



**Molekularzytogenetische Identifizierung und
Charakterisierung chromosomaler Aberrationen bei
Osteosarkomzelllinien**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Birte Möhlendick

aus Duisburg

Düsseldorf, Mai 2010

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
(Institutsdirektorin: Prof. Dr. rer. nat. Royer-Pokora)

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. med. Harald Rieder

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. William Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 28.06.2010

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm
AB	Antibiotikum
Abb	Abbildung
ABC	Anaphasenbrückencondensation
aCGH	Array comparative genomic hybridisation, vergleichende genomische Hybridisierung auf DNA-Microarrays
<i>Alu I</i>	<i>Arthrobacter luteus I</i>
AP	Alkalische Phosphatase
BAC	Bacterial artificial chromosome
BFB	Breakage-Fusion-Bridge, Bruch-Fusion-Brücke
bp	Basenpaare
bphs	Banden pro haploidem Chromosomensatz
BSA	Bovine serum albumine, Rinderserumalbumin
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
C	Cytosin
CA3	Chromomycin A3
CAD	Concentrated Antibodies Detection Kit
cDNA	Complementary DNA
CFS	Common Fragile Site, häufige fragile Stellen
CGH	Comparative Genomic Hybridisation, komparative genomische Hybridisierung
Chr	Chromosom
Cl	Chlorid
CT	Computertomographie
Cy3	Cyanin 3
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
dATP	Desoxyadenin-Triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanin-Triphosphat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DMs	Double minutes, Doppelte Kleine
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
DOP-PCR	Degenerate Oligonucleotide Primed-PCR
DSB	Doppelstrangbrüche
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSS	Dextran sulfate sodium, Dextransulfat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
E	Exon
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid)

EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FA	Deionisiertes Formamid
FBS	Fetal bovine serum, Fötales Rinderserum
F-Faktor	Fertilitätsfaktor
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Fix.	Fixativ
FK	Flow Karyotyping, Durchflusszytometrische Karyotypisierung
G	Guanin
GAG	Acetic-Saline- und Giemsa-Chromosomenbandenfärbung
G-Banden	Giemsa-Banden
GTG	Giemsa-Trypsin-Chromosomenbandenfärbung
h	hour(s), Stunde(n)
HCl	Salzsäure
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenzae</i> III
HO	Hoechst 33258
HSRs	Homogeneous staining regions, homogen färbbare Regionen
I	Intron
IF	Immunfluoreszenz
<i>i</i> -PrOH	<i>iso</i> -Propanol, 2-Propanol
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclature
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
konz.	Konzentriert
l	Liter
LB	Lysogeny Broth
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LN ₂	Liquid Nitrogen, flüssiger Stickstoff
Lsg.	Lösung
M	Molar (mol/l); 1 mol= 6.022 x 10 ²³ Teilchen
Mb	Megabasen
MDCAC	Mitelman Database of Chromosomal Aberrations in Cancer
MG	Molekulargewicht
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute(n)
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
NaCl	Natriumchlorid
Na ₃ Citrat	Trinatriumcitrat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid, Natronlauge
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
ORI	Origin of replication, Replikationsursprung
OS	Osteosarkom
OT	Objektträger

p.a.	Pro analysis
PAB	Polyamine Isolation Buffer, Polyaminpuffer
p-Arm	Kurzer Chromosomenarm (petit)
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
pH	Potentia Hydrogenii
POS	Parosteales Osteosarkom
q-Arm	Langer Chromosomenarm
rFISH	reverse FISH
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROI	Region of interest
Rpm	Rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Rsa I	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> I
RT	Raumtemperatur
sec	second(s), Sekunde(n)
SKY	Spectral karyotyping, spektrale Karyotypisierung
Spermidine	Spermidintrihydrochlorid
Spermine	Spermintetrahydrochlorid
ssDNA	einzelsträngige DNA
SSC	Saline Sodium Citrate
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA
TR	Texas Red
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid
U	Unit
UCSC	Univeristy of Santa Cruz
ÜN	Über Nacht
V	Version
Vol.	Volumen

Abkürzungsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Osteosarkom	1
1.1.1	Inzidenz und Klassifikation	1
1.1.2	Klinik	2
1.1.3	Diagnostik	2
1.1.5	Befallsmuster	3
1.1.6	Therapie	3
1.1.7	Prognose	5
1.1.8	Nachsorge	5
1.2	Zytogenetik	5
1.3	Ziele der Arbeit	9
2	Material	11
2.1	Zelllinien	11
2.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	12
2.3	Puffer und Lösungen	14
2.4	Kulturmedien, Antibiotika und Zusätze	15
2.4.1	Angesetzte Medien und Lösungen	15
2.4.2	Gebrauchsfertige Medien und Lösungen	15
2.5	Kits	16
2.6	Oligonukleotidarrays und Zubehör	16
2.7	DNA, Sonden und Fluoreszenzfarbstoffe	16
2.8	Antikörper	18
2.8.1	Primäre Antikörper	18
2.8.2	Sekundäre Antikörper	18
2.9	Restriktionsenzyme und Polymerasen	18
2.10	Gele und Marker	19
2.10.1	Agarosegele	19
2.10.2	Größenmarker	19
2.11	Bacterial Artificial Chromsomes (BACs)	19
2.12	Oligonukleotide (Primer)	21
2.13	Geräte	21

2.13.1	Zentrifugen	21
2.13.2	Inkubatoren und Wasserbäder	21
2.13.3	Cycler	21
2.13.4	Mikroskope und Zubehör	21
2.13.5	Sonstige Laborgeräte	22
2.14	Software, Datenbanken und Internettools.....	22
3	Methoden	24
3.1	Zellkultur	24
3.1.1	Kultivierung von permanent wachsenden Zelllinien	24
3.1.1.1	Auftauen von Zelllinien	24
3.1.1.2	Passagieren von adhärent wachsenden Zelllinien	24
3.1.1.3	Einfrieren von Zelllinien	24
3.2	Zytogenetik	25
3.2.1	Präparation von Metaphasenchromosomen	25
3.2.2	Chromosomenbandenfärbung	25
3.2.3	Mikrodissektion	26
3.2.4	Durchflusszytometrische Karyotypisierung	27
3.2.4.1	Chromosomenisolation.....	27
3.2.4.2	Färben der Chromosomensuspension	28
3.2.4.3	Durchflusszytometrische Analyse und Sortierung	29
3.3	Molekularzytogenetik.....	29
3.3.1	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH)	29
3.3.1.1	Kultivierung von BAC-Klonen	31
3.3.1.2	Isolation von Plasmid-DNA.....	31
3.3.1.3	Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA.....	33
3.3.1.4	Markierung der BAC-DNA mittels Nick-Translation	33
3.3.1.5	Denaturierung und Hybridisierung.....	34
3.3.1.6	Detektion	35
3.3.1.7	FISH mit kommerziell erhältlichen Sonden.....	35
3.3.2	Vielfarbige Karyotypisierung mittels Spectral Karyotyping	36
3.3.3	Vergleichende genomische Hybridisierung auf DNA-Microarrays (aCGH)	38
3.3.3.1	Restriktionsverdau der genomischen DNA mittels <i>Alu</i> I und <i>Rsa</i> I .	41
3.3.3.2	Fluoreszenzmarkierung der genomischen DNA	41

3.3.3.3	Aufreinigung und Bestimmung der spezifischen Aktivität der fluoreszenzmarkierten DNA	42
3.3.3.4	Vorbereitung der fluoreszenzmarkierten DNA für die Hybridisierung	43
3.3.3.5	Hybridisierung	43
3.3.3.6	Waschen des DNA-Microarrays	43
3.3.3.7	Scannen des DNA-Microarrays	44
3.3.3.8	Datenextraktion & Analyse	45
3.4	Molekularbiologie.....	48
3.4.1	DNA-Isolation aus Zellsuspensionen	48
3.4.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	48
3.4.2.1	Etablierung der Primer.....	48
3.4.2.2	DNA-Analyse.....	50
3.4.2.3	Degenerate Oligonucleotide Primed-PCR (DOP-PCR).....	51
3.4.3	Immunfluoreszenzfärbung.....	54
3.4.3.1	Immunfluoreszenzfärbung von Centrosomen und Teilungsspindeln.....	54
3.5	Datenanalyse und Statistik.....	55
3.5.1	Datenanalyse mittels 'CyDAS'.....	55
3.5.2	Statistische Analyse der Verteilung der Bruchpunkte	57
3.5.3	Datenbankanalysen	57
4	Ergebnisse.....	58
4.1	Methodenvergleich.....	58
4.1.1.1	aCGH-Methodik und Analysequalität	58
4.1.1.2	Methodenvergleich SKY-, aCGH- und FISH-Analyse.....	63
4.2	Numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen.....	69
4.2.1	Konventionelle Chromosomenbandenanalyse.....	69
4.2.2	Vielfarbige Karyotypisierung	71
4.2.3	'CyDAS'-Analyse der SKY-Karyotypen	76
4.3	Spezifische Chromosomenaberrationen.....	81
4.3.1	Ausschluss von <i>EWSR1</i> -Translokationen mittels FISH	81
4.4	Rekurrente chromosomale Bruchpunkte.....	84
4.5	Rekurrente Bruchpunkte in einzelnen Genen.....	87
4.6	Rekurrente Zugewinne und Verluste	91

4.6.1	6p-Zugewinne	94
4.6.2	12q-Zugewinne	96
4.6.3	17p-Zugewinne	99
4.6.4	3q-Verluste.....	103
4.6.5	9p-, 13q- und 17p- Verluste	104
4.7	Veränderungen des Mitoseapparates.....	105
4.7.1	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	105
4.8	Zusätzliche Analyseverfahren zur Aufklärung komplexer Aberrationen	107
4.8.1	Durchflusszytometrische Karyotypisierung	107
5	Diskussion.....	108
5.1	Beurteilung der Methodik	108
5.1.1	SKY.....	108
5.1.2	aCGH.....	109
5.2	Zytogenetische und molekulargenetische Veränderungen der Zelllinien	112
5.2.1	Numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen.....	112
5.2.2	Balancierte und unbalancierte Chromosomenaberrationen	113
5.2.3	Spezifische Chromosomenaberrationen	113
5.2.4	Rekurrente chromosomale Bruchpunkte.....	114
5.2.5	Rekurrente Bruchpunkte in einzelnen Genen	115
5.2.5.1	Tumorgenese	115
5.2.5.2	Tumorsuppressorgene	116
5.2.5.3	Metastasierung.....	117
5.2.5.4	Knochenentwicklung.....	117
5.2.5.5	Mitoseapparat.....	117
5.2.6	Rekurrente Zugewinne und Verluste.....	118
5.2.6.1	Zugewinne 6p21.33-6p12.1.....	118
5.2.6.2	Zugewinne 12q13-12q15.....	120
5.2.6.3	Zugewinne 17p12-17p11.2.....	125
5.2.6.4	Verluste 3q13.31	128
5.2.6.5	Verluste 9p21.3, 13q14.2 und 17p13.1	130
5.3	Entstehung und Progression der Osteosarkome.....	133

5.4 Ursachen von Zugewinnen und Verlusten	
chromosomalen Materials - Chromosomeninstabilität.....	134
5.5 Veränderungen des Mitoseapparates.....	139
5.6 Zusätzliche Analysemethoden zur	
Aufklärung komplexer Aberrationen	141
5.6.1 Durchflusszytometrische Karyotypisierung und	
Sortierung von Chromosomen	141
5.7 Ausblick	142
6 Zusammenfassung	144
7 Abstract	145
8 Literaturverzeichnis	146
9 Danksagung	167
Eidesstattliche Erklärung	168
Anhang	169

1 Einleitung

1.1 Osteosarkom

Das Osteosarkom (OS) ist ein hochmaligner mesenchymaler Knochentumor. Es geht von den Osteoblasten der Markhöhle der Havers-Kanäle und des Periosts aus und führt meist schnell zu voluminösen Tumoren.

1.1.1 Inzidenz und Klassifikation

Das Osteosarkom ist mit einer Inzidenz von 2-5 Fällen pro 1 Millionen Einwohner im Jahr der häufigste primäre maligne Tumor des Skeletts. In Deutschland erkranken jährlich etwa 150-200 Menschen am Osteosarkom (Böcker *et al.*, 2008). Es macht 15% der primären Knochentumoren und 0,2% aller Malignome bei Kindern und Jugendlichen aus (Müller, 2007; Kaatsch, 2008). Der Altersgipfel liegt in der Wachstumsphase des Skeletts zwischen 10 und 25 Jahren. Das Durchschnittsalter beträgt 19 Jahre (von Harnack und Heimann, 1994; Böcker *et al.*, 2008). Auch Erkrankungen bis zum 60. Lebensjahr sind beschrieben, sie sind jedoch mit unter 1% aller Tumorerkrankungen bei Erwachsenen sehr rar (Husmann *et al.*, 2010). Männer bzw. Jungen sind mit einer Rate von 1,5:1 etwas häufiger betroffen als Frauen bzw. Mädchen. Selten (<7%) treten Osteosarkome als Sekundärneoplasie z.B. nach Retinoblastom und Bestrahlung auf. Die Osteosarkome werden nach der WHO-Klassifikation in verschiedene Kategorien (z.B. über Gewebetyp oder Lokalisation) eingeteilt, die meist über unterschiedliche Malignitätsgrade verfügen (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: WHO-Klassifikation der Osteosarkome

WHO-Klassifikation	Malignität
Intramedulläres Osteosarkom (~93%)	
Konventionelles OS (chondroblastisch/fibroblastisch/osteoblastisch)	hoch
Teleangietaktisches OS	hoch
Kleinzelliges OS	hoch
Niedrigmalignes zentrales OS	niedrig
Sekundäres OS	i.d.R. hoch
Oberflächliches Osteosarkom (~7%)	
Parosteales (juxtakortikales) OS	i.d.R. niedrig
Periostales OS	intermediär
Hochmalignes Oberflächen-OS	hoch

In der Regel ist das Osteosarkom ein hochmaligner Tumor (~93%) und liegt intraossär. Die häufigste Form mit ca. 85% ist das hochmaligne konventionelle

Osteosarkom, niedrig maligne zentrale Osteosarkome sind mit 1-2% sehr selten. Die hochmalignen Oberflächensarkome sind sehr rar (<1%), die parostealen Osteosarkome (~5%) und die selteneren periostalen Osteosarkome (1-2%) besitzen vorwiegend niedrige Malignitätsgrade (Böcker *et al.*, 2008).

1.1.2 Klinik

Als Symptome beim OS sind zunehmende, oft als belastungsunabhängig empfundene Schmerzen der betroffenen Region beschrieben. Derbe Schwellungen und Überwärmung der Gelenke mit darüber verdünnter Haut und vermehrter Gefäßzeichnung, manchmal pathologische Frakturen und Bewegungseinschränkungen im benachbarten Gelenk werden auch beobachtet. Die Laborwerte der OS-Patienten sind meist unspezifisch. Die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG), Werte für alkalische Phosphatase (AP) und Laktat-Dehydrogenase (LDH) können erhöht sein (Heare *et al.*, 2009).

1.1.3 Diagnostik

Die Diagnostik erfolgt röntgenologisch mittels Übersichtsaufnahmen des gesamten befallenen Knochens in zwei Ebenen (posterior-anterior und lateral), sowie über ein Skelettszintigramm mit ROI-Vergleich. Außerdem wird eine Magnetresonanztomographie (MRT) durchgeführt. Zusätzliche Röntgenaufnahmen und Computertomographie (CT) des Thorax dienen zum Nachweis von Metastasen. Das Röntgenbild zeigt neben der Weichteilschwellung meist ausgedehnte osteolytische Herde und häufig eine starke, vom Periost ausgehende Knochenneubildung, zum Teil als Knochenporne, sogenannte 'Spiculae' (Caudill und Arndt, 2007). Außerdem werden dreieckige Knochenneubildungszonen, die als 'Codman-Dreiecke' bezeichnet werden, oft beobachtet (Heare *et al.*, 2009)(Abbildung 1.1 c).

1.1.4 Histologie

Histologisch findet sich bei den OS ein stark polymorphes Gewebe aus Spindelzellen und Riesenzellen, Inseln aus hyalinem, knorpeligem oder knöchernem Material mit Ablagerung von pathologischem Osteoid. Besonders die hochmalignen OS sind oft sehr vielgestaltig, neben osteoblastischen Komponenten können zusätzlich chondro- und fibroblastische Areale vorhanden sein. Die niedrigmalignen zentralen OS können

meist histologisch nur schwer von benignen Läsionen wie z.B. der fibrösen Dysplasie abgegrenzt werden.

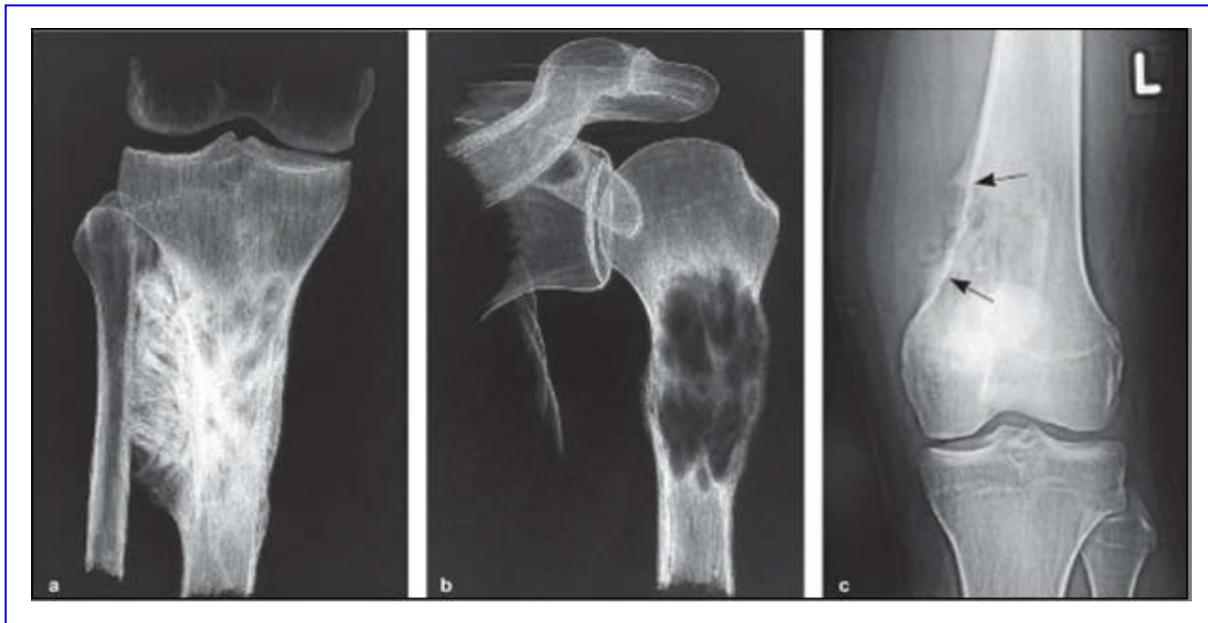


Abbildung 1.1: Osteosarkom. a) Stark sklerosierendes Osteosarkom der Tibiameta- und -diaphyse. b) Vorwiegend lytisches Osteosarkom des proximalen Humerus. c) Gemischtes, teils lytisches, teils gering sklerotisches Osteosarkom der distalen Femurmetaphyse links mit Destruktion der Spongiosa und Vorhandensein von 'Codman-Dreiecken' (Pfeile). Abbildungen nach Böcker *et al.*, 2008.

1.1.5 Befallsmuster

Die typische Lokalisationen des Tumors sind die Metaphysen langer Röhrenknochen, wie distaler Femur (Oberschenkel), proximale Tibia (Schienbein) und proximaler Humerus (Oberarm), am häufigsten (50%) sind die OS im Kniebereich lokalisiert. Bei 20% der Patienten liegen initial bereits sichtbare Fernmetastasen vor, vorwiegend in der Lunge (Diemel *et al.*, 2009). 80-90% der übrigen Patienten haben schon eine Mikrometastasierung (Mundy, 2002; Müller, 2007).

1.1.6 Therapie

Die Behandlung junger Patienten mit malignen Knochentumoren erfolgt im Rahmen multinationaler, prospektiver Therapiestudien, meist wird eine Kombination von chirurgischer Behandlung und neoadjuvanter Chemotherapie eingesetzt (Grimer, 2005; Basaran *et al.*, 2007; Lewis *et al.*, 2007). Aus deutschsprachigen Ländern werden in aller Regel Kinder und Jugendliche zu 100 % in Therapieprotokollen der 'Cooperativen Osteosarkomstudiengruppe' (COSS) behandelt. Die Studien der

Cooperativen Osteosarkomstudiengruppe rekrutieren seit 1977 Patienten mit Osteosarkomen, ossären malignen fibrösen Histiozytomen und anderen ossären Spindelzellsarkomen aus Deutschland, Österreich, der Schweiz und zuletzt auch aus Ungarn. Aktuell werden sowohl für jüngere Patienten, als auch für ältere Patienten Studien im transatlantischen bzw. europäischen Verbund angeboten. Hierbei werden die kindlichen, jugendlichen und jüngeren erwachsenen Patienten mit einem OS im Rahmen der laufenden OS-Studie (EURAMOS-1) therapiert. Patienten im Alter von 40 bis 65 Jahren werden nach Protokoll der EURO-B.O.S.S-Studie behandelt (Bielack und Carrle, 2008; Bielack *et al.*, 2008).

Nach der diagnostischen Biopsie folgt die präoperative Chemotherapie. In der 10. Woche nach Chemotherapie erfolgt die Operation des Tumors, dessen Ansprechen für die histologische Beurteilung der zytostatischen Wirksamkeit benutzt wird (Tumor-Regressionsgrad nach Salzer-Kuntschik), um die Medikamentenkombination postoperativ gegebenenfalls zu modifizieren. Die totale Exstirpation des Tumors ist immer erforderlich, da ein Lokalrezidiv die Prognose massiv verschlechtert. Die Radikalität der Operation ist abhängig von Tumorsitz und -Größe. Es wurden spezielle Operationstechniken zur bestmöglichen Funktionserhaltung entwickelt. Extremitäten-erhaltende Operationen weisen etwas mehr Lokalrezidive auf. Die zusätzlich zur Operation eingesetzte Chemotherapie trägt zur Lokalkontrolle und zum Überleben bei. Zur sequentiellen alternierenden prä- und postoperativen Chemotherapie werden Substanzen wie Doxorubicin, Hochdosis-Methotrexat, Cisplatin und Ifosfamid eingesetzt (Bacci *et al.*, 2003; Bacci *et al.*, 2008). Die Strahlentherapie des OS erfolgt wegen seiner relativen Strahlenresistenz nur im Rahmen der Palliativtherapie und bei (partieller) Inoperabilität, z.B. bei Gesichtsschädelbefall (Bielack *et al.*, 2008). Die operative Entfernung des tumortragenden Knochens stellt für die orthopädische Chirurgie eine große Herausforderung dar, da eine R0-Resektion notwendig ist und eine Amputation der Extremitäten vermieden werden sollte. Durch endoprothetischen Ersatz, Fremdspender, Explantation und Reimplantation, Rotationsplastiken, vaskuläre Fibula-Transplantationen sowie Knochendistraktionen sind dennoch einige Möglichkeiten gegeben, die Mobilität und Lebensqualität der meist noch jungen Patienten zu erhalten (Heare *et al.*, 2009).

1.1.7 Prognose

Tumorzellen, Ansprechen auf initiale Chemotherapie und R0-Resektion sind die wichtigsten prognostischen Faktoren. Bei alleiniger Operation liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei nur 1-15%. Mit Operation und adjuvanter Chemotherapie sind Heilungen in über 50-70% möglich. Bei Patienten mit solitären Lungenmetastasen liegt die 5-Jahresüberlebensrate hingegen nur bei 20-24% (Bacci *et al.*, 2003; Kager *et al.*, 2003; Bacci *et al.*, 2008). 95% der Rezidive treten in den ersten 5 Jahren auf.

1.1.8 Nachsorge

Aufgrund des Risikos für ein Lokalrezidiv und Lungenmetastasierung sind in den ersten 3 Jahren engmaschige Kontrolluntersuchungen erforderlich. Nach Doxorubicin-Therapie sind auf Grund seiner kardiotoxischen Nebenwirkungen langzeitige Echokardiogramm-Kontrollen nötig. Bildgebende lokale Kontrollen werden mindestens bis zum vierten Jahr nach Diagnosestellung durchgeführt. Nach diesem Zeitpunkt sind auftretende Lokalrezidive selten. Das Lokalrezidiv wird erneut operativ angegangen (eventuell Amputation), Lungenmetastasen werden reseziert, da ein langfristiges Überleben in 30-50% möglich ist (Bacci *et al.*, 2008; Diemel *et al.*, 2009).

1.2 Zytogenetik

Bei etwa 70% der OS lassen sich mit Hilfe der Chromosomenbandenanalyse Chromosomenveränderungen nachweisen. Häufig liegen multiple Klone mit unterschiedlichem Ploidiegrad vor. Die Ploidiegrade reichen hier von haploid bis hexaploid. Zytogenetische Korrelate von Gen-Amplifikationen, wie homogen anfärbare Chromosomenregionen ('homogeneously staining regions', HSRs) und 'double minutes' (DMs), werden beim OS häufig beobachtet. In der Literatur wurden die Ergebnisse der zytogenetischen Studien beim OS zusammengefasst (Sandberg und Bridge, 2003). Hierbei wurden unter den numerischen Veränderungen Zugewinne, die Chromosom 1 betreffen und Verluste, die die Chromosomen 9, 10, 13 und 17 betreffen am häufigsten beobachtet. Ebenso sind partielle oder komplette Verluste von 6q beschrieben. Am häufigsten in Rearrangements involviert sind die chromosomalen Regionen 1p11-p13 (15%), 1q10-q12 (19%), 1q21-q22 (14%), 11p15 (17%), 12p13 (15%), 17p12-p13 (14%), 19q13 (17%) und 22q11-q13 (15%) (Bridge *et al.*, 1997)(Abbildung 1.2, Abbildung 1.3).

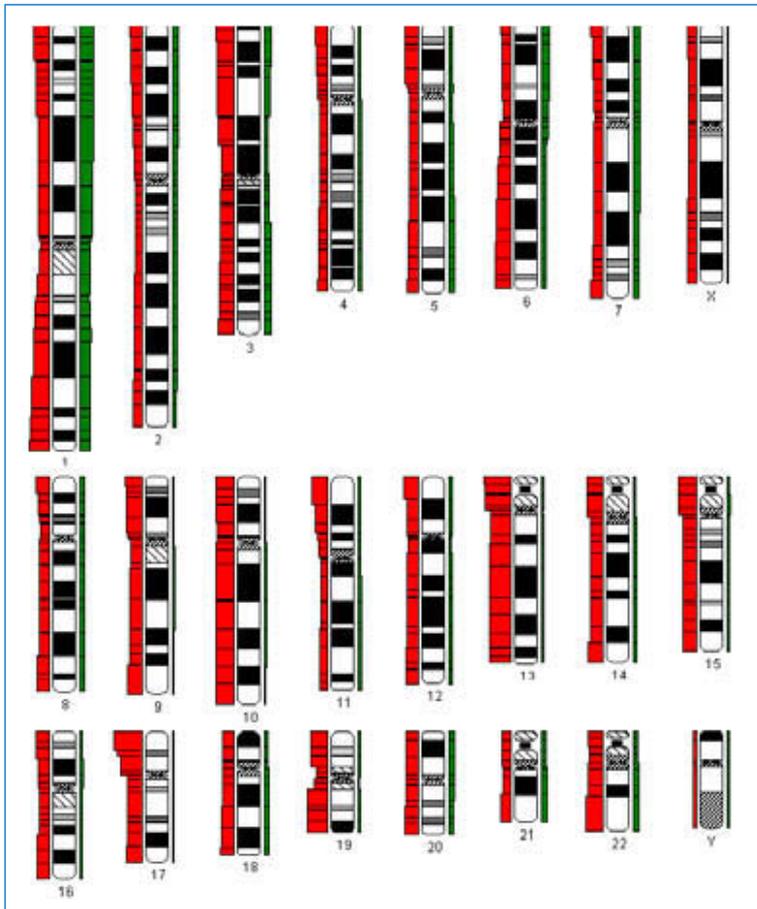


Abbildung 1.2: Verteilung der Zugewinne (grün) und Verluste (rot) von chromosomalen Regionen von 136 Karyotypen von OS-Patienten aus der 'Mitelman'-Datenbank. Die Höhe der Balken zeigt die Häufigkeit der Ereignisse an.

Die komplex veränderten Chromosomensätze mit einer hohen Anzahl an Aberrationen, die bei nahezu allen Tumoren beobachtet werden, können mittels konventioneller Zytogenetik nicht ausreichend charakterisiert werden. In einer neueren Studie wurden molekularzytogenetische Methoden, wie komparative genomische Hybridisierung (CGH), vielfarbige Karyotypisierung (SKY) und Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) kombiniert, um die komplexen Chromosomenveränderungen beim OS aufzudecken (Lau *et al.*, 2004). Hier zeigten sich bei einem Kohort von 25 Patienten zahlreiche rekurrente Verluste (2q, 3p, 9, 10p, 12q, 13q, 14q, 15q, 16, 17p und 18q) und Zugewinne (Xp, Xq, 5q, 6p, 8q, 17p und 20q) von chromosomalem Material.

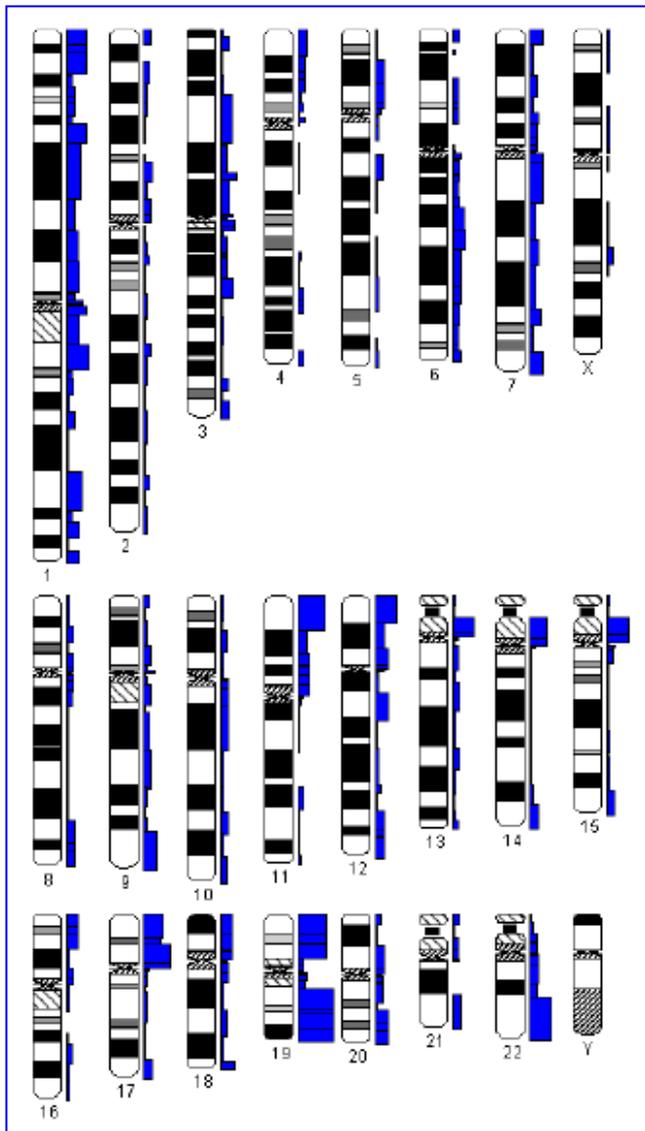


Abbildung 1.3: Verteilung der Bruchpunkte von strukturellen Chromosomenveränderungen von 136 Karyotypen von OS-Patienten aus der 'Mitelman'-Datenbank. Die Höhe der Balken zeigt die Häufigkeit der Ereignisse an.

