auszugehen, dass der Schnitt so planer auf dem Objektträger aufliegt und das Gewebe sich dadurch nicht zu fest in die Unebenheiten des Objektträgers legt. Durch diesen Zugewinn an Stabilität wird eine zu starke Adhäsion

zwischen Gewebe und Glasoberfläche verhindert. Während der Dehydrierung (aufsteigende Alkoholreihe und Xylol) wird das OCT entfernt, so dass es die LCM nicht behindert.

Feuchtigkeit des Schnittes

Der Schnitt darf nach der Dehydrierung in Xylol und Lufttrocknung keine Feuchtigkeit mehr enthalten (bei der Dissektion an zur Mitte hin fließenden Spots zu erkennen), da sich der Polyethylenfilm sonst nicht mit dem Gewebe verbinden kann. Es stellte sich heraus, dass sich die Aufbewahrung der Schnitte bei -80 °C sowie der Transport auf Trockeneis in Bezug auf die Feuchtigkeit des Schnittes ungünstig auswirkten, da es zur Bildung von Kondenswasser beim Auftauen kam. Dementsprechend wurde das Protokoll geändert: Die Kryoschnitte wurden direkt aus dem Kryotom in 70% Ethanol gegeben und unmittelbar anschließend gefärbt und dehydriert. Dies hatte zur Folge, dass nur so viele Schnitte hergestellt werden durften, wie im Anschluss in der LCM bearbeitet werden konnten. So wurde sowohl eine zwischenzeitliche Lufttrocknung als auch die Bildung von Kondenswasser verhindert. Eine Wasserabscheidung im Xylol beim letzten Dehydrierungsschritt schadet der Dehydrierung und macht daher einen regelmäßigen Wechsel der Xylollösung notwendig.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei der LCM besonders die Gewebeaufarbeitung einen heiklen Schritt darstellt. Mittels standardisierter Einbettung der Proben in OCT vor dem Schneiden und dem sich direkt anschließenden Färbe- und Deydrierungsvorgang gelang es, ideale Adhärenz-Bedingungen zu schaffen, so dass die LCM systematisch und unabhängig vom eingesetzten Gewebetyp und der Objektträgerbeschaffenheit funktionierte.

4.2.3. Der Dissektionsvorgang

Ein Nachteil aller Mikrodissektionstechniken, so auch der LCM, ist die Einschränkung der optischen Beurteilbarkeit, da die Schnitte nicht mit einem Deckglas versehen werden dürfen, welches das Gewebe schützen und die optische Brechung verbessern würde. Bei starker Vergrößerung können so zelluläre Details verloren gehen. Um dem

entgegen zu wirken, hat die Firma Arcturus einen Diffusionsfilter entwickelt, der vor der Mikrodissektion zwischen Gewebe und Objektiv eingebracht wird und das Deckglas simuliert. Er ermöglicht es, Gewebedetails annähernd wie mit einem Deckglas scharfzustellen. Wichtig ist dennoch die Herstellung von Referenzschnitten mit Deckglas, mit deren Hilfe Tumoreareale exakter beurteilt werden können.

Simone et al. erwähnen eine weitere Möglichkeit, die Funktion des Deckglases zu ersetzen: Anstatt eines Filters könnte auch ein Tropfen Xylol aufgebracht werden, der die Brechzahl verändert und den Schnitt gleichzeitig vor Feuchtigkeit schützt und bis zur Mikrodissektion verdampft ist (Simone et al., 1998). Dieses Verfahren ist aufgrund der Gesundheitsgefährdung durch die entstehenden Xyloldämpfe abzulehnen.

4.2.4. DNA-Aufarbeitung nach LCM

Da die Literatur zur DNA-Isolation nach Mikrodissektion sehr uneinheitlich ist (Aubele et al., 1999; Moskaluk and Kern, 1997; Shibata, 1994; Speicher et al., 1993; Turbett et al., 1996; Zhuang et al., 1995), wurden in der Arbeit für die Etablierung der CGH mehrere Methoden angewandt. Von den drei in Kapitel 2.3.6. beschriebenen DNA-Isolationsmethoden erwies sich die Isolation in PCR-Puffer mit anschließendem Proteinase K Verdau am zuverlässigsten. Die Isolation mit Arcturus-Lysepuffer ist ähnlich, das darin enthaltene EDTA könnte allerdings die DOP-PCR stören, da es als Komplexbildner Magnesium- und Kalziumionen abfängt (Joos, persönliche Mitteilung). Problematisch bei diesen beiden Formen der DNA-Isolation „in einem Schritt“ (Zellyse in Arcturus-Lysepuffer bzw. in PCR-Puffer mit jeweils anschließendem Proteinase K Verdau) schien teilweise die Verunreinigung durch Proteine und andere Zellbestandteile zu sein. Um dieses Problem zu umgehen, wurde eine DNA-Aufreinigung bestehend aus Zellyse, Proteinase K Verdau, Fällung und Proteinpräzipitation (Promega DNA-Isolation) getestet. Diese lieferte zwar reinere DNA, eignete sich aber nur für größere Zellmengen, da vermutlich während der einzelnen Aufreinigungsschritte viel DNA verloren ging.

Für die Qualität der aus mikrodisseziertem Gewebe gewonnenen DNA spielt bereits die DNA-Isolation eine wichtige Rolle. Daher könnte die DNA-Isolation eine mögliche Ursache für die Qualitätsunterschiede der CGH-Ergebnisse (siehe unten) sein. Die

meisten Autoren, die mit mikrodiseziertem Gewebe arbeiteten und die DOP-PCR zur Amplifikation der genomischen DNA anwendeten, beschreiben eine „Ein-Schritt“-DNA-Extraktion. Allerdings wurde in vielen Fällen nicht mit Frischgewebe, sondern mit Paraffingewebe gearbeitet (Aubele et al., 1999; Aubele et al., 1998; Jones et al., 2000b; Joos et al., 2000).

4.2.5. LCM an Mammakarzinom

Bisher liegen wenige Erfahrungen zur LCM am Mammakarzinom vor. Lediglich Sgroi et al. (1999), Jones et al. (2000) und Luzzi et al. (2001) setzten die LCM am Mammakarzinom ein.

Sgroi et al. kombinierten die LCM am duktal invasiven Mammakarzinom mit cDNA Microarrays. Von einer Patientin wurden verschiedene Progressionsstadien eines Tumors disseziert, die RNA extrahiert und die cDNA nach reverser Transkription auf Microarray Genfilter mit cDNA Sonden hybridisiert, um durch den Vergleich der Expressionsprofile die verschiedenen Progressionsstadien auf Unterschiede in der Genexpression zu untersuchen. Die Ergebnisse wurden mittels RT-PCR und Immunhistochemie validiert. Sgroi et al. entnahmen jeweils ca. 100000 Zellen, was etwa der 100fachen Zellzahl der in der vorliegenden Arbeit dissezierten Zellen entspricht (Sgroi et al., 1999).

Jones et al. setzten die LCM am seltenen myoepithelialen Mammakarzinom in Kombination mit der CGH ein, um die genetischen Alterationen dieses Tumortyps mit in der Literatur beschriebenen Veränderungen des duktal invasiven Mammakarzinoms zu vergleichen. Eine Angabe über die eingesetzte Zellzahl findet sich nicht. Jones et al. führten die LCM an 5 µm dicken Paraffinschnitten durch und isolierten die DNA in „einem Schritt“ unter Einsatz eines TRIS-haltigen Extraktionspuffers. Die 10 untersuchten myoepithelialen Tumoren wiesen im Verhältnis zum duktal invasiven Karzinom weniger Alterationen auf. Alle im myoepithelialen Karzinom vorkommenden Veränderungen wurden aber auch am duktal invasiven Karzinom gefunden, so dass diese Veränderungen eher Hinweise auf die Karzinogenese des Mammakarzinoms allgemein geben (Jones et al., 2000b).

In beiden Publikationen wird auf die Methodik nicht näher eingegangen. Des Weiteren muss festgehalten werden, dass beide Autoren nur eine geringe Anzahl an Proben analysierten: Sgroi et al. untersuchten den Tumor *einer* Patientin, Jones et al. 10 myoepitheliale Karzinome und verglichen sie mit Literaturdaten.

Luzzi et al. setzten die LCM ein, um RNA von DCIS zu gewinnen, die sie dann mittels Oligonukleotidarrays analysierten und damit Genexpressionsmuster erhielten, die sie mit Mustern von nichtmalignen Brusttumoren verglichen (Luzzi et al., 2001).

4.3. Kritische Wertung der DOP-PCR

4.3.1. Die Methodik der DOP-PCR

Mittels der von Telenius et al. 1992 entwickelten DOP-PCR wurde es möglich, zytogenetische Untersuchungen wie die CGH auch für kleine Zellgruppen bzw. für mikrodiseziertes Material anzuwenden, da die DOP-PCR eine schnelle, effiziente und speziesunabhängige Technik zur Amplifikation des kompletten Genoms aus geringen DNA Mengen darstellt (Telenius et al., 1992a; Telenius et al., 1992b).

Voraussetzung für CGH-Experimente an mikrodiseziertem Gewebe ist zunächst die Kenntnis über die notwendige Mindestmenge an eingesetzter DNA. Nach Standardprotokoll werden pro CGH-Experiment 0,5 bis 1 µg DNA benötigt, was ca. 50.000 bis 100.000 Zellen entspricht. Speicher et al. konnten zeigen, dass eine Ausgangsmenge von 100 pg DNA reproduzierbar mit Hilfe der DOP-PCR amplifiziert werden konnte und auswertbare Ergebnisse in der CGH lieferte. In derselben Publikation wurde überprüft, ob das Amplifikationsmuster einer Zelllinie in der CGH nach Amplifikation von 100 pg DNA in der DOP-PCR dem beschriebenen Amplifikationsmuster von nicht amplifizierter, direkt eingesetzter DNA dieser Zelllinie entspricht. Alle bislang bekannten Veränderungen konnten auch nach DOP-PCR nachgewiesen werden und es konnten sogar zusätzliche Veränderungen entdeckt werden. (Speicher et al., 1993). Darauf begründet sich die Anwendung der DOP-PCR für die Amplifikation geringer Mengen genomischer DNA, z.B. nach Mikrodisektion.

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit, wie auch bereits in anderen Arbeiten am Mammakarzinom, die DOP-PCR vor CGH-Analysen angewendet (Aubele et al., 1999; Aubele et al., 2000a; Aubele and Werner, 1999; du Manoir et al., 1993; Jones et al., 2000b; Kallioniemi et al., 1994b; Kuukasjarvi et al., 1997b; Kuukasjarvi et al., 1997c).

4.3.2. DOP-PCR nach LCM

Die Ergebnisse der DOP-PCR für DNA aus LCM-Proben wurden anhand der Gelelektrophorese mit DNA nicht mikrodissasierter Zellen verglichen: Eine Abschwächung der DNA-Amplifikation nach DNA-Extraktion aus LCM-Tumorproben im Vergleich zur DNA aus nicht mikrodissiierten Zellen wurde nicht beobachtet: Der „Schmier“ der amplifizierten DNA von Tumorproben nach LCM unterschied sich in der Intensität und Verteilung im Gel nicht von der Positivkontrolle (DNA von MCF-7 Zellen nach Promega Isolation ohne LCM). Diese Beobachtung stimmt mit Emmert-Buck et al. (1996) überein, die ebenfalls keine bzw. eine geringe Verminderung der Amplifikation von RNA und DNA nach LCM beschreiben (Emmert Buck et al., 1996). Dies bedeutet, dass sich die DOP-PCR als Methode zur Vermehrung von mittels LCM gewonnener DNA eignet.