Die Ergebnisse dieser und anderer vorangegangener Studien (Tarkkanen *et al.*, 1995; Bayani *et al.*, 2002; Batanian *et al.*, 2002; Ozaki *et al.*, 2002; Man *et al.*, 2004) zeigen die Komplexität und Instabilität der genetischen Konstitution der OS. Mit Hilfe von hochauflösenden Techniken konnte eine Reihe von molekularen Veränderungen beim OS aufgedeckt werden. So konnte nachgewiesen werden, dass die Verluste häufig Regionen mit Tumorsuppressorgenen, wie *RB1*, *CDKN2A* und *p53*, betreffen. Besonders bei den hereditären Osteosarkomen, z.B. bei Retinoblastom-Familien und Patienten mit dem Li-Fraumeni-Syndrom (Picci, 2007), sind die Gene *RB1* und *p53* von Aberrationen betroffen. In Amplifikationen sind Regionen mit Onkogenen oder Genen z.B. *MYC* und *CDK4*, die Tumorentstehung und Progression begünstigen,

involviert. Die Heterogenität der Tumoren macht es schwierig einzelne Kandidatengene herauszufiltern, die spezifisch für die Entstehung oder Progression von Osteosarkomen verantwortlich sind. Ein wesentlicher Mechanismus der genetischen Veränderungen bei anderen Tumoren sind Translokationen und Inversionen, die zur Fusion von Genen und hierdurch zur Aktivierung oder Inaktivierung von Promotoren führen. Bei hämatopoetischen Neoplasien sind bereits eine große Reihe von Translokationen bekannt, die für die einzelnen Subtypen spezifisch sind und hierdurch die Diagnose erleichtern, außerdem ist eine spezifische Therapie der betroffenen Patienten möglich. Einige der Veränderungen wurden deshalb in das internationale Klassifikationssystem der WHO aufgenommen (Vardiman, 2009). Tumoren der Ewing-Sarkom (ES)- oder primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET)-Familie sind durch Translokationen des *EWSR1* ('Ewing Sarcoma 1')-Gens (22q12) gekennzeichnet. Der Translokationspartner ist in 85% der Fälle das Gen *FLI1* ('Homologous to Friend leukemia virus integration site 1'), welches auf dem Chromosom 11q24 lokalisiert ist. In 10% der Fälle ist das Gen *ERG* ('ETS related gene') lokalisiert auf Chromosom 21q22 der Translokationspartner, desweiteren sind Translokationen mit den Genen *ETV1* ('ETS variant 1', 7q22), *E1AF* ('ETS variant 4', 17q12) und *FEV* ('Fifths Ewing variant', 2q33) beschrieben (Urano *et al.*, 1998; Carlotti *et al.*, 1999; Dagher *et al.*, 2001; Khoury, 2005, Khoury, 2007). Bei diesen Translokationen werden onkogene Fusionsproteine gebildet, die den N-terminalen Teil des *EWSR1*-Gens tragen. Dieser Teil wird mit der ETS-Domäne der Translokationspartner fusioniert. Die ETS-Domäne zeigt Charakteristika eines Transkriptionsfaktors, so dass die *EWSR1*-Fusionsgene über die ETS-Domäne der Translokationspartnergene gegen die Promotorregionen verschiedener Zielgene gerichtet sind, deren Transkription vom *EWS*-Element aktiviert wird. Beim Osteosarkom hingegen sind bisher keine rekurrenten Translokationen beschrieben, bei denen es zu onkogenen Fusionsgenen kommt.

Rekurrente Bruchereignisse in Genen sind interessant, da ihre Funktion durch stückweise Deletionen sowohl eingeschränkt, als auch durch teilweise Duplikationen die Aktivität der Gens erhöht werden kann. Aber nicht nur durch Verluste oder Zugewinne sondern besonders auch durch Verlagerungen der zerbrochenen Gene in andere Regionen kann es z.B. durch eine Translokation in die Nähe eines anderen Promotors zu einer veränderten Funktion des Gens kommen. Ebenfalls kann durch einen Chromosomenbruch die regulatorische Sequenz eines Gens zerstört werden,

was mit einem Funktionsverlust des Gens einhergeht (Buselmaier und Tariverdian, 2007). Hochauflösende Analysen von Bruchereignissen könnten somit einen Aufschluss über rekurrente Brüche in einzelnen Genen auch bei den Osteosarkomen geben.

1.3 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragen zu genetischen Veränderungen beim Osteosarkom bearbeitet werden:

- Welche numerischen und/oder strukturellen Chromosomenveränderungen liegen vor?
- Welche strukturellen Chromosomenveränderungen sind auf genomischer Ebene balanciert, welche unbalanciert?
- Welche Chromosomenveränderungen kommen wiederholt vor?
- Liegen spezifische Translokationen vor?
- Welche Regionen sind wiederholt in Bruchereignisse involviert?
- Sind Gene in Bruchereignisse involviert, in denen Veränderungen Einfluss auf Entstehung oder Progression der Tumore spielen könnten ?
- Welche Regionen sind wiederholt von Zugewinnen und/oder Verlusten betroffen?
- Wie stellen sich die Zugewinne und/oder Verluste auf zytogenetischer Ebene dar?
- Welche Gene könnten Ziel evtl. vorhandender Kopienzahlveränderungen sein?
- Liegen Aberrationen der Centrosomen und Teilungsspindeln vor, die eine genetische Stabilität begünstigen könnten?
- Welche Methoden könnten zur weiteren, vertieften Aufklärung der ggf. beobachteten Veränderungen eingesetzt werden?

Für die Untersuchungen wurden Osteosarkomzelllinien ausgewählt und mit Hilfe der kombinierten Chromosomenbandenanalyse und vielfarbigen Karyotypisierung sowie mittels molekularer Karyotypisierung und Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung untersucht.

Teile dieser Arbeit wurden als Vorträge auf folgenden Tagungen oder Kongressen vorgestellt:

Klinische Genetik Nordrhein 2007, Düsseldorf:

Molekulare Pfade der Tumorentstehung beim Osteosarkom

Möhlendick Birte¹

¹Institut für Humangenetik und Anthropologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Düsseldorf, Germany

21. Tumorzytogenetische Arbeitstagung (TZA) 2008, Uslar-Volpriehausen:

SKY-Analysen bei Osteosarkomzelllinien

Möhlendick Birte¹, Poremba Christopher², Schäfer Karl-Ludwig², Rieder Harald¹

¹Institut für Humangenetik und Anthropologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Düsseldorf; ² Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Düsseldorf

**Jahrestagung der deutschen, österreichischen und schweizerischen
Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie (DGHO) 2008, Wien
(Österreich):**

Möhlendick Birte, Poremba Christopher, Schäfer Karl-Ludwig, Rieder Harald

EWSR1 gene rearrangements in osteosarcoma cell lines., *Onkologie* **31** S4, 202 (2008).

22. Tumorzytogenetische Arbeitstagung (TZA) 2009, Emetten (Schweiz):

Vergleichende SKY- und aCGH-Analysen bei Osteosarkomzelllinien

Möhlendick Birte¹, Schäfer Karl-Ludwig², Rieder Harald¹

¹ Institut für Humangenetik und Anthropologie, Universitätsklinikum Düsseldorf

² Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Düsseldorf

Teile dieser Arbeit wurden als Posterpräsentation auf folgenden Tagungen oder Kongressen vorgestellt:

Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GFH) 2009,

Aachen:

Möhlendick Birte, Schäfer Karl-Ludwig, Poremba Christopher, Rieder Harald

Chromosome banding and spectral karyotyping in combination with the cytogenetic data analysis system CyDAS reveals regions of recurring genome changes in osteosarcoma cell lines., *Medizinische Genetik* **21**, 117 (2009)

2 Material

2.1 Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden von Herrn Prof. Dr. Christopher Poremba und PD Dr. rer. nat. Karl-Ludwig Schäfer des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf in Zusammenarbeit mit dem EuroBoNet zur Verfügung gestellt. Die Zelllinien sind zum Teil über das ATCC bezogen (Tabelle 2.1, ATCC-Nummer in Klammern) oder wurden am Norwegian Radium Hospital in Oslo, am Istituto Ortopedico Rizzoli in Bologna oder am Institut für Pathologie in Düsseldorf etabliert.

Tabelle 2.1: Angaben über Geschlecht, Alter und Herkunft der Tumoren der Patienten der 21 Zelllinien, ¹abgeleitet von der Zelllinie HOS, ²metastasierendes OS, ³konstitutioneller Karyotyp unauffällig, n.s.=nicht spezifiziert.

Zelllinie	Geschlecht	Alter	Herkunft	Referenz
143b-HOS (ATCC CRL-8303) ¹	weiblich	13	Knochen n.s.	ATCC
HAL	männlich	16	Knochen n.s.	Høifødt, Oslo
HOS (ATCC CRI-1543)	weiblich	13	distaler Femur rechts	McAllister <i>et al.</i> , 1971
KPD	männlich	7	Knochen n.s.	Bruland <i>et al.</i> , 1988
MG63 (ATCC CRL-1427) ²	männlich	14	distaler Femur links	Billiau <i>et al.</i> , 1977
MHM ²	weiblich	42	Os ilium (Darmbein)	Bruland <i>et al.</i> , 1988
MNNG-HOS (ATCC CRL-1547) ¹	weiblich	13	distaler Femur rechts	Rhim <i>et al.</i> , 1975
MOS	weiblich	13	Knochen n.s.	Benini <i>et al.</i> , 1999
OHS ³	weiblich	14	distaler Femur links	Fodstad <i>et al.</i> , 1986
OS09 ²	männlich	15	Knochen n.s.	Scotlandi <i>et al.</i> , 1994
OS10	weiblich	10	Knochen n.s.	Benini <i>et al.</i> , 1999
OS14	männlich	13	Knochen n.s.	Benini <i>et al.</i> , 1999
OS15	weiblich	12	Knochen n.s.	Benini <i>et al.</i> , 1999
OS18 ²	männlich	33	Knochen n.s.	Benini <i>et al.</i> , 1999
OSA (ATCC CRL-2098)	männlich	19	Femur	Roberts <i>et al.</i> , 1989
OST	weiblich	15	Knochen n.s.	Ozaki <i>et al.</i> , 2003
SAOS2 (ATCC HTB-85)	weiblich	11	Knochen n.s.	ATCC
SARG ²	männlich	24	Knochen n.s.	Scotlandi <i>et al.</i> , 1992
TPXM	männlich	34	Femur	Bruland <i>et al.</i> , 1985
U-2OS (ATCC HTB-96) ³	weiblich	15	Tibia	Pontén und Saksela, 1968
ZK-58	männlich	21	Bein n.s.	Schulz <i>et al.</i> , 1993

2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Acetonitril	Sigma [®] -Aldrich
Albumin bovine Fraction V (BSA)	Serva
Bacto™ Agar	Difco Laboratories
Bacto™ Tryptone	BD and Company
Bacto™ Yeast Extract	BD and Company
Borsäure	Sigma [®] -Aldrich
Brij [®] -35	Sigma [®] -Aldrich
Bromphenolblau	Merck
Cellstar [®] Tube 14 ml, steril	Greiner Bio-One
Celltrics [®] Filtereinheiten 20 µm	Partec
CertiPUR [®] -Pufferlösung pH 6,88	Merck
Chloramphenicol	Sigma [®] -Aldrich
Corbit-Balsam	I.Hecht
Cryo Tube™ Vials 1,8 ml und 4,5 ml	Nunc™
Deckgläser 18 x 18 mm; 22 x 22 mm; 24 x 60 mm	Menzel-Gläser [®]
Dextransulfat	Sigma [®] -Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma [®] -Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma [®] -Aldrich
Dithiothreitol	Sigma [®] -Aldrich
EDTA	Sigma [®] -Aldrich
EGTA	Sigma [®] -Aldrich
Essigsäure (Eisessig) 100% wasserfrei, p.a.	Merck
Ethanol 99,5% (v/v) mit 1% Petroläther vergällt	Merck
Ethanol absolut, p.a.	Merck
Falcon-Tubes, 15 ml und 50 ml	Falcon
Ficoll 400	Sigma [®] -Aldrich
Fixogum	Marabu
Formamid (FA), deionisiert	Sigma [®] -Aldrich
Gelatine	Sigma [®] -Aldrich
Giemsa	Merck
Immersionsöl für Mikroskopie	Merck
Isopropanol (2-Propanol)	Merck
Kaliumchlorid p.a.	Merck

Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma [®] -Aldrich
Magnesiumchlorid, Sigma ultra	Sigma [®] -Aldrich
Magnesiumsulfat	Sigma [®] -Aldrich
Mercaptoethanol	Sigma [®] -Aldrich
Methanol 100%	Merck
Microcon YM-30-Säulen	Millipore [™]
Natriumacetat (NaOAc)	Sigma [®] -Aldrich
Natriumchlorid	Sigma [®] -Aldrich
Natriumcitrat	Sigma [®] -Aldrich
Natriumhydrogenphosphat	Sigma [®] -Aldrich
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma [®] -Aldrich
Natriumsulfit, min. 98 %	Sigma [®] -Aldrich
Nunc EasYFlasks [™] Nunclon [™] Δ	
Zellkulturflaschen aus PS, 25 cm ² ; 75 cm ² ; 150cm ²	Nunc [™]
Objektträger Superfrost [®] (ISO Norm 8037/l)	Menzel-Gläser [®]
Objektträger 3-well, 14 mm, teflonbeschichtet	Menzel-Gläser [®]
Oligo aCGH-Waschpuffer 1	Agilent Technologies
Oligo aCGH-Waschpuffer 2	Agilent Technologies
Parafilm	Pechiney Packaging
Reaktionsgefäße 0,2 ml; 1,5 ml; 2,0 ml	Eppendorf
SeaKem [®] LE Agarose	Cambrex
Spermidintrihydrochlorid (Spermidin)	Sigma [®] -Aldrich
Spermintetrahydrochlorid (Spermin)	Sigma [®] -Aldrich
Stabilisierungs- & Trockenlösung	Agilent Technologies
Sterilfilter 0,2 µm	Millipore
TE-Puffer	Promega
Trinatriumcitratdihydrat	Sigma [®] -Aldrich
Tris-HCl	Sigma [®] -Aldrich
Triton-X 100	Sigma [®] -Aldrich
Trockenblock	Schleicher & Schuell
Trypsin 1:250 Puder	PAN [™] Biotech
Tween-20	Sigma [®] -Aldrich
Vectashield [®] Mounting Medium	Vector Laboratories

2.3 Puffer und Lösungen

Acetic-Saline-Lösung	0,88% (w/v) Tri-Natriumcitratdihydrat/0,55% NaCl (w/v) ad 1l dest. H ₂ O
Auftragungspuffer (5x)	25% Ficoll 400/25 mM EDTA/0,1% Bromphenolblau
Blocklösung (FISH)	5% (w/v) BSA/2 x SSC/0,2% Tween-20
Blocklösung (IF)	2% Horse Serum/1 x PBS
DAPI-Stammlösung	200 µg/ml 4',6-Diamidin-2-phenyl-indol-dihydrochlorid in dest. H ₂ O
DAPI-Gebrauchslösung	200 ng/ml DAPI-Stammlösung in 4 x SSC
Denaturierungs-Master Mix	20% Dextransulfat/4 x SSC
Detektions-Master Mix (FISH)	150 µl Blocklösung/0,6 µl AvidinCy3 50%/1,5 µl anti-Digoxigenin-Fluorescein
EDTA	0,1 M pH 7,5 (Ethylenamintetraessigsäure)
Ethanol	30%, 50%, 70% und 100%
Fixativ	Ethanol absolut: Eisessig=3:1
Giemsa-Lösung (5%)	5% Giemsa/CertiPUR [®] -Phosphatpuffer
Giemsa-Lösung (6,4%)	6,4% Giemsa/CertiPUR [®] -Phosphatpuffer
KCl-Lösung 0,075 M	5,6 g KCl ad 1l dest. H ₂ O
KCl-Lösung (FK)	75 mM KCl/0,5 mM Spermidin/0,2 mM Spermin/10 mM MgSO ₄ ; pH 8,0 einstellen mit NaOH
Natriumacetat 3 M pH 5,2	24,6 g C ₂ H ₃ NaO ₂ in 60 ml dest. H ₂ O lösen, pH 5,2 mit Essigsäure einstellen ad 100 ml dest. H ₂ O; autoklavieren
Natronlauge 1 M	40 g NaOH auf 1l dest. H ₂ O
PAB (10x)	800 mM KCl/5 mM EGTA/20 mM EDTA/150 mM Tris-HCl pH7,4
PAB (1x)	5 ml PAB-Puffer (10x)/3 mM DTT/0,25% Triton-X 100/0,5 mM Spermidin/0,2 mM Spermin ad 50 ml dest. H ₂ O; pH 7,5 mit 0,5 M NaOH einstellen und sterilfiltrieren
PBS (1 x)	0,8% (w/v) NaCl/0,02% KCl 0,02% (w/v) KH ₂ PO ₄ /0,12% (w/v) Na ₂ HPO ₄ ad 1l dest. H ₂ O, pH 7,2 einstellen mit NaOH

SSC (20 x)	3 M Natriumchlorid/0,3 M Tri-Natriumcitratdihydrat; pH 7 einstellen mit HCl; autoklavieren
TBE (10 x)	0,89 M TrisBase/0,89 M Borsäure/0,02 M EDTA
Trypsin-Stocklösung	1 mg/ml Trypsin in CertiPUR [®] -Phosphatpuffer
Trypsin-Lösung 0.6%	0,5 ml Trypsin-Stocklösung/80 ml NaCl (0.9%)
Waschlösung 1 (37°C)	2 x SSC/0,2% Tween-20
Waschlösung 2 (42°C)	0,05 x SSC
Waschpuffer (SKY)	4 x SSC /0,1% Tween-20

Alle Lösungen wurden mit destilliertem oder wenn nötig mit autoklaviertem Wasser angesetzt.

2.4 Kulturmedien, Antibiotika und Zusätze

2.4.1 Angesetzte Medien und Lösungen

Agar	1,5% Bacto Agar (w/v) in LB-Medium; autoklavieren; bei Gebrauch 1‰ AB zufügen
Chloramphenicol-Stock-Lsg.	34 mg/ml in Ethanol (Endkonzentration 25µg/ml) aliquotieren, bei -20°C lagern
Einfriermedium	70% RPMI 1640/20% FBS/10% DMSO
Lysogeny Broth (LB)-Medium (nach Miller)	1% Bacto™ Tryptone (w/v)/0,5% Bacto™ Yeast (w/v)/1% NaCl (w/v); pH 7,5 einstellen mit NaOH; autoklavieren; bei Gebrauch 1‰ AB zufügen
Zelllinien-Medium	80% RPMI 1640 w/o L-Glutamin, w Phenolrot/20% FBS/1% L-Glutamin/1% Antibiotic Antimycotic

2.4.2 Gebrauchsfertige Medien und Lösungen

Antibiotic-Antimycotic (Penicillin G 10.000 Units/ml, Streptomycin 10000 µg/ml, AmphotericinB 25 µg/ml)	GibCo [®]
Horse Serum	GibCo [®]
KaryoMAX [®] Colcemid [®] Solution, liquid (10 µg/ml), in PBS	GibCo [®]
Research Grade Fetal Bovine Serum	Perbio
RPMI 1640 w/o L-Glutamin, w Phenolrot	PAN™ Biotech

2.5 Kits

BioNick™ Labeling System	Invitrogen
Concentrated Antibodies Detection Kit (CAD)	Applied Spectral Imaging
DIG-Nick Translation Mix	Roche
Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit	Agilent Technologies
Oligo aCGH/ChIP-on-chip Hybridization Kit	Agilent Technologies
QIAamp® DNA Blood Midi Kit	Qiagen
QIAGEN® Plasmid Midi Kit	Qiagen
SkyPaint™ DNA Kit H-10	Applied Spectral Imaging

2.6 Oligonukleotidarrays und Zubehör

Human Genome CGH Microarray, 4x44K, Design ID 014950, UCSC hg18 (NCBI Build 36), March 2006	Agilent Technologies
Hybridization Backing Kit	Agilent Technologies
Hybridization Chamber - SureHyb	Agilent Technologies
Ozone-Barrier Slide Cover Kit	Agilent Technologies

2.7 DNA, Sonden und Fluoreszenzfarbstoffe

4',6-Diamidin-2-phenyl-indol-dihydrochlorid (DAPI)	Sigma®-Aldrich
Anti-digoxigenin-fluorescein, Fab fragments	Roche
Chromomycin A3 (CA3)	Sigma®-Aldrich
Cy™3-conjugated Streptavidin	dianova
Ethidiumbromid (EtBr), 10mg/ml	Sigma®-Aldrich
EWSR1 Break-Probe (# KBI-10708; Abbildung 2.1)	Kreatech
Hoechst 33258 (HO)	Sigma®-Aldrich
Human Cot-1 DNA (1 µg/µl)	Invitrogen
LSI EGR1/D5S23, D5S721 Dual Color Probe (#05J76-001; Abbildung 2.2)	Abbott Molecular
LSI IGH/CCND1 Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe (#05J69-001; Abbildung 2.3 b & c)	Abbott Molecular

LSI IGH/FGFR3 Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe (#05J74-001; Abbildung 2.3 a & c)	Abbott Molecular
Salmon Testes DNA (9,9 µg/µl), Lachssperma-DNA	Sigma®-Aldrich

2.8 Antikörper

2.8.1 Primäre Antikörper

Die primären Antikörper, die bei der indirekten Immunfluoreszenz eingesetzt werden sind in Tabelle 2.2 aufgeführt. Die Antikörper werden in Blocklösung verdünnt.

Tabelle 2.2: Primäre Antikörper für die indirekte Immunfluoreszenz.

Antikörper	Herkunft	Wirtstier	gegen	Verdünnung
Anti-Pericentrin Antiserum	Covance	Kaninchen polyklonal	Pericentrin	1:800
Anti-alpha-Tubulin IgG Antikörper	Sigma®-Aldrich	Maus monoklonal	alpha-Tubulin	1:500

2.8.2 Sekundäre Antikörper

Die sekundären Antikörper, die bei der indirekten Immunfluoreszenz eingesetzt werden sind in Tabelle 2.3 aufgeführt. Die Antikörper werden in Blocklösung verdünnt.

Tabelle 2.3: Sekundäre Antikörper für die indirekte Immunfluoreszenz.

Antikörper	Herkunft	Wirtstier	gegen	Verdünnung
Cy3-markierter IgG Antikörper	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.	Ziege	Kaninchen	1:800
FITC-markierter IgG Antikörper	Sigma®-Aldrich	Ziege	Maus	1:500

2.9 Restriktionsenzyme und Polymerasen

<i>Alu</i> I	AG [▼] CT TC [▲] GA	(10 U/ µl)	Promega
<i>Rsa</i> I	GT [▼] AC CA [▲] TG	(10 U/ µl)	Promega

Tabelle 2.4: BAC-Sonden und deren chromosomale Lokalisation (nach DGV build36 mar2006).

Name	Chromosom	Lokalisation bp	Größe kb	Gen
RP11-259N12	1p21.1	103.956.050-104.113.271	157,221	<i>AMY2A, AMY1A, AMY1B, AMY1C</i>
RP11-411H5	1p21.2p21.1	101.879.592-102.009.471	129,879	-
RP11-622P3	3p26.2	4.376.29-4.562.896	186,267	<i>SUMF1, ITPR1</i>
RP11-249J17	3q13.31	117.048.246-117.110.595	62,349	<i>LSAMP</i>
RP11-149B11	3q13.31	117.206.690-117.348.689	141,999	<i>LSAMP</i>
RP11-402E20	3q13.31	117.515.823-117.626.814	110,991	<i>LSAMP</i>
RP11-663H6	3q13.31	117.612.223-117.778.487	166,264	<i>LSAMP</i>
RP11-395I6	4p14	39.806.181-39.969.707	163,526	<i>RHOH</i>
RP11-282C14	4p15.31	19.892.318-20.062.068	169,750	<i>SLIT2</i>
RP11-96F10	5p14.1	26.853.450-27.013.443	159,993	<i>CDH9</i>
RP11-419M2	5p14.3	20.970.991-21.136.670	165,679	-
RP11-143H23	5q23.2	124.700.561-124.851.206	150,645	-
RP11-166J22	5q31.2	137.542.260-137.638.185	95,925	<i>KIF20A, CDC23, GFRA3</i>
RP11-759G10	5q33.1	149.543.080-149.727.151	184,071	<i>CAMK2A, ARSI</i>
RP11-354C13	5q35.3	177.410.194-177.581.223	171,029	<i>N4BP3, RMND5B, NHP2</i>
RP11-152M23	6p21.1	44.385.940-44.543.315	157,375	<i>CDC5L</i>
RP11-720D9	6p21.1	41.991.767-42.172.189	180,422	<i>CCND3</i>
RP11-1G6	8p23.1	8.242.236-8.404.580	162,344	<i>PRAGMIN</i>
RP11-211C9	8p23.1	8.489.795-8.677.720	187,925	<i>CLDN23</i>
RP11-83O12	9p21.1	28.202.458-28.293.952	91,494	<i>LINGO2</i>
RP11-456G14	11q22.1	99.230.416-99.403.441	173,025	<i>CNTN5</i>
RP11-744N12	11q24.3	128.023.640-128.241.032	217,392	<i>FLI1, KCNJ1</i>
RP11-978I1	12p13.31	7.556.104-7.766.805	210,701	<i>APOBEC1, GDF3</i>
RP11-465A21	12p13.32	5.132.587-5.164.844	32,257	-
RP11-181L23	12q13.3	56.116.000-56.288.135	172,135	<i>GLI1, ARHGAP9, MARS, DDIT3</i>
RP11-66N19	12q14.1	56.362.976-56.513.586	150,610	<i>OS9, AGAP2, TSPAN31, CDK4, MARCH9, AVIL</i>
RP11-562A8	15q21.2	48.435.208-48.630.259	195,051	<i>USP8</i>
RP11-48J10	17p11.2	19.133.559-19.295.563	162,004	<i>EPN2, MAPK7</i>
RP11-136M15	17p12	15.033.880-15.145.100	111,220	<i>PMP22</i>
RP11-392O1	17q21.31	38.926.965-39.091.575	164,610	<i>ETV4/E1AF</i>
RP11-11I5	19p13.2p13.13	12.587.923-12.782.977	195,054	<i>MAN2B1, MORG1, DHPS</i>
RP11-483M4	21q22.12	35.208.903-35.381.013	172,110	<i>RUNX1</i>
RP11-836E15	21q22.3	43.905.790-44.108.003	202,213	<i>RRP1B, PDXK</i>
RP11-612D3	22q12.2	27.956.402-28.159.844	203,442	<i>EWSR1</i>

2.12 Oligonukleotide (Primer)

6-MW: 5' CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G 3', 22bp (Tm 64,0°C)

TSPAN-I1-F: 5' CGCCATCCTAGCCATTCTAA 3', 20 bp (Tm 56,4°C)

TSPAN-E2-R: 5' CACTCCAATGAGCAACAAGC 3', 20 bp (Tm 56,4°C)

2.13 Geräte

2.13.1 Zentrifugen

Fischerbrand® Minispin

Heraeus Megafuge 1.0; Rotor BS 4402/A

Hermle Z 200 M/H; Rotor 220.59 V04

Hermle Z 233 MK; Rotor 220.59 V07

Hettich Rotina 46 R; Rotor 4624

Sorvall® Instruments RC-5B Plus; Rotoren SLA1500 und SS-34

Sorvall® Instruments RT7; Rotor RTH-250

2.13.2 Inkubatoren und Wasserbäder

Agilent Microarray Hybridisierungssofen

Braun Biotech International Certomat® BS-1 Inkubator mit Schüttler

Eppendorf Thermomixer 5436 Schüttelinkubator

Grant Instruments Wasserbäder

Jouan Inkubator

Julabo Exatherm V3 electronic Wasserbad

National Labnet Company Vortemp 56 EVC Schüttelinkubator

Sanyo CO₂-Inkubator MCO-17AI

2.13.3 Cyclers

BioRad DNA Engine® Peltier Thermal Cycler

Eppendorf Mastercycler gradient

MJ Research Inc PTC-200™ Programmable Thermal Controller

2.13.4 Mikroskope und Zubehör

Leica DM/L Umkehrmikroskop

Okulare: Leica HC Plan 10x/20

Objektive: Leica N Plan 10x/ 0.25 PH1; Leica N Plan L 40x/0.55 CORR PH2

Kamera: Leica DFC 300 Fx

Zeiss Axioskop 40 FISH-Mikroskop

Okulare: W-PI 10x/23, 455043-000

Objektive: Zeiss Plan Neofluar, 100x/1.30 Oil, 10 185 95; 40x/0.75 Ph2, 440351; A-Plan, 10x/0.25, 44 10 30

Filter: AHF Analysentechnik, Tripleband DAPI/FITC/Cy3, DAPI, FITC, Cy3, Dualband FITC/Cy3

Kamera: Metasystems, Cool Cube

Lampe: Osram Typ HBO 103 W/2

Zeiss Axioplan 2 Imaging SKY-Mikroskop

Okulare: PI 10x/25, 44 40 34

Objektive: Zeiss Plan-Neofluar, 100x /1.30 Oil, 1018-595; 63x/1.25 Oil, 44 04 60

Filter: Zeiss, Filtersatz 01, DAPI, Cy5, Cy5.5, SO, SG, TexasRed[®]

Kamera: Applied Spectral Imaging, SpectraCube[®] & CCD Kamera

Lampe: Osram Typ XBO 75W

2.13.5 Sonstige Laborgeräte

Agilent Technologies Scanner G2565BA

Dako Cytomation MoFlo Cytometer und High Speed Sorter

Heidolph REAX 2000 Vortexer

Heidolph REAX Control

IKA[®]-Werke Ika[®] RH basic Magnetrührer

Kern 440-47 Waage

Knick pH-Meter 766 Calimatic

Nalgene[™] Cryo 1°C Freezing Container 'Mr. Frosty'

NanoDrop[®] ND-1000 Spektralphotometer

Sartorius AC 2115 Analysenwaage

Watson Marlow 505Di Dosier-Pumpe

2.14 Software, Datenbanken und Internettools

Agilent Technologies Scan Control V 7.0.3

Agilent Technologies Feature Extraction V 9.5.3.1 & 10.1.1.1

Agilent Technologies Genomic Workbench V 5.0.14

Applied Spectral Imaging SkyView® V 2.1
Applied Spectral Imaging Spectral Imaging V 2.6 (build 2.07)
Applied Spectral Imaging CaseDataManager V 3.0.3.3
Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology
(<http://atlasgeneticsoncology.org>)
Cytogenetic Data Analysis System (CyDAS; <http://www.cydas.org>)
Database of genomic variants V build36 mar2006 (<http://projects.tcag.ca/variation/>)
Ensembl release 57 Mar 2010 (<http://www.ensembl.org>)
Metasystems Ikaros Karyotyping System V 5.2.15
Metasystems Isis FISH Imaging System V 5.2.16
Microsoft® Office 2007
Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer
(MDCAC; <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>)
National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
Open Office 3.2
Primer 3 V 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>)
Summit V 3.1
UCSC Genome Bioinformatics, Genome Browser V hg 18, NCBI36 mar2006
(<http://genome.ucsc.edu/>)

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivierung von permanent wachsenden Zelllinien

3.1.1.1 Auftauen von Zelllinien

Das Röhrchen mit der LN₂-gefrorenen Zelllinie wurde bei 37°C kurz angetaut und die Zelllinie dann mittels Plastikpipette in 10 ml angewärmtes Medium pipettiert. Die Zellen wurden bei 900 rpm für 10 min (Sorvall RT7) zentrifugiert, um das Einfriermedium mit DMSO von den Zellen zu trennen. DMSO schädigt die Zellen, deshalb sollten die Zellen sowohl beim Auftauen, als auch beim Einfrieren zügig bearbeitet werden. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet mittels Plastikpipette durchmischt und in eine 12,5 cm²- oder 25 cm²-Kulturflasche gegeben. Die Kultur wurde auf 5 ml Medium aufgefüllt und im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

3.1.1.2 Passagieren von adhärent wachsenden Zelllinien

Die Zelllinien wurden bei 80% Konfluenz geteilt. Hierzu wurden die Zellen erst mit PBS-Puffer gewaschen und dann für 30 sec bis 5 min mit Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert. Zwischenzeitlich wurde das Ablösen der Zellen von der Flaschenwand unter einem Umkehrmikroskop überprüft. Durch Zugabe von Medium mit Serum wurde der Trypsinverdau gestoppt. Die Zelllinien wurden auf neue Flaschen gemäß den gewünschten Verdünnungen verteilt.

3.1.1.3 Einfrieren von Zelllinien

Zum Einfrieren wurde der Inhalt einer 75 cm²-Kulturflasche auf vier 15 ml-Zentrifugenröhrchen aufgeteilt. Diese wurden dann für 7 min bei 900 rpm (Sorvall RT7) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Zellpellet durch einmaliges Auf- und Abpipettieren mit einer sterilen Plastikpipette resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein Einfriereröhrchen überführt und mit Einfriermedium bis zur 1,8ml-Markierung aufgefüllt und kurz durch Pipettieren gemischt. Das Röhrchen wurde in ein Einfriergefäß ('Mr. Frosty') gestellt, das ein kontrolliertes Abkühlen der Probe (-1°C/min) bei -80°C und somit ein schonendes Einfrieren der Proben ermöglicht. Die Proben wurden für 4 h bei -80°C vorgefroren und dann in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingelagert.

3.2 Zytogenetik

3.2.1 Präparation von Metaphasenchromosomen

Die Zellen wurden für 30 min bis 24 h mit Colcemid (0,2 µg/ml) inkubiert. Hierbei arretieren die Zellen in der Metaphase, da Colcemid die Polymerisation der Microtubuli durch seine Bindung an Tubulin inhibiert und somit der Aufbau des Spindelapparates verhindert wird. Die adhärent wachsenden Zelllinien wurden dann durch Zugabe von 1 ml-5 ml Trypsin/EDTA aus den Flaschen gelöst und 10 min bei 1000 rpm (Hettich Rotina 46R) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet resuspendiert und 7 ml 0,075 M KCl zugefügt. Durch die Zugabe der hypotonen Lösung schwellen die Zellen an. Die Zellsuspension wurde für 15 min bei RT inkubiert, danach folgte eine Zentrifugation von 10 min bei 700 rpm (Hettich Rotina 46R). Der Überstand der KCl-Lösung wurde abgenommen und das Pellet resuspendiert. Unter mäßigem Schütteln wurden 0,5 ml eiskaltes Fixativ (Ethanol: Eisessig) tropfenweise zugegeben. Dann wurde das Röhrchen unter kräftigem Schütteln mit 7 ml Fixativ aufgefüllt. Die fixierten Zellen wurden für 7 min bei 900 rpm zentrifugiert (Hettich Rotina 46R). Es folgten zwei Waschschriffe mit Fixativ. Die Zellen wurden dann entweder auf Objektträger aufgetropft oder bei -20°C in 4,5 ml-Cryoröhrchen gelagert.

Zum Herstellen von Chromosomenpräparaten wurden die Objektträger 3 h in einer Küvette mit 100 % Ethanol gereinigt und dann 3 x mit dest. H₂O gewaschen. Die Objektträger wurden mit Eiswürfeln bedeckt und für 5 min in den Kühlschrank gestellt. Die Chromosomensuspension wurde mit einer Glaspipette durchmischt und dann mit senkrecht gehaltener Pipette mäanderförmig aus 10-15 cm Höhe auf die noch feuchten kalten Objektträger getropft. Es wurden etwa 4-8 Tropfen pro OT aufgebracht. Die Objektträger mit den aufgetropften Chromosomen wurden einen Tag bei RT gealtert und dann für die Chromosomenbandenanalyse, SKY oder FISH benutzt.

3.2.2 Chromosomenbandenfärbung

Die Chromosomen wurden entweder GAG oder GTG gebändert. Die GTG-Bänderung eignet sich besonders für lange Chromosomen und die GAG-Bänderung für kürzere Chromosomen. Die Länge der Chromosomen hängt hierbei von verschiedenen Faktoren ab, z.B. von der Zelllinie an sich oder von der Präparation.

Bei der Acetic-Saline-Giemsa-Chromosomenbandenfärbung (GAG-Banden) wurden die gealterten Chromosomenpräparate ÜN bei 59°C in eine modifizierte SSC-Lösung gestellt. Am nächsten Morgen wurden die Präparate für 3 min in einer 5%igen Giemsa-Färbelösung gefärbt und die Präparate abschließend mit Corbit eingedeckt. Für die Giemsa-Chromosomenbandenfärbung mit Trypsin (GTG-Banden) wurden die die Präparate für 2 h bei 100°C auf einer Heizplatte gealtert. Die Präparate wurden für 1,5-2 min in einer 37°C-warmen 0,6%igen Trypsinlösung inkubiert. Danach wurden die Präparate 2 x mit 0,9% NaCl gespült. Die Präparate wurden daraufhin 6 min in 6,4%iger Giemsa-Lösung gefärbt und danach 2 x mit dest. H₂O gespült. Die Präparate wurden abschließend mit Corbit eingedeckt. Die Chromosomenbandenanalyse wurde an einem Mikroskop, welches mit einer Kamera und an einem Rechner, der mit der Software 'Ikaros' der Fa. Metasystems ausgestattet ist, durchgeführt. Die Karyotypen wurden nach 'International System for Human Cytogenetic Nomenclature' (ISCN 2009; Shaffer *et al.*, 2009) verfasst.

3.2.3 Mikrodissektion

Die Mikrodissektion ist eine Methode zur Klassifikation von Markerchromosomen, also für aberrante Chromosomen, deren komplexe Zusammensetzung nicht identifiziert werden kann und zur Herstellung von sogenannten 'painting'-Sonden, die ganze Chromosomen anfärben. Bei der Mikrodissektion wurden die Chromosomen wie bei der konventionellen Chromosomenpräparation (siehe 3.2.1) vorbereitet. An einem speziellen Mikroskop, das mit einem Mikromanipulator ausgerüstet ist, wurden die mittels Giemsa gefärbten Chromosomen analysiert, um das gewünschte Chromosom identifizieren und ausschneiden zu können. Das veränderte Chromosom wurde dann mit einer sehr feinen Glasnadel von der Glasoberfläche des Objektträgers manuell heruntergekratzt (Mikrodissektion) und in ein kleines Reaktionsgefäß überführt. In der Regel sind fünf auf diese Weise gewonnene Chromosomen ausreichend, um weitere Analysen durchzuführen. Nach der Mikrodissektion der Chromosomen wurde die DNA isoliert und mittels DOP-PCR ('Degenerated Oligonucleotide-Primed'-PCR, siehe 3.4.2.3) amplifiziert. Nach der Amplifikation der DNA wurde sie in einer zweiten DOP-PCR-Reaktion direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen oder indirekt über Haptene markiert und mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH, siehe 3.3.1) auf normale Chromosomen hybridisiert (reverse FISH, rFISH). Damit kann die chromosomale Herkunft des Materials näher

bestimmt werden, aus dem das zu untersuchende Chromosom besteht. Desweiteren können auf diese Weise hergestellte Sonden von normalen Chromosomen zur FISH-Analyse auf aberranten Chromosomen eingesetzt werden. Die Mikrodissektion wurde hier für die Vereinzelung eines Markerchromosoms mit 12q-Amplifikation benutzt, das bei der SKY- und aCGH-Analyse mit kombinierter FISH-Analyse aufgefallen war, um anschließend die Zusammensetzung des Markerchromosoms mittels rFISH genauer zu analysieren.

Die Mikrodissektion von Chromosomen wurde von Frau Ina Bachmann in Kooperation mit Frau PD Dr. Barbara Fritz und Frau Evelyn Kornmann am Institut für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Die mikrodissektierten Chromosomen wurden von mir mittels DOP-PCR amplifiziert und markiert.

3.2.4 Durchflusszytometrische Karyotypisierung

Die bivariate Analyse von Chromosomen wurde zuerst von Gray *et al.* (Gray *et al.*, 1979) beschrieben. Hierbei werden die spezifischen Bindeeigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe Hoechst 33258 (HO; AT-spezifisch) und Chromomycin A3 (CA3; GC-spezifisch) genutzt, um Chromosomen durchflusszytometrisch sowohl nach Größe, als auch nach Basenpaarverhältnis und somit nach DNA-Gehalt aufzutrennen. Hierdurch ist es möglich ein durchflusszytometrisches Karyogramm der Zelllinien zu erstellen und einzelne Fraktionen aberranter Chromosomen auszusortieren, um diese für weitere Analysen nutzen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Zelllinie OSA für die durchflusszytometrische Karyotypisierung ausgewählt, da diese zuvor am besten zytogenetisch charakterisiert werden konnte und wenige Aberrationen aufwies. Ebenfalls verfügt sie über ein schnelles Wachstum, welches bei der großen Menge an Zellen, die für die Analyse benötigt werden, von Vorteil war.

3.2.4.1 Chromosomenisolation

Die Zellen wurden in Kultur durch eine 6 h-Inkubation mit dem Mitosehemmers Colcemid (0,1 µg/ml) in der Metaphase arretiert. Es wurden mindestens sechs voll bewachsene 150 cm²-Zellkulturflaschen für eine Analyse verwendet. Die Metaphasezellen wurden über Klopfen aus den Flaschen gelöst. Eine Trypsinbehandlung erfolgte nicht, damit möglichst wenig Interphasezellen in der Suspension vorhanden sind, die die Analyse stören könnten. Die Zellsuspensionen wurde 5 min bei 1500 rpm und RT zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0). Der

Überstand wurde anschließend komplett abgenommen. Auf das Pellet wurden 2-5 ml der 0,075 M KCl-Lösung (w Spermin 0,2 mM/Spermidin 0,5 mM/10 mM MgSO₄) zugefügt, das Pellet resuspendiert und die Lösung für 15-20 min bei RT inkubiert. Hierdurch schwellen die Zellen an, so dass sich die Chromosomen besser in der Zelle verteilen können. Das Schwellen der Zellen wurde an einem Lichtmikroskop überprüft und die Suspension gegebenenfalls nachinkubiert. Die Suspensionen wurden nach der KCl-Behandlung in einem 50 ml-Falconröhrchen vereinigt. Die Zellsuspension wurde im Anschluss nach Zugabe von 0,5-2 ml des PAB-Isolationspuffers (1x), der Stabilisatoren, wie Polyamine enthält für 15-20 min auf Eis inkubiert. Die Freisetzung der Chromosomen wurde danach an einem Fluoreszenzmikroskop begutachtet, indem 5 µl der Chromosomensuspension mit 5 µl DAPI-Lösung gefärbt wurden. Die Chromosomen sollten frei vorliegen und möglichst wenige Klumpen und Zellreste zu sehen sein. Wenn die Chromosomen gruppiert vorlagen wurde die Suspension 15-30 sec vehement gerüttelt und die Chromosomen erneut am Mikroskop begutachtet. Konnten die Chromosomen sich nicht durch Vortexen freisetzen lassen, wurde die Suspension durch eine 2 ml Spritze mit abgeknickter Kanüle (21G 1 ½; 0,8 mm x 38 mm) ein oder zwei Mal aufgezogen und anschließend 3 min bei 1500 rpm zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0). Abschließend wurde der Überstand abgenommen und durch einen 20 µm Filter in ein 15 ml Falcon-Röhrchen filtriert. Um die Ausbeute an Chromosomen zu erhöhen kann dem Pellet erneut PAB-Puffer zugesetzt werden und die Suspension erneut gevortext und zentrifugiert werden. Die Chromosomensuspension kann bei 4°C für ein paar Tage gelagert oder direkt mit den Fluoreszenzfarbstoffen CA3 und HO gefärbt werden.

3.2.4.2 Färben der Chromosomensuspension

Die Chromosomensuspension wurde mit 5 µg/ml HO-Stocklösung, 50 µg/ml CA3-Stocklösung und 10 mM MgSO₄ ÜN bei 4°C gefärbt. Durch Zugabe von MgSO₄ wird Färbung mit CA3 ermöglicht und somit die Auflösung des Karyogramms bei der durchflusszytometrischen Analyse begünstigt. Einen Tag oder mindestens zwei Stunden vor der Analyse wurden 10 mM Natriumcitrat und 25 mM Natriumsulfit zu den gefärbten Chromosomen gegeben. Die Chromosomensuspensionen wurden bis zur Analyse auf Eis gelagert. Kurz vor der Analyse wurden die Proben aufgeschüttelt und für 3 min bei 1500 rpm zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0) und der Überstand

durch einen 20 µm Filter filtriert, um eventuelle Verunreinigungen, die bei der Analyse stören könnten, zu entfernen.

3.2.4.3 Durchflusszytometrische Analyse und Sortierung

Die Analyse der Chromosomensuspension erfolgte auf dem MoFlo-Durchflusszytometer der Firma Dako. Das Gerät war ausgestattet mit einem UV-Laser (300-330 nm, 300 mW), um HO anzuregen und mit einem Laser (458 nm, 300 mW), um CA3 anzuregen. Die Detektion von HO erfolgte über einen 400 nm-Langpassfilter und einen 480 nm-Kurzpassfilter, die Detektion von CA3 über einen 490 nm-Langpassfilter. Der Druck der Hüllflüssigkeit betrug 60 psi und es wurde eine 70 µm Injektionsnadel benutzt. Die Chromosomen werden über den Hüllstrom verdünnt und so im rechten Winkel an der Lichtquelle vorbeigeführt. Bei der Analyse wurden die Chromosomen zuerst mittels UV-Laser und dann mit dem 458 nm-Laser angeregt. Über die Streuung des Anregungslichts und Anregung von fluoreszenten Markern erfolgte die simultane Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften der Chromosomen. Hierbei kann sowohl die Größe, als auch der DNA-Gehalt gleichzeitig detektiert werden. Die Helligkeit der Fluoreszenzsignale entspricht dabei dem DNA-Gehalt. Die Datenanalyse erfolgte mittels dem Programm 'Summit' (Vers. 3.1), welches eine Darstellung der Messergebnisse als Histogramm oder 'Dot Plot', also einer Punktwolke, ermöglicht. Bei der Analyse wurde die Region mit den Chromosomen auf ein Minimum über das sogenannte 'Gaten' eingegrenzt und daraufhin das durchflusszytometrische Karyogramm erstellt. Danach wurden die einzelnen Chromosomenfraktionen sortiert. Die so erhaltenen Chromosomen könnten für weitere Applikationen, wie dem Herstellen von FISH-Sonden oder zur Analyse auf hochauflösenden DNA-Microarrays oder Sequenzierung genutzt werden. Die durchflusszytometrischen Analysen wurden von mir am Wellcome Trust Sanger Centre, Cambridge (UK) in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Nigel Carter und Dr. Bee Ling Ng durchgeführt.

3.3 Molekularzytogenetik

3.3.1 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) ist eine molekularzytogenetische Methode, um definierte Chromosomenregionen, also Nukleinsäuresequenzen, auf den Chromosomen sichtbar zu machen und zu beurteilen. Eine fluoreszenzmarkierte

DNA-Probe bildet mit der homologen Chromosomenregion Hybridmoleküle, die im Fluoreszenzmikroskop, welches mit entsprechenden Filtern ausgestattet ist, detektiert werden können. Kommerziell sind eine Vielzahl von Sonden für unterschiedliche Fragestellungen erhältlich. So gibt es locuspezifische Sonden für einzelne Gene, Sonden für die Anfärbung ganzer Chromosomen und für die chromosomenspezifischen alpha-Satelliten oder andere Satelliten-DNA, die meist im Centromerbereich markieren und somit für die Bestimmung der Kopienzahl eines Chromosoms verwendet werden. Für nahezu alle Regionen des menschlichen Genoms stehen DNA-Sonden zur Verfügung, die in künstliche Bakterienchromosomen eingefügt sind und somit in Bakterien vermehrt werden können. Diese sogenannten 'bacterial artificial chromosomes', kurz BACs sind DNA-Konstrukte bzw. künstliche Chromosomen, die auf dem Fertilitätsplasmid (F-Plasmid) von *E.coli* basieren. Die BACs dienen als Vektor, in die bis zu 300kb große Genomabschnitte kloniert werden können. So wird zum Beispiel eine DNA-Sequenz eines humanen Genes in ein BAC inseriert und dieser anschließend in *E.coli* eingeschleust. Dies erlaubt eine einfache Vervielfachung des Zielbereichs. Nach Isolation der Plasmid-DNA steht eine große Menge an DNA der gewünschten DNA-Sequenz zur Verfügung. Die DNA kann dann mit Hilfe unterschiedlicher Techniken markiert und als Sonde in der FISH eingesetzt werden. Für die FISH muss zuerst die Ziel-DNA, die im Chromosomenpräparat erkannt werden soll, als Einzelstrang vorliegen. Das wird durch Hitzedenaturierung oder durch Behandlung der Präparate mit alkalischen Lösungen erreicht. Im darauf folgenden Hybridisierungsschritt wird die Ziel-DNA mit der Sonden-DNA zu einem Doppelstrang vereint, es bildet sich ein Hybridstrang aus Ziel- und Sonden-DNA. Der Nachweis erfolgt bei einer indirekten Markierung, wie der Biotin- oder Digoxigeninmethode, über Reportermoleküle, wie z.B. Streptavidin oder Anti-Digoxigenin, an die Fluoreszenzfarbstoffe (Cyanin 3 oder FITC) gekoppelt sind. Die Analyse erfolgt an einem Fluoreszenzmikroskop, das mit geeigneten Filtern ausgestattet ist.

Die FISH-Analyse wurde in dieser Arbeit zur Überprüfung der Ergebnisse der aCGH und der Charakterisierung der zytogenetischen Präsentation der Aberrationen verwendet. Hierbei wurden die BAC-Sonden mittels den Datenbanken 'UCSC' oder 'Ensembl' ausgewählt und vor dem Einsatz auf den Zelllinien mittels Hybridisierung auf Kontrollpräparate einer weiblichen und einer männlichen Testperson auf die korrekte chromosomale Lokalisation und eine gute Signalstärke getestet. Eine

Auflistung der BAC-Sonden, die für die Analysen verwendet wurden findet sich in Abschnitt 2.11. Desweiteren wurde die FISH-Analysen zum Ausschluss von *EWSR1*-Translokationen und durchgeführt. Das Gen *EWSR1* ('Ewing Sarcoma Region 1') ist auf Chromosom 22q12.2 (27.994.017-28.026.515 bp, UCSC hg18) lokalisiert und spielt beim Ewing-Sarkom eine entscheidende Rolle. Hier ist es mit einer Reihe von verschiedenen Partnern (*FLI1*, *ETS*, *ERG*, *E1AF*) in Translokationen involviert, bei denen onkogene Fusionsproteine entstehen. Um die Ewing-Sarkom-typischen Translokationen bei den Osteosarkomzelllinien ausschließen zu können wurden diese mit der Sonde 'EWSR1 break probe' der Fa. Kreatech auf Brüche innerhalb des Gens untersucht, die eine Voraussetzung für eine Fusion mit anderen Genen bieten würden (siehe 3.3.1.7). Nach der Voranalyse wurde eine BAC-Sonde für die Region 17q21.31, der Lokalisation des potentiellen Fusionspartners *FLI1* etabliert, um eine Kolo-kalisation der Gene auf dem gleichen Chromosom bei der Zelllinie OS10 untersuchen zu können.

Die Analyse der FISH-Präparate erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop, welches mit speziellen Filtern ausgestattet ist und mittels dem Programm 'ISIS'. Es wurden für jede Sonde wenn möglich 25 Metaphasen begutachtet und zusätzlich 200 Interphasenkerne ausgezählt. Eine Anzahl von über 20 Signalen oder ein flächiges Vorliegen von Signalkopien wurde als amplifiziert (amp) bezeichnet. Die detektierten Signalmuster wurden dann mit dem Ploidiegrad der Zelllinien und dem SKY- und/oder aCGH-Karyotyp verglichen, um das Vorliegen von Zugewinnen oder Verlusten zu bestimmen.

3.3.1.1 Kultivierung von BAC-Klonen

Die Kultivierung der BACs erfolgte über einen Verdünnungsausstrich der Bakterien auf eine selektive Agarplatte. Die Agarplatte wurde ÜN bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde eine Einzelkolonie aufgenommen und in 5 ml LB-Medium (1‰ Antibiotikum) gegeben. Die Kultur wurde 10 h bei 37°C inkubiert. 100 µl der Startkultur wurden in einen 100 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml LB-Medium (1‰ Antibiotikum) pipettiert und ÜN bei 37°C inkubiert.

3.3.1.2 Isolation von Plasmid-DNA

Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mittels 'QIAGEN® Plasmid Midi Kit', indem alle verwendeten Lösungen, außer TE-Puffer und Isopropanol, enthalten sind. Zur

Gewinnung der Sonden-DNA, wurden die Bakterien mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen. Die Bakterien wurden abzentrifugiert und in EDTA-haltigem Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. EDTA komplexiert zweiwertige Kationen (Mg^{2+} , Ca^{2+}), die für die Stabilität der Bakterienzellwände wichtig sind und destabilisiert daher die bakterielle Zellwand. Zusätzlich wurde dem Resuspensionspuffer RNase zugesetzt, die einen Großteil der bakteriellen RNA degradiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend durch Zugabe des Lysepuffers (200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)) lysiert. SDS löst als Detergenz die Phospholipide und Proteinkomponenten der Zellwände. Natronlauge denaturiert chromosomale und Plasmid-DNA sowie Proteine. Bei diesem Schritt muss genau auf die Dauer der Inkubation geachtet werden. Wird zu kurz inkubiert, ist die Ausbeute an Plasmid-DNA sehr gering. Wird zu lange inkubiert, denaturiert die Plasmid-DNA irreversibel. Das Lysat wurde mit saurem Kaliumacetatpuffer (3 M, pH 5,5) neutralisiert. Denaturierte Proteine, hochmolekulare RNA, denaturierte chromosomale DNA und bakterieller Zelldebris bilden in Anwesenheit von Kaliumacetat unlösliche Komplexe und werden zusammen mit dem Salz präzipitiert. Die kleineren Plasmidmoleküle bleiben in Lösung und können durch die Neutralisation der Lösung wieder renaturieren. Die Säulen dienen lediglich zur Aufreinigung. Hierbei handelt sich um Anionenaustauschersäulen, deren positive Ladung durch protonierte Diethylammoniummethylgruppen (DEAE) bereitgestellt wird. Die negativ geladene DNA wurde bei relativ geringer Salzkonzentration (750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% Isopropanol (v/v); 0,15% Triton® X-100 (v/v)) an das Säulenmaterial gebunden. Degradierte RNA und Proteine binden unter den gewählten Bedingungen nicht. Das Säulenmaterial wurde dann mit einem Puffer einer höheren Salzkonzentration (1 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% Isopropanol (v/v)) gewaschen, um restliche RNA und Proteine zu eliminieren. Die Elution der DNA erfolgte dann bei einer noch höheren Salzkonzentration (1,25 M NaCl; 50 mM Tris-Cl, pH 8,5; 15% Isopropanol (v/v)). Die eluierte DNA wurde durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol präzipitiert und nach Zentrifugation und Waschen des Pellets mit 70%igem Ethanol in einem Volumen von 100-150 µl TE-Puffer aufgenommen. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

3.3.1.3 Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA

Die Bestimmung der Konzentration der BAC-DNA erfolgte mittels Spektralphotometrie ('NanoDrop[®]'-Spektralphotometer). Hierbei wurden 1,5 µl der Probe auf den Messarm des Spektralphotometers pipettiert und die Konzentration über die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Um Messfehler durch lichtabsorbierende Stoffe im Puffer auszuschließen, wurde gegen den Lösungspuffer als Nullwert gemessen. Die DNA-Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration (ng/}\mu\text{l)} = \text{Absorption (A}_{260}\text{)} \cdot \text{Extinktionskoeffizient/Weglänge.}$$

Der Extinktionskoeffizient für doppelsträngige DNA beträgt 50 ng^{nm}/µl. Die Weglänge für das benutzte Gerät beträgt 1 mm. Zusätzlich wurde die Absorption bei 280 nm bestimmt. Das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ gibt an, inwieweit die DNA-Lösung mit Protein-Resten verunreinigt ist. Das Verhältnis für eine reine DNA-Präparation liegt bei 1,8.

3.3.1.4 Markierung der BAC-DNA mittels Nick-Translation

Die BAC-DNA wurde mittels Nick-Translation mit Biotin oder Digoxigenin markiert. Bei diesem Verfahren werden durch Verwendung einer Endonuklease, z.B. DNase I, Einzelstrangbrüche ('nicks') erzeugt, so dass freie 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphat-Enden entstehen. Mittels der DNA-Polymerase aus *E.coli* werden an den freien 3'-OH-Enden neue Nukleotide eingebaut. Gleichzeitig werden durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase auf der anderen Seite der Bruchstelle vorhandene Nukleotide entfernt. Hierdurch ist es möglich, dass die ursprünglichen Nukleotide durch modifizierte Nukleotide ersetzt werden.

Die indirekte Markierung von 1 µg DNA erfolgte mit dem 'BioNick[™] Labeling System' (Invitrogen) und mit dem 'DIG-Nick Translation Mix' (Roche) nach Angaben der Hersteller. Zur Überprüfung der Fragmentgröße, die für die FISH zwischen 200 und 500 bp liegen sollte, wurden 2 µl der Probe nebst 100 bp-Leiter als Größenstandard auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Waren die Fragmente noch größer wurden die Sonden bei 37°C nachinkubiert und danach erneut überprüft. Bei Erreichen der optimalen Größe wurde die Enzymreaktion durch die Zugabe eines 0,5 M EDTA-Puffers gestoppt. Um nicht gebundene Nukleotide von der markierten DNA zu Entfernen wurde eine Alkoholpräzipitation durchgeführt.

Hierzu wurde eine Lösung folgender Zusammensetzung hergestellt:

Komponente	pro Reaktion (μ l)
H ₂ O	34
Biotin-Sonde [100 ng]	5
DIG-Sonde [100 ng]	2
Lachssperma-DNA [10 μ g/ μ l]	1,5
Cot-DNA [1 μ g/ μ l]	2,5
3 M NaOAc pH 5,2 (1/10 Vol)	5
100 % EtOH (3 x Vol)	150
Gesamtvolumen	200

Die DNA-Fällung wurde für 15 min bei -80°C durchgeführt. Die DNA-Probe wurde bei 12000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert (Hermle Z 200 M/H), der Überstand abgenommen und das Pellet darauf mit 150 μ l 70 % EtOH gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet getrocknet und in 2,5 μ l deionisiertem Formamid (FA) aufgenommen. Die Probe wurde ÜN bei 400 rpm und 37°C im Schüttler gelöst.

3.3.1.5 Denaturierung und Hybridisierung

Die Objektträger mit den aufgetropften Chromosomen (siehe 3.2.1) wurden für die FISH vorbehandelt und denaturiert. Hierzu wurden die Objektträger zuerst in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 70%, 50% und 30% EtOH) für jeweils 1 min rehydriert. Dann wurde das Präparat mit 0,1 x SSC-Lösung bei RT für 1 min, 2 x SSC-Lösung bei 70°C für 30 min und abschließend erneut für 1 min mit 0,1 x SSC-Lösung bei RT gewaschen. Die monovalenten Kationen erhöhen dabei die Ionenstärke und stabilisieren so die DNA. Nachfolgend wurde die chromosomale DNA mit 0,07 M Natronlauge denaturiert. Dies ist für die chromosomalen Proteine schonender als eine Hitzedenaturierung oder eine Denaturierung mit Formamid, da sie bereits bei Raumtemperatur durchgeführt werden kann. Danach folgten 2 Waschschrte für jeweils 1 min mit eiskalter 0,1 x SSC-Lösung und 2 x SSC-Lösung. Durch die abschließende Dehydrierung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70% und 100% EtOH) für jeweils 1 min wurde die Denaturierung gestoppt und die Renaturierung verhindert. Die Sonde wurde parallel zu den Objektträgern denaturiert, indem zuerst 2,5 μ l Denaturierungs-Master Mix zu der gefällten Sonden-DNA gegeben wurden und die Sonde dann bei 72°C für 5 min inkubiert wurde. Die denaturierte Sonden-DNA (5 μ l) wurde auf das Präparat aufgetragen und ein 22 x 22

mm Deckglas auf den Objektträger gelegt. Das Deckglas wurde mit Fixogum umrandet. Das Präparat wurde ÜN in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit hybridisiert die denaturierte Sonden-DNA an die denaturierte chromosomale Zielsequenz. Die Hybridisierung der Sonden-DNA allein führt aber zu unspezifischen Hybridisierungssignalen, die über das gesamte Chromosom oder Genom verteilt sind. Um eine spezifische Hybridisierung der Probe mit ihren chromosomalen Zielsequenzen zu ermöglichen, wurde die Probe zusammen mit einem Überschuss an unmarkierter Cot-DNA und Lachssperma-DNA denaturiert. Bei der Renaturierung hybridisieren die repetitiven Elemente der Sonden-DNA mit dem Überschuss an Repeats der Cot-DNA, während der größte Teil der spezifischen Proben-Sequenzen einzelsträngig bleibt. Diese Sequenzen können anschließend mit ihren chromosomalen Zielsequenzen hybridisieren. Die Lachssperma-DNA wurde ebenfalls als Kompetitor eingesetzt, um unspezifische Hintergrundsignale zu unterdrücken. Nach der Hybridisierung wurde überschüssige ungebundene Sonden-DNA abgewaschen und die indirekt markierte Sonden-DNA über fluoreszenzmarkierte Reportermoleküle detektiert.