4.4. Kritische Wertung der CGH

4.4.1. Die Methodik der Nicktranslation

Ziel der Nicktranslation ist die Markierung der Sonden für die CGH. In Abhängigkeit von der DNase-Konzentration und der Verdauzeit können die Sonden sehr unterschiedliche Fragmentlängen aufweisen. Nach dem Ulmer Protokoll wurden für die Arbeit Fragmentlängen von 500 bis 2000 bp angestrebt. Diese Länge deckt sich nur teilweise mit Angaben in der Literatur: Die beschriebenen Fragmentlängen der Sonden für die CGH variieren zwischen 500-1000 bp (Buerger et al., 1999a), 600–1200 bp (Kuukasjarvi et al., 1997c), 600-2000 bp (Courjal and Theillet, 1997; Kallioniemi et al., 1994b)

und 300-3000 bp (Isola et al., 1994). Die Fragmentlänge nimmt Einfluss auf den Erfolg der CGH-Experimente (Houldsworth and Chaganti, 1994; Kallioniemi et al., 1994a). Wichtig scheinen dabei vor allem lange Fragmente (>1000 bp) zu sein, da diese die Intensität und Gleichmäßigkeit der CGH im Vergleich zu Fragmenten der Länge 300–600 bp (aus herkömmlichen Nicktranslationen) verbessern (Kallioniemi et al., 1994b). Weiterhin wurden in der Arbeit zwei verschiedene Nicktranslationstechniken angewandt und verglichen: die indirekte Markierung durch dNTP gekoppeltes Biotin bzw. Digoxigenin mit Nachweis durch FITC- bzw. Rhodamin-markierte Antikörper (Ulmer Protokoll) und die direkte Markierung mit dNTP gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen (Vysis Protokoll). In den ausgeführten Experimenten konnten keine grundsätzlichen Unterschiede der Methoden erkannt werden. Laut Hermsen et al. führt angeblich die direkte Markierung zu glatteren, aber schwächeren Fluoreszenzsignalen als die indirekte (Hermsen et al., 1996).

Als weitere Möglichkeit kann die DNA bereits während der DOP-PCR fluoreszenzmarkiert werden, indem dUTP gekoppeltes FITC bzw. Texas-Red in den zweiten stringenten Amplifikationsschritt der DOP-PCR eingesetzt wird (Kuukasjarvi et al., 1997c). Diese Methode scheint in hohen Fluoreszenzintensitäten der CGH zu resultieren. Laut Huang et al. scheint die Qualität dieser CGH-Experimente aber sehr zu variieren: Grund für einen zu starken Hintergrund oder ungleichmäßige Hybridisierung könnte sein, dass die Fragmentlänge der Proben im Vergleich zur optimalen Länge von 500 bis 2000 bp (Kallioniemi et al., 1994b) zu groß war. Amplifizierte DNA, die größer als 2000 bp ist, sollte daher mittels Nicktranslation markiert werden (Huang et al., 2000).

Ein weiterer kritischer Punkt ist die Zugabe der Fluoreszenz-dUTPs nach dem Präamplifikationsschritt. Diese Manipulation der DOP-PCR könnte mit erhöhter Kontaminationsgefahr einhergehen. In der vorliegenden Arbeit wurde aus diesem Grund die Fluoreszenzmarkierung während der DOP-PCR nicht angewandt.

4.4.2. Die Technik der CGH – Vorteile und Grenzen

Vorteile der CGH

Die CGH ermöglicht die Darstellung genetischer Imbalancen im gesamten Genom in einer einzigen Hybridisierung. Dies ist ein Vorteil gegenüber anderen zytogenetischen Techniken, mit denen einzelne spezifische Genorte untersucht werden, wie z.B. die Technik der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) (Isola et al., 1994) oder die Technik der Loss of heterozygosity (LOH) Analyse (Hermsen et al., 1996). Für beide Techniken wird die Kenntnis möglicher Kandidatengene vorausgesetzt und es werden für einen Genort spezifische DNA-Sonden (FISH) bzw. spezifische Primer (LOH) benötigt. Daher eignen sich diese Techniken im Gegensatz zur CGH nicht, um einen Überblick über alle genetischen Alterationen eines kompletten Genoms zu gewinnen, sondern vielmehr zur Bestätigung von CGH-Ergebnissen oder zur Untersuchung spezifischer chromosomaler Aberrationen (du Manoir et al., 1993). Die Karyotypisierung oder Bänderungsanalyse, eine weitere Technik zur zytogenetischen Analyse, liefert zwar wie die CGH diesen Überblick, allerdings handelt es sich dabei um eine extrem arbeitsaufwendige Technik, die eine In-vitro-Kultivierung der Tumorzellen voraussetzt, welche oft mißlingt (Hermsen et al., 1996; Persson et al., 1999). Im allgemeinen können mit der CGH mehr Imbalancen entdeckt werden als mittels Karyotypisierung (Persson et al., 1999). Ausgangsmaterial für die CGH ist genomische DNA, die unabhängig von der Tumorquelle aus Zelllinien, Frisch-, Gefrier- oder Paraffingewebe gewonnen werden kann. Dies ermöglicht die Untersuchung bislang unzugänglicher Materialien. Vor allem solide Tumoren eignen sich für die CGH, da unbalancierte chromosomale Veränderungen in diesen dominieren und wesentlich für deren Pathogenese zu sein scheinen (Persson et al., 1999). 1998 waren bereits über 1500 Tumoren mittels CGH untersucht worden (Tirkkonen et al., 1998). Ebenfalls können selbst geringe Mengen DNA nach Amplifikation in einer DOP-PCR analysiert werden (du Manoir et al., 1993; Hermsen et al., 1996; Speicher et al., 1993). Dies ist u.a. Voraussetzung der zytogenetischen Analyse mikrodisssezierten Gewebes.

Grenzen der CGH

Die CGH gibt Aufschluss über Zugewinne und Verluste an DNA. Dagegen können balancierte chromosomale Veränderungen wie Translokationen oder Inversionen nicht entdeckt werden (du Manoir et al., 1993; Hermsen et al., 1996; Kallioniemi et al., 1992; Kallioniemi et al., 1994b).

Imbalancen werden nur sichtbar, wenn sie im überwiegenden Teil der Zellen vorhanden sind (du Manoir et al., 1993). Liegen neben den Tumorzellen viele normale Zellen (Stromazellen, Entzündungszellen) vor, wird die Tumor-DNA durch kontaminierende Normal-DNA verdünnt (Kallioniemi et al., 1994b; Waldmann et al., 1996). Dies erfordert die Anwendung von Mikrodissektionstechniken, um ausschließlich DNA aus Tumorzellen zu analysieren (siehe 4.1.).

CGH-Ergebnisse geben Hinweise auf die Lokalisation von Onkogenen und Tumorsuppressorgen. Die betroffenen Gene können aber letztendlich nicht identifiziert werden, da das Auflösungsvermögen der Metaphasenchromosomen beschränkt ist. Hierfür eignet sich wiederum die FISH-Technik, mit der mittels spezifischer Gensonden bestimmte Gene und Genveränderungen detektiert werden. In der CGH werden genetische Veränderungen nur identifiziert, wenn Chromosomenabschnitte, die sich über mehr als 4 Megabasenpaare (Mbp) (du Manoir et al., 1993) bzw. 5-10 Mbp (Forozan et al., 1997) erstrecken, betroffen sind. Veränderungen auf kleineren Regionen werden nur bei extrem starker Amplifikation sichtbar: Damit eine Amplifikation auf einem 250 Kilobp großen Genabschnitt sichtbar wird, sind nach Schätzungen 400fache Zugewinne an DNA nötig (Hermsen et al., 1996). Die Detektion von Deletionen ist daher noch schwieriger, da der DNA-Verlust maximal 100% beträgt.

Die Häufigkeit von mittels CGH detektierten DNA-Verlusten ist in der Regel niedriger als die durch LOH-Analyse ermittelten, insbesondere wenn die Tumor-DNA durch Normalzellen kontaminiert ist. Allerdings können bei der LOH-Analyse Zugewinne schlechter von Verlusten differenziert werden als in der CGH (Tirkkonen et al., 1998).

Eine ausreichende Menge an genomischer DNA (die Literaturdaten reichen von 60 ng bis 1 µg) muss für ein CGH-Experiment zur Verfügung stehen.

4.5. Kritische Wertung der Kombination von Mikrodissektion, DOP-PCR und CGH – eigene Erfahrungen und Ergebnisse

Die unter 3.5. dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sich die Kombination von LCM, DOP-PCR und CGH zur Analyse genomischer Aberrationen am Mammakarzinom eignet. Allerdings entsprachen nicht alle durchgeführten CGH-Experimente den unter 2.7.2. beschriebenen Auswertungskriterien, was zu nachfolgenden Überlegungen veranlasste.

4.5.1. Etablierung der Methoden

Durch die Kombination der Methoden LCM, DOP-PCR und CGH führt bereits ein Fehler oder Problem in einem Glied der Kette zu unbefriedigenden Ergebnissen der CGH. Die Qualität der CGH-Experimente kann dementsprechend von multiplen Faktoren beeinflusst werden:

1. Faktoren bei der DNA-Aufbereitung *vor* der Hybridisierung:

Bereits bei der *DNA-Extraktion* können Proteine für eine Verunreinigung der DNA verantwortlich sein, da insbesondere bei der DNA-Lyse „in einem Schritt“ Proteine nicht extra gefällt werden.

Eine *Verunreinigung bzw. Verdünnung der Tumor-DNA durch DNA* von Normalzellen wird durch den Einsatz der LCM umgangen.

Verunreinigungen können auch während der *DOP-PCR* entstehen, da die degenerierten Primer unspezifisch amplifizieren, also auch DNA vervielfältigt wird, die aus Kontaminationen und nicht aus den Tumorzellen stammt. So beobachteten Kuukasjärvi et al., dass CGH-Ergebnisse von kontaminierten DOP-PCRs im Allgemeinen von schlechter Qualität waren (Kuukasjarvi et al., 1997c).

Für eine gute Qualität der CGH-Experimente wird DNA mit hohem *Molekulargewicht* benötigt. Daher eignet sich Frischgewebe besser als formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Gewebe, da die DNA dort oft degeneriert ist, als Proteinkomplex oder in

kurzen Fragmenten vorliegt [Kallioniemi, 1994 #176; Isola, 1994 #131; Waldmann, 1996 #205; Joos, persönliche Mitteilung]. Auch scheint die Fragmentlänge der DOP-PCR-Amplifikate vom eingesetzten Gewebe abzuhängen: Huang et al. zeigten, dass Paraffingewebe in der DOP-PCR kleinere Fragmente als Frisch- oder Gefrierewebe ergab, so dass teilweise keine CGH möglich war (Huang et al., 2000). DOP-PCR-Vorversuche an Paraffingewebe erbrachten im Rahmen der Arbeit keine verwertbaren Ergebnisse (Daten nicht gezeigt), daher wurde die CGH an Frischgewebe etabliert. Analysen an Frisch- und Gefrierewebe erfordern eine große Frischgewebekbank. Diese existiert an der Frauenklinik Tübingen, steht vielen Arbeitsgruppen aber nicht zur Verfügung. Dies und die Möglichkeit zu groß angelegten, retrospektiven Studien an pathologisch gut charakterisierten soliden Paraffingewebe-Tumoren erklärt den häufigeren Einsatz von Paraffingewebe (siehe auch Tab. 4.1) durch viele Arbeitsgruppen.

Die Länge der *Nicktranslationsprodukte* spielt eine weitere Rolle: Ein körniges, inhomogen gefärbtes Bild kann entstehen, wenn Tumor- und Referenz-DNA sich in der Länge der DNA-Fragmente nicht entsprechen oder die Nickprodukte nicht die erforderliche Fragmentlänge besitzen, da die Verdauzeit zu kurz bzw. zu lang oder die DNase-Konzentration nicht angemessen war. Ein strahlender, stark gefärbter Hintergrund außerhalb der Chromosomen spricht für zu große, ein homogener Schleier über allen Chromosomen für zu kleine Fragmente. Ein solcher Schleier wurde in mehreren Proben beobachtet, allerdings auch in Proben, deren Nickprodukte im Agarosegel im richtigen Bereich lagen.

In Rahmen der Arbeit ergaben sich auswertbare CGH-Experimente nach Nicktranslationen, bei denen die DNA im Gel nicht sichtbar war (siehe Ergebnisse 3.5.1. für # TÜ 70), was vermuten lässt, dass die Zuverlässigkeit der CGH nicht ausschließlich vom Ergebnis der Nicktranslation abhängt. Weshalb die DNA während der Nicktranslation nicht in allen Gelen sichtbar war, konnte nicht eruiert werden.