3.3.1.6 Detektion

Die Objektträger wurden nach Ablösen des Deckglases zunächst 3 x 5 min bei 37°C mit 2 x SSC/0,2% Tween-Lösung gewaschen. Daraufhin wurden die Objektträger 3 x 5 min bei 42°C mit 0,05 x SSC-Lösung gewaschen. Dann wurden 200 µl FISH-Blocklösung auf den Objektträger gegeben und dieser für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Detektion der mit Biotin und Digoxigenin markierten Sonden erfolgte nun mittels Avidin-Cy3 und Anti-Digoxigenin-Fluoreszein, indem 150 µl des Detektions-Master Mix auf den Objektträger pipettiert wurden und dieser 60 min bei 37°C inkubiert wurde. Anschließend wurde das Präparat 3 x 5 min mit 2 x SSC/0,2% Tween-Lösung bei 37°C gewaschen und mit DAPI-Lösung für 2 min bei Raumtemperatur gegengefärbt. Das Präparat wurde mit Vectashield eingedeckt. Die Präparate können bei 4°C im Dunklen gelagert werden.

3.3.1.7 FISH mit kommerziell erhältlichen Sonden

Bei der FISH mit kommerziell erhältlichen Sonden wurde ähnlich verfahren wie bei den selbst hergestellten Sonden. Die kommerziellen Sonden sind meist in einer gebrauchsfertigen Mischung erhältlich, die nur noch denaturiert werden muss oder

Sonde und Puffer werden einzeln geliefert, so dass der Hybridisierungsansatz noch hergestellt werden muss. In nachfolgender Tabelle sind die Vorbereitungsschritte, sowie das eingesetzte Volumen aufgeführt.

Tabelle 3.1: Ansatzvolumen der kommerziellen Sonden und Denaturierungsbedingungen

Sonde	Hersteller	Volumen Sonde	Volumen Puffer	Volumen H ₂ O	Denaturierung
EWSR1 Break-Probe LSI	Kreatech	10 µl	-	-	90°C, 10 min
EGR1/D5S23, D5S721 LSI	Abbott	0,5 µl	3,5 µl	1 µl	75°C, 5 min
IGH/CCND1 LSI	Abbott	0,5 µl	3,5 µl	1 µl	75°C, 5 min
IGH/FGFR3 LSI	Abbott	0,5 µl	3,5 µl	1 µl	75°C, 5 min

Die Denaturierung der Objektträger und die anschließende Hybridisierung erfolgte wie in Abschnitt 3.3.1.5 beschrieben. Die kommerziellen Sonden sind direkt markiert, deshalb sollte bei allen Schritten lichtgeschützt gearbeitet werden. Die Objektträger wurden nach der Hybridisierung für 10 min mit 2 x SSC-Lösung bei Raumtemperatur gewaschen. Danach folgt ein stringenter Waschschrift bei 75°C mit 1 x SSC-Lösung für 5 min, um ungebundene Sonden zu entfernen. Abschließend wurden die Objektträger für 5 min bei Raumtemperatur in 2 x SSC-Lösung gewaschen und für 2 min mit DAPI-Lösung gegengefärbt. Die Präparate wurden mit Vectashield eingedeckt und bei 4°C im Dunklen gelagert.

3.3.2 Vielfarbige Karyotypisierung mittels Spectral Karyotyping

Bei der spektralen Karyotypisierung (SKY) handelt es sich um eine FISH mit 24 chromosomenspezifischen 'Painting'-Sonden. Mittels Mikrodisektion oder durchflusszytometrischer Sortierung werden normale Chromosomen gewonnen und die DNA mittels 'Degenerate Oligonucleotide Primed-PCR' (DOP-PCR) markiert (Telenius *et al.*, 1992). Jede Sonde wird hierbei mit einer Kombination aus bis zu fünf unterschiedlichen Fluorochromen (Tabelle 3.2) markiert, so dass jedes Chromosom an Hand seiner spektralen Zusammensetzung über eine computergestützte Analyse eindeutig identifiziert werden kann (Schröck *et al.*, 1996; Macville *et al.*, 1998). Die drei Fluorochrome Rhodamin, Texas Red und FITC werden direkt in die DNA-Sonde eingebaut. Zusätzlich werden die zwei Haptene Biotin und Digoxigenin eingesetzt, an die bei der Detektion indirekt Fluorochrome an die Sonde gebunden werden. Die Detektion der Haptene erfolgt über Avidin-Cy5 bei Biotin und über einen Maus-Anti-

Dig-Antikörper und einem Ziege-Anti-Maus-Antikörper, der mit Cy5.5 konjugiert ist, bei Digoxigenin. Nach der Hybridisierung und der Immunodetektion wird das spektrale Bild mittels konventionellem Fluoreszenzmikroskop mit speziellem Dreifach-Bandpassfilter, einer digitalen Kamera und dem 'SpectraCube®', der für jeden Pixel eines 'Charged-Coupled-Device-Images' (CCD) spektrale Informationen über Fourier Transformation (Malik *et al.*, 1996) empfangen kann, erfasst. Anschließend wird eine Emissionskurve für jeden Pixel generiert. Das rohe spektrale Bild zeigt die Fluoreszenzintensitäten pro Wellenlänge. Mittels mathematischen Klassifikationsalgorithmus errechnet die Software aus den spektralen Informationen ein Pseudofarbenbild, das die Analyse des Karyogramms erleichtert. Die Auswertung erfolgte über die Software 'Spectral Imaging'. Bei Chromosomen mit komplexen strukturellen Aberrationen, insbesondere bei Translokationen eignet sich die SKY gut zur Aufklärung dieser Markerchromosomen. Für jede Zelllinie wurden mindestens zehn Karyogramme analysiert und diese in einer Karyotypformel gemäß 'International System for Human Cytogenetic Nomenclature' (ISCN 2009, Shaffer *et al.*, 2009) zusammengeführt. Einzelzellaberrationen wurden nicht berücksichtigt. Die Karyotypen wurden mit den aCGH-Ergebnissen verglichen und die Bruchpunkte von Translokationen wenn möglich genauer eingegrenzt. Außerdem erfolgte eine Analyse hinsichtlich der Zugewinne und Verluste von chromosomalen Material und rekurrenter Bruchpunkte mittels dem Programm 'CyDAS' (siehe 3.5.1).

Tabelle 3.2: Werte der Absorption und Emission der bei der SKY verwendeten Fluorochrome

Fluorochrom	Rhodamin	Texas Red	FITC	Cy 5	Cy 5.5
Absorption	550	596	495	650	675
Emission	570	620	525	670	694

Die Vorbehandlung der Objektträger erfolgte wie bei der FISH (3.3.1.5). Die SKY erfolgte mit dem 'SkyPaint™ DNA Kit' der Firma Applied Spectral Imaging, in dem die Sonde, die Block-Lösung und die Färbelösungen enthalten sind. Pro Hybridisierung wurden 10 µl der vorgefertigten Sonde für 30 min bei 37°C im Schüttelinkubator bei 600 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Sonde bei 80°C für 7 min denaturiert und danach für 45 min bei 37°C im Wasserbad vorhybridisiert. Die Sonde wurde dann auf den denaturierten Objektträger aufgetragen und unter einem 18 x 18 mm Deckglas eingedeckt. Das Deckglas wurde mit Fixogum umrandet und der Objektträger 15 min auf eine Wärmeplatte (37-42°C) gelegt, um das Präparat zu versiegeln. Die

Hybridisierung erfolgte in einer feuchten Kammer bei 37°C für 48 h. Nach der Hybridisierung wurde das Deckglas entfernt und das Präparat zuerst in 2 x SSC für 10 min bei RT gewaschen. Der zweite Waschschrift wurde in 0,4 x SSC bei 74°C für 5 min durchgeführt. Anschließend folgte ein Waschschrift für 2 min bei RT in 4 x SSC mit 0,1% Tween als Detergenz. Der Objektträger wurde 30 min bei 37°C mit Block-Lösung inkubiert. Für die Detektion von Biotin mittels Streptavidin-Cy5 und von Digoxigenin mittels Cy 5.5 erfolgten zwei aufeinanderfolgende Inkubationen mit den mitgelieferten Färbelösungen für jeweils 30 min bei 37°C. Um überschüssige Färbelösung zu entfernen wurde der Objektträger 3 x 2 min mit Waschpuffer bei 45°C gewaschen. Zum Schluss wurde der Objektträger 2 min mit DAPI-Lösung gegengefärbt und mit Vectashield eingedeckt. Die Präparate wurden bei 4°C im Dunklen aufbewahrt.

3.3.3 Vergleichende genomische Hybridisierung auf DNA-Microarrays (aCGH)

Die vergleichende genomische Hybridisierung ('comparative genomic hybridisation', CGH) an DNA- oder Oligonukleotidarrays ist eine gesamtgenomische molekularzytogenetische Methode zum Nachweis genomischer Imbalancen. Hierbei werden die zu untersuchende DNA und eine Kontroll-DNA bestehend aus einem DNA-Pool gesunder Probanden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und auf einen Objektträger mit synthetisch hergestellten Oligonukleotiden hybridisiert. Die Imbalancen können dann über Unterschiede in den Verhältnissen der verschiedenen Fluoreszenzintensitäten der Proben- und Kontroll-DNA bestimmt werden.

In dieser Arbeit wurden 4x44k-DNA-Microarrays der Firma Agilent Technologies verwendet. Das gesamte Genom ist auf den Objektträgern durch DNA-Oligonukleotide mit einer Länge von 60 bp repräsentiert. Diese Oligonukleotide werden synthetisch über die Phosphoramidit-Methode hergestellt. Das Prinzip beruht auf der Blockierung der spontanen Ausbildung von Phosphordiesterbindungen zwischen den Nukleotiden durch Einsatz von Schutzgruppen am 5'-Ende der Desoxyribose. Ein gezieltes Entfernen der Schutzgruppen ermöglicht eine gerichtete Verlängerung der Nukleotidketten (Abbildung 3.1). Ähnlich wie beim Drucken mit einem Tintenstrahldrucker werden die Nukleotide als 60-mer Oligonukleotide direkt auf einen speziellen Objektträger nach der Phosphoramidit-Methode synthetisiert (Abbildung 3.2).

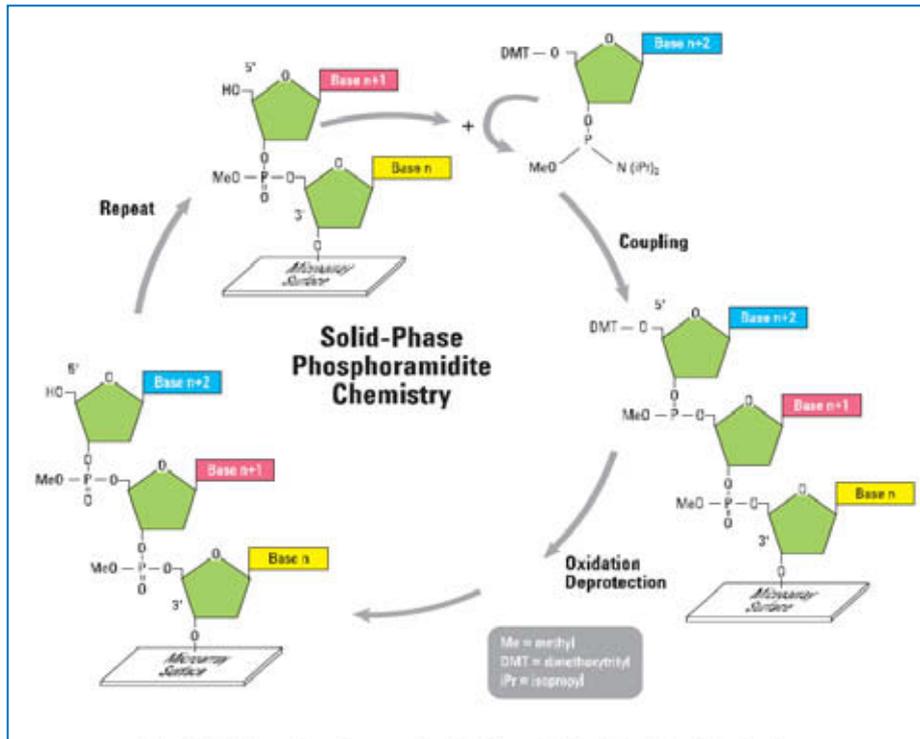


Abbildung 3.1: Phosphoramidit-Methode zur Herstellung der Oligonukleotide eines Arrays. Ein freies Nukleotid bindet über eine Phosphordiesterbindung an die 5'-Gruppe der wachsenden Kette. Das nun gebundene Nukleotid kann seinerseits erst dann eine Bindung eingehen, wenn die Schutzgruppe am 5'-Ende entfernt wurde (Quelle:<http://www.genomics.agilent.com>).

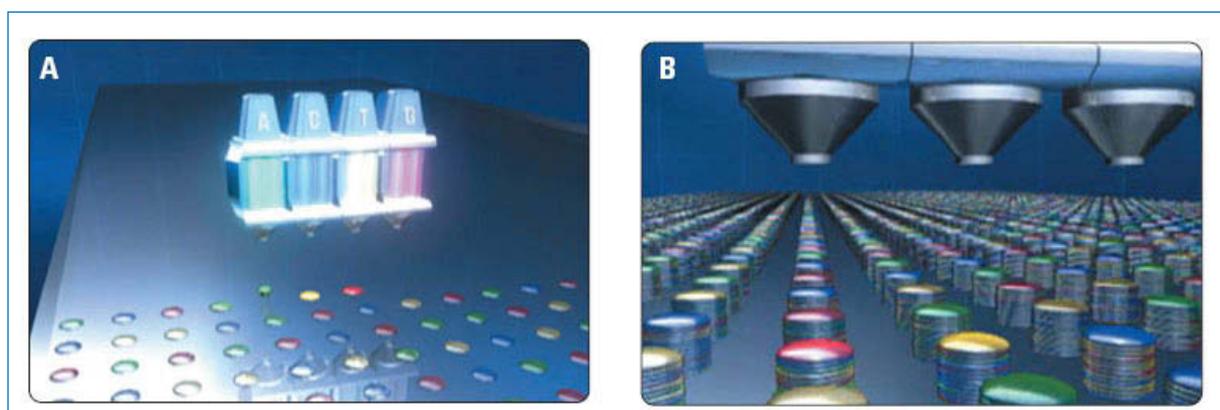


Abbildung 3.2: Bedrucken der Objektträger mit synthetisch hergestellten Oligonukleotiden auf die Microarray-Objektträger. a) Die erste Schicht der Nukleotide wurde auf den Objektträger gedruckt. b) Verlängerung der Nukleotidkette.(Quelle:<http://www.genomics.agilent.com>).

Durch die Anzahl der Proben auf dem Objektträger wird die Auflösung bestimmt. Bei einem 44k-Microarray wird das Genom mit ca. 44000 Oligonukleotidproben abgedeckt. Gut charakterisierte genreiche Regionen sind hierbei durch mindestens

eine Probe und tumor-spezifische Gene durch mindestens zwei Proben repräsentiert. Die Proben sind mit den Annotationen der Gene der 'UCSC'-Datenbank der Universität von Kalifornien (Version hg18, März 2006) bzw. der Datenbank des 'National Center for Biotechnology Information' (NCBI) mit der Version 36 abgeglichen. Die Proben bedecken in gleichmäßiger Verteilung den gesamten Array, wobei sie nicht ihrer Lokalisation auf den Chromosomen nach angeordnet sind, wodurch erreicht wird, dass es bei einem lokalen Ausfall von mehreren Proben, z.B. durch Verschmutzung oder fehlende Hybridisierung, keine kompletten Chromosomen betroffen sind. Die mediane globale Auflösung der Proben beträgt 43 kb und die mediane Auflösung der Proben in Genen beträgt 24 kb.

Der Arbeitsablauf einer aCGH-Analyse wird in Abbildung 3.3 vorgestellt.



Abbildung 3.3: Arbeitsablauf der aCGH.

Die zu untersuchenden Proben- und Kontroll-DNAs werden zunächst über einen Restriktionsverdau fragmentiert, dann mit Fluoreszenzstoffen markiert und abschließend aufgereinigt. Die markierten DNAs werden vereinigt und auf den DNA-Microarray hybridisiert. Nach 24 h wird der Array gewaschen und gescannt. Danach folgt die computergestützte Datenextraktion und komparative Analyse der Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten und somit eine Identifizierung der genomischen Imbalancen der zu untersuchenden Probe.

In dieser Arbeit wurden alle 21 Zelllinien mittels aCGH untersucht. Als Referenz-DNA diente ein Pool von mindestens fünf DNAs weiblicher oder männlicher gesunder Spender. Die Referenz-DNAs wurden gegeneinander auf einem Array hybridisiert,

um genomische Imbalancen bei den Kontrollen ausschließen zu können. Um die technische Reproduzierbarkeit der Experimente zu überprüfen wurde für die Zelllinie OSA zusätzlich ein 'dye swap' durchgeführt, hierbei wurde die Proben-DNA mit Cyanin 3 statt mit Cyanin 5 markiert. Die Zelllinie U-2OS wurde wiederholt analysiert, hierbei wurde DNA aus unterschiedlichen Zellkulturpassagen verwendet, um die biologische Reproduzierbarkeit der Experimente zu prüfen. Auf Grund der schlechten Qualitätsparameter bei der ersten Analyse wurde die DNA der Zelllinie OS18 erneut präpariert und analysiert. Nach Absprache und auf Anraten des Herstellers wurde bei Proben mit schlechten Werten für die spezifische Aktivität die aCGH trotzdem fortgeführt.

3.3.3.1 Restriktionsverdau der genomischen DNA mittels *Alu* I und *Rsa* I

Bevor die DNA mittels 'random primed labeling' markiert werden kann muss sie zunächst fragmentiert werden. Hierzu wurden die Restriktionsenzyme *Alu* I und *Rsa* I verwendet. Das Enzym *Alu* I schneidet hierbei zwischen den Basen Guanin und Cytosin und *Rsa* I zwischen Adenin und Thymin. Eine Menge von 1 µg DNA wurde mit dest. H₂O auf ein Volumen von 20,2 µl verdünnt. Der Reaktionsmix für eine Reaktion setzt sich aus 2 µl dH₂O, 2,6 µl Puffer C (10 x), 0,2 µl BSA (10 µg/µl), 0,5 µl *Alu* I (10 U/µl) und 0,5 µl *Rsa* I (10 U/µl) zusammen. Die 5,8 µl Reaktionsmix wurden zu den 20,2 µl DNA gegeben und der Ansatz 2 h bei 37°C und 400 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Die Reaktion wurde durch Inkubation für 20 min im Heizblock bei 65°C gestoppt. Die Probe wurde auf Eis gestellt. Für die anschließende Markierung sollten die DNA-Fragmente eine Größe zwischen 200 und 500 bp haben. Die Fragmentgröße wurde auf einem 0,8%igen Agarosegel überprüft. Hierzu wurden 2 µl Probe mit 8 µl H₂O und 3 µl 5x-Auftragungspuffer gemischt und nebst 100 bp-Leiter als Größenstandard auf das Gel aufgetragen. Die fragmentierte DNA kann bei -20°C gelagert oder direkt fluoreszenzmarkiert werden.

3.3.3.2 Fluoreszenzmarkierung der genomischen DNA

Die Markierung der DNA erfolgte nach den Herstellerangaben mittels 'Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit' der Fa. Agilent Technologies nach Protokoll Vers. 6.1. Hierbei wurden 1 µg Proben-DNA mit Cyanin 5 und 1 µg Referenz-DNA mit Cyanin 3 über 'random primed labeling' markiert. Bei dieser Markierungsreaktion werden kurze, nach dem Zufallsprinzip an die Sonden-DNA hybridisierende Hexanukleotide

als Startpunkt (Primer) für eine Neusynthese der DNA gewählt. Hierzu wird die Ausgangs-DNA denaturiert und anschließend abgekühlt, damit sich die Hexanukleotide an die DNA anlagern können. Die Synthese der komplementären DNA-Stränge beginnt an den gebundenen Hexanukleotiden und wird durch das Klenow-Fragment katalysiert, welches die Polymeraseaktivität der DNA-Polymerase I von *E.coli*, jedoch keine 5'-3'-Exonukleaseaktivität besitzt. Während der Synthese werden neben den normalen Nukleotiden auch markierte Nukleotide, hier entweder Cyanin 3-dUTP oder Cyanin 5-dUTP, eingebaut. Die verdaut DNA wurde für die Markierung in 0,5 ml Reaktionsgefäße gegeben und 5 µl der Random Primer hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde durch Auf- und Abpipettieren gemischt und für 3 min bei 95°C in Thermocycler denaturiert. Die Probe wurde danach für 5 min auf Eis inkubiert. Es wurde folgender Mastermix angesetzt:

Komponente	pro Reaktion (µl)
Nuklease-freies H ₂ O	2
5x Puffer	10
10x dNTP	5
Cyanin 3-dUTP oder Cyanin 5-dUTP	3
Exo-Klenow Fragment	1
Gesamtvolumen	21

Danach wurden 21 µl des Mastermixes mit Cyanin 5 zu der Proben-DNA und 21 µl des Mastermixes mit Cyanin 3 zu der Kontroll-DNA gegeben. Die Proben wurden für 2 h bei 37°C im Thermocycler inkubiert. Die Reaktion wurde für durch eine Inkubation für 10 min bei 65°C gestoppt. Die Proben können bei -20°C ÜN gelagert oder direkt aufgereinigt werden.

3.3.3.3 Aufreinigung und Bestimmung der spezifischen Aktivität der fluoreszenzmarkierten DNA

Die Aufreinigung der fluoreszenzmarkierten DNA erfolgte über Microcon YM-30-Säulen der Fa. Millipore nach Protokoll Vers. 6.1 (Fa. Agilent Technologies).

Die Einbaurrate von markierten Nukleotiden in die DNA wurde über die spezifische Aktivität bestimmt. Die spezifische Aktivität ist wie folgt definiert:

$$\text{Spez. Aktivität (pmol/}\mu\text{g)} = [(\text{pmol}/\mu\text{l Farbe}/(\mu\text{g}/\mu\text{l gDNA})].$$

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde die Absorption der Farbstoffe Cyanin 3 (550 nm) und Cyanin 5 (650 nm) mittels 'NanoDrop[®]-Spektralphotometer

bestimmt. In Tabelle 3.3 sind die nach Angaben der Fa. Agilent Technologies bei einer erfolgreichen Markierung zu erwartenden Werte aufgeführt.

Tabelle 3.3 Herstellerangaben der zu erwartenden Werte für Ausbeute und spezifische Aktivität

eingesetzte gDNA (μg)	Ausbeute (μg)	spez. Aktivität Cy3 ($\text{pmol}/\mu\text{g}$)	spez. Aktivität Cy5 ($\text{pmol}/\mu\text{g}$)
0,5 - 1	5 – 7	25 – 40	20 – 35
3	7 – 10	35 – 55	25 – 40

3.3.3.4 Vorbereitung der fluoreszenzmarkierten DNA für die Hybridisierung

Nach der Aufreinigung und Messung der spezifischen Aktivität wurden Referenz- und Proben-DNA vereinigt und dann nach Zugabe von Hybridisierungsmix laut Herstellerangaben denaturiert. Der Hybridisierungsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Komponente	Volumen (μl) pro Hybridisierung
markierter Probenmix	39
Cot-1 DNA (1 mg/ml)	5
10x Blocking Lösung	11
2x Hybridisierungspuffer	55
Gesamtvolumen	110

Der Hybridisierungsansatz wurde für 3 min bei 95°C im Heizblock und danach 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Abschließend wurde der Ansatz 1 min bei 12000 rpm zentrifugiert (Hermle Z 233 MK).

3.3.3.5 Hybridisierung

Die Hybridisierung der DNA-Proben auf einen 4x44k-Oligonukleotidarray erfolgte für 24 h bei 65°C und 20 rpm in dem Hybridisierungsofen der Fa. Agilent Technologies. Hierzu wurde der Überstand (100 μl) des Probenansatzes auf den Microarrayobjektträger pipettiert und dieser mit einem 'Backing', einem Objektträger, der mit vier Gummidichtungen versehen ist, versiegelt.

3.3.3.6 Waschen des DNA-Microarrays

Das Waschen des DNA-Microarrays fand unter dem Abzug nach Protokoll Vers. 6.1 statt. Hierbei wurde auf Grund der Anfälligkeit zur Ozondegradierung von Cyanin 5 mit einer Stabilisierungslösung gearbeitet. Zuerst wurde das 'Backing' vom Microarrayobjektträger mit Hilfe einer Pinzette in 'Oligo aCGH-Waschpuffer' 1 gelöst.

Der Arrayobjektträger wurde dann für 5 min bei RT in 'Oligo aCGH-Waschpuffer' 1 gewaschen. Anschließend erfolgte ein Waschschrift bei 37°C für 1 min in 'Oligo aCGH-Waschpuffer' 2. Danach wurden die aCGH-OTs für 10 sec in Acetonitril bei RT inkubiert und abschließend für 30 sec bei RT in Stabilisierungs- und Trockenlösung gegeben. Alle Schritte wurden in Glasküvetten mit 200 ml der jeweiligen Lösung unter Rühren durchgeführt. Nach dem Waschen wurde der Array in einen Plastikhalter eingespannt und direkt gescannt.

3.3.3.7 Scannen des DNA-Microarrays

Der Scan des Microarrays erfolgte im 'Scanner B' der Fa. Agilent Technologies. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden mit zwei Lasern, einem 'SHG-YAG'-Laser ('second harmonic generation-Yttrium-Aluminium-Granat') mit einer Emissionswellenlänge von 532 nm für Cyanin 3 und einem 'HeNe'-Laser ('Helium-Neon') mit einer Emissionswellenlänge von 633 nm für die Anregung von Cyanin 5, angeregt.

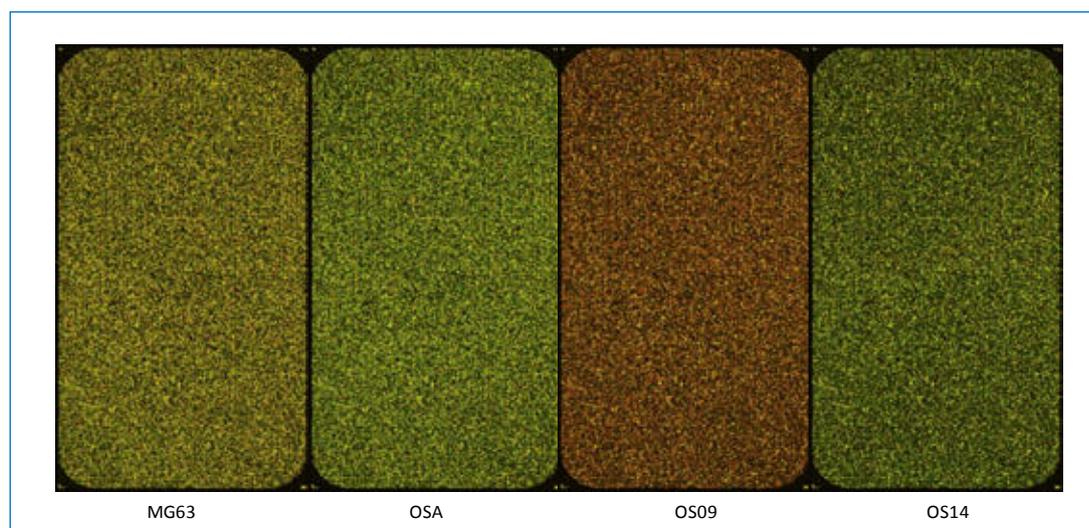


Abbildung 3.4: Ansicht eines nach dem Scannen eines 4x44k-Oligonukleotidarray erstellten tif-Bildes. Bei einer gleichmäßigen Hybridisierung von Proben und Kontroll-DNA erscheinen die Spots gelb, bei einer Überrepräsentation von Proben-DNA erscheinen die Punkte rot-orange und bei einer Unterrepräsentation grün.

Dabei absorbieren die Fluorochrome das Laserlicht und emittieren längerwelliges Licht. Die Lichtsignale gelangen durch spezifische Filter für Cyanin 3 und Cyanin 5 in einen Photomultiplier. Hier werden sie in elektronische Signale umgewandelt, verstärkt und digitalisiert. Abschließend wird eine Bilddatei erstellt, die in das Datenextraktionsprogramm eingeladen werden kann (Abbildung 3.4).

3.3.3.8 Datenextraktion & Analyse

Zur Datenextraktion wurde das Programm 'Feature Extraction' (Vers. 9.5.3.1 & 10.1.1.1; Agilent Technologies) benutzt. Hierbei wurden die Rohdaten der Fluoreszenzverhältnisse aus der Bilddatei der einzelnen Oligonukleotide ausgelesen. Zunächst wurde ein Kontrollgitter über die Bilddatei gelegt, mit Hilfe dessen die Position der Oligonukleotide für die Datenextraktion festgelegt wird. Hier geben besonders die hybridisierten und unhybridisierten Kontrolloligonukleotide in den vier Eckpartien des Microarrays Aufschluss über den korrekten Verlauf der Hybridisierung (Abbildung 3.5). Anschließend wurden die Intensitäten der beiden Fluorochrome normalisiert, unspezifische Hintergrundsignale herausgefiltert und die Verhältnisse der Intensitäten verglichen. Der Wert $\log_2\text{ratio}$ sind hierbei die logarithmierten Fluoreszenzintensitäts-Verhältnisse der Fluoreszenzfarben der Probe und der Kontrolle. Die zu erwartende Kopienzahl kann über folgende Formel berechnet werden:

$$\text{Kopienzahländerung} = 2^{\log_2 \text{ratio}}.$$

Ein $\log_2\text{ratio}$ von 0,6 entspricht also der 1,5-fachen Kopienzahl und ein Wert von -1 der 0,5-fachen Kopienzahl bei einer Aberration in 100% der Zellen. Bei Tumoren treten Aberrationen aber unter Umständen in einem geringeren Prozentsatz der Zellen, also in unterschiedlichen Klonen auf, so dass hier auch geringere Werte einen Zugewinn oder Verlust bedeuten können. Aus diesem Grund wurde hier schon $\log_2\text{ratio}$ -Wert ab über 0,2 oder ab unter -0,2 als Zugewinn oder Verlust gewertet.

Die Software gibt die Ergebnisse in einer Textdatei aus, die mit dem Analyseprogramm 'Genomic Workbench' ausgewertet werden kann. Zusätzlich erhält man einen Qualitätsbericht ('QC-Report'), dem man Informationen über den Verlauf der Analyse und die Qualität des Arrays entnehmen kann (Tabelle 3.4).

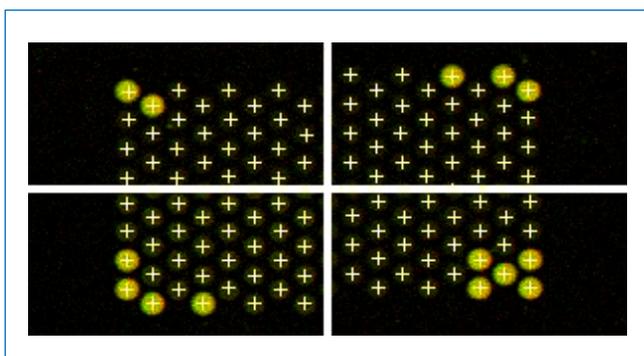


Abbildung 3.5: Ansicht auf die vier Eckpartien mit sowohl hybridisierten als auch unhybridisierten Kontrolloligonukleotiden des aCGH-Objektträgers der Zelllinie OSA. Die Software 'Feature Extraction' legt ein Kontrollgitter (Kreuze) über diese Oligonukleotide, welches bei der Datenextraktion eine wichtige Rolle spielt.

Der Durchschnitt der absoluten Werte der \log_2 ratio-Varianzen von Probe zu Probe über das gesamte Genom wird als 'derivative of the log ratio spread' (DLRS) bezeichnet. Der DLRS ist eine Maßeinheit, die Aufschluss über die aCGH-Qualität gibt und somit einer der wichtigsten Qualitätsparameter.

Tabelle 3.4: Qualitätsparameter und Richtwerte zur Beurteilung der Qualität der aCGH-Hybridisierung laut Protokoll Vers. 6.1 der Fa. Agilent Technologies.

Parameter	Exzellent	Gut	Schlecht
BGNoise	<5	5 - 10	>15
Signal Intensität	>150	50 - 150	<50
Signal-zu-Rauschen (SNR)	>100	30 - 100	<30
Reproduzierbarkeit	<5	5 - 20	>20
DLRSspread	<0,2	0,2 - 0,3	>0,3

Bei einem zu hohen DLRS-Wert kommt es zu einer hohen Streuung der Oligonukleotide, was dazu führen kann, dass Aberrationen nicht mehr abgegrenzt werden können. Bei schlechten Qualitätswerten wurde zuerst die DNA mittels Agarosegelanalyse auf einem 1%igen Agarosegel analysiert, um eine Degradierung der DNA ausschließen zu können. Insgesamt wurden die Experimente wiederholt, wenn mehr als zwei Qualitätsparameter einen schlechten Wert aufwiesen.

Zur Analyse der genomischen Imbalancen wurde die Textdatei aus der 'Feature Extraction' in die Analysesoftware 'Genomic Workbench' Version 5.0.14 (Fa. Agilent Technologies) eingeladen. Hier werden die Intensitätsverhältnisse der beiden Farbkanäle aller Oligonukleotide entsprechend ihrer Abweichung vom Nullwert und Lage auf dem Genom dargestellt. Das Programm bietet die Möglichkeit, sich die Ergebnisse auf Genom-, Chromosom- und Genebene (Abbildung 3.6) anzeigen zu lassen, hierdurch ist eine genaue Charakterisierung der Bruchpunkte möglich.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurden folgende Parameter gewählt:

- Genome Build: hg18
- Auswerte-Algorithmus: ADM-2, Schwellenwert 6,0
- Centralisation: Schwellenwert 6,0; Fenstergröße 10
- Aberrationsfilter:
 - Minimale Anzahl von Proben in Region: 3
 - Minimales absolutes mittleres \log_2 ratio für die Region: 0,2
 - Maximale Anzahl aberranter Regionen: 20000

Die hier gewählten Analyseparameter wurden bei der Erstellung der aCGH-Karyotypen benutzt. Die Karyotypen wurden mit einer Auflösung von 850 bbps erstellt. Für die Detektion kleinerer rekurrenter Aberrationen, die nur ein oder zwei Oligonukleotide betreffen wurde der Aberrationsfilter deaktiviert und interessante Regionen visuell analysiert. Außerdem erfolgte eine gezielte Analyse auf Verluste von bekannten Tumorsuppressorgenen.

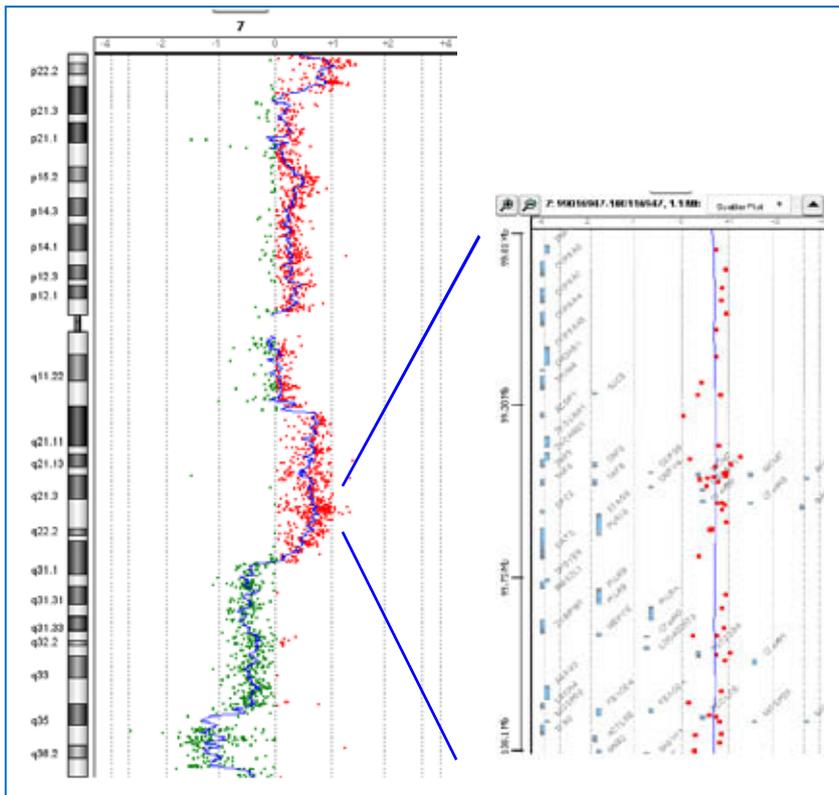


Abbildung 3.6: Ansicht des aCGH-Profiles eines Chromosoms 7 dargestellt auf Chromosomen- und Genebene im Programm 'Genomic Workbench'. In der oberen Skala kann das \log_2 ratio abgelesen werden. Auf der linken Seite ist das komplette Chromosom 7 dargestellt. Die blaue Linie präsentiert den 'Moving Average', eine Ausgleichsgerade zwischen den Oligonukleotiden. Oligonukleotide mit einem hohen \log_2 ratio sind nach rechts verschoben und zeigen einen Zugewinn an, Oligonukleotide mit einem negativen \log_2 ratio sind nach links verschoben und zeigen einen Verlust chromosomalen Materials an. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt die Region 7q22.1 im Detail.

Die Analyse auf die Verteilung der genomischen Imbalancen erfolgte über die Darstellung der Aberrationen im 'penetrance plot', bei dem der prozentuale Anteil mit Zugewinnen oder Verlusten für die jeweilige Region angezeigt wird. Die zytogenetische Präsentation und Verteilung der Zugewinne und Verluste wurde mittels FISH mit eigens hergestellten BAC-Sonden analysiert. Für diese Analysen wurden Regionen ausgewählt, die in vielen Zelllinien betroffen waren und/oder deren

\log_2 ratios besonders hoch oder niedrig waren. Die Analyse der Bruchpunkte erfolgte mit Hilfe der automatischen Auswertung der Software 'Genomic Workbench'. Die reine softwaregestützte Auswertung kann auf Grund der Schwankungen der \log_2 ratios zu einer Ausgabe falsch-positiver Bruchpunkte oder falsch-negativer Bruchpunkte führen, deswegen wurden die Bruchpunkte ebenfalls visuell in der Chromosomen- und Genansicht des Programms überprüft.

3.4 Molekularbiologie

3.4.1 DNA-Isolation aus Zellsuspensionen

Die Isolation von genomischer DNA aus den Zelllinien erfolgte nach Herstellerangaben der Firma Qiagen mittels 'QIAamp DNA Blood Midi Kit'. Das Eluat wurde hierbei wiederholt auf die Säule gegeben, um so die Ausbeute an DNA zu maximieren. Nach der Isolation wurde die DNA-Konzentration mittels 'NanoDrop[®]'-Spektralphotometer gemessen und die DNA bei -20°C gelagert.

3.4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ('polymerase chain reaction', PCR) ist eine Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren. Die DNA wird zunächst denaturiert, damit sich die Primer beim sogenannten 'Annealing'-Schritt an die einzelsträngige DNA anlagern können. Primer sind kurze DNA-Abschnitte aus etwa 20 Nukleotiden (Oligonukleotide), die sich spezifisch an die Zielsequenz anlagern, hierdurch ist es möglich bestimmte Genomabschnitte gezielt zu vermehren. An das freie 3'-OH-Ende der Primer werden mit Hilfe der *Taq*-Polymerase freie Nukleotide (dNTPs) im 'Elongations'-Schritt angehängt. Auf diese Weise erhält man nach einem Reaktionszyklus aus einem doppelsträngigen DNA-Strang zwei DNA-Stränge. Führt man eine bestimmte Anzahl von Zyklen aus kann man eine Vielzahl identischer Moleküle erzeugen, die dann für weitere analytische Methoden zur Verfügung stehen.

3.4.2.1 Etablierung der Primer

Die Primer für die Amplifikation einer gewünschten Zielsequenz wurden mit Hilfe des Programms 'Primer 3' ausgewählt, indem die Zielsequenz in das Internettool eingeladen wurde und die bestmöglichen Primer mit einer in etwa gleichen Schmelztemperatur gewählt wurden. In dieser Arbeit wurden Primer für das Exon 2

des Gens *TSPAN31* (12q14.1, 56.425.051-56.428.293 bp) etabliert, mit deren Hilfe die amplifizierte DNA eines mikrodisektierten derivativen Chromosoms 12 analysiert werden sollte.

Vor dem Einsatz in die PCR mit der Proben-DNA wurden die Primer in einer PCR in einem Temperaturgradientencycler (Fa. Eppendorf) optimiert, so dass die optimale 'Annealing'-Temperatur für eine maximale Menge des amplifizierten Produktes bestimmt werden konnte.

Hierzu wurden die Primer bei 12 unterschiedlichen Annealing-Temperaturen (°C) getestet:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
52,3	52,5	53,0	53,9	55,0	56,4	57,7	59,1	60,4	61,5	62,3	62,7

Der Mastermix für die Temperaturgradienten-PCR setzte sich wie folgt zusammen:

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen	Endkonzentration
dH ₂ O	-	37,5 µl	-
Forward-Primer	50 µM	0,5 µl	0,5 µM
Reverse-Primer	50 µM	0,5 µl	0,5 µM
dNTPs	10 mM	1 µl	0,2 mM
Tris-HCl	100 mM	5 µl	10 mM
KCl	500 mM	(10 x Puffer NEB)	50 mM
MgCl ₂	15 mM		1,5 mM
<i>Taq</i> DNA Polymerase	5 U/µl	0,5 µl	2,5 U (0,05 U/µl)
Zwischenvolumen		45 µl	
Test-DNA	20 ng/µl	5 µl	100 ng
Endvolumen		50 µl	

Der Reaktionsansatz wurde in 0,2 ml-Reaktionsgefäßen zusammenpipettiert. Als Test-DNA wurde eine männliche oder weibliche Kontroll-DNA verwendet. Die PCR wurde in dem Gradientencycler mit nachfolgendem Programm durchgeführt.

PCR-Programm:

	94°C	5 min	} 35 Zyklen
	94°C	1 min	
Annealing-Temperatur	1-12	30 sec	
	72°C	1 min	
	72°C	10 min	
	4°C	halten	

Die Analyse von jeweils 5 µl der PCR-Produkte gemischt mit 2,5 µl 5x-Auftragspuffer und 5 µl dest. H₂O erfolgte auf einem 2%igen Agarosegel. Für das Exon 2 des Gens *TSPAN31* wird ein Produkt mit der Größe von 218 bp erwartet. Bei der Agarosegelanalyse zeigte sich, dass bei fast allen Temperaturen ein Produkt mit korrekter Größe gebildet wurde, die größte Menge von Produkt wurde bei einer 'Annealing'-Temperatur von 56,4°C gebildet (Abbildung 3.7). Diese Temperatur wurde für die nachfolgenden PCRs für die Amplifikation des Exons 2 des Gens *TSPAN31* gewählt.

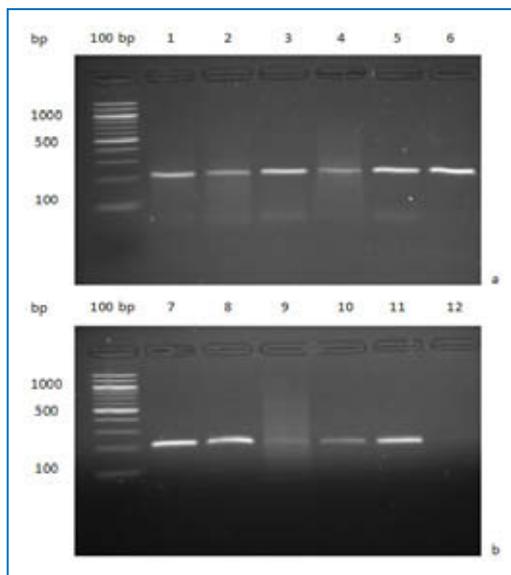


Abbildung 3.7: Analyse der PCR-Produkte der Temperaturgradienten-PCR auf einem 2%igen Agarosegel. Die Größe des Produktes liegt bei 218 bp. Es wurden keine unspezifischen Nebenprodukte amplifiziert. Die Spuren 1-6 (a) und 7-12 (b) repräsentieren die unterschiedlichen getesteten 'Annealing'-Temperaturen. Die Menge des amplifizierten Produktes war in Spur 6 am größten. Hierbei handelt es sich um die 'Annealing'-Temperatur von 56,4°C.

3.4.2.2 DNA-Analyse

Die wie in Abschnitt 3.4.2.1 etablierten Primer wurden für die PCR-Analysen der amplifizierten DNA des mikrodisektierten Chromosoms eingesetzt. Der Reaktionsansatz und das PCR-Programm der *TSPAN31*-PCR setzte sich wie folgt zusammen:

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen	Endkonzentration
dH ₂ O	-	37,5 µl	-
Forward-Primer	50 µM	0,5 µl	0,5 µM
Reverse-Primer	50 µM	0,5 µl	0,5 µM
dNTPs	10 mM	1 µl	0,2 mM
Tris-HCl	100 mM	5 µl	10 mM
KCl	500 mM	(10 x Puffer NEB)	50 mM
MgCl ₂	15 mM		1,5 mM
<i>Taq</i> DNA Polymerase	5 U/µl	0,5 µl	2,5 U (0,05 U/µl)
Zwischenvolumen		45 µl	
Test-DNA	20 ng/µl	5 µl	100 ng
Endvolumen		50 µl	

PCR-Programm:

94°C	5 min	
94°C	1 min	} 35 Zyklen
56,4°C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	10 min	
4°C	halten	

Die Reaktionsansätze wurden in 0,2 ml-Reaktionsgefäßen pipettiert. Nach Ablauf der PCR wurden die Produkte neben einer adäquaten Standard-DNA-Leiter auf einem 2%igen Agarosegel analysiert.

3.4.2.3 Degenerate Oligonucleotide Primed-PCR (DOP-PCR)

Bei der DOP-PCR werden spezielle sogenannte degenerierte Primer verwendet. Diese Primer verfügen in der Mitte über sechs zufällig eingefügte, sogenannte 'wobble'-Basen (5'...(N)₆...3'). Hier werden bei der Synthese der Primer die Basen A, C, G und T zu gleichen Teilen eingebaut. Auf diese Weise erhält man eine Vielzahl von Primern mit unterschiedlicher Sequenz, die im humanen Genom zahlreiche Bindungsstellen finden. Durch den Einsatz dieser degenerierten Primer ist es möglich ein komplettes Genom oder Teile davon zu vermehren. Die DOP-PCR wird deshalb für die gesamtgenomische Amplifikation von Kleinstmengen gesamtgenomischer DNA benutzt, wie man sie zum Beispiel nach der Mikrodisektion von Chromosomen erhält. In dieser Arbeit wurde die DNA der mikrodisektierten Chromosomen mit Hilfe der DOP-PCR amplifiziert und markiert. Dazu wurden die Chromosomen (siehe 3.2.3) in einem Volumen von 20 µl Puffer (2,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 0,1 mg/ml Gelatine, 0,1 % Brij-35) komplett zu 50 µl Mastermix gegeben und in die erste DOP-PCR eingesetzt.

Der Mastermix (MM) für die erste PCR setzte sich wie folgt zusammen:

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen	Endkonzentration
dH ₂ O	-	23,5 µl	-
DOP Primer-Mix	15 µM	5,0 µl	1,5 µM
dNTPs	10 mM	1,0 µl	0,2 mM
Tris-HCl	100 mM	5,0 µl	10 mM
KCl	500 mM	(10 x Puffer)	50 mM
MgCl ₂	25 mM	10,0 µl	5 mM
Ampli ^{Taq} DNA Polymerase	5 U/µl	0,5 µl	2,5 U (0,08 U/µl)
Endvolumen		50,0 µl	

1. PCR-Programm:

94°C 3 min

94°C 1 min 30 sec

30°C 2 min 30 sec $\rightarrow 0,1^\circ\text{C/s}$ bis 72°C (~7min) } 10 Zyklen

72°C 3 min

94°C 1 min

62°C 1 min 30 sec } 30 Zyklen

72°C 2 min

72°C 8 min

Die Amplifikation wurde auf einem 1,5%igen Agarosegel analysiert, indem 10 μl des PCR-Produktes mit 3,5 μl 5x-Auftragspuffer aufgetragen wurden. Abbildung 3.8 zeigt die Analyse der DOP-PCR-Produkte. Es wurde sowohl bei den positiven Kontrollen mit einer definierten Menge von Ausgangs-DNA (10 ng und 5 pg), als auch mit der mikrodisektierten chromosomalen DNA ein Produkt erzeugt. Die Negativkontrolle wies wie erwartet kein Produkt auf.

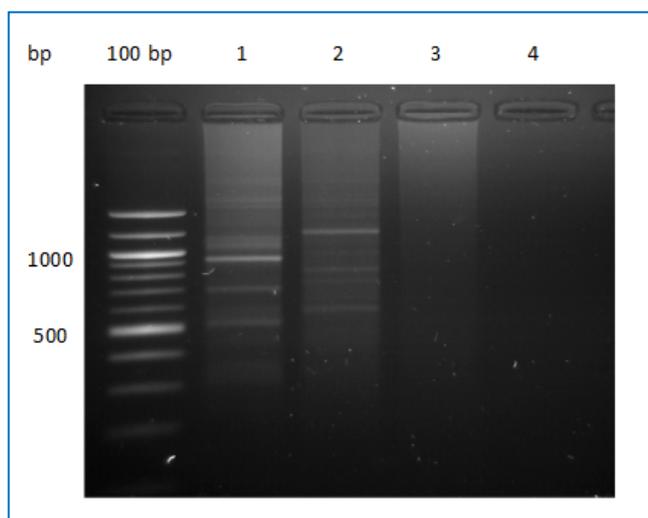


Abbildung 3.8: Analyse der DOP-PCR-Produkte auf einem 1,5%igen Agarosegel. In Spur 1 ist eine Positivkontrolle mit 10 ng DNA als Ausgangsmaterial aufgetragen, in Spur 2 das PCR-Produkt der chromosomalen mikrodisektierten DNA, in Spur 3 eine Positivkontrolle mit 5 pg DNA als Ausgangsmaterial und in Spur 4 eine Negativkontrolle ohne DNA. Es konnten in allen Fällen Produkte amplifiziert werden. Die Negativkontrolle wies wie erwartet kein Produkt auf.

Anschließend erfolgte eine Überprüfung mittels PCR für das Gen *TSPAN31* (3.4.2.1 und 3.4.2.2) aus der Zielsequenz des mikrodisektierten Chromosoms, somit wurde überprüft, ob das korrekte Chromosom mikrodisektiert und dessen DNA amplifiziert wurde. Die Analyse zeigte, dass sowohl für eine gesamtgenomische Positivkontrolle, als auch für die amplifizierte mikrodisektierte DNA ein korrektes Produkt für das Gen *TSPAN31* amplifiziert werden konnte (Abbildung 3.9). Dies zeigte, dass das

amplifizierte Produkt der mikrodisezierten chromosomalen DNA die gewünschte Region enthält.

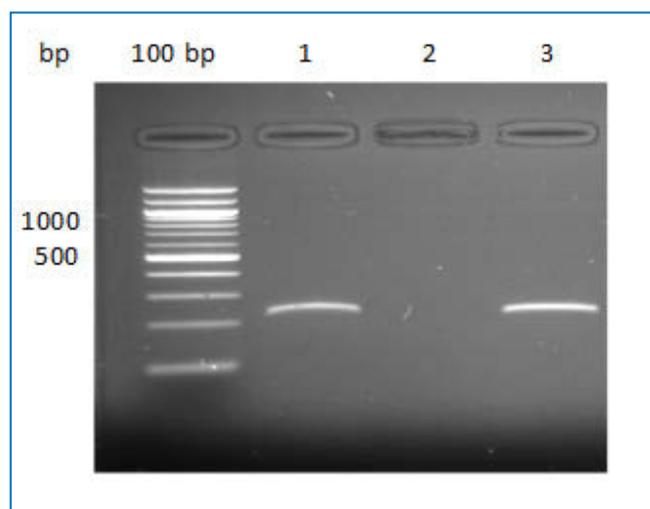


Abbildung 3.9: Analyse der PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel. In Spur 1 ist das Produkt der mikrodisezierten amplifizierten DNA aufgetragen, in Spur 2 eine Negativkontrolle ohne DNA und in Spur 3 die Positivkontrolle einer mittels DOP-PCR amplifizierten gesamtgenomischen DNA. Es konnte sowohl für die Positivkontrolle, als auch für die Test-DNA ein korrektes PCR-Produkt nachgewiesen werden. Die Negativkontrolle enthielt wie erwartet kein Produkt.

Die DOP-PCR-Produkte können bei -20°C gelagert oder einer Markierungsreaktion zugeführt werden.

In die zweite DOP-PCR wurden $40\ \mu\text{l}$ des Markierungsansatzes zu $10\ \mu\text{l}$ PCR-Produkt der ersten PCR gegeben. In dieser DOP-PCR wurde die DNA mit Biotin (im Markierungsansatz fett dargestellt) oder Cyanin 3 markiert, so dass sie als Sonde bei der FISH (3.3.1) eingesetzt werden konnte. Die Markierung wurde auf einem 1,5%igen Agarosegel überprüft, hierbei wurden $5\ \mu\text{l}$ des PCR-Produktes und $2,5\ \mu\text{l}$ 5x-Auftragspuffer verwendet. Mit Hilfe der zweiten DOP-PCR konnte die eingesetzte DNA sowohl amplifiziert, als auch markiert werden (Abbildung 3.10).

Der Markierungsmastermix (MM2) setzte sich wie folgt zusammen:

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen	Endkonzentration
dH ₂ O	-	10,5 μl / 8,5 μl	-
DOP Primer-Mix	15 μM	5,0 μl	1,5 μM
dNTPs w/o dTTP	10 mM	1,0 μl	0,20 mM
dTTP	1 mM	7,0 μl	0,14 mM
		5,0 μl	0,10 mM
Cy3-dUTP/	1 mM	1,0 μl /	0,02 mM
Biotin-11-dUTP	1 mM	5,0 μl	0,10 mM
Tris-HCl	100 mM	5,0 μl	10 mM
KCl	500 mM	(10x Puffer)	50 mM
MgCl ₂	25 mM	10 μl	5 mM
Taq DNA Polymerase	5 U/ μl	0,5 μl	2,5 U (0,16 U/ μl)
DOP-DNA		10,0 μl	
Endvolumen		50,0 μl	

2. PCR-Programm:

95°C 10 min
 95°C 1 min
 60°C 1 min } 35 Zyklen
 72°C 1 min }
 72°C 10 min

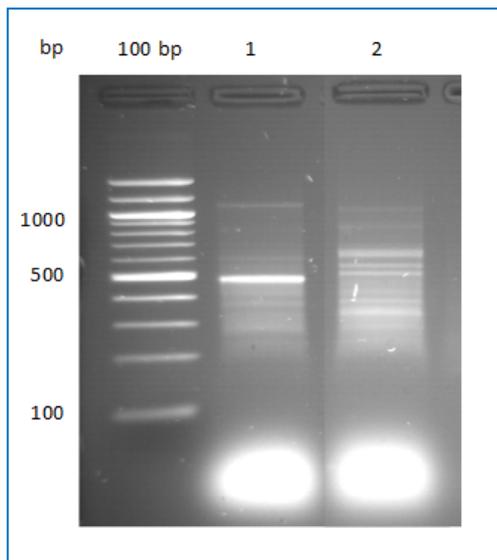


Abbildung 3.10: Analyse der DOP-PCR-Produkte der zweiten DOP-PCR auf einem 1,5%igen Agarosegel. In Spur 1 ist die Positivkontrolle aufgetragen und in Spur 2 das PCR-Produkt der chromosomalen mikrodissektierten DNA. Im Vergleich mit den Produkten der ersten DOP-PCR zeigt sich eine deutliche Vermehrung der Produktmenge. Die leuchtenden Flecken unterhalb der 100bp-Bande sind Reste der Primer und markierten Cy3-dUTP-Nukleotide, die unter UV-Bestrahlung stark leuchten.

Die DNA der mikrodissektierten Chromosomen wurde anschließend als Sonde bei der reversen FISH benutzt, um nachweisen zu können aus welchen chromosomalen Bereichen, außer 12q, das mikrodissektierte Markerchromosom bestand. Hierbei zeigte sich, dass die Sonde die mittels Biotin markiert war bei der FISH eine höhere Signalintensität aufwies, als die direkt mit Cyanin 3 markierte Sonde. Bei weiteren Markierungsreaktionen sollte, trotz höherem Zeitaufwand bei der Detektion deshalb die indirekte Methode verwendet werden.

3.4.3 Immunfluoreszenzfärbung

3.4.3.1 Immunfluoreszenzfärbung von Centrosomen und Teilungsspindeln

Die Immunfluoreszenzfärbung der Centrosomen und Teilungsspindeln erfolgte in Kooperation mit PD Dr. rer. nat. Alice Fabarius am Forschungslabor der Abteilung Hämatologie und internistischen Onkologie des Universitätsklinikums Mannheim.

Bei der Immunfluoreszenzfärbung werden Proteine in Zellen über geeignete Antikörper nachgewiesen und sichtbar gemacht. Um die Centrosomen zu analysieren wurde ein spezifischer primärer Antikörper gegen Pericentrin (PCNT) eingesetzt. Das

Gen *PCNT* ist auf dem Chromosom 21q22.3 lokalisiert und kodiert das Protein Pericentrin. Dieses Protein ist in den Centrosomen lokalisiert und gewährleistet eine reguläre Funktion von Centrosomen, Zytoskelett und Zellzyklusprogression (Flory *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2002; Zimmerman *et al.*, 2004). Durch einen sekundären Antikörper, an den der Fluoreszenzfarbstoff Cy3 gekoppelt ist wurden die Centrosomen sichtbar gemacht. Die Teilungsspindeln wurden über einen primären Antikörper gegen α -Tubulin und anschließend über einen sekundären Antikörper, der den Farbstoff FITC trägt sichtbar gemacht. Als Gegenfärbung für die DNA wurde DAPI eingesetzt. Die adherenten Zelllinien wurden für die Immunfluoreszenzfärbung auf einem teflonbeschichteten Objektträger angezchtet und nach 24-48h gefärbt. Die Begutachtung erfolgte unter einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop, welches mit geeigneten Filtern ausgestattet ist. Mehr als 2 Centrosomen wurden als numerisch aberrant gewertet und bei einem Durchmesser eines Centrosoms mehr als zweimal so groß wie der eines normales Centrosoms wurden die Centrosomen als strukturell aberrant bezeichnet. Ein Verbund von mehr als zwei Centrosomen wurde als 'clustering' der Centrosomen beschrieben. Es wurden, wenn möglich 100 Zellen analysiert. Der 'cut off' der Fluoreszenzsonden liegt bei 5%, unterhalb dieses Schwellenwertes wurden die Veränderungen als Artefakte gewertet.

3.5 Datenanalyse und Statistik

3.5.1 Datenanalyse mittels 'CyDAS'

Das freie Analyse-Programm 'CyDAS' ('Cytogenetic Data Analysis System', www.cydas.org; Hiller *et al.*, 2005) wurde zur Analyse der SKY- und aCGH-Karyotypen und Extraktion der Daten, also der Anzahl der Bruchpunkte, Zugewinne und Verluste genutzt. Die SKY- und aCGH-Karyotypen wurden einzeln und gruppiert in die Software importiert. Bei der 'CyDAS'-Analyse wurde als erstes die Karyotypformel auf ISCN-Fehler hin analysiert, danach erfolgte eine Auswertung der Zugewinne, Verluste und Bruchpunkte bezogen auf eine Auflösung von 2 'digits', 400 und 500 Banden pro haploidem Chromosomensatz (bphs). 'CyDAS' bietet hier sowohl die Möglichkeit einer graphischen, als auch einer tabellarischen Ansicht der Ergebnisse. Die Tabellen verfügen über die Angaben der betroffenen Banden, über die man in die 'NCBI'-Datenbank gelangt, die ermöglicht einzusehen welche Gene in der betroffenen Region liegen und Informationen dazu abzurufen. Ein besonderer Vorteil der Software ist die Möglichkeit Idiogramme zu erstellen, was bei komplexen

Karyotypen einen besseren Überblick über die zahlreichen Rearrangements ermöglicht und somit die Überprüfung des Karyotyps erleichtert. Die Karyotypen der Tochterzelllinien 143b und MNNG-HOS der Zelllinie HOS wurden nicht in der Gesamtberechnung der Zugewinne, Verluste und Bruchpunkte berücksichtigt. Bei der Analyse der SKY-Karyotypen wurde zuerst eine Bruttoverteilung der Zugewinne und Verluste und danach eine Nettoverteilung erstellt, um die Ergebnisse mit denen der aCGH vergleichen zu können. Hierbei wurde die Auflösung von 2 'digits' (368 bphs) gewählt, die sich über die ersten zwei numerischen Stellen ('digits') hinter der Angabe des Chromosomenarms (z.B. 1q31) ergibt. In Abbildung 3.11 wird die Nummerierung der Chromosomenbanden der 24 humanen Chromosomen vorgestellt. Aberrationen wurden als rekurrent gewertet, die mehr als zwei Mal in einer Zelllinie oder in mehr als zwei Zelllinien beobachtet wurden.