Die *Markierung der DNA in der Nicktranslation* kann mittels Dot-Blot qualitativ überprüft werden, wobei quantitative Aussagen zur Markierung nicht möglich sind.

2. Faktoren *während* der Hybridisierung:

Die Qualität der CGH hängt stark von der *Qualität der Metaphasen* ab (du Manoir et al., 1993; Kallioniemi et al., 1994b). Da die verwendeten Metaphasen von der Firma Vysis bezogen wurden, konnte auf die Qualität kein Einfluss genommen werden. Soweit im Phasenkontrastmikroskop zu beurteilen, war die Qualität der Metaphasen ausreichend (regelmäßig kondensierte Chromosomen, genügend Metaphasen mit wenigen Überlappungen).

Die *Denaturierung der Tumor- und Referenz-DNA* spielt eine wichtige Rolle: Ist sie nicht ausreichend, liegt die DNA als Doppelstrang vor und kann nicht an homologe Chromosomenabschnitte auf den Metaphasen binden. Entsprechendes gilt für die DNA der Metaphasen. Für die Denaturierung könnte die Qualität des deionisierten Formamids, das die Doppelstränge spaltet, von Bedeutung zu sein. Allerdings ergaben sich in der Arbeit selbst unter Verwendung von reinstem Formamid Qualitätsunterschiede in der CGH, so dass die Probleme nicht eindeutig damit in Verbindung gebracht werden konnten.

Eine zu geringe *Menge an humaner Cot1-DNA* führt zur Überstrahlung durch repetitive Sequenzen. Eine erfolgreiche Blockade der repetitiven Sequenzen an Zentromeren und Telomeren durch Zugabe von Cot1-DNA im Überschuss war in allen CGH-Experimenten gewährleistet, was an den ausschließlich DAPI-gefärbten Zentromeren zu erkennen war.

Falsche *Hybridisierungsbedingungen* in der feuchten Kammer können durch Austrocknen der Proben zu Rissen und Artefakten führen. Dies wurde durch stichprobenartige Kontrollen während der Inkubationszeit verhindert.

Eine zu niedrige *Stringenz beim Waschen* nach der Hybridisierung kann für eine zu starke Hintergrundfärbung verantwortlich sein. Je niedriger die Salzkonzentration im Waschpuffer, desto höher ist die Stringenz, d.h. desto stärker werden Hintergrund, aber auch erwünschte Fluoreszenz herausgewaschen.

Während der Arbeit wurden die unter 2. genannten Faktoren, die *während* der Hybridisierung einwirken, variiert und optimiert. Dennoch blieben Unterschiede in der Qualität der CGH-Experimente. Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass die

Ursache der beobachteten Qualitätsschwankungen eher von Faktoren bei der schwieriger beeinflussbaren DNA-Aufbereitung vor der Hybridisierung (siehe 1.) zu suchen ist.

Obwohl dies im Rahmen der Arbeit nicht endgültig geklärt werden konnte, zeigen die unter 3.5. dargestellten Ergebnisse jedoch klar die Eignung der Kombination von LCM, DOP-PCR und CGH zur Analyse genomischer Aberrationen bei der weiteren Charakterisierung des Mammakarzinoms.

4.5.2. Interpretation der eigenen CGH-Ergebnisse

Die unter 3.5. dargestellten CGH-Untersuchungen zeigen die Ergebnisse der durchgeführten CGH-Experimente. In den Negativkontrollen (Hybridisierung von gesunder Plazenta-DNA sowohl als Ziel-DNA als auch als Referenz-DNA) dieser Experimente finden sich wie erwartet keine Aberrationen. Kleine Zugewinne und Verluste an Zentromer und Telomer können wegen der dort vorkommenden repetitiven Sequenzen vernachlässigt werden. Die Auswertbarkeitskriterien (siehe 2.7.2.) waren für die gezeigten Fälle erfüllt.

Für *Tumor # TÛ 70* (Nicktranslation und CGH nach Ulmer Protokoll) entsprechen die gefundenen Aberrationen (siehe 3.5.1.) für Chromosom 16p, 17q, 19p, 20q den in der Literatur beschriebenen Veränderungen (siehe Tabelle 4.2 unter 4.6.2.). Chromosom 17q kodiert für das Protoonkogen c-erbB2 (Her2/neu). Der gefundene Zugewinn auf Chromosom 17q des Tumors # TÛ 70 deckt sich mit der positiven Immunhistochemie für Her2/neu (3+) (siehe Tumorentabelle 8.4.) dieses Tumors. Diese Übereinstimmungen und die Negativkontrolle, die keine Aberrationen zeigt, bestätigen die Auswertbarkeit dieser Experimente.

Die dargestellten Ergebnisse für die *Positivkontrolle (DNA von MCF-7 Zellen)* (siehe 3.5.3.) zeigen ebenfalls Übereinstimmungen mit in der Literatur beschriebenen Aberrationen. Kytölä et al. beschrieben Zugewinne auf Chromosom 9q, 11q, 12q, 14q, 15q, 17q, 19p, 19q und 20q, fanden allerdings keine Zugewinne auf Chromosom 1p, 5, 7p, 10, 16 und 20p, statt dessen beschrieben sie Zugewinne auf den Chromosomen 1q,

3p, 7q und 8q. Übereinstimmende Verluste waren 1p, 4p, 9p und 13q. Nicht beschrieben wurden die Verluste 2q, 3, 4q, 6q und 13p, statt dessen fanden sie Verluste auf den Chromosomen 8p, 11, 13q, 18q und X. Die Tatsache, dass in der CGH von der Zelllinie MCF-7 deutlich mehr chromosomale Veränderungen als im Primärtumor auftraten, entspricht der Beobachtung in der Literatur: Zelllinien zeigten etwa die doppelte Zahl an Aberrationen im Vergleich zum Primärtumor (Kytola et al., 2000). Jones et al. untersuchten 3 verschiedene MCF-7 Zelllinien und fanden in den Aberrationsmustern deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Klonen (Jones et al., 2000a), was bedeutet, dass die Aberrationsmuster von verschiedenen MCF-7 Zelllinien durchaus variieren und damit die Abweichungen der Ergebnisse erklären können.

Für die *Positivkontrolle (DNA von MPE 600 Zellen)* (siehe 3.5.4.) bei den CGH-Experimenten, die nach Vysis Protokoll ausgeführt wurden, entsprachen die gefundenen Aberrationen den von Vysis angegebenen Veränderungen, was das erfolgreiche CGH-Experiment bestätigte. Die *Negativkontrolle* war ebenfalls wie erwartet frei von Veränderungen.

Der Vergleich von *Primärtumor # TÛ 71 und Lymphknoten # TÛ 73* (Nicktranslation und CGH nach Vysis Protokoll) zeigte für den Primärtumor und den Lymphknoten fast identische Aberrationen. Diese Übereinstimmungen sprechen ebenfalls dafür, dass es sich bei den gefundenen Aberrationen um tatsächliche Veränderungen und nicht um Artefakte handelt.

In den durchgeführten Experimenten wurde sowohl direkt isolierte als auch mit DOP-PCR amplifizierte Plazenta-DNA als Referenz-DNA eingesetzt. Die Vorbehandlung der Plazenta-DNA schien keinen systematischen Unterschied der CGH-Ergebnisse zu bewirken. Anders beschreibt es Huang et al. (2000): CGH-Ergebnisse von Homo-Hybridisierungen (mittels DOP-PCR amplifizierte Tumor- und Plazenta-Referenz-DNA) waren von besserer Qualität als Ergebnisse von Hetero-Hybridisierungen (mittels DOP-PCR amplifizierte Tumor-DNA und direkt isolierte, nicht amplifizierte Plazenta-Referenz-DNA) (Huang et al., 2000) (siehe auch 4.6.1.).

Die erläuterten Ergebnisse zeigen: Die CGH kann in Kombination mit der LCM und DOP-PCR eingesetzt werden, um das Mammakarzinom molekularzyotgenetisch genauer zu charakterisieren. Für Rückschlüsse auf die Pathogenese des Mamma-

karzinoms ist die Zahl der durchgeführten Experimente allerdings zu gering. Die Arbeit dient jedoch als Grundlage für weiterreichende systematische CGH-Studien.

4.6. Kritische Wertung von CGH-Studien am Mammakarzinom – Heterogenität der Literatur

Sowohl die Methoden als auch die Ergebnisse der bislang durchgeführten CGH-Studien am Mammakarzinom sind sehr uneinheitlich. Daher werden unter 4.6.1. zunächst die methodischen Unterschiede der verschiedenen Publikationen diskutiert und unter 4.6.2. die daraus resultierenden Ergebnisse kritisch hinterfragt.

4.6.1. Die Kombination von Mikrodissektion, DOP-PCR und CGH – Methodische Heterogenität der bisherigen Untersuchungen

Publikationen zur molekulargenetischen Charakterisierung des Mammakarzinoms mittels Mikrodissektion, DOP-PCR und CGH weisen große methodische Unterschiede auf. Die folgende Tabelle, in der verschiedene Publikationen zusammengestellt sind, bei denen am Mammakarzinom Mikrodissektion, DOP-PCR und CGH eingesetzt wurden, soll veranschaulichen, wie uneinheitlich die Experimente in Bezug auf untersuchtes Gewebe, Anzahl und Art der Tumoren, Art der Mikrodissektion, dissezierte Zellzahl und Art der Fluoreszenzmarkierung sind.

Die Zahl der pro CGH-Experiment ausgewerteten Metaphasen variierte ebenfalls, bzw. wurde in den Publikationen teilweise nicht erwähnt. So werteten z.B. Aubele et al. in verschiedenen Studien unterschiedlich viele Metaphasen aus: 8-15 in (Aubele et al., 1999), 10-15 in (Aubele et al., 2000a). Eine standardisierte Mindestzahl der ausgewerteten Metaphasen gibt es nicht.

Tab. 4.1: Die gezeigte Zusammenstellung von Publikationen, die an Mammakarzinom mit Mikrodissektion arbeiteten, verdeutlicht die methodische Heterogenität dieser Studien in Bezug auf Zahl, Art der Tumoren, Art der Mikrodissektion, Zahl der dissezierten Zellen und Art der Fluoreszenzmarkierung.

(DCIS = duktales Carcinoma in situ, IDC = invasives duktales Karzinom, IH = intraduktale Hyperplasie, ADH = atypische duktales Hyperplasie, LK = Lymphknotenmetastase, formalinfix. Paraffin = Formalin fixiertes, in Paraffin eingebettetes Gewebe, Mikrodiss. = Mikrodissektion)

Publikation	Zahl	Art der Tumoren	Ausgangsmaterial	Art der Mikrodissektion	Zahl der dissezierten Zellen	Floreszenzmarkierung
(Kuukasjarvi et al., 1997b)	5 2	DCIS ohne IDC DCIS mit IDC	formalinfix. Paraffin	sterile Nadel	keine Angabe	in DOP-PCR
(James et al., 1997)	9	DCIS	formalinfix. Paraffin	sterile Nadel	mehrere Gänge	in DOP-PCR
(Werner et al., 1999)	5	Pat. (IH, ADH, DCIS, IDC)	formalinfix. Paraffin	PALM-Laser-Mikrodiss.	keine genauen Angaben	in DOP-PCR
(Aubele et al., 1999)	1 1	IDC mit LK IDC ohne LK	formalinfix. Paraffin	PALM-Laser-Mikrodiss.	20-50 Zellen	in DOP-PCR
(Aubele et al., 2000b)	4	Pat. (DH, DCIS angrenzend an IDC)	formalinfix. Paraffin	PALM-Laser-Mikrodiss.	400-500 Zellen	indirekt in Nicktranslation
(Aubele et al., 2000a)	7	DCIS (>4 cm) mit IDC-Herd, 3/7 mit LK-Metastase	formalinfix. Paraffin	PALM-Laser-Mikrodiss.	300-500 Zellen	indirekt in Nicktranslation
(Waldman et al., 2000)	18	DCIS und deren Lokalrezidive	formalinfix. Paraffin	keine Angabe	keine Angabe	direkt und indirekt in Nicktranslation
(Jones et al., 2000b)	10	myoepitheliale Karzinome	formalinfix. Paraffin	LCM	keine Angabe	in DOP-PCR

Ein weiterer Punkt, in dem die Publikationen zur CGH nach Mikrodissektion am Mammakarzinom voneinander abweichen, ist die Frage, ob eine Homo-Hybridisierung (amplifizierte Test-DNA gegen amplifizierte Referenz-DNA) oder eine Hetero-Hybridisierung (amplifizierte Test-DNA gegen genomische, nicht amplifizierte Referenz-DNA) durchgeführt wurde. Während Kuukasjärvi et al. die Hetero-Hybridisierung als geeignete Methode beschrieben (Kuukasjarvi et al., 1997c), bevorzugten Huang et al. die Homo-Hybridisierung: Sie stellten fest, dass die Homo-Hybridisierung im Vergleich zur Hetero-Hybridisierung eher den Ergebnissen aus Standard-CGH Untersuchungen entsprach. Hetero-Hybridisierung wies einen stärkeren Hintergrund, ungleichmäßige Hybridisierung, falsche Deletionen und Amplifikationen auf (Huang et al., 2000).