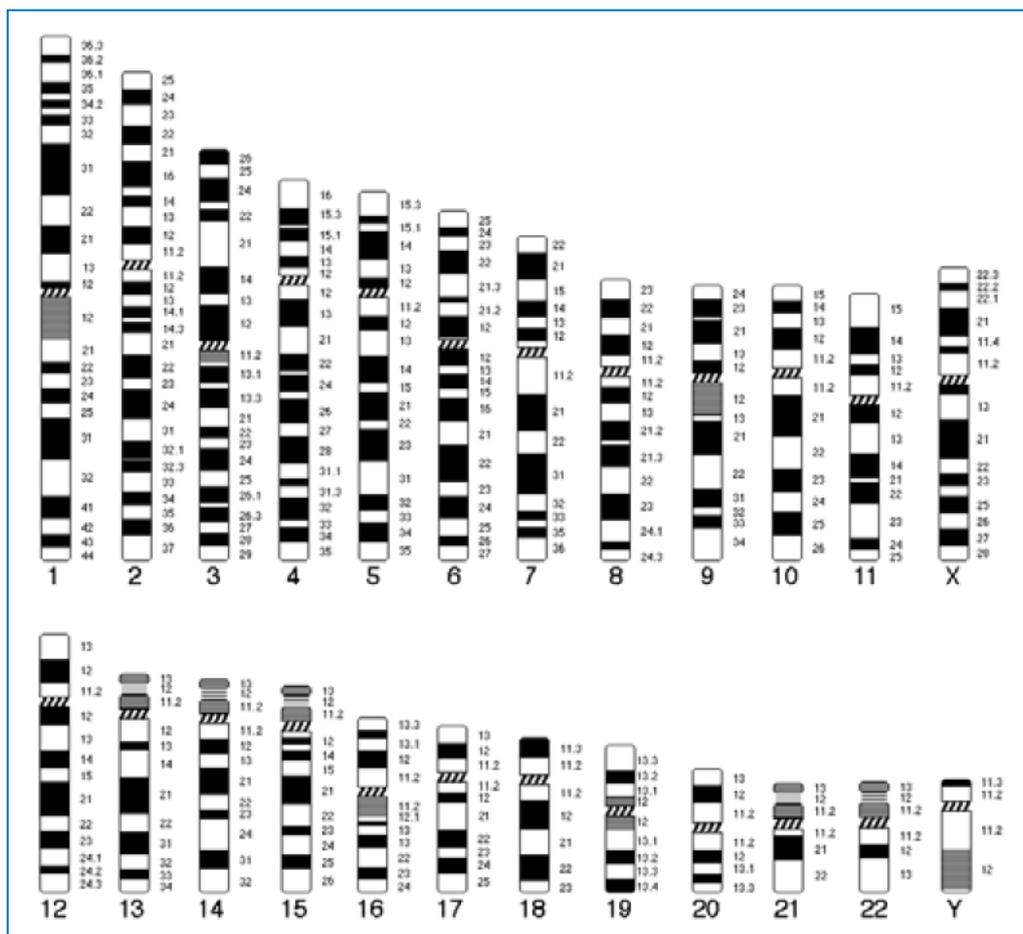


Abbildung 3.11: Idiogramme der 24 humanen Chromosomen. Die Chromosomen werden nach ihrer Größe verschiedenen Gruppen zugeordnet: A (1-3), B (4-5), C (6-12,X), D (13-15), E (16-18), F (19-20) und G (21-22,Y).Quelle: <http://www.biologia.uniba.it/rmc/>.

3.5.2 Statistische Analyse der Verteilung der Bruchpunkte

Nach der aCGH wurde die Verteilung der Bruchpunkte auf signifikante Unterschiede zwischen beobachteten und erwarteten Werten für die Chromosomenbrüche analysiert. Die p-Werte wurden über die Poissonverteilung, als Summenwahrscheinlichkeit für das Auftreten von k oder mehr diskreten Ereignissen (k =beobachtete Brüche) in einem Intervall (Länge Chromosomenarm) bei gegebenem Erwartungswert λ (λ =Gesamtzahl Brüche * Länge Chromosomenarm/Länge Genom) berechnet. Anschließend wurden die p-Werte nach Holm-Bonferroni auf multiples Testen korrigiert. Als schwach signifikant wurden die p-Werte ab einem Wert von $<0,1$ angesehen, als signifikant ab $<0,05$, als hoch signifikant ab $<0,01$ und als höchst signifikant ab $<0,001$. Die statistischen Analysen wurden von Dipl.-Ing. Manfred Beier durchgeführt.

3.5.3 Datenbankanalysen

Nach der Analyse der Verteilung der häufigsten Bruchereignisse erfolgte eine Auswertung der Bruchpunkte auf Genebene. Hierzu wurden Gene, die in rekurrente Bruchereignisse involviert waren mit Hilfe der Datenbanken 'Pubmed', 'Gene' und 'OMIM' des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) auf interessante Funktionen wie Regulation des Zellwachstums, der Apoptose, Tumorgenese, Knochenentwicklung und Aufbau des Spindelapparates oder der Centrosomen analysiert.

4 Ergebnisse

4.1 Methodenvergleich

4.1.1.1 aCGH-Methodik und Analysequalität

Bei der aCGH gibt es einige Kontrollschritte, die zum Überprüfen des korrekten Verlaufs der Methode dienen. Abbildung 4.1 zeigt die typische Fragmentgröße der DNA nach der Fragmentierung, die bei allen Fragmentierungen beobachtet werden konnte.

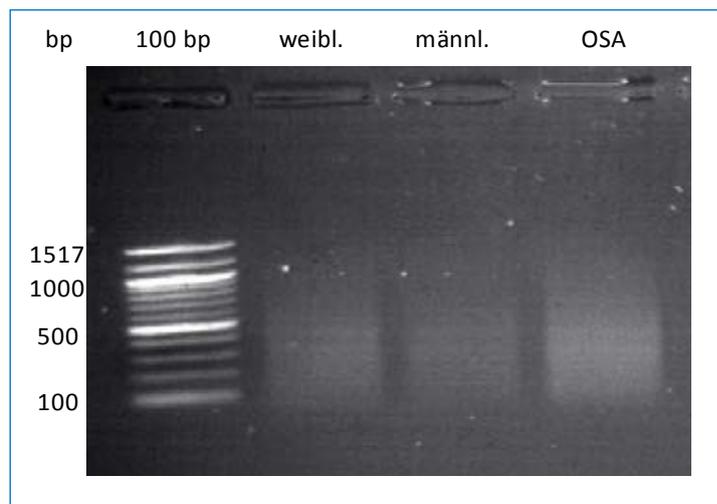


Abbildung 4.1: Analyse der Fragmentierung auf einem 0,8%igen Agarosegel. Die Fragmentgröße der DNAs der weiblichen und männlichen Kontroll-Probe, sowie der Zelllinie OSA liegt zwischen der 200 und 500 bp.

Die Ergebnisse der Absorptionsmessungen, die Aufschluss über die Markierungseffizienz geben sind für die Proben-DNA in Tabelle 4.1 dargestellt.

Die zu erwarteten Werte der spezifischen Aktivität und der Ausbeute sind detailliert in Tabelle 3.3 (Abschnitt 3.3.3.3) dargestellt. Die Werte für Ausbeute und spezifische Aktivität entsprachen meist denen der Herstellerangaben. Die DNA-Ausbeute betrug zwischen dem 4- bis 6-fachen der eingesetzten Menge. Gute 260/280-Werte für die DNA-Reinheit wurden bei allen Messungen beobachtet. Bei den Zelllinien OS18 und TPXM wurden Abweichungen festgestellt. OS18 zeigte sowohl bei der ersten Markierung mit Cyanin 5, als auch bei einer zweiten Markierung mit Cyanin 3 schlechte Werte. Die Werte für die Referenz-DNA wurden hier nicht dargestellt, entsprachen aber immer den zu erwartenden Werten des Herstellers.

Tabelle 4.1: Ergebnisse der Absorptionsmessung, der Berechnung der spezifischen Aktivität und Ausbeute der aufgereinigten und markierten DNA.

Probe	ng/µl	pmol/µl	260/280	spez. Akt. (pmol/µg)	Ausbeute (µg)
143b	262,82	6,6909	1,8386	25,5	5,5
HAL	228,12	4,7336	1,8097	20,8	4,8
HOS	243,39	5,5059	1,8438	22,6	5,1
KPD	293,02	7,0752	1,8289	24,1	6,2
MG63	309,90	7,4677	1,8394	24,1	6,5
MHM	255,41	6,5915	1,8596	27,2	4,9
MNNG-HOS	230,80	6,9658	1,8526	30,2	4,5
MOS	278,15	6,0264	1,8389	21,7	5,8
OHS	272,29	7,2257	1,8043	26,5	5,7
OS09	302,27	7,0918	1,8588	23,5	6,3
OS10	252,02	5,6821	1,8434	22,5	5,3
OS14	214,57	4,0800	1,8600	19,0	4,5
OS15	287,40	7,3456	1,8064	25,6	6,0
OS18	241,19	3,6517	1,8208	15,1	5,1
OS18-2	191,51	3,0332	1,8080	15,8	4,0
OSA	263,27	6,8282	1,8328	25,9	5,5
OSA-2	232,54	7,4900	1,8400	32,2	4,8
OST	244,02	6,2694	1,7718	25,7	5,1
SAOS2	277,00	6,1582	1,8428	22,2	5,8
SARG	277,51	6,0721	1,8349	21,9	5,8
TPXM	238,64	3,3864	1,7913	14,2	5,0
U-2OS	238,21	6,8433	1,8604	28,7	4,6
U-2OS-2	227,30	5,4867	1,8202	24,1	4,7
ZK-58	205,47	5,2041	1,7885	25,3	4,3

Exzellente oder gute Werte konnten bei der Analyse der Qualitätsparameter bei 87% aller Werte beobachtet werden. Eine detaillierte Tabelle mit allen Qualitätsparametern ('DLRSspread', Signal-zu-Rauschen, Signalintensität, Hintergrundrauschen und Reproduzierbarkeit) wurde anschließend mit der Software 'Genomic Workbench' generiert. Eine grafische Darstellung der Verteilung der Werte findet sich in Abbildung 4.2. Der DLRS-Wert war bei 68% der Zelllinien gut bis exzellent, bei den übrigen Zelllinien war der DLRS-Wert schlecht, eine Auswertung der aCGH-Ergebnisse konnte dennoch erfolgen. Die Werte für das Hintergrundrauschen der Farbe Rot war in 31,8 % der Experimente schlecht.

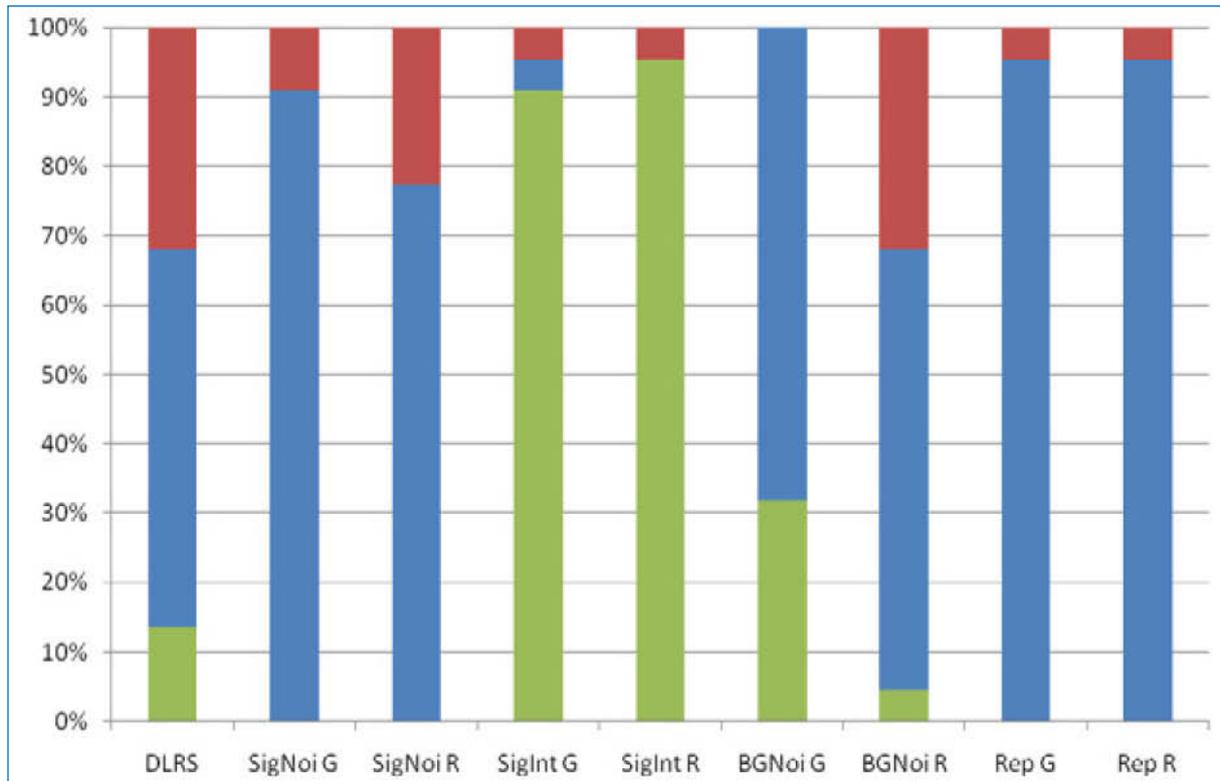


Abbildung 4.2: Verteilung der Werte der Qualitätsparameter aller aCGH-Analysen. Grün=Exzellent, Blau=Gut, Rot=Schlecht, SigNoi G/R=Signal-zu-Rauschen Grün/Rot, SigInt G/R=Signalintensität Grün/Rot, BGNoi G/R=Hintergrundrauschen Grün/Rot, Rep G/R=Reproduzierbarkeit Grün/Rot.

Die Agarosegelanalyse zur DNA-Qualität zeigte nur bei der Zelllinie OS18, dass die eingesetzte DNA zum Teil degradiert war, die DNA der erneuten Präparation wies eine gute DNA-Qualität auf (Abbildung 4.3). Die Werte für die Qualitätsparameter konnten bei der wiederholten aCGH-Analyse der Zelllinie OS18 nicht wesentlich verbessert werden. Es wurden aber bei beiden Analysen die gleichen Aberrationen, trotz hoher Streuung detektiert, weshalb die Auswertung der Zugewinne und Verluste der Zelllinie trotzdem erfolgen konnte.

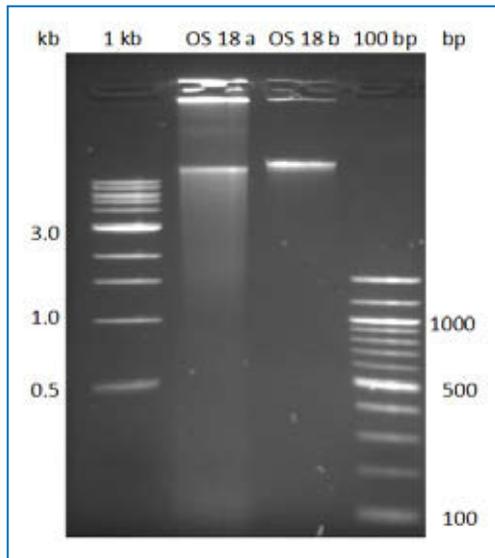


Abbildung 4.3: Überprüfung der DNA-Qualität der Zelllinie OS18 auf einem 1%igen Agarosegel. OS18 a=erste Präparation, OS18 b=zweite Präparation. Die DNA in Spur OS18 a ist teilweise degradiert.

Ein Vergleich zwischen dem aCGH-Profil des Chromosoms 1 der Zelllinie OS18 und der Zelllinie MG63 veranschaulicht die hohe Streuung der Oligonukleotide bei der Zelllinie OS18 (Abbildung 4.4).

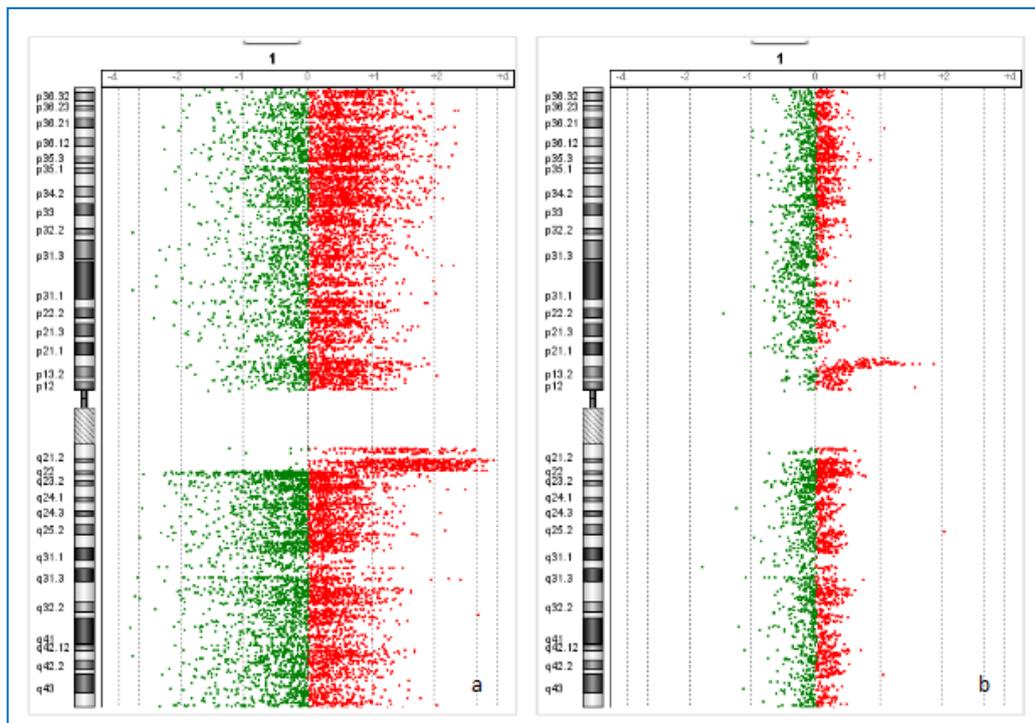


Abbildung 4.4: Vergleich zweier aCGH-Profile des Chromosoms 1 in der Chromosomenansicht des Programms 'Genomic Workbench'. a) Starke Streuung der Fluoreszenzverhältnisse der einzelnen Oligonukleotide bei der Zelllinie OS18. b) Geringe Streuung der Fluoreszenzverhältnisse der einzelnen Oligonukleotide der Zelllinie MG63.

Die Analyse der Referenz-DNAs gegeneinander konnte zeigen, dass die Kontrollen über keine genomischen Imbalancen verfügten und sich somit gut als Referenz eigneten (Abbildung 4.5).

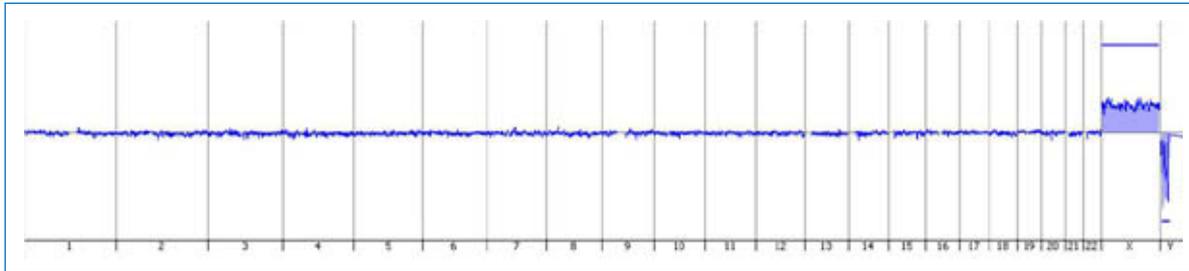


Abbildung 4.5: aCGH-Analysen der weiblichen Referenz-DNA gegen die männliche Referenz-DNA in der Genomsicht der Software 'Genomic Workbench'. Lediglich in den Geschlechtschromosomen werden Aberrationen angezeigt.

Die 'dye swap'-Experimente der Zelllinie OSA zeigten, dass die Profile der beiden Analysen genau übereinstimmten, was eine hohe technische Reproduzierbarkeit der Experimente bedeutet (Abbildung 4.6). Die Vergleichsanalysen der Wiederholungsexperimente der Zelllinie U-2OS mit DNA aus unterschiedlichen Zellpassagen zeigte ebenfalls eine gute Überlappung der Profile (Abbildung 4.7). Abweichungen konnten hier nur für einzelne Oligonukleotide beobachtet werden, was eine gute biologische Reproduzierbarkeit der Experimente bedeutet.

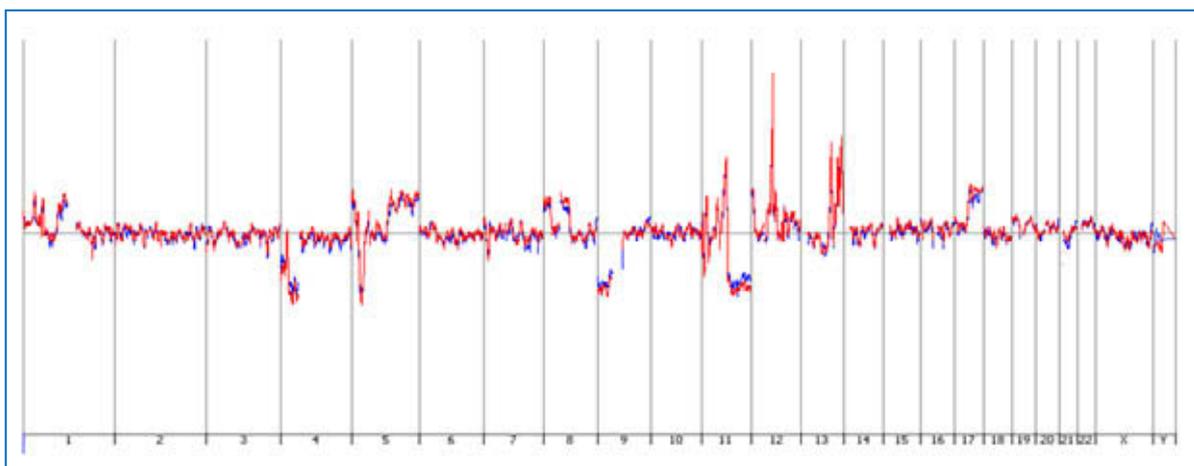


Abbildung 4.6: Reproduzierbarkeit der aCGH Analysen des 'dye swap'-Experimentes: Profile zweier aCGH-Analysen der Zelllinie OSA in der Genomsicht der Software 'Genomic Workbench'. Beide Profile in blau und rot überdecken sich nahezu vollständig und zeigen damit einen hohen Grad der Reproduzierbarkeit an.

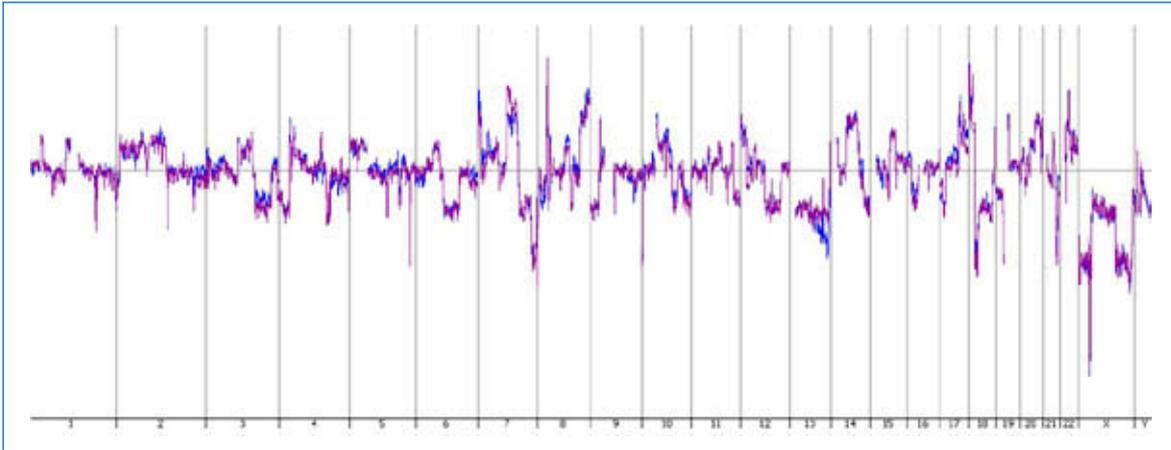


Abbildung 4.7: Reproduzierbarkeit der aCGH Analysen: Profile zweier aCGH-Analysen der Zelllinie U2-OS in der Genomansicht der Software 'Genomic Workbench'. Beide Profile überdecken sich nahezu vollständig und zeigen damit einen hohen Grad der Reproduzierbarkeit an.

Die aCGH-Analysen der Zelllinien zeigten an nahezu jedem Chromosom genomische Imbalancen. Auf Grund der großen Menge der in dieser Arbeit produzierten Daten, wurde sich primär auf Aberrationen konzentriert, die in mehreren Zelllinien auftraten und solche die bereits in der SKY-Analyse aufgefallen waren. Des Weiteren wurden Bereiche mit rekurrenten Brüchen auf interessante Gene hin analysiert.

4.1.1.2 Methodenvergleich SKY-, aCGH- und FISH-Analyse

Für den Methodenvergleich zwischen SKY-, aCGH- und FISH-Analyse wurde die Zelllinie OSA gewählt, da diese Zelllinie mit sechs Aberrationen bei der SKY-Analyse und einem nahezu diploiden Chromosomensatz die geringste Aberrationsrate der hier untersuchten Zelllinien aufwies. Die Vergleich zwischen detektierten Zugewinnen und Verlusten von SKY- und aCGH-Analyse zeigte eine gute Übereinstimmung und zusätzliche kleinere Aberrationen in der aCGH-Analyse (Abbildung 4.8). Ebenfalls war es über die Ergebnisse der aCGH-Analyse möglich, die Bruchpunkte der mit Hilfe der SKY-Analyse detektierten Veränderungen genauer einzugrenzen.

Die Zelllinie OSA wies bei der aCGH-Analyse acht Imbalancen auf, die mit denen der SKY-Analyse übereinstimmten. Es handelte sich hierbei um die Zugewinne der chromosomalen Bereiche 1p22.1-1p12, 5p15.33-5p15.32, 5q15-5q35.3 und 8q11.21-8q13.3 und die Verluste der Regionen 4p16.3-4p11, 9p24.3-9p13.1, 11q13.4-11q25 und 17q21.31-17q25.3. Drei dieser Aberrationen werden hier im Detail vorgestellt. Sowohl in der SKY-Analyse, als auch bei der aCGH-Analyse wurde ein Verlust des kurzen Arms Chromosoms 9 detektiert (Abbildung 4.10 a & b). Der Verlust des Armes resultiert aus Anlagerung des langen Arms des Chromosom 9 an den langen Arm des Chromosom 14 ($\text{dic}(9;14)(p11;p11)$). Mit Hilfe der BAC-Sonde RP11-83O12, die an den Bereich 9p21.1 bindet, konnte der heterozygote Verlust des chromosomalen Materials von 9p in allen analysierten Zellen gezeigt werden (Abbildung 4.10 c).

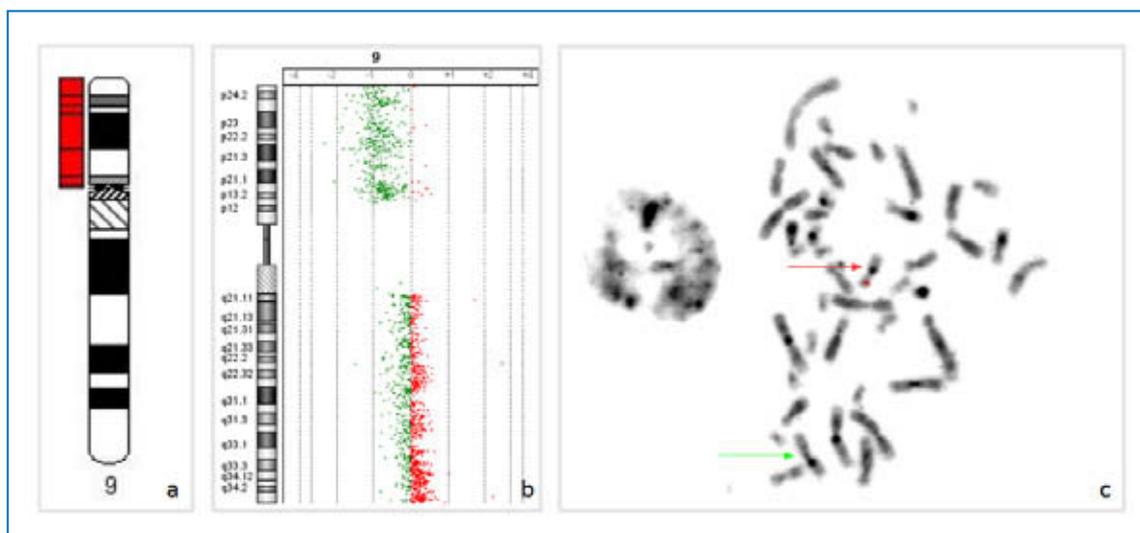


Abbildung 4.10: 9p-Deletion der Zelllinie OSA. a) Verlust des Chromosoms 9p schematisch dargestellt mittels 'CyDAS' nach SKY-Analyse. b) Verlust des Chromosoms 9p dargestellt als aCGH-Profil des gesamten Chromosoms 9 mittels 'Genomic Workbench'. c) Bestätigung des Verlustes von 9p mittels FISH mit der BAC-Sonde RP11-83O12 (rot). Der Bereich 9p21.1 ist auf dem normalen Chromosom 9 vorhanden (roter Pfeil), auf dem dizen-trischen Chromosom (9;14) ist der Bereich hingegen nicht mehr nachweisbar (grüner Pfeil).

Zu einer Übereinstimmung zwischen SKY- und aCGH-Analyse kam es ebenfalls bei der Detektion des Zugewinns eines Teils des langen Arms von Chromosom 17 (Abbildung 4.11 a & b). Die Aberration wurde mit Hilfe der BAC-Sonde RP11-392O1 (17q21.31) in allen untersuchten Zellen bestätigt. Der Zugewinn von 17q-Material auf dem derivativen Chromosom 8 konnte bereits in der SKY-Analyse detektiert werden.

Durch die nachfolgenden aCGH- und FISH-Analysen konnte nachgewiesen werden, dass es sich um den Bereich 17q21.31 bis 17q25.3 handelt (Abbildung 4.11 b & c).