Die notwendige Mindestmenge an eingesetzter DNA variiert ebenfalls stark und hängt von der Sensitivität der DOP-PCR ab: Nachdem sich Speicher et al. auf eine Mindestmenge von 100 pg festlegten (Speicher et al., 1993), reichten bei Kuukasjärvi et

al. beispielsweise 50 pg DNA aus, was sie anhand einer MCF-7 Verdünnungsreihe zeigen konnten. Bei 10-25 pg zeigten sich allerdings nur noch die auffälligsten Aberrationen (17q21 und 20q13 bei MCF-7 Zellen). Demgegenüber ergaben sich bei Huang et al. mit Hilfe eines veränderten DOP-PCR-Protokolls in einer Verdünnungsreihe bis zu 12,5 pg DNA auswertbare CGH-Ergebnisse (Huang et al., 2000).

Die Diskussion der Methoden in den oben angeführten Publikationen verdeutlicht, dass es für die Kombination aus Mikrodissektion, DOP-PCR und CGH bislang noch keine einheitlich standardisierte Vorgehensweise gibt. Die Frage nach der Art der DOP-PCR, der Entscheidung ob Homo- oder Heterohybridisierung und der DNA-Menge lässt sich letztlich nicht beantworten und müsste zunächst in einer systematischen Studie geklärt werden.

Bezüglich der Diskussion um die (Mindest-)Menge der eingesetzten DNA muss betont werden, dass Mikrodissektion nicht mit Mikromenge gleichzusetzen ist. Viel mehr als um die Minimierung der DNA-Menge sollte es um die Maximierung des Reinheitsgrades der Tumor-DNA gehen, weshalb Mikrodissektionstechniken wie die LCM so entscheidend sind.

4.6.2 Vergleich der Ergebnisse von CGH-Untersuchungen am Mammakarzinom

Die unter 4.6.1. dargestellte methodische Heterogenität der verschiedenen CGH-Studien erklärt, weshalb die im Folgenden erläuterten Untersuchungen zu genetischen Aberrationen beim Mammakarzinom immer vor dem Hintergrund der Versuchsbedingungen interpretiert werden müssen und bislang nur Hinweise auf für die Tumorentstehung und Progression verantwortliche Genlokalisierungen geben. Für exaktere Aussagen ist eine methodische Verbesserung und Standardisierung notwendig, um erhaltene Ergebnisse vergleichen zu können. Hierfür bedarf es einer groß angelegten Studie unter exakt standardisierten Bedingungen. Die Mikrodissektion mittels LCM würde sich hierbei zur Gewinnung reinen Tumormaterials eignen.

Die CGH ist eine Technik, die sich eignet, um Veränderungen des gesamten Genoms zu identifizieren (siehe 4.4.2.) (Gray et al., 1994). Die Wichtigkeit der genetischen Aberrationen bei der Progression des Mammakarzinoms spiegelt sich darin wieder, dass

alle bislang mittels CGH untersuchten Primärtumoren chromosomale Aberrationen aufwiesen (Tirkkonen et al., 1998).

In der nachstehenden Tabelle 4.2 (siehe S.93 und 94) ist eine Zusammenstellung der mittels CGH erhaltenen publizierten chromosomalen Aberrationen dargestellt.

Die am häufigsten beschriebenen Amplifikationen liegen auf Chromosom 1q, 8q, 17q, und 20q, die am häufigsten beschriebenen Deletionen auf Chromosom 13q, 16q und 17p. Diese Auswertung verschiedener Publikationen deckt sich größtenteils mit einer Zusammenfassung mehrerer Publikationen von Forozaan et al.: Die drei am häufigsten auftretenden Zugewinne an DNA beim Mammakarzinom fanden sie auf den Chromosomen 1q, 8q und 17q, die drei am häufigsten vorkommenden Verluste auf den Chromosomen 8p, 16q und 17 p (Forozaan et al., 1997). Obwohl in diese Zusammenfassung von 1997 keine neueren Studien einfließen, lässt sich erkennen, dass sich an den häufigsten Aberrationen im Prinzip nichts verändert hat.

Es ist bekannt, dass Chromosom 8q24 für das Protoonkogen c-myc, 17q12 für das Protoonkogen c-erbB2 kodiert. Entsprechend weiß man, dass Chromosom 17p13 für das Tumorsuppressorgen p53 kodiert. Amplifikationen von Protoonkogenen bzw. Deletionen von Tumorsuppressorgenen sind u.a. verantwortlich für die Tumorprogression (Aubele et al., 2000a; Isola et al., 1995; Kallioniemi et al., 1994a; Nishizaki et al., 1997; Ried et al., 1995).

Tab. 4.2: Die nachstehende Tabelle zeigt eine Zusammenstellung verschiedener Studien zu chromosomalen Aberrationen des Mammakarzinoms. Dargestellt sind die gefundenen Amplifikationen (A) und Deletionen (D) mit deren Lokalisation auf den Chromosomen 1 bis 22 bzw. X bei starker Heterogenität der Studien bezüglich Tumorart, Anzahl der untersuchten Tumoren, Art der Mikrodissektionstechnik.

(p = kurzer Chromosomenarm, q = langer Chromosomenarm, A* = zusätzliche Amplifikation in IDC, nicht in DCIS, A' = Amplifikation in DCIS, IDC, nicht im LK, D* = zusätzliche Deletion im LK, IDC = invasives duktales Karzinom, DCIS = duktal invasives Carcinoma in situ, LK = Lymphknotenmetastase, FA = Fibroadenom, dICD = diploides IDC, aIDC = aneuploides IDC)

Durch den Vergleich von verschiedenen Tumorarten und Tumorstadien können Rückschlüsse auf die Tumorentstehung und –progression gezogen werden. Es sind Studien beschrieben, die unterschiedlich aggressive Tumoren (Ried et al., 1995; Tirkkonen et al., 1998) oder die Rezidivneigung (Isola et al., 1995) von *verschiedenen* Patientinnen vergleichen. Eine zweite Gruppe von Studien untersuchte unterschiedliche Progressionsstadien von Tumoren *einer* Patientin, z.B. Primärtumor und Lymphknoten (Nishizaki et al., 1997), Primärtumor und Metastase (Kuukasjarvi et al., 1997a), Herde von duktal invasivem Carcinoma in situ (DCIS) und invasivem duktalem Karzinom (IDC) desselben Tumors (Aubele et al., 2000b; Aubele et al., 2000a; Kuukasjarvi et al., 1997b). Für Untersuchungen verschiedener Anteile *eines* Tumors wurden verschiedene Mikrodissektionstechniken eingesetzt.

Bei allen zitierten Studien muss erwähnt werden, dass sie größtenteils an kleinen Tumorkollektiven durchgeführt wurden (siehe Tabelle 4.2). Es wurden unterschiedliche Tumor-Subgruppen analysiert und miteinander verglichen, da eine Standardisierung der Untersuchungsmethode in diesem Bereich bislang nicht existiert. Deshalb können die Ergebnisse nicht direkt miteinander verglichen werden, sondern geben lediglich Hinweise auf mögliche Tumorentstehungs- und Progressionsmuster.

CGH-Studien ohne Mikrodissektion

Studien am duktal invasiven Karzinom (IDC)

Ried et al. verglichen mittels CGH Aberrationsmuster von Fibroadenomen, diploidem und aneuploidem (progrediente Form mit veränderter Chromosomenzahl einhergehend mit schlechter Prognose) IDC. Fibroadenome zeigten keine chromosomalen Aberrationen, aneuploide zeigten im Vergleich zu diploiden Karzinomen deutlich mehr Alterationen. Daraus wurde gefolgert, dass die höhere Aberrationsrate mit schlechter Prognose korreliert (Ried et al., 1995).

Entsprechend zeigten sich in einer Untersuchung von Isola et al. deutlich mehr Aberrationen in der CGH von Patientinnen, die an einem Rezidiv erkrankten im Vergleich zu Patientinnen, die rezidivfrei blieben. Untersucht wurden hier ausschließlich Primärtumoren von IDC, die nicht in die Lymphknoten metastasiert hatten. Ein Zugewinn auf Chromosom 1q schien den meisten Tumoren im Frühstadium

gemeinsam und könnte daher verantwortlich für die Tumorentstehung sein, schien aber keinen Einfluss auf den klinischen Ausgang zu haben. Ein Zugewinn auf Chromosom 8q, ebenfalls häufig, war assoziiert mit Rezidiven und schien signifikant für die Tumorprogression zu sein. Aus diesen CGH-Ergebnissen wurde geschlossen, dass bereits Tumoren ohne Lymphknotenbefall, sofern sie genetisch weiter verändert sind, mit einem erhöhten Rezidivrisiko einhergehen und zur Progression neigen (Isola et al., 1995).

Tirkkonen et al. fanden bei ihrer Studie an 55 unselektierten IDC ebenfalls Zugewinne von Chromosom 1q selbst in Tumoren mit sonst unauffälligem Aberrationsmuster und schlossen dabei bei dieser Veränderung auf ein frühes Ereignis. Im Gegensatz dazu fand sich ein Zugewinn auf Chromosom 8 assoziiert mit zahlreichen anderen Aberrationen. Die Amplifikation auf 8q schien mit späterer Progression zu korrelieren oder die Tumoren zu instabilisieren (Tirkkonen et al., 1998).

Hermsen et al. untersuchten 53 IDC ohne Lymphknotenmetastasen und verglichen das Aberrationsmuster mit klinischen und histologischen Prognosemarkern. In der Gruppe mit schlechter Prognose fanden sie bestimmte Aberrationen gehäuft, wie z.B. einen Zugewinn auf Chromosom 8q (Hermsen et al., 1998).

Burger et al. verglichen Aberrationsmuster von DCIS, LCIS und invasivem Karzinom, wobei sie auf morphologisch sehr heterogene Subtypen stießen und daraus schlussfolgerten, dass die Tumorprogression über sehr variable Pathomechanismen verläuft (Burger et al., 2000b).

Studien zur Metastasierung des IDC

In der Gruppe der CGH-Studien, die verschiedene Progressionsstadien jeweils einer Patientin untersuchten, fanden Nishizaki et al., dass die Progression vom Primärtumor zur Lymphknotenmetastase mit zusätzlichen Aberrationen der Metastase einhergeht und folgerten daraus, dass Tumorwachstum und –progression die Folge der Akkumulation genetischer Abberationen sind (Nishizaki et al., 1997).

Kuukasjärvi et al. fanden ebenfalls Veränderungen, die den meisten Tumoren und Metastasen gemeinsam waren, und schlossen auf einen gemeinsamen klonalen Ursprung in der frühen Phase. In 69% entsprachen sich die Muster von Primärtumor und Metastase, in 31% unterschied sich das Aberrationsmuster aber nahezu komplett.

Identisch waren Primärtumor und Metastase nie. Für die Heterogenität wurde eine genetische Instabilität verantwortlich gemacht, die charakteristisch für Progression und Metastasierung scheint. Bislang konnte aber kein lineares Progressionsmodell wie z.B. beim kolorektalen Karzinom beschrieben werden (Kuukasjarvi et al., 1997a).

Studien unter Verwendung von Mikrodissektionstechniken

In den oben genannten Studien wurde DNA aus heterogenem Tumorgewebe isoliert. Durch die DNA von normalen Zellen können chromosomale Imbalancen maskiert werden (Aubele et al., 1999; Kallioniemi et al., 1994b) was bei Anwendung von Mikrodissektionstechniken verhindert wird.

Ebenfalls ermöglichen Mikrodissektionstechniken die Analyse verschiedener Progressionsstadien innerhalb eines Tumors, wie z.B. den Vergleich von Aberrationsmustern von duktalem Carcinoma in situ (DCIS) mit dem Aberrationsmuster von IDC. Das DCIS ist eine sog. Precursorläsion des IDC, die kritischen genetischen Ereignisse der Progression sind aber bislang unbekannt (Aubele et al., 2000a). Einige Studien konnten Hinweise auf mögliche Progressionsvorgänge liefern (Aubele et al., 2000b; Aubele et al., 2000a; James et al., 1997; Kuukasjarvi et al., 1997b; Werner et al., 1999).

James et al. führten CGH Untersuchungen an 9 DCIS durch. Sie fanden beim DCIS im Vergleich zu veröffentlichten Studien am IDC (Kallioniemi et al., 1994a; Muleris et al., 1994; Ried et al., 1995) weniger Aberrationen pro Fall, aber der Großteil der Veränderungen entsprach den für das IDC bereits beschriebenen. Diese Beobachtungen legten die Vermutung nahe, dass das DCIS eine präinvasive Precursorläsion für das IDC ist (James et al., 1997) .

Kuukasjärvi et al. fanden ebenfalls eine überwiegende Übereinstimmung zwischen DCIS und IDC, was auf einen gemeinsamen klonalen Ursprung hinweist, jedoch zeigten DCIS genetische Aberrationen, die im IDC nicht vorkamen (Zugewinn auf Chromosom Xq), was wiederum gegen ein einfaches, lineares Progressionsmodell spricht (Kuukasjarvi et al., 1997b).

Buerger et al. untersuchten 38 DCIS mittels Mikrodissektion und CGH und verglichen diese mit Daten von 100 IDC. Sie stellten fest, dass das DCIS genetisch weit

fortgeschritten und als direkte genetische Precursorläsion des IDC anzusehen ist. Ein Verlust auf Chromosom 16q22-24 schien ausschließlich für das DCIS charakteristisch zu sein (Buerger et al., 1999a). Auf die Mikrodissektion wurde nicht näher eingegangen, insofern ist nicht klar, inwieweit ausschließlich DCIS analysiert wurde.

Werner et al. gewannen Tumor-DNA mittels Laser-Mikrodissektion (konfokale Laserscanning Mikroskopie) aus heterogenen Mammakarzinomen von 5 Patientinnen. Herde von intraduktaler Hyperplasie (IH), atypischer duktaler Hyperplasie (ADH), DCIS und IDC wurden getrennt auf Amplifikation von Chromosom 20q13 analysiert. Abgesehen von einem IH-Herd war diese Amplifikation in allen Proben zu finden, die Stärke der Amplifikation nahm mit der Progression zu. Amplifikation von Chromosom 20q13 könnte ein Stimulus für die Bildung von Hyperplasien aus normalem Epithelgewebe sein, der Übergang von niedrig- zu hochgradigen Amplifikationen könnte zur Entstehung der neoplastischen Formen (DCIS, IDC) führen (Werner et al., 1999).

Waldman et al. analysierten 18 primäre DCIS und deren Lokalrezidive, wobei sie eine klonale Verwandtschaft in deren Aberrationsmuster fanden (Waldman et al., 2000).

Aubele et al. arbeiteten mit Laser-Mikrodissektion (P.A.L.M.-Gerät) (siehe 4.1.1.), DOP-PCR und CGH. Die CGH-Experimente an histologisch heterogenen Tumoren von 4 Patientinnen (2 Tumoren mit Duktaler Hyperplasie (DH) und DCIS-Anteil, 2 Tumoren mit großem DCIS-Anteil jeweils *an IDC Herde grenzend*) ergaben, dass in einem Tumorstück einer Patientin heterogene chromosomale Imbalancen auftreten können. Die Heterogenität war in den Abschnitten mit DH am größten. Allen Stadien war ein Zugewinn auf Chromosom 20q gemeinsam, der in allen Proben vorhanden war und bisher für das DCIS nicht beschrieben wurde (Buerger et al., 1999a; Kuukasjarvi et al., 1997b). Das Onkogen AIB (= amplified in breast cancer) wird dort vermutet. Zugewinn auf Chromosom 1 war fast allen DCIS gemeinsam, dagegen in DH seltener. Ebenso war der Verlust auf Chromosom 13 häufig. Die Tatsache, dass konstant vorhandene Veränderungen wie +20q und -13q in den meisten Proben mit DH bereits vorhanden waren, ließ Aubele et al. vermuten, dass dort für die Kanzerogenese wichtige Gene liegen (Aubele et al., 2000b).

Bezüglich dieser Untersuchung stellt sich die Frage, inwiefern es sich bei dem *an IDC angrenzenden DCIS* tatsächlich noch um ein in situ Karzinom handelt und nicht bereits um ein invasives Karzinom, das beispielsweise in seinen Randbereichen intraduktal wächst, was mikroskopisch nur schwer zu beurteilen ist. Um dieses Problem zu berücksichtigen, müssten korrekterweise DCIS und IDC-Herde untersucht werden, die im Tumor mit deutlichem Mindestabstand voneinander entfernt vorliegen, um so tatsächlich reines DCIS bzw. reines IDC zu untersuchen.

Entsprechendes gilt für eine weitere Studie von Aubele et al., in der sie an 7 hochgradigen DCIS (> 4 cm) *mit angrenzendem invasivem Herd* ebenfalls zeigten, dass sich Aberrationsmuster von DCIS und IDC weitgehend entsprachen. Lymphknotenmetastasen zeigten in 3 von 7 Fällen zwar bereits im DCIS und IDC vorkommende Veränderungen (Zugewinne auf den Chromosomen 1q, 7q, 8q, 16, 17, 19, 20q, 21q, 22q und Verluste auf den Chromosomen 4q, 11q, 13q). Bestimmte Veränderungen fanden sich aber ausschließlich in DCIS und IDC und nicht in den Lymphknotenmetastasen (Zugewinne auf den Chromosomen 6p, 14q, 15q und Verluste auf 9p), was für frühe Ereignisse im Karzinogeneseprozess auf diesen Chromosomen spricht. Darüber hinaus schienen für die Lymphknotenmetastasen zusätzliche Verluste auf den Chromosomen 2q, 3q, 5q, 6q, 12, und 16q charakteristisch (Aubele et al., 2000a).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bestimmte Veränderungen wie der Zugewinn auf Chromosom 1 meist in frühen Tumorstadien beobachtet werden und Tumorprogression in der Regel mit einer Zunahme an Aberrationen einhergeht. Bestimmte Aberrationen, wie der Zugewinn auf Chromosom 8q, scheinen mit aggressiven Tumortypen zu korrelieren. Metastasen können sich in ihrem Aberrationsmuster durchaus vom Primärtumor unterscheiden. Das DCIS scheint in seinen genetischen Veränderungen dem IDC bereits sehr ähnlich, was die Bezeichnung Precursor-Läsion auf genetischer Ebene bestätigt. Die Ergebnisse der genannten Studien geben also Hinweise auf Chromosomenabschnitte, die mit der Tumorgenese und -progression assoziiert sind. Dadurch ist die Grundlage zur Suche relevanter Gene geschaffen (Aubele et al., 2000a). Die Diversität der einzelnen Ergebnisse und die stark variierenden Versuchsbedingungen reichen nicht aus, um ein für das Mammakarzinom

vermutetes allgemeingültiges Tumorprogressions-Modell zu bestätigen. Der Beweis eines solchen Modells der malignen Transformation, wie es für das kolorektale Karzinom bereits 1988 von Vogelstein et al. (Vogelstein et al., 1988) entdeckt wurde, steht für das Mammakarzinom noch aus.

Ein wichtiger Schritt in diese Richtung wäre aber zunächst die Etablierung einer einheitlich standardisierten Untersuchungsmethode, die es bislang, wie die Vielzahl und Heterogenität der in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Publikationen zeigt, für das Mammakarzinom noch nicht gibt.

4.7. Schlussfolgerung und weitere Fragestellungen

Anhand der dargestellten CGH-Ergebnisse für DNA von Mammakarzinomen, die mittels LCM gewonnen wurde, konnte gezeigt werden, dass sich die Kombination von LCM und DOP-PCR eignet, um Veränderungen des DNA Gehalts auf genomischer Ebene in der CGH sichtbar zu machen. Aus ca. 1000 mit LCM mikrodissidierten Zellen sind nach Amplifikation der DNA in der DOP-PCR effektive CGH Untersuchungen möglich. Bei der Untersuchung der Entstehung und Progression des Mammakarzinoms sollte es im Gegensatz zu den Arbeiten von Speicher und Kuukasjärvi (Kuukasjärvi et al., 1997c; Speicher et al., 1993) nicht in erster Linie um eine Minimierung der Menge an analysierter DNA (z.B. für Single-Cell oder Oligo-Cell-PCR) mit Hilfe der Mikrodissidation gehen, sondern vielmehr um die Analyse hochaufgereinigter Tumor-DNA einer Tumor-Subgruppe (in situ Komponente, invasives Karzinom, Lymphknotenmetastase). Die Gewinnung dieser Subgruppen-DNA aus heterogenem Tumormaterial ist mittels der LCM möglich.

Bislang konnten die erfolgten Studien nur Hinweise auf möglicherweise in den Tumorentstehungsprozess verwickelte Onkogene und Tumorsuppressorgene geben. Für systematische, biometrisch abgesicherte Analysen und die Bestätigung und genauere Kenntnis eines Tumorprogressions-Modells für das Mammakarzinom entsprechend dem des kolorektalen Karzinoms ist als nächster Schritt eine groß angelegte Studie erforderlich. Voraussetzung hierfür ist zunächst eine klare Subgruppenbildung nach klinischen und pathologischen Parametern und die Analyse reiner DNA einer exakt

charakterisierten Tumorerkrankung, die z.B. mittels LCM gewonnen werden kann, ebenso wie eine Standardisierung der CGH-Analysen, die aufbauend auf die Erfahrungen dieser Arbeit erfolgen kann. Hierfür steht an der Tübinger Frauenklinik eine Tumorerkrankungs-Frischgewebekbank zur Verfügung, deren Tumoren pathologisch und klinisch gut erfasst sind. Für eine Studie zum genetischen Unterschied zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase, die dann Rückschlüsse auf das Progressionsverhalten des Mammakarzinoms zulässt, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit der Auswahl und Zusammenstellung geeigneter Tumoren (siehe Tumorentabelle im Anhang 8.4.) und der Etablierung der Methoden LCM, DOP-PCR und CGH an der Universitätsfrauenklinik der Grundstock gelegt.

Auf der Grundlage der CGH-Ergebnisse könnten dann DNA-Chips hergestellt werden, die ein routinemäßiges Screening des Mammakarzinoms auf für bestimmte Progressionsstufen charakteristische Onkogene und Tumorsuppressorgene ermöglichen würden. Einen ersten Schritt in diese Richtung gingen bereits Daigo et al., denen es gelang, mittels eines 57 Onkogene enthaltenden CGH Microarrays (hergestellt mit Hilfe einer Lasermikrodissektionstechnik und DOP-PCR) 28 in Paraffin eingebettete Mammakarzinomproben zu screenen. Der Vergleich der Ergebnisse mit herkömmlichen CGH- und FISH-Analysen ohne Mikrodissektion und DOP-PCR zeigte, dass in beiden Experimenten identische Amplifikationen gefunden wurden, was für die Eignung dieser Microarrays zu sprechen schien (Daigo et al., 2001).

Mit Hilfe solcher Techniken könnten in Zukunft aggressive Tumoren frühzeitig von weniger malignen Tumoren differenziert und die Therapie entsprechend wirkungsvoll abgestimmt und ergänzt werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Mammakarzinom ist sowohl von seinem klinischen als auch von seinem molekularzytogenetischem Erscheinungsbild ein heterogener Tumor. Daher ist eine genaue Kenntnis der auftretenden Defekte auf molekulargenetischer Ebene für eine verbesserte Diagnostik und für eine effektive, individualisierte Therapie von wesentlicher Bedeutung.