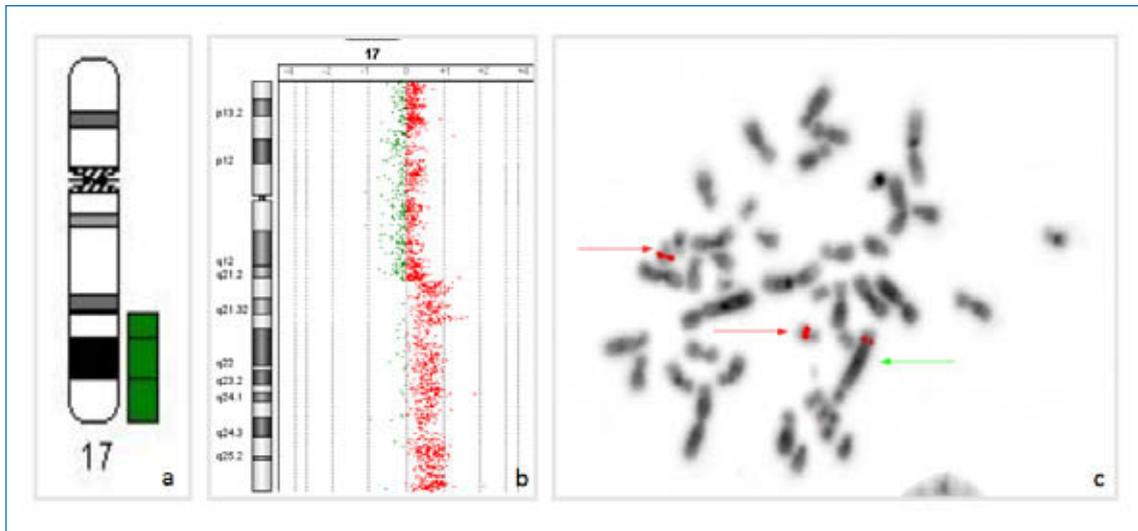


Abbildung 4.11: 17q-Zugewinn der Zelllinie OSA. a) Zugewinn des Chromosoms 17q schematisch dargestellt mittels 'CyDAS' nach SKY-Analyse. b) Zugewinn des Chromosoms 17q dargestellt als aCGH-Profil des gesamten Chromosoms 17 mittels 'Genomic Workbench'. c) Bestätigung des Zugewinns von 17q mittels FISH mit der BAC-Sonde RP11-392O1 (rot). Der Bereich 17q21.31 ist auf beiden normalen Chromosomen 17 vorhanden (rote Pfeile), außerdem gibt es ein zusätzliches Signal auf dem derivativen Chromosom 8 (grüner Pfeil).

Mit Hilfe der aCGH- und FISH-Analyse konnte ein Markerchromosom charakterisiert werden, das bei der SKY-Analyse in 50% der Zellen aufgefallen war, aber nicht eindeutig klassifiziert werden konnte. Es handelte sich um ein Chromosom mit Anteilen aus dem Bereich 12p13.33-12p13.31, der bei der aCGH-Analyse als vermehrt angezeigt wurde (Abbildung 4.12 a). Mittels der BAC-Sonde RP11-465A21, die im Bereich 12p13.32 lokalisiert ist konnte der Zugewinn bestätigt werden (Abbildung 4.12 b). Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Markerchromosom größtenteils aus dem amplifizierten Bereich besteht.

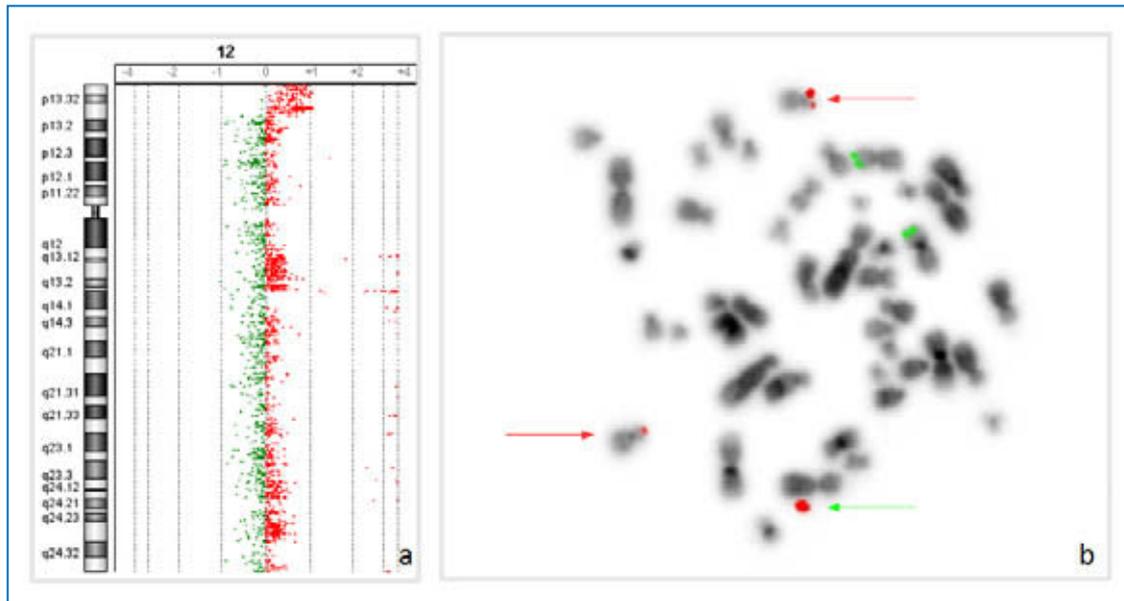


Abbildung 4.12: 12p-Zugewinn der Zelllinie OSA. a) Zugewinn des Chromosoms 12p dargestellt als aCGH-Profil des gesamten Chromosoms 12 mittels 'Genomic Workbench'. b) Verifikation des Zugewinns von 12p mittels FISH mit der BAC-Sonde RP11-465A21 (rot). Der Bereich 12p13.32 ist auf beiden normalen Chromosomen 12 vorhanden (rote Pfeile), außerdem gibt es ein zusätzliches Signal auf dem derivativen Chromosom 12 (grüner Pfeil). Desweiteren gibt es 2 Kopien des Bereiches 3p26.2 der mit dem BAC RP11-622P3 hybridisiert wurde. Dieser Bereich war auch in der aCGH unauffällig.

Eine Diskrepanz zwischen SKY- und aCGH-Ergebnissen konnte für den Zugewinn von Material des kurzen Arms von Chromosom 1 detektiert werden. In der SKY-Analyse wurde der Zugewinn von chromosomalem Material auf dem derivativen Chromosom 22 der Region 1q31-1q34 zugeordnet (Abbildung 4.13 a). In der aCGH-Analyse wurde für diese Region kein Zugewinn angezeigt, jedoch für den Bereich 1p22.1-1p12 (Abbildung 4.13 b). Um diese Aberration zu überprüfen wurden die BAC-Sonden RP11-259N12 (1p21.1) und RP11-411H5 (1p21.2-1p21.1) verwendet. Hierbei konnte in allen analysierten Zellen ein Zugewinn dieser Region nachgewiesen werden, die auf dem derivativen Chromosom 22 vorlag (Abbildung 4.13 c). Der SKY-Karyotyp wurde daraufhin korrigiert.

Des Weiteren zeigte sich in der aCGH ein Zugewinn der Bereiche 8p23.3-8p21.3 (Abbildung 4.14 b). Diese Region zeigte in der 'CyDAS'-Auswertung der SKY-Analyse keine Imbalancen (Abbildung 4.14 a). Der Zugewinn konnte mittels FISH mit der BAC-Sonde RP11-1G6 (8p23.1) bestätigt werden. Außerdem konnte ermittelt werden, dass die zugewonnene Region auf dem derivativen Chromosom 8 vorlag (Abbildung 4.14 c).

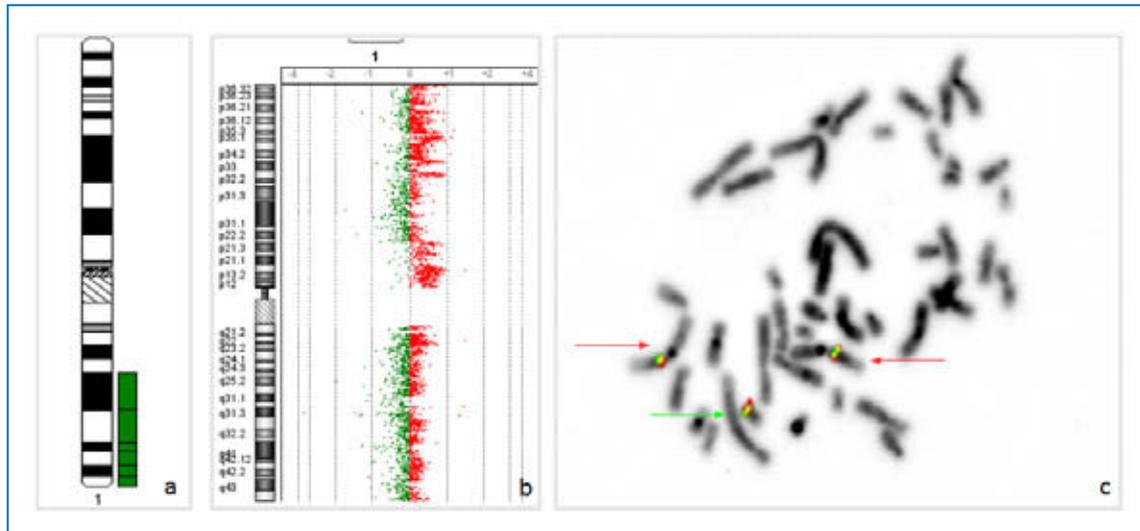


Abbildung 4.13: 1p-Zugewinn der Zelllinie OSA. a) Zugewinn des Chromosoms 1q schematisch dargestellt mittels 'CyDAS' nach SKY-Analyse. b) Zugewinn des Chromosoms 1p dargestellt als aCGH-Profil des gesamten Chromosoms 1 mittels 'Genomic Workbench'. c) Bestätigung des Zugewinns von 1p mittels FISH mit der BAC-Sonden RP11-259N12 (rot) und RP11-411H5 (grün). Der Bereich 1p21.2-1p21.1 ist auf beiden normalen Chromosomen 1 vorhanden (rote Pfeile), außerdem konnte ein zusätzliches Signal für beide Sonden auf dem derivativen Chromosom 22 detektiert werden (grüner Pfeil).

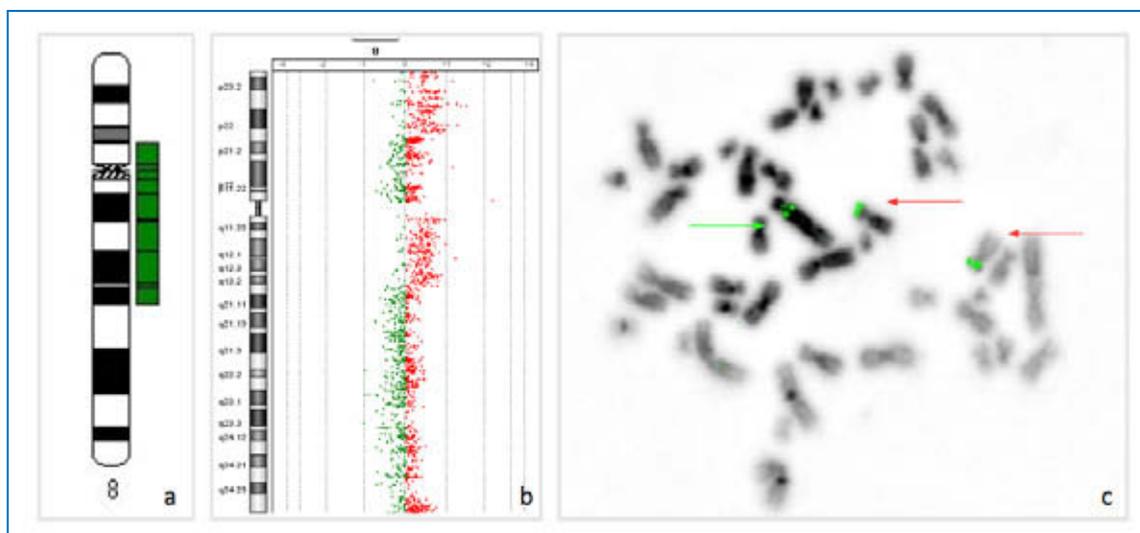


Abbildung 4.14: 8p-Zugewinn der Zelllinie OSA. a) Ausgeglichenes Verhältnis von Chromosomenmaterial 8p dargestellt mittels 'CyDAS' nach SKY-Analyse. b) Zugewinn des Chromosoms 8p dargestellt als aCGH-Profil des gesamten Chromosoms 8 mittels 'Genomic Workbench'. c) Bestätigung des Zugewinns von 8p mittels FISH mit der BAC-Sonde RP11-1G6 (grün). Der Bereich 8p23.3-8p21.3 ist auf beiden normalen Chromosomen 8 vorhanden (rote Pfeile), außerdem konnte ein zusätzliches Signal auf dem derivativen Chromosom 8 detektiert werden (grüner Pfeil).

Die Bestätigung der aCGH-Ergebnisse bei der Zelllinie OSA mittels FISH war nahezu in allen Fällen möglich. Lediglich bei einer Imbalance mit einem Zugewinn von Chromosom 19p13.2 konnte das aCGH-Ergebnis nicht mittels FISH mit der BAC-Sonde RP11-11I5 nachgewiesen werden. In dieser Region betrug der mediane Wert für das \log_2 ratio 0,21. Bei der Auswertung der aCGH-Ergebnisse wurde ein medianer \log_2 ratio-Wert von mindestens 0,2 gewählt, meist jedoch lagen die medianen Werte mindestens bei 0,25. Der Wert für den Zugewinn auf Chromosom 19 bewegt sich sehr nah an der Schwelle, so dass dieses Ergebnis als falsch-positiv anzusehen ist. Insgesamt zeigte der Methodenvergleich, dass große Zugewinne und Verluste gut mittels SKY und aCGH detektiert werden konnten. Kleine Imbalancen konnten jedoch nur mit Hilfe der aCGH- und FISH-Analysen aufgedeckt werden.

4.2 Numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen

4.2.1 Konventionelle Chromosomenbandenanalyse

Die Chromosomenbandenanalyse erbrachte bei allen Zelllinien komplex veränderte Chromosomensätze. Der Ploidiegrad der Zelllinien reichte von hypodiploid bis hyperhexaploid. Die Ploidiegrade aller Zelllinien sind in Tabelle 4.2 aufgeführt.

Tabelle 4.2: Ploidiegrade der Zelllinien nach G-Bandenanalyse.

Zelllinie	Ploidiegrad
143b	3n-
HAL	4n-
HOS	2n+
KPD	2n-
MG63	3n-
MHM	3n+
MNNG-HOS	3n-
MOS	2n+
OHS	3n+
OS09	3n-
OS10	3n-
OS14	3n+
OS15	6n+
OS18	6n-
OSA	2n-
OST	3n-
SAOS2	3n+
SARG	4n-
TPXM	4n+
U-2OS	3n+
ZK-58	2n+

Die Karyotypisierung anhand des G-Bandenmusters war auf Grund der zahlreichen und komplexen Rearrangements meist nur eingeschränkt möglich. Deswegen wurde ein kombinierter G-Banden- und SKY-Karyotyp erstellt (siehe 4.2.2). In Abbildung 4.15 wird anhand eines Karyogramms der Zelllinie OSA einer weniger komplexer Karyotyp vorgestellt und in Abbildung 4.16 eine Metaphase der Zelllinie TPXM, die einen hypertetraploiden Chromosomensatz aufweist und sich durch zahlreiche komplexe Rearrangements auszeichnet. Hier zeigte sich, dass die Methode der G-Bänderung nicht ausreicht, um einen Karyotyp zu erstellen.

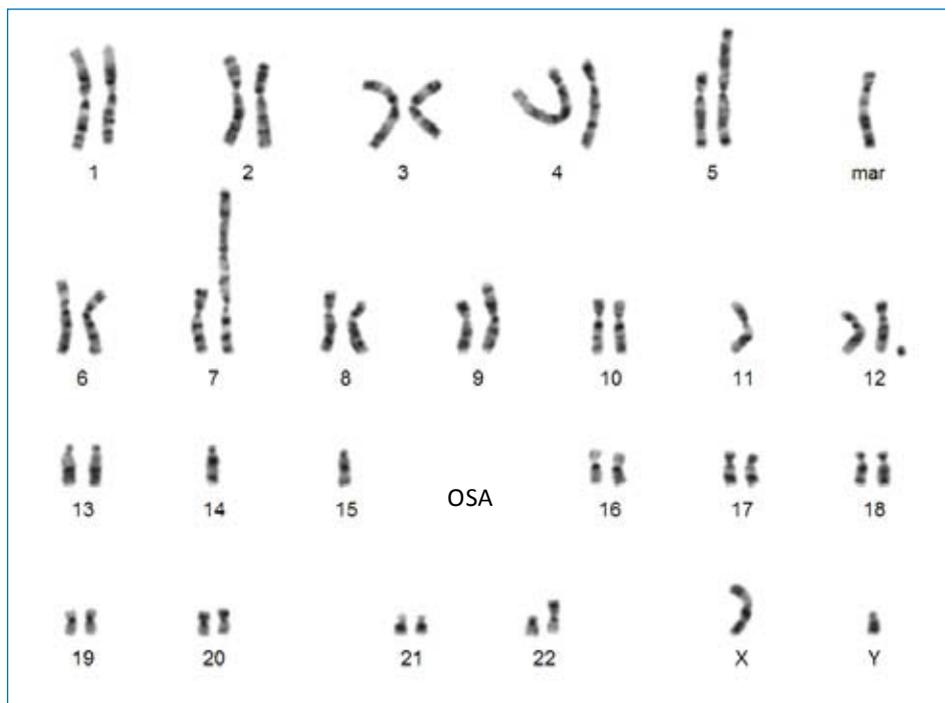


Abbildung 4.15: Karyogramm der Zelllinie OSA mit komplexen Chromosomenumbauten in einem hypodiploiden Chromosomensatz. Karyotyp: 44,XY,der(5)(15qter->15q13::5p13->5qter), der(4;7)(4qter->4p11::7p22->7qter),+der(8)(5pter->5p15::8p11->8q13::5q15->5q35::17q21->17qter),dic(9;14)(p11;p11),der(11)t(5;11)(q22;q13),-15,der(22)(:1p22->1p11::22p13->22qter),+mar.

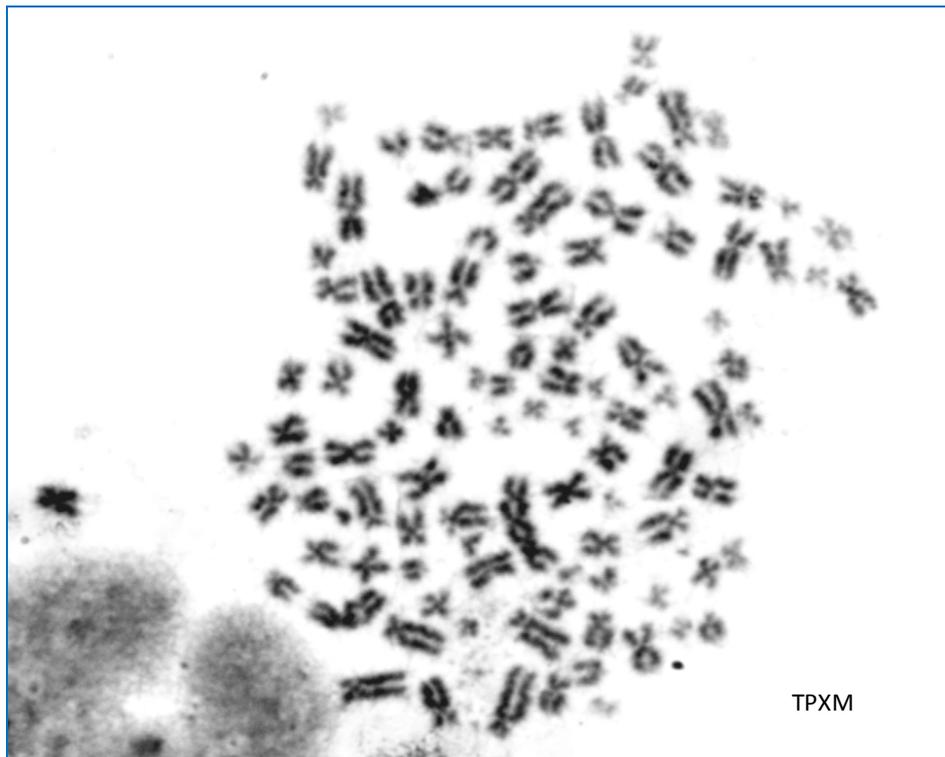


Abbildung 4.16: Metaphase der Zelllinie TPXM mit hypertetraploidem Chromosomensatz und komplexen strukturellen Chromosomenveränderungen.

4.2.2 Vielfarbige Karyotypisierung

Die kombinierte G-Banden- und SKY-Analyse zeigte in allen Zelllinien komplexe numerische und strukturelle Veränderungen. Die Karyotypen der 14 analysierten Zelllinien befinden sich in Tabelle 4.3. Abbildung 4.17 zeigt ein typisches SKY-Karyogramm der Zelllinie OSA, welche einige strukturelle, jedoch wenige numerische Aberrationen verfügt.



Abbildung 4.17: Kombiniertes DAPI-Banden- und SKY-Karyogramm der Zelllinie OSA, links außen die Darstellung der Chromosomen in Spektralfarben, in der Mitte die Darstellung der Chromosomen in DAPI-Bänderung und rechts die Darstellung der Chromosomen in Pseudofarben.

In Abbildung 4.18 wird ein charakteristisches Karyogramm der Zelllinie TPXM mit einer Vielzahl von strukturellen und numerischen Veränderungen vorgestellt.

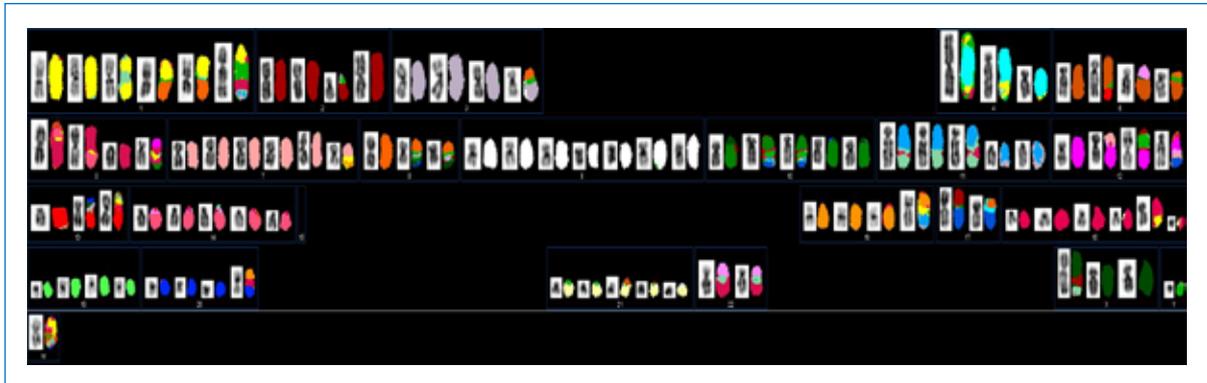


Abbildung 4.18: Kombiniertes DAPI-Banden- und SKY-Karyogramm der Zelllinie TPXM, links die Darstellung der Chromosomen in DAPI-Bänderung und rechts die Darstellung der Chromosomen in Pseudofarben. Mit Ausnahme des Chromosoms 19 sind alle übrigen Chromosomen in strukturelle und/oder numerische Veränderungen involviert.

Tabelle 4.3: Karyotypen von 14 OS-Zelllinien nach kombinierter G-Banden- und SKY-Analyse. *=Tochterzelllinie der Zelllinie HOS.

Zelllinie	Karyotyp
HOS	50,X,-X,der(1)t(1;6)(q32;p23),der(1)(6pter->6p11::1p13->1q11::7p11->7pter),der(2)(17qter->17q11::2p25->2q14:),del(2)(p11),+2,der(4;6)(q10;q10),+del(5)(q15),-6,der(7)t(1;7)(q23;q34),der(7)t(7;15)(q34;q23),dic(9;20)(q11;q11),+9,der(9)t(5;9)(q33;q22),der(11;20)(20pter->20p11::11p14->11q11::20p11->20qter),+11,der(12)t(12;14)(q24;q11),der(14)(14qter->14q22::14q13->14p11::14q22->14q24::18q21->18qter),+15,der(17;18)(17pter->17q10::18q10->18q21:),der(21)t(11;21)(q13;p11)
KPD	40-43,XY,der(1;6)(p10;q10),der(1;19)(p11;q11),del(2)(p21),-3,del(4)(q12q33),der(4)(:4p14->4q23::10q21->10qter),der(15;21)(21qter->21p11::15p11->15qter::4q13->4q32::7p13->7pter),der(6;9)(q10;q10),der(7;20)(20pter->20p10::7q10->7q22:),der(8)t(6;8)(q21;p12),del(9)(q21),der(10)(10pter->10q22::6q13->6q21::7q32->7qter),del(10)(q11),der(11)t(10;11)(p13;p15),der(12)(12pter->12p13::5q11->5q13::12p13->12qter),der(12)t(12;22)(q13;q12),del(15)(q21),der(16)t(16;18)(p13.3;p11.3),del(17)(p11),der(17)(6qter->6q23::17p11->17q25::17p11->17pter),der(20)(1qter->1q32::7p21->7p14::20p11->20qter),+der(20)t(4;20)(q31;p11),der(22)t(Y;22)(q12;p11)
MG63	58,X,der(Y)t(Y;12)(p11;p11),+1,dic(1;12)(p11;p12),der(3)t(3;21)(q13;q11),der(4)t(3;4)(p12;p14),-4,-6,dic(7;20)(p10;p10),-8,der(8;9)(8pter->8q24::9p24->9q13::13q13->13qter)x2,der(9)(:9p12->9q22::3p25->3pter),-10,der(11)t(5;11)(q31;q23),-12,der(12)t(12;13)(p13;q14),-13,-14,der(15)t(15;17)(p11;q21),-17,-18,der(17)(17qter->17q21::17q11->17p13::17q11->17q21::9p13->9pter),der(17)(17pter->17q11::8q13->8qter),-18,-19,der(20)(20qter->20p11::8q11->8q13::6q13->6qter),hsr(21)(q22),+mar
MHM	74-82,XX,t(1;19)(p22;p13),t(1;3)(p22;q29),der(1)t(1;19)(p22;p13),i(2)(q10),der(3)t(3;8)(q13;p11),der(4)t(4;11)(q21;q21)x2,del(4)(q27),inv(5)(q31p15),der(8)t(8;10)(q11;q22),dic(9;22)(p11;p11),der(10)t(2;10)(p13;p12),der(11)t(4;11)(q22;q21)x3,der(10;12)(10pter->10q11::12p13->12q24::3p25->3pter),der(12;21)(12pter->12q11::21p11->21q22::12q11->12qter),der(14)(6pter->6p11::14p11->14q11::16q22->16qter),+der(14)t(1;14)(q12;q23),del(16)(p11)x2,+16,+der(1;18)(q10;p10),+der(19)(17qter->17q21::19q13->19p13::1p22->1pter),+19,+20,+21,+22
MNNG-HOS*	64-72,X,-X,-X,del(1)(q32)x2,der(1)(1pter->1q32::6p21->6pter)x2,+2,der(2)(:2p13->2q33::17q21->17qter),der(5)(:5p13->5q11::2p11->2pter),+6,der(5pter->5p11::1p11->1q23::6q11->6pter),der(6;14)(q10;q10)x2,dic(6;22)(p11;p13),der(7)t(7;15)(q34;q24),der(7)t(1;7)(q32;q35),der(11q32->1q25::7q11->7p11::22q11->22pter),i(8)(q10),der(9qter->9p11::9p11->9qter),der(9pter->9q11::9q11->p22::5q33->5qter),-11,der(12)t(12;14)(q24;q22),-14,i(15)(q10),+16,der(16)(7pter->7p14::16q12->16p12::2p11->2pter),del(17)(q21),der(17)t(10;17)(q22;p13),-18,der(20)(18qter->18q21::20p13->20q13::Xq13->Xqter)der(20p11->20q13::20q13->20p11:),+20,der(21)t(5;21)(q11;p13),-21,der(22)t(2;22)(q11;q11),der(22)t(8;22)(q11;q11),+22