Differentielle DNA-Analysen dienen der Entdeckung neuer Tumormarker und Tumoreigenschaften. Für exakte Analysen sind effektive Mikrodissektionstechniken erforderlich. Tumorgewebe ist heterogen und von Bindegewebszellen und anderen Zellen durchsetzt. Um Rückschlüsse auf die Tumorentstehung und -progression ziehen und charakteristische Veränderungen bestimmter Progressionsstadien identifizieren zu können, muss die untersuchte Tumor-DNA einen hohen Reinheitsgrad aufweisen. Mit Hilfe von effektiven Mikrodissektionstechniken können gezielt nur die interessierenden Tumorzellen gewonnen und damit die Qualität der folgenden Untersuchungen verbessert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund dieser Zusammenhänge zur Untersuchung genetischer Aberrationen des duktal invasiven Mammakarzinoms die Laser Capture Microdissection (LCM), eine neue Laser-Mikrodissektionstechnik, eingesetzt, die die Analyse hochreinen Tumormaterials ermöglicht. Für die 1996 erstmals publizierte LCM bestanden keine Vorerfahrungen, die Universitätsfrauenklinik verfügte als erste Einrichtung in Deutschland über ein LCM-Gerät der Firma Arcturus (USA). Für die weitere DNA-Analyse wurde die LCM im Rahmen dieser Arbeit mit der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH) kombiniert. Diese Kombination ist bisher für das duktal invasive Mammakarzinom in der Literatur nicht beschrieben.

Im Rahmen der Arbeit wurden vorbereitende Schritte der LCM optimiert, da sich zeigte, dass die Qualität und Art der Gefrierschnittpräparation und Färbung den Erfolg der LCM wesentlich beeinflussten.

Um CGH-Experimente an DNA aus mittels LCM disseziertem Gewebe durchführen zu können, musste ein geeignetes DNA-Isolationsverfahren etabliert werden. Hierfür

erwies sich die Isolation in PCR-Puffer mit anschließendem Proteinase K Verdau als bestes Verfahren. Die DOP-PCR wurde an die Versuchsbedingungen angepasst, um aus geringen DNA-Mengen von mikrodissiziertem Tumorgewebe eine für die CGH ausreichende DNA-Menge zu erhalten. In einem nächsten Schritt wurde die Nicktranslation, in der die Tumor-Proben- und die Plazenta-Referenz-DNA unterschiedlich markiert werden, etabliert. Dies war Voraussetzung für die CGH, für die unterschiedlich markierte Tumor- und Plazenta-DNA in gleichem Verhältnis gemischt und auf Metaphasen hybridisiert wird, wo sie um homologe Bindungsstellen konkurriert. Die Etablierung dieser Technik war ebenfalls essentieller Bestandteil der Arbeit.

Es konnte gezeigt werden, dass CGH-Experimente aus mit LCM mikrodissizierten Zellen (ca. 1000) effektiv durchgeführt werden konnten. Zwei Primärtumoren wurden intensiv untersucht, ebenso eine Lymphknotenmetastase von einem der beiden Tumoren. Die gefundenen Aberrationen stimmen weitgehend mit Literaturangaben überein. Des Weiteren wurden Experimente mit DNA von einer MCF-7 Zelllinie als Positivkontrolle durchgeführt. Als Negativkontrolle diente gesunde Plazenta-DNA. Mit den dargestellten Ergebnissen konnte die Voraussetzung für weiterreichende CGH-Studien am Mammakarzinom geschaffen werden.

Aufbauend auf die Ergebnisse dieser Arbeit kann nun in einer breit angelegten biometrisch abgesicherten Studie das Mammakarzinom weiterreichend charakterisiert werden. In einer solchen Studie können unter Verwendung von LCM, DOP-PCR und CGH unter Voraussetzung standardisierter Bedingungen nach klarer Subgruppenbildung der einzelnen Precursorläsionen des Mammakarzinoms für bestimmte Progressionsstufen charakteristische Veränderungen als Onkogene und Tumorsuppressorgene identifiziert werden. Diese Erkenntnisse könnten das bereits vermutete Tumorprogressions-Modell entsprechend dem bekannten Modell für das kolorektale Karzinom für das Mammakarzinom bestätigen und damit auf lange Sicht die Diagnostik verbessern und zur Individualisierung der Therapie beitragen.

6. ABKÜRZUNGEN

#	Nummer
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
Aqua bidest	Aqua bidestillata
Biotin-11-dUTP	mit Biotin markiertes dUTP
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CGH	Comparative Genomische Hybridisierung
Cl	Chlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
Digoxigenin-11-dUTP	mit Digoxigenin markiertes dUTP
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat (enthält dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Deosxyuridintriphosphat
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FITC	Fluoresceinisothiocanat
g	Gramm
gDNA	Genomische DNA
h	Stunde

H ₂ O	Wasser
IDC	Duktal invasives Karzinom
Konz.	Konzentration
l	Liter
LCM	Laser Capture Microdissection
LOH	Loss of heterozygosity
LS	Längenstandard
M	molar (mol/l)
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
msec	Millisekunde
mW	Milliwatt
Na	Natrium
ng	Nanogramm
nmol	Nanomol
NP-40	Nonidet 40 (Detergens)
OCT	Gefriereinbettmedium
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatpuffer)
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfat) (Detergens)
sec	Sekunde
SSC	Saline sodium citrat buffer
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure
TE	Tris-Ethylendiamintetraessigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett

7. LITERATURVERZEICHNIS

Ansari-Lari, M. A., Jones, S. N., Timms, K. M., and Gibbs, R. A. (1996). Microdissection RT-PCR analysis of gene expression in pathologically defined frozen tissue sections. *BioTechniques* 21, 38-43.

Aubele, M., Cummings, M., Walch, A., Zitzelsberger, H., Nahrig, J., Hofler, H., and Werner, M. (2000b). Heterogeneous chromosomal aberrations in intraductal breast lesions adjacent to invasive carcinoma. *Anal. Cell. Path.* 20, 17-24.

Aubele, M., Mattis, A., Zitzelsberger, H., Walch, A., Kremer, M., Hutzler, P., Hofler, H., and Werner, M. (1999). Intratumoral heterogeneity in breast carcinoma revealed by laser-microdissection and comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 110, 94-102.

Aubele, M., Mattis, A., Zitzelsberger, H., Walch, A., Kremer, M., Welzl, G., Hofler, H., and Werner, M. (2000a). Extensive ductal carcinoma In situ with small foci of invasive ductal carcinoma: evidence of genetic resemblance by CGH. *Int J Cancer* 85, 82-6.

Aubele, M., and Werner, M. (1999). Heterogeneity in breast cancer and the problem of relevance of findings. *Anal Cell Pathol* 19, 53-8.

Aubele, M., Zitzelsberger, H., Schenck, U., Walch, A., Hofler, H., and Werner, M. (1998). Distinct cytogenetic alterations in squamous intraepithelial lesions of the cervix revealed by laser-assisted microdissection and comparative genomic hybridization. *Cancer* 84, 375-9.

Baisse, B., Bian, J.-S., and Benhattar, J. (2000). Microdissection by exclusion and DNA extraction for multiple PCR analysis from archival tissue sections. *BioTechniques* 28.

Banks, R. E., Dunn, M. J., Forbes, M. A., Stanley, A., Pappin, D., Naven, T., Gough, M., Harnden, P., and Selby, P. J. (1999). The potential use of laser capture microdissection to selectively obtain distinct populations of cells for proteomic analysis-preliminary findings. *Electrophoresis* 20, 689-700.

Becker, I., Becker, K. F., Rohrl, M. H., Minkus, G., Schutze, K., and Hofler, H. (1996). Single-cell mutation analysis of tumors from stained histologic slides. *Lab Invest* 75, 801-7.

Beckmann, M. W., Niederacher, D., Schnürch, H. G., Gusterson, B. A., and Bender, H. G. (1997). Multistep carcinogenesis in breast cancer and tumor heterogeneity. *J Mol Med* 75, 429-439.

Blackwood, A., and Weber, B. L. (1998). From molecular genetics to clinical medicine. *J Clin Oncol* 16, 1969-1977.

Bonner, R. F., Emmert Buck, M., Cole, K., Pohida, T., Chuaqui, R., Goldstein, S., and Liotta, L. A. (1997). Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science* 278, 1481,1483.

Buerger, H., Otterbach, F., Simon, R., Poremba, C., Diallo, R., Decker, T., Riethdorf, L., Brinkschmidt, C., Dockhorn Dworniczak, B., and Boecker, W. (1999a). Comparative genomic hybridization of ductal carcinoma in situ of the breast-evidence of multiple genetic pathways. *J Pathol* 187, 396-402.

Buerger, H., Otterbach, F., Simon, R., Schafer, K. L., Poremba, C., Diallo, R., Brinkschmidt, C., Dockhorn Dworniczak, B., and Boecker, W. (1999b). Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes. *J Pathol* 189, 521-6.

Burger, H., Poremba, C., Diallo, R., Dockhorn-Dworniczak, B., and Bocker, W. (2000b). Establishing a cytogenetic and morphological progression models of invasive breast cancer. Comparative genomic hybridization (CGH) in malignant and premalignant tumors of the female breast. *Pathologie* 21 (5), 375-82.

Conia, J., Edwards, B. S., and Voelkel, S. (1997). The micro-robotic laboratory: optical trapping and scissoring for the biologist. *journal of clinical laboratory analysis* 11, 28-38.

Consensus-Conference (1997). Consensus Conference on the classification of ductal carcinoma in situ. *Hum Pathol* 28, 1221-1225.

Couch, F. J., and L., W. B. (1998). Breast Cancer. In *The basis of human cancer*, M. G. Hill, ed. (New York, pp. 537-564.

Courjal, F., and Theillet, C. (1997). Comparative genomic hybridization analysis of breast tumors with predetermined profiles of DNA amplification. *Cancer Res* 57, 4368-77.

Craven, R. A., and Banks, R. E. (2001). Laser capture microdissection and proteomics: possibilities and limitation. *Proteomics* 1, 1200-4.

Daigo, Y., Chin, S. F., Gorringe, K. L., Bobrow, L. G., Ponder, B. A., Pharoah, P. D., and Caldas, C. (2001). Degenerate oligonucleotide primed-polymerase chain reaction-based array comparative genomic hybridization for extensive amplicon profiling of breast cancers : a new approach for the molecular analysis of paraffin-embedded cancer tissue. *Am J Pathol* 158, 1623-31.

Donegan, W. L. (1997). Tumor related prognostic factors for breast cancer. *CA Cancer J Clin* 47, 28-51.

du Manoir, S., Speicher, M. R., Joos, S., Schrock, E., Popp, S., Dohner, H., Kovacs, G., Robert Nicoud, M., Lichter, P., and Cremer, T. (1993). Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet* 90, 590-610.

Emmert Buck, M. R., Bonner, R. F., Smith, P. D., Chuaqui, R. F., Zhuang, Z., Goldstein, S. R., Weiss, R. A., and Liotta, L. A. (1996). Laser capture microdissection [see comments]. *Science* 274, 998-1001.

Fend, F., Kremer, M., and Quintanilla-Martinez, L. (2000). Laser capture microdissection: methodical aspects and applications with emphasis on immuno-laser capture microdissection. *Pathobiology* 68, 209-14.

Fend, F., Quintanilla Martinez, L., Kumar, S., Beaty, M. W., Blum, L., Sorbara, L., Jaffe, E. S., and Raffeld, M. (1999). Composite low grade B-cell lymphomas with two immunophenotypically distinct cell populations are true biclonal lymphomas. A molecular analysis using laser capture microdissection. *Am J Pathol* 154, 1857-66.

Forozan, F., Karhu, R., Kononen, J., Kallioniemi, A., and Kallioniemi, O. P. (1997). Genome screening by comparative genomic hybridization. *Trends Genet* 13, 405-9.

Going, J. J., and Lamb, R. F. (1996). Practical histological microdissection for PCR analysis. *J Pathol* 179, 121-4.

Gray, J. W., Collins, C., Henderson, I. C., Isola, J., Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Nakamura, H., Pinkel, D., Stokke, T., Tanner, M., and et al. (1994). Molecular cytogenetics of human breast cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 59, 645-52.

Gupta, S. K., Douglas Jones, A. G., and Morgan, J. M. (1997). Microdissection of stained archival tissue. *Mol Pathol* 50, 218-20.

Harris, J. R., Morrow, M., and Bonadonna, G. (1993). Cancer of the breast. In *Cancer - Principles and Practice of Oncology*, V. T. DeVita, S. Hellman and A. Rosenberg, eds. (Philadelphia: Lippincott).

Hermsen, M. A., Baak, J. P., Meijer, G. A., Weiss, J. M., Walboomers, J. W., Snijders, P. J., and van Diest, P. J. (1998). Genetic analysis of 53 lymph node-negative breast carcinomas by CGH and relation to clinical, pathological, morphometric, and DNA cytometric prognostic factors. *J Pathol* 186, 356-62.

Hermsen, M. A., Meijer, G. A., Baak, J. P., Joenje, H., and Walboomers, J. J. (1996). Comparative genomic hybridization: a new tool in cancer pathology. *Human pathology* 27, 342-349.

Holford TR, R. G., McKay (1991). Trend in female breast cancer in Connecticut and the United States. *J Clin Epidemiol* 44, 29.

Houldsworth, J., and Chaganti, R. S. (1994). Comparative genomic hybridization: an overview [comment]. *Am J Pathol* 145, 1253-60.

Huang, Q., Schantz, S. P., Rao, P. H., Mo, J., McCormick, S. A., and Chaganti, R. S. (2000). Improving degenerate oligonucleotide primed PCR-comparative genomic

hybridization for analysis of DNA copy number changes in tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 28, 395-403.

Isola, J., DeVries, S., Chu, L., Ghazvini, S., and Waldman, F. (1994). Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples [see comments]. *Am J Pathol* 145, 1301-8.

Isola, J. J., Kallioniemi, O. P., Chu, L. W., Fuqua, S. A., Hilsenbeck, S. G., Osborne, C. K., and Waldman, F. M. (1995). Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization predict outcome in node-negative breast cancer. *American Journal of Pathology* 147, 905-911.

James, L. A., Mitchell, E. L., Menasce, L., and Varley, J. M. (1997). Comparative genomic hybridisation of ductal carcinoma in situ of the breast: identification of regions of DNA amplification and deletion in common with invasive breast carcinoma. *Oncogene* 14, 1059-65.

Jones, C., Foschini, M. P., Chaggar, R., Lu, Y. J., Wells, D., Shipley, J. M., Eusebi, V., and Lakhani, S. R. (2000b). Comparative genomic hybridization analysis of myoepithelial carcinoma of the breast. *Lab Invest* 80, 831-6.

Jones, C., Payne, J., Wells, D., Delhanty, J. D., Lakhani, S. R., and Kortenkamp, A. (2000a). Comparative genomic hybridization reveals extensive variation among different MCF-7 cell stocks. *Cancer Genet Cytogenet* 117, 153-8.

Joos, S., Küpper, M., Ohl, S., von Bonin, F., Mechttersheimer, G., Bentz, M., Marynen, P., Möller, P., Pfreundschuh, M., Trümper, L., and Lichter, P. (2000). Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30+ hodgkin cells. *Cancer Research* 60, 549-552.

Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Piper, J., Tanner, M., Stokke, T., Chen, L., Smith, H. S., Pinkel, D., Gray, J. W., and Waldman, F. M. (1994a). Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2156-2160.

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, 818-21.

Kallioniemi, O. P., Kallioniemi, A., Piper, J., Isola, J., Waldman, F. M., Gray, J. W., and Pinkel, D. (1994b). Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 10, 231-43.

Kuukasjarvi, T., Karhu, R., Tanner, M., Kakonen, M., Schaffer, A., Nupponen, N., Pennanen, S., Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., and Isola, J. (1997a). Genetic heterogeneity and clonal underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. *Cancer Research* 57, 1597-1604.

- Kuukasjarvi, T., Tanner, M., Pennanen, S., Karhu, R., Kallioniemi, O. P., and Isola, J. (1997b). Genetic changes in intraductal breast cancer detected by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* *150*, 1465-71.
- Kuukasjarvi, T., Tanner, M., Pennanen, S., Karhu, R., Visakorpi, T., and Isola, J. (1997c). Optimizing DOP-PCR for universal amplification of small DNA samples in comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* *18*, 94-101.
- Kytola, S., Rummukainen, J., Nordgren, A., Karhu, R., Farnebo, F., Isola, J., and Larsson, C. (2000). Chromosomal alterations in 15 breast cancer cell lines by comparative genomic hybridization and spectral karyotyping. *Genes Chromosomes Cancer* *28*, 308-317.
- Luzzi, V., Holtschlag, V., and Watson, M. A. (2001). Expression profiling of ductal carcinoma in situ by laser capture microdissection and high-density oligonucleotide arrays. *Am J Pathol* *158*, 2005-10.
- Moskaluk, C. A., and Kern, S. E. (1997). Microdissection and polymerase chain reaction amplification of genomic DNA from histological tissue sections. *Am J Pathol* *150*, 1547-52.
- Muleris, M., Almeida, A., Gerbault-Seureau, M., Malfoy, B., and Dutrillaux, B. (1994). Detection of DNA amplification in 17 primary breast carcinomas with homogeneously staining regions by modified comparative genomic hybridization technique. *Genes, Chromosomes, Cancer* *10*, 160-170.
- Murphy, D. S., McHardy, P., Coutts, J., Mallon, E. A., George, W. D., Kaye, S. B., Brown, R., and Keith, W. N. (1995). Interphase cytogenetic analysis of erbB2 and topo2a co-amplification in invasive breast cancer and polysomy of chromosome 17 in ductal carcinoma in situ. *International Journal of Cancer* *64*, 18-26.
- Nishizaki, T., DeVries, S., Chew, K., Goodson, W. H., 3rd, Ljung, B. M., Thor, A., and Waldman, F. M. (1997). Genetic alterations in primary breast cancers and their metastases: direct comparison using modified comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* *19*, 267-72.
- Ornstein, D. K., Englert, C., Gillespie, J. W., Paweletz, C. P., Linehan, W. M., Emmert Buck, M. R., and Petricoin, E. F., 3rd (2000). Characterization of intracellular prostate-specific antigen from laser capture microdissected benign and malignant prostatic epithelium. *Clin Cancer Res* *6*, 353-6.
- Persson, K., Pandis, N., Mertens, F., Borg, A., Baldetorp, B., Killander, D., and Isola, J. (1999). Chromosomal aberrations in breast cancer: a comparison between cytogenetics and comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* *25*, 115-22.

- Petersen, I., Schwendel, A., Bockmuhl, U., and Dietel, M. (1996). [Comparative genomic hybridization. A screening method in genetic tumor diagnosis]. *Pathologe* 17, 333-41.
- Peterson, L. A., Brown, M. R., Carlisle, A. J., Kohn, E. C., Lance, A. L., Emmert-Buck, M., and Krizman, D. B. (1998). An improved method for construction of directionally cloned cDNA librereis from microdissected cells. *Cancer research* 58, 5326-5328.
- Rapley, R., and Walker, J. M. (1998). *Molecular Biomethods Handbook* (Totowa: Humana Press Inc.).
- Ried, T., Just, K. E., Holtgreve Grez, H., du Manoir, S., Speicher, M. R., Schrock, E., Latham, C., Blegen, H., Zetterberg, A., Cremer, T., and et al. (1995). Comparative genomic hybridization of formalin-fixed, paraffin-embedded breast tumors reveals different patterns of chromosomal gains and losses in fibroadenomas and diploid and aneuploid carcinomas. *Cancer Res* 55, 5415-23.
- Schmidt-Matthiesen, H., Bastert, G., and Wallwiener, D. (2000). *Gynäkologische Onkologie* (Stuttgart: Schattauer).
- Schutze, K., Posl, H., and Lahr, G. (1998). Laser micromanipulation systems as universal tools in cellular and molecular biology and in medicine. *Cell Mol Biol Noisy le grand* 44, 735-46.
- Sgroi, D. C., Teng, S., Robinson, G., LeVangie, R., Hudson, J. R., and Elkahloun, A. G. (1999). In vivo gene expression profile analysis of human breast cancer progression. *Cancer Res* 59, 5656-5661.
- Shibata, D. (1994). Extraction of DNA from paraffin-embedded tissue for analysis by polymerase chain reaction: new tricks from an old friend. *Hum Pathol* 25, 561-3.
- Shibata, D. (1993). Selective ultraviolet radiation fractionation and polymerase chain reaction analysis of genetic alterations. *Am J Pathol* 143, 1523-6.
- Shibata, D. (1998). The SURF technique. Selective genetic analysis of microscopic tissue heterogeneity. *Methods Mol Biol* 92, 39-47.
- Simone, N. L., Bonner, R. F., Gillespie, J. W., Emmert Buck, M. R., and Liotta, L. A. (1998). Laser-capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis. *Trends Genet* 14, 272-6.
- Simone, N. L., Paweletz, C. P., Charboneau, L., Petricoin, E. F. r., and Liotta, L. A. (2000b). Laser capture microdissection: beyond functional genomics to proteomics. *Mol Diagn* 2000 5, 301-7.
- Speicher, M. R., du Manoir, S., Schrock, E., Holtgreve Grez, H., Schoell, B., Lengauer, C., Cremer, T., and Ried, T. (1993). Molecular cytogenetic analysis of formalin-fixed,

paraffin-embedded solid tumors by comparative genomic hybridization after universal DNA-amplification. *Hum Mol Genet* 2, 1907-14.

Telenius, H., Carter, N. P., Bebb, C. E., Nordenskjold, M., Ponder, B. A., and Tunnacliffe, A. (1992a). Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13, 718-25.

Telenius, H., Pelmear, A. H., Tunnacliffe, A., Carter, N. P., Behmel, A., Ferguson Smith, M. A., Nordenskjold, M., Pfragner, R., and Ponder, B. A. (1992b). Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer* 4, 257-63.

Tirkkonen, M., Tanner, M., Karhu, R., Kallioniemi, A., Isola, J., and Kallioniemi, O. P. (1998). Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. *Genes Chromosomes Cancer* 21, 177-84.

Turbett, G. R., Barnett, T. C., Dillon, E. K., and Sellner, L. N. (1996). Single-tube protocol for the extraction of DNA or RNA from paraffin-embedded tissues using a starch-based adhesive. *BioTechniques* 20, 846-851.

Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nahaam, Y., White, R., Smits, A. M., and Bos, J. L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *New England Journal of Medicine* 319, 525-532.

Waldman, F. M., DeVries, S., Chew, K. L., Moore, D. H., Kerlikowske, K., and Ljung, B. M. (2000). Chromosomal alterations in ductal carcinomas in situ and their in situ recurrences. *Journal of the national cancer institute* 92, 313-320.

Waldmann, F. M., Sauter, G., Sudar, D., and Thompson, C. T. (1996). Molecular cytometry of cancer. *Human pathology* 27, 441-449.

Werner, M., Mattis, A., Aubele, M., Cummings, M., Zitzelsberger, H., Hutzler, P., and Hofler, H. (1999). 20q13.2 Amplification in intraductal hyperplasia adjacent to in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *VIRCHOWS ARCHIV AN INTERNATIONAL JOURNAL OF PATHOLOGY* 435, 469-472.

Wulfkühle, J. D., McLean, K. C., Paweletz, C. P., Sgroi, D. C., Trock, B. J., Steeg, P. S., and Petricoin, E. F. r. (2001). New approaches to proteomic analysis of breast cancer. *Proteomics* 1, 1205-15.

Zhuang, Z., Bertheau, P., Emmert Buck, M. R., Liotta, L. A., Gnarra, J., Linehan, W. M., and Lubensky, I. A. (1995). A microdissection technique for archival DNA analysis of specific cell populations in lesions < 1 mm in size. *Am J Pathol* 146, 620-5.

8. ANHANG

8.1. Substanzen

EDTA	Merck
Eisessig	Universitätsapotheke
Ethidiumbromid (1 mg/ml)	Fluka
NaAcetat	Fluka
NaCl	Merck
NaDihydrogenphosphat	Fluka
NaHydrogenphosphat	Fluka
TriNaCitratdihydrat	Merck
Tris	Sigma

8.2. Puffer

50x TAE:	121 g Tris (2 M) 28,55 ml Eisessig 50 ml 0,5M EDTA (pH 8,0) auf 500 ml auffüllen pH auf 7,2 einstellen
1x TAE:	20 ml 50x TAE 980 ml aqua bidest
1M TRIS pH 8,0:	M=121,1 g/mol 60,55 g 500 ml Aqua bidest pH mit 0,1 M HCl auf 8,0 einstellen

0,5 M EDTA pH 8,0:	M=292,25 g/mol 73,06 g EDTA 500 ml H ₂ O Mit 10 M NaOH auf pH 8,0
5 M NaCl	M=58,44 g/mol 2,92 g NaCl 10ml Aqua bidest
20% SDS	M=288,38 g/mol 2,88 g SDS 50 ml Aqua bidest
20x SSC	NaCl (M=58,44 g/mol) 175,3 g (3 M) TriNaCitratDihydrat (M=294,10 g/mol) 88,4 g (0,3 M) Add 1000 ml mit Aqua bidest Mit 1 M HCl auf pH 7,0 einstellen
0,5 M NaPhosphatpuffer	0,5 M NaDihydrogenPhosphat (M=156 g/mol) 39 g NaH ₂ PO ₄ 500 ml Aqua bidest 0,5 M NaHydrogenPhosphat 44,5 g Na ₂ HPO ₄ 500 ml Aqua bidest Na ₂ HPO ₄ mit NaH ₂ PO ₄ im Verhältnis 2:1 mischen Mit einer der beiden Lösungen pH auf 7,0 einstellen
10x DNA Ladepuffer	25% Glycerin 2,5 ml 0,2% Phenolblau 20 mg 2x TAE 44 µl 50x TAE add 10 ml mit aqua bidest

8.3. Geräte

Heizblöcke	Boekel, Uniequip
Hybridisierungssofen	Amersham
Kühlzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5417R
Magnetrührer	Heidolph
Minizentrifuge	National Labnet
PH-Meter pH 526	WTW
Photometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech
Thermocycler	GeneAmp PCR System 9700, Perkin Elmer
Vortexer	Heidolph
Waage	Kern

8.4. Tumorentabelle

Tab 8.1: Zusammenstellung der für die Arbeit geeigneten Mammakarzinome (Frischgewebe) aus der Frischgewebe-Tumorbank der Universitätsfrauenklinik mit Angaben zum *Typ der Probe* (P = Primärtumor, LK = Lymphknotenmetastase jeweils derselben Patientin), *Alter der Patientin* zum OP-Zeitpunkt, *Histologie-Typ* (IDC = invasives duktales Karzinom, DCIS = duktal invasives Carcinoma in situ, ILC = lobulär invasives Karzinom, LCIS = lobulär invasives Carcinoma in situ, Comedo-Karzinom = IDC mit intraduktalen Nekrosen), *pTNM-Klassifikation* und *Grading* (Differenzierung der Tumorzellen)

Probe	Typ	Alter OP	Histologie-Typ	pTNM-Stadium	Grading
#TÜ16	P	59	LCIS mit inv.Anteilen, Fibroadenom	pT1a(23mm) pN0(12/0) pMx R0 L0	G2
#TÜ17	LK	59			
#TÜ57	P	75	IDC mit DCIS	pT1c(13mm) pN1bi(12/4) R1 L0	G2
#TÜ57a	LK	75			
#TÜ70	P	34	IDC mit DCIS (Comedo)	pT1c(15mm) pN1bi(13/2) pMx R0 L0	G2
#TÜ72	LK	34			
#TÜ71	P	63	IDC	pT2(25mm) pN1bi(14/2) pMx R0 L0	G2
#TÜ73	LK				
#TÜ76	P		IDC (bifokal)	pT1c(13/9mm) pN0(20/0) pMx L0 R0	G2
#TÜ78	LK				
#TÜ85	P	42	DCIS hochmaligne (Nys-Index 8)	pTis pN0 R0 L0	
#TÜ86	LK				

Probe	Typ	Alter OP	Histologie-Typ	TNM-Stadium	Grading
#TÜ87	P	83	ILC (bifokal)	pT2(25/20mm) pN1biii(10/7) pMx R0 L1	G2
#TÜ88	LK		Lymphangiosis carcinomatosa, Kapselüberschreitung		
#TÜ89	P	61	LK 10/7		
#TÜ90	LK		IDC mit DCIS, Fibroadenom	pT1b(6mm) pNo(12/0) pMx L0 R0	G2
#TÜ89x	P	76	ILC (Z. n. Chemo)	ypT1c(17mm) ypN1a(25/2) ypMx L0 R0	G2
#TÜ92x	LK				
#TÜ143	P	74	IDC mit DCIS (Comedo)	pT1c(1,7cm) pN0(5/0) R0 L0	G2
#TÜ144	LK				
#TÜ152	P	58	IDC, Mikrokalk	pT1c(1,2cm) pN1biv(9/1) pMx L0 R0	G2
#TÜ153	LK				
#TÜ201	P	58	IDLC mit DCIS	pT3(5,5cm) pN1biii(26/12) pMx L0 R0	G2
#TÜ202	LK		LK 26/12		
#TÜ208	P	61	IDC (Desmoplasie) mit DCIS	pT2(2,2cm) pN1biii(11/19) pMx L0 R0	G2
#TÜ209	LK		LK11/1		
#TÜ216	P	51	IDLC	pT2(50mm) pN1biii(18/4) pMx L0 R0	G2- G3
#TÜ217	LK		LK 18/4		
#TÜ227	P	54	medulläres Mamma- CA	pT2(2,2cm) pNo(7/0) L0 R0	
#TÜ228	LK				
#TÜ231	P	72	IDLC	pT2(23mm) pN0(22/0) pMx L0 R0	G2
#TÜ232	LK				
#TÜ234	P	61	IDC (bifokal)	pT1c(17/14mm) pN0(19/0) pMx L0 R1	G2
#TÜ235	LK				

Tab. 8.2: Zusammenstellung von verschiedenen bislang identifizierten Prognosemarkern der Tumoren aus Tab. 8.1, die routinemäßig von der Pathologie mitbestimmt werden. *Hormonrezeptorstatus für Östrogen- und Progesteronrezeptoren:* Rezeptorpositive Tumoren sind low-risk Tumoren, bessere Prognose, da endokrine Therapie (z.B. mit Antiöstrogen Tamoxifen) erfolgreich; *Onkogen HER/2neu (c-erbB2):* Bestimmung einer evtl. Überexpression mittels immunhistochemischer Nachweis, mit schlechter Prognose assoziiert, aber mit Trastuzumab (Herceptin) günstig zu beeinflussen; *Tumorsuppressorgen p53:* Mutation = ungünstige Prognose; *bcl-2:* Apoptosemarker; *Mib-1:* Proliferationsindex.

Probe	Typ	Hor.rez.status	HER/2neu	p53	bcl2	Mib-1
#TÜ16	P	ER 12=100%; PR 4=50%	1=4%	0	100%	1%
#TÜ17	LK					
#TÜ57	P	ER 12=80%; PR 0	0 =5%	5%	>60%	10%
#TÜ57a	LK					
#TÜ70	P	ER 8=95%; PR 6=70%	3+=100%	2%	100%	30%
#TÜ72	LK					

Probe	Typ	Hor.rez.status	Her2neu	p53	bcl2	Mib-1
#TÜ71	P	ER 12=>80%; PR 9=70%	3+=30%	50%	30%	20%
#TÜ73	LK					
#TÜ76	P	ER 12=>80%; PR 4=10%	3+=80%	5%	100%	10%
#TÜ78	LK					
#TÜ85	P	ER 0; PR 0	0	0	0	0
#TÜ86	LK					
#TÜ87	P	ER 12=>80%; PR 0	0	60%	0	5%
#TÜ88	LK					
#TÜ89	P					
#TÜ90	LK	ER 12=100%; PR 4=30%	1+	<1%	100%	10%
#TÜ89x	P					
#TÜ92x	LK					
#TÜ143	P	ER 4=>80%; PR 0	0	80%	<5%	20%
#TÜ144	LK					
#TÜ152	P	ER 0; PR 0	95%	10%	0	60%
#TÜ153	LK					
#TÜ201	P					
#TÜ202	LK					
#TÜ208	P	ER 8=95%; PR 2=40%	0	<1%	100%	2%
#TÜ209	LK					
#TÜ216	P	ER 2=30%; PR 0	3+=80%	5%	80%	30%
#TÜ217	LK					
#TÜ227	P	ER 12=>80%; PR 6=30%	3+	50%	30%	35%
#TÜ228	LK					
#TÜ231	P	ER 12=100%; PR 1=5%	3+	0	50%	40%
#TÜ232	LK					
#TÜ234	P	ER 1=10%; PR 4=40%	3+	<1%	100%	5%
#TÜ235	LK					

Danksagung

Ich danke ganz herzlich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. D.Wallwiener für das Überlassen des Themas und für die Annahme als Doktorandin an der Frauenklinik.

Dr. Raffael Kurek danke ich für die Ideen, die Anlass für diese Arbeit waren, seine Betreuung und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Besonderer Dank geht an Verena Henkel, die mir die Molekularbiologie auf sehr angenehme Weise näherbrachte, ständig ein offenes Ohr und ein motivierendes Wort hatte und immer da war, wenn ich sie brauchte. Das gemeinsame Arbeiten, Bergsteigen und Skifahren war der Beginn einer Freundschaft, die wir uns hoffentlich trotz der räumlichen Entfernung und des unterschiedlichen Alltags noch lange erhalten können.

Außerdem danke ich Dr. Peter Benöhr, meinem Betreuer im Labor, der Verena und mir sein Labor auf dem Berghof zur Mitbenutzung überließ. Er nahm sich trotz seiner vielen Aktivitäten immer Zeit, sich mit anstehenden Fragen und Problemen zu beschäftigen und half mit seiner großen Laborerfahrung, so manche methodische Hürde zu nehmen.

Dr. Robert Emig danke ich für das Beurteilen der CGH-Ergebnisse.

Mein Dank geht auch nach Ulm zu Herrn PD Dr. M. Benz und Frau Martina Enz (Abteilung Hämatologie und Onkologie der Universität Ulm) für das Erlernen von Nicktranslation und CGH. Es hat sehr viel Spaß gemacht, bei ihnen im Labor zu arbeiten.

Herrn Dr. S. Joos vom DKFZ Heidelberg danke ich für seine Unterstützung und Tips bezüglich der DOP-PCR.

Meinen Freunden in Tübingen danke ich, dass ich ihnen so manches Mal mit meiner Arbeit in den Ohren lag und besonders Janina, die (zu Recht) das Wort "Doktorarbeit" irgendwann nicht mehr hören konnte.

Vor allem danke ich meinen Eltern und meiner Schwester für die vielen motivierenden Gespräche und für ihre Unterstützung in jeder Hinsicht.

Ganz besonders danke ich meinem Freund Uli, der mit viel Zeit, Verständnis und unzähligen Diskussionen wesentlich zu meiner Motivation beigetragen hat.

Lebenslauf

Ute Christine Braig

Persönliches

geboren: 27. Juli 1975 in Reutlingen
 Eltern: Dr. med. Sieglinde Braig-Bücher und Bruno Braig
 Schwester: Dorothee Ulrike (geboren 1977)

Schulbildung

1982 bis 1986 Freie Evangelische Schule Reutlingen
 1986 bis 1995 Isolde-Kurz-Gymnasium Reutlingen
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

Oktober 1995 Immatrikulation an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen im
 Fach Humanmedizin
 August 1997 Ärztliche Vorprüfung
 August 1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 Sept. 1998 Studium an der Université Victor Segalen Bordeaux, Frankreich,
 bis Juni 1999 im Rahmen des Erasmus Programms
 Januar 2000 Beginn der Doktorarbeit an der Universitätsfrauenklinik Tübingen
 Aug/Sept 2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 Oktober 2001 Hochschulwechsel an die Humboldt-Universität zu Berlin,
 Beginn des Praktischen Jahres
 18.Oktober 2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der Humboldt-
 Universität zu Berlin