Zelllinie	Karyotyp
MOS	52-60,X,-X,i(1)(p10),der(1)t(1;5)(q25;q13),der(X;2)(9pter->9p22::Xp22->Xp10::2q10->2qter),der(3)(10qter->10q24::3p23->3q21::17q21->17qter),der(4)t(4;14)(q21;q13),dic(4;11)(q27;q13),der(5)(:5p11->5q11::Xq13->Xqter),+5x2,del(5)(q11),+der(5;8)(p10;p10),+dic(5;16)(q11;q22),+6x2,del(6)(q15),der(6)(6pter->6q13::10q11->10q21::3p21->3pter),-7,i(8)(q10),der(9)(1qter->1q42::9p23->9q22:),der(9)(1qter->1q42::9p23->9q12:),+der(9)(9pter->9q11::10p13->10p11::7q22->7qter),+10,der(10)t(3;10)(p23;q24)x2,der(15)(7qter->7q11::6q23->6q11::15p11->15qter),+11,+12,-13,add(14)(p13),+15,der(17)t(4;17)(p16;q25)x2,der(18;19)(q10;p10),der(19)t(3;19)(p23;p13),+der(19)(19pter->19q11::15q11->15q24::3q25->3q27::15q24->15qter),add(20)(q11),-21,-22
OHS	69-76,X,der(X)(3pter->3p23::2p25->2p11::Xp22->Xqter)x2,del(1)(q11),der(1)(1pter->1p10::4q10->4q31::1q10->1q21::11p13->11pter),-3,der(4;15)(4pter->4q31::15p11->15qter),del(4)(q33),-5,der(5)t(5;13)(q31;q14),dup(6)(p12p25),+dup(6)(p12p25),der(6;10)(6pter->6q11::1q12->1q22::10q11->10pter)x2,der(7)t(7;16)(q11;q13),der(7)t(1;7)(p34;p11),+7,+7,+7,+der(1;8)(p10;q10),+idic(8)(p23),+del(8)(q11),dic(8;17)(q11;p11)x3,der(9)(q22),+der(10)t(10;20)(p15;p11)x3,+der(10)(10pter->10q22::3p14->3p23::17q21->17qter),der(11)(11pter->11q25::6q15->6q26::15q15->15qter)x3,der(12)t(3;12)(q23;p11),-13,der(14)(3pter->3p23::14q32->14q22::14p13->14q22::14q32->14qter),der(15)(15qter->15q24::15q22::15p13->15qter),-15,+19,+21,-22x3
OS09	n.a.
OS10	55-65,der(X)(Xpter->Xp22.3::Xp21->Xq26::Xq22->Xq26::22q11->22q13::17p13->17q21::21q21->21q22::Xq26->Xqter),der(X;6)(6pter->6q23::Xp11->Xq22::2q33->2qter),-Y,der(1)t(1;5)(p11;p11),der(1)(1pter->1q21::11q23->11q24::11q23->11q24::3q21->3q25::7p13->7pter),+1,der(2)(2pter->2q33::6p21->6p12::3p11->3pter),del(2)(q23q33),der(3)t(3;11)(q26;p11),der(3)(5pter->5p13::3p11->3q11::11q12->11qter),der(3)(3p11->3q11::11q12->11qter),-4,-5,del(5)(p11),+6,der(7)ins(7;1)(p15;p31p34),-8,der(9)t(9;18)(p10;q10),der(9)(9pter->9q13::8q12->8q21::17p11->17q23::9q32->9qter),der(10)t(10;17)(p11;p11),i(11)(q10),der(11)t(11;17)(p15;p11),t(13;13)(q14;p13),der(13)(5pter->5p14::13p11->13q31),+der(13)(13q31->13q21::13p13->13q21),+der(13)(13q31->13q21::13p13->13q21::11q23->11qter),der(17)t(4;17)(p10;q10),-18,der(18)(18pter->18q21::15q22->15qter),der(19)(19pter->19q13::17q12->17q23::22q12->22qter),der(20)(20pter->20q13::5q31->5qter)x2,der(20)(20pter->20q11::9p11->9pter),+20,-22,-22
OS18	132,XXXYYY,+X,+Y,+1,-2,der(3;6)(q10;p10)x3,der(7;11)(11pter->11p13::7p15->7q22::11p13->11qter)x4,+7x2,der(8;15)(q10;q10)x3,-9x2,der(10;22)(q10;q10)x2,-10x2,+11x2,-13x2,-14x2,der(15;22)(q10;q10)x2,-15,der(16)t(2;16)(q35;q24)x2,+16,der(18;20)(q10;q10),-18,-19x2,+20x2,+21x1
OSA	44,XY,der(5)(15qter->15q13::5p13->5qter),der(4;7)(4qter->4p11::7p22->7qter),+der(8)(5pter->5p15::8p11->8q13::5q15->5q35::17q21->17qter),dic(9;14)(p11;p11),der(11)t(5;11)(q22;q13),-15,der(22)(:1p22->1p11::22p13->22qter),+mar
OST	62,XX,der(X)(Xpter->Xq22::5q15->5q21:),der(1)t(1;9)(q11;q11),der(1)(3pter->3p21::1p32->1q42::6p21->6pter)x2,del(2)(q33),-3,-3,der(4)(4pter->4p11::4p14->4q31::18q21->18qter),-4,i(5)(p10)x2,+5,del(6)(p21),-6,der(6)t(6;7)(p25;p21),+7,der(7)(:7p12->7q11.2::6q23->6qter),der(7)(13qter->13q22::11q14->11q12::7p11->7q11.2::6q21->6qter),dic(8;9)(q11;q11),del(9)(q22),der(10)t(3;10)(p13;p11),der(11)(9qter->9q34::11p15->11p11::11p15->11q23::1p34->1pter),-13,del(13)(q22),del(18)(q21),-18,der(19)t(1;19)(q42;p13),-22

Zelllinie	Karyotyp
TPXM	94-112,XX,-Y,+der(X)(Yqter->Yp11::2q11->2q23::Xp22->Xqter),i(1)(q10),+der(1)(1pter->1q11::4q11->4q27::Yp11->Yq12::11p13->11pter),der(1;8)(p10;q10)x2,+i(2)(q10),der(2)t(2;3)(p11;q11),der(3)(3pter->3q12::8p12->8pter),der(4)t(4;11)(q35;p11)x2,del(4)(q25)x2,del(5)(q21q31)x2,der(5)t(5;13)(q31;q14)x2,der(6)t(6;14)(p22;q24)x2,+7,+der(7)t(7;16)(q22;q12)x2,-8,+i(8)(q10)x2,+der(8)(8pter->8q11::3q11->3q21::Xp22.1->Xpter),+i(9)(p10)x2,+der(9)t(3;9)(p21;q11),der(10)t(X;10)(p22.1;p13)x4,+der(10)(10pter->10q22::Yp11->Yq12::17q22->qter)x2,-11,der(11)(11pter->11q24::6q13->6q21::15q15->15qter)x3,+inv(11)(p11q24)x2,der(12)(2pter->2p23::3q25->3q27::12p11->12qter)x2,der(12)t(12;17)(q24;q11),-13,+14,-15x4,-17x2,dic(2;17)(q11;p11),dic(8;17)(q11;p11),der(18)t(1;18)(q25;p11),+21x2,der(22)(6pter->6p11::11q24->11q13::22p11->22qter)x2,dic(20;22)(q13.3;p13)
U-2OS	75-80,der(X)t(X;22)(q28;q11),del(X)(q13),der(Y)ins(Y;8)(p11;q11q24),der(1)t(1;5)(p35;q21),der(1;18)(q10;p10),del(2)(p15),der(2)del(2)(q11)del(2)(p13)+2,del(3)(p21),der(4)t(4;4)(p11;q35),der(4;22)(q10;q10),der(5)t(5;19)(q22;q11),+i(5)(p10),r(5)(p12;q13)x2,der(6)del(6)(p11)dup(6)(q21q27),der(6;10)(p10;p10),der(6)t(6;15)(q21;q13),+6,der(7)t(7;12)(q34;p11),der(7)(7qter->7q34::7p22->7q36::14p12->14q22::14q32),del(7)(p11),+der(7)del(7)(p11)del(7)(q31),dup(8)(q23q24),inv(8)(p11q24),del(8)(q22),der(9;16)(q10;q10),der(9)t(9;5)(p21;p13)del(9)(q13q32),der(9)t(5;9)(q33;q22),del(10)(q11)x2,del(11)(q13q24),der(11)t(5;11)(q31;p15),dup(11)(q24q13),del(12)(p11),der(12)del(12)(p11)del(12)(q15),der(12)ins(12;8)(p11;q11q21),+der(12;17)(p10;q10),-13,t(13;19)(p11;p11),del(14)(q22q32),der(15)t(11;15)(q23;q26),dic(15;19)(q26;q11),der(15)t(2;15)(p11;p13),t(17;17)(p11;q11),der(18)(18qter->18q23::18q11->18p11::18q11->18q23::18q11->18qter),r(18)(p11.3q11),+r(18)(p11.3q11)x2,-19,dup(20)(q12q13),+del(20)(p11),der(21)t(1;21)(q21;p11),der(22)t(3;22)(q25;q13),+der(22)(1q22->1p11::22p11->22qter),der(22)t(10;22)(q22;q11)
ZK-58	53,Y,der(X)t(X;9)(p22.3;p11),+der(1)t(1;14)(q12;q11),der(1)(1pter->1p34::14q32->14q11::1p22->1q32:),der(1;19)(1qter->1p11::19q11->19pter),del(2)(q31),der(2)(Yqter->Yq11::1p34->1p22::2p23->2qter),der(3)t(3;8)(q12;q12),-3,del(4)(q21q31),der(5;5)(:5p11->5q13::5q13->5p11:),der(6)del(6)(p22p12)del(6)(q11),del(7)(q11),dic(8;22)(p11;p11),der(8)t(6;8)(p23;q11),+der(9)t(8;9)(q11;q11),der(9)(:5p14->5p11::9p11->q13::8q13->8qter),der(9;20)(20pter->20q11::1p11->1p36::9q13->9pter),+der(11)dup(11)(q23q25)del(11)(p11),del(11)(q11),del(12)(p12),der(12;22)(pter->q22::22p13->22q13::3q11->3qter),der(13)(13pter->13q21::13q12->13q21::13q34->qter),del(13)(q12q14),-14,der(11;17)(7qter->7q11::11p15->11q11::17q25->17p13::3q25->3qter),+der(11;17)(:11p15->11q11::17q25->17p13::3q25->3qter),der(18)(11qter->11q13::18p11->18qter),der(18)(18pter->18p11.1::18p11.3->18q11:),+der(19)t(7;19)(q11;q13.1),der(19)t(8;19)(p11;q11),+del(19)(q11),+del(20)(q11),del(20)(p11),-21

4.2.3 'CyDAS'-Analyse der SKY-Karyotypen

Die Analyse mittels dem Programm 'CyDAS' konnte die Verteilung der Zugewinne und Verluste aufdecken. Des Weiteren half die Erstellung von Idiogrammen bei der Überprüfung der Karyotypen. In Abbildung 4.19 wird das Idiogramm der Zelllinie OSA mit nahezu diploiden Chromosomensatz und überschaubaren Aberrationen, wie Verluste von kompletten Chromosomen, Translokationen mit einem Translokationspartner oder Insertionen vorgestellt. Abbildung 4.20 zeigt, dass besonders bei komplexaberranten Karyotypen, wie bei der Zelllinie ZK-58 durch das Idiogramm ein besserer Überblick über die Veränderungen gewonnen werden konnte. Nahezu jedes Chromosom, mit Ausnahme der Chromosomen 10, 15 und 16 war in Aberrationen involviert. Bei diesen Veränderungen handelte es sich um diffizile Translokationen mit zwei oder mehr Translokationspartnern.

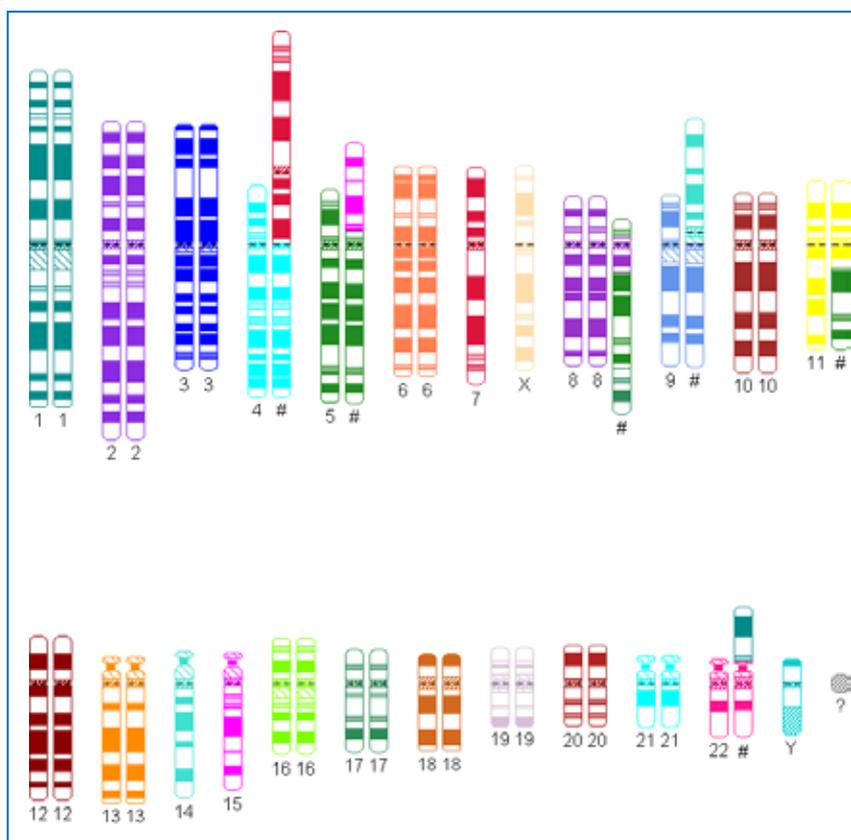


Abbildung 4.19: Idiogramm der Zelllinie OSA bezogen auf eine Auflösung von 400 Banden pro haploidem Satz, die aberranten Chromosomen sind durch eine Raute (#) gekennzeichnet.

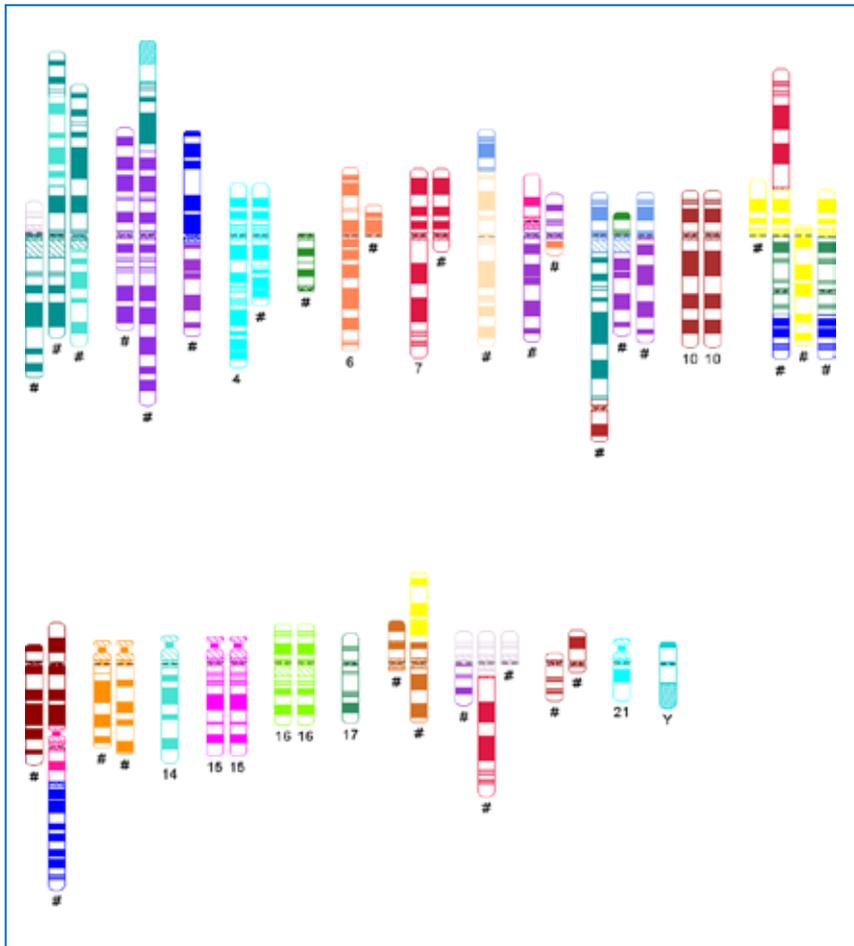


Abbildung 4.20: Idiogramm der Zelllinie ZK-58 bezogen auf eine Auflösung von 400 Banden pro haploidem Satz, die aberranten Chromosomen sind durch eine Raute (#) gekennzeichnet.

Bei der Analyse der Zelllinien auf Zugewinne und Verluste von chromosomalem Material zeigte sich, dass nahezu alle Chromosomenregionen Zugewinne und Verluste aufwiesen. Die Verluste von chromosomalem Material überwogen mit einer Gesamtzahl von 2000 denen der Zugewinne mit einer Anzahl von 1536 bei einer Auflösung von 368 bphs. Abbildung 4.21 zeigt die graphische Darstellung der Zugewinne und Verluste mit einer Auflösung von 400 bphs, welche durch die Balkenhöhe einen vereinfachte Auswertung der Häufigkeit der Ereignisse ermöglichte.

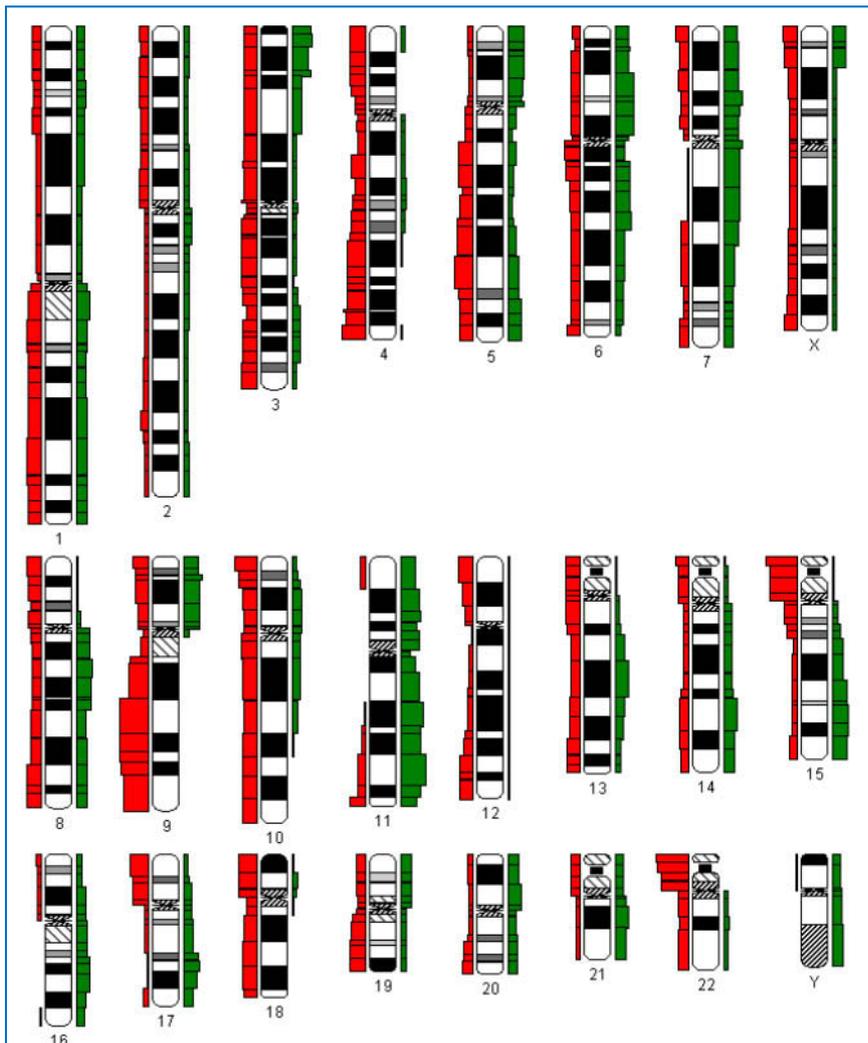


Abbildung 4.21: Verteilung der Netto-Zugewinne und -Verluste chromosomalen Materials der Zelllinien auf Basis des kombinierten SKY- und G-Bandenkaryotyps, bezogen auf eine Auflösung von 400 bphs. Die Zugewinne sind in grün dargestellt und die Verluste in rot. Die Höhe der Balken zeigt die Häufigkeit der Ereignisse an.

Bei der Analyse der Zugewinne fiel auf, dass besonders Bereiche der kurzen Arme der Chromosomen 3, 5, 6, 7, 9 und 11 und Bereiche der langen Arme der Chromosomen 1, 6, 7, 8, 11 und 15 an chromosomalem Material zugewonnen hatten. Von Verlusten waren hauptsächlich Regionen der kurzen Arme der Chromosomen 4, 9, 10, 15, 17, 18 und 22 und Bereiche der langen Arme der Chromosomen 1, 4, 5, 9, 11, 18 und 19 betroffen (Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4: Auflistung der Anzahl der am häufigsten von Zugewinnen oder Verlusten betroffenen Chromosomenbanden.

Chromosomenbanden	Anzahl Zugewinne	Chromosomenbanden	Anzahl Verluste
11q23	14	22p13	18
11q14	12	15p13, 22p12	17
3p25, 11p13, 11q21q22, 11q24	11	9q22q32	16
3p26, 3p23, 5p10, 6p21p12, 7p14, 7q10q11, 9p22, 11p14, 11p11, 11q13	10	9q33, 15p12p11, 22p11,	15
3p24, 5p15p14, 5p11, 6q21, 7p13, 7q21, 8q13, 9p21p11, 11p12, 11q25, 15q24q25, 17q23	9	9q34 4q35	14 13
5p13, 6p23, 6q13q16, 7p21p15, 7p12p10, 7q22, 8q21, 9p24p23, 9p10, 11p15, 11q12, 15q22q23, 15q26, 17q22	8	4q33, 10p15, 15q10	12
		4q34, 9q21, 15p10, 22p10	11

Die Analyse der Verteilung der Bruchpunkte zeigte, dass die Brüche zwar über das gesamte Genom verteilt sind, es in manchen Regionen aber gehäuft zu Brüchen kam. Insgesamt konnten 650 Bruchereignisse bei einer Auflösung von 368 bphs detektiert werden. Die Verteilung der Bruchpunkte in der graphischen Darstellung wird in Abbildung 4.22 gezeigt.

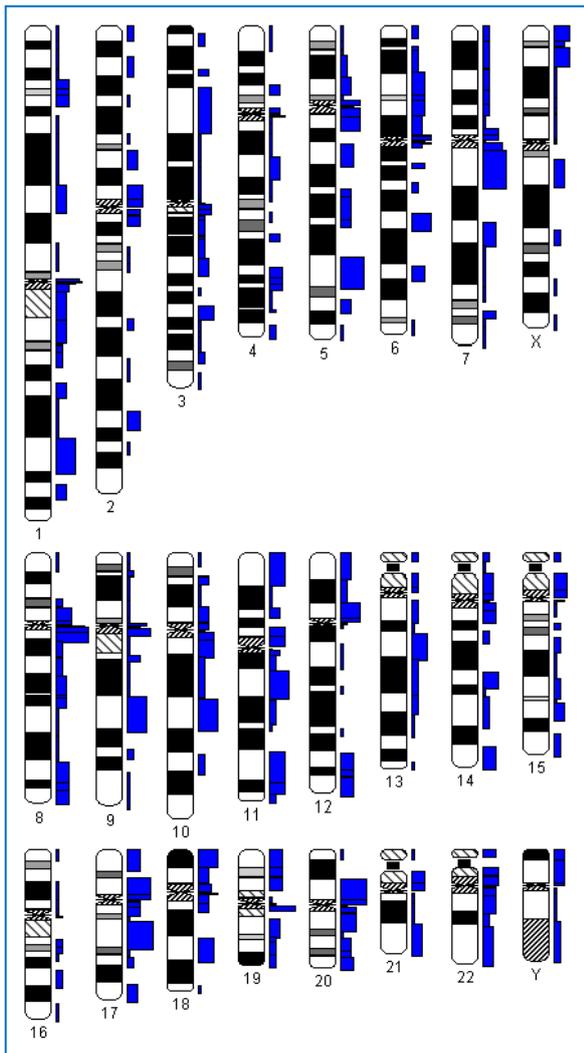


Abbildung 4.22: Verteilung Bruchpunkte der Zelllinien auf Basis des kombinierten SKY- und G-Bandenkaryotyps, bezogen auf eine Auflösung von 400 bphs. Die Höhe der blauen Balken zeigt die Häufigkeit der Ereignisse an.

Bei der Analyse der Bruchereignisse in den Zelllinien zeigte sich, dass es häufig in den Centromeren oder in Centromernähe zu Brüchen kam. In den telomernahen Regionen Xp22 und 11p15 kam es auch gehäuft zu Bruchereignissen. Außerhalb dieser Regionen waren besonders die Banden 3q25, 5q31, 6q21, 9q22, 10q22, 11q13, 11q23, 11q24, 13q14 und 17q21 betroffen (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.5: Auflistung der häufigsten Bruchereignisse. Brüche im Centromer, oder in Centromernähe sind fett dargestellt. Brüche in Telomernähe sind in kursiv dargestellt.

Chromosomenbande	Anzahl Brüche
8q11	9
1p10, 8q10, 19q11	8
<i>Xp22, 1p11, 5q31, 11q13, 17p11, 17q21, 18p11, 20p11</i>	7
1q10, 6q21, 7q11, 9q11, 9q22, 12p11, 18q10	6
3q25, 4q10, 8p11, 9p11, 10q11, 10q22, 11p15, 11p11, 11q23, 11q24, 13q14, 20q11, 22p11	5

Insgesamt zeigten die SKY-Analysen die genetische Heterogenität der Tumoren. Rekurrente und/oder balancierte Translokationen konnten nicht detektiert werden. Diczentrische Chromosomen und komplexe Chromosomen die aus mehr als zwei Translokationspartnern bestanden lagen häufig vor. Nahezu alle Chromosomenregionen waren von Brüchen betroffen und die Brüche lagen hauptsächlich in den Centromeren oder in Centromernähe vor.

4.3 Spezifische Chromosomenaberrationen

4.3.1 Ausschluss von *EWSR1*-Translokationen mittels FISH

Die Ergebnisse der FISH-Analysen, sowie der aCGH-Analysen für das Gen *EWSR1* können der Tabelle 4.6 entnommen werden. 16 Zelllinien zeigten ein abweichendes Signalmuster mit zusätzlichen Signalen bei der FISH-Analyse. In den acht Zelllinien 143b, HAL, MG63, MNNG-HOS, OHS, OS09, OS14 und OS15 war dies auf eine ganzzahlige Vermehrung des Chromosomensatzes zurückzuführen. Bei den Zelllinien MHM, MOS, OS10, OS18, SARG, TPXM und U2-OS korrelierte die Signalvermehrung mit der Kopienzahlvermehrung des Gens in der aCGH-Analyse. Der durch die aCGH-Analyse ermittelte Kopienzahlverlust von *EWSR1* bei den Zelllinien KPD, OS15 und OST konnte ebenfalls bei der FISH beobachtet werden. Die Zelllinie OS15 zeigte bei der FISH ein gemischtes Ergebnis (71% Zellen 6 Signale, 29% Zellen 2 Signale), das entweder mit dem Ergebnis der aCGH oder dem Ploidiegrad der Zelllinie zu vereinbaren war. Es konnten bei 15 Zelllinien Rearrangements des kompletten Gens, ein Bruch im Gen *EWSR1* mit Rearrangements der 5'- und 3'-Anteile jedoch nur bei der Zelllinie OS10 beobachtet werden, somit war nur hier die Voraussetzung für die Fusion mit einem anderen Gen gegeben.

Tabelle 4.6: Ergebnisse der *EWSR1*-FISH-Analysen und der aCGH-Analysen für das Gen *EWSR1*, u=unauffällig, +=Zugewinn, -=Verlust, prox.=proximal, dist.=distal.

Zelllinie	aCGH	Signale <i>EWSR1</i>	Rearrangement
143b	u	3	ja
HAL	u	3-4	ja
HOS	u	2	nein
KPD	-	1	ja
MG63	u	3-4	nein
MHM	+	4	ja
MNNG-HOS	u	3	ja
MOS	+	4-5	ja
OHS	u	3	ja

Zelllinie	aCGH	Signale <i>EWSR1</i>	Rearrangement
OS09	u	3	ja
OS10	u/+	3 prox./6 dist.	ja
OS14	u	3-4	nein
OS15	-	2/6	ja
OS18	-/+	5-7	ja
OSA	u	2	ja
OST	-	2	nein
SAOS2	u	2	nein
SARG	+	3-7	ja
TPXM	+	5	ja
U-2OS	+	4	ja
ZK-58	u	2	ja

Abbildung 4.23 zeigt die komplexe Umverteilung der Sonde 'EWSR1 break probe', mit einer Signalkolokalisation lediglich auf einem Chromosom 22 und einer Aufteilung der Signale, sowie einer Vermehrung des distalen Anteils der Sonde auf den übrigen Chromosomen. Der Abgleich mit den aCGH-Daten zeigte ebenfalls eine Kopienzahlvermehrung mit einem \log_2 ratio von 0,46 für 3'-*EWSR1* und für 5'-*EWSR1* eine ausgeglichene Kopienzahl mit einem normalen \log_2 ratio.

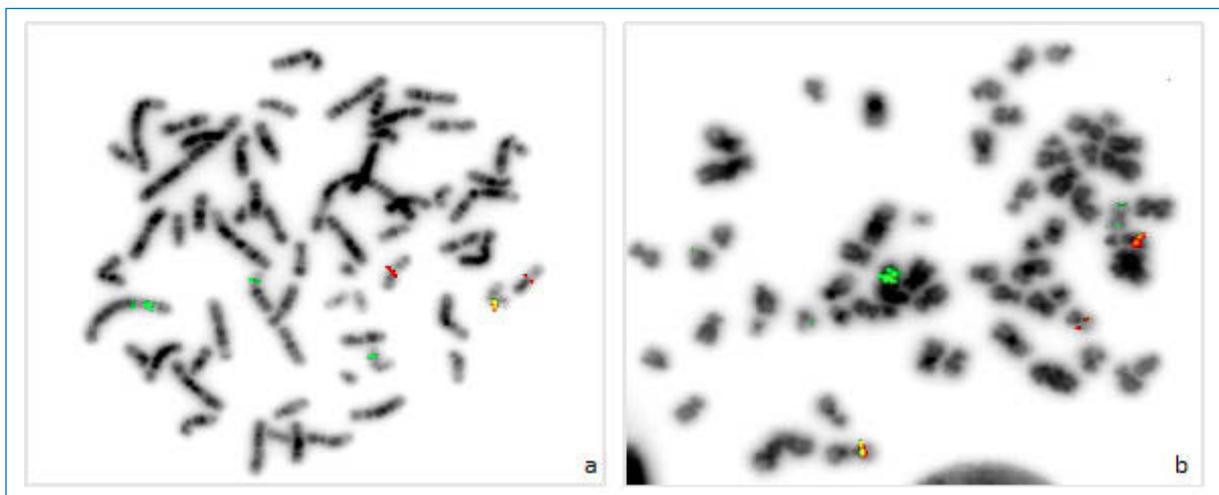


Abbildung 4.23: a) Metaphase der Zelllinie OS10 nach Hybridisierung mit der Sonde 'EWSR1 break probe' (5'-*EWSR1*=rot, 3'-*EWSR1*=grün) Es liegt ein kolokalisiertes Signal auf Chromosom 22 vor, die Sonde für den proximalen Bereich liegt auf zwei Chromosomen einzeln vor und die Sonde für den distalen Bereich auf drei Chromosomen mit einer Vermehrung der Kopienzahl auf einem derivativem Chromosom vor. b) Metaphase der Zelllinie OS10 nach Hybridisierung mit den Sonden RP11-612D3 (22q12.2, grün) und RP11-392O1 (17q21.31, rot). Die Gene *EWSR1* und *ETV4/E1AF* liegen auf dem derivativen Chromosom 19 kolokalisiert vor.

Der Bruchpunkt lag zwischen den Oligonukleotidproben A_14_P115003 (28.013.110-28.013.168) und A_14_P119490 (28.022.210-28.022.266). Die SKY-Analyse zeigte

eine Umlagerung der Region 22q12 auf das derivative Chromosom 19 (der(19)(19pter->19q13::17q12->17q23::22q12->22qter)). Die FISH-Analyse mit den BAC-Sonden RP11-392O1 (*E1AF*, 17q21.31) und RP11-612D3 (*EWSR1*, 22q12.2) konnte eine Kolokalisation der Gene *EWSR1* und *E1AF/ETV4* auf dem derivativem Chromosom 19 aufdecken. Eine Reverse Transkriptase-PCR-Analyse zum Nachweis eines *ETV4/E1AF-EWSR1*-Fusionstranskriptes, die am Institut für Pathologie durchgeführt wurde, konnte allerdings keine Fusion der Gene nachweisen.

Bei den übrigen Zelllinien konnten für die 'EWSR1 break probe'-Sonde heterozygote Deletionen, Duplikationen, aber auch komplexe Umverteilungen des kompletten *EWSR1*-Gens beobachtet werden (Abbildung 4.24).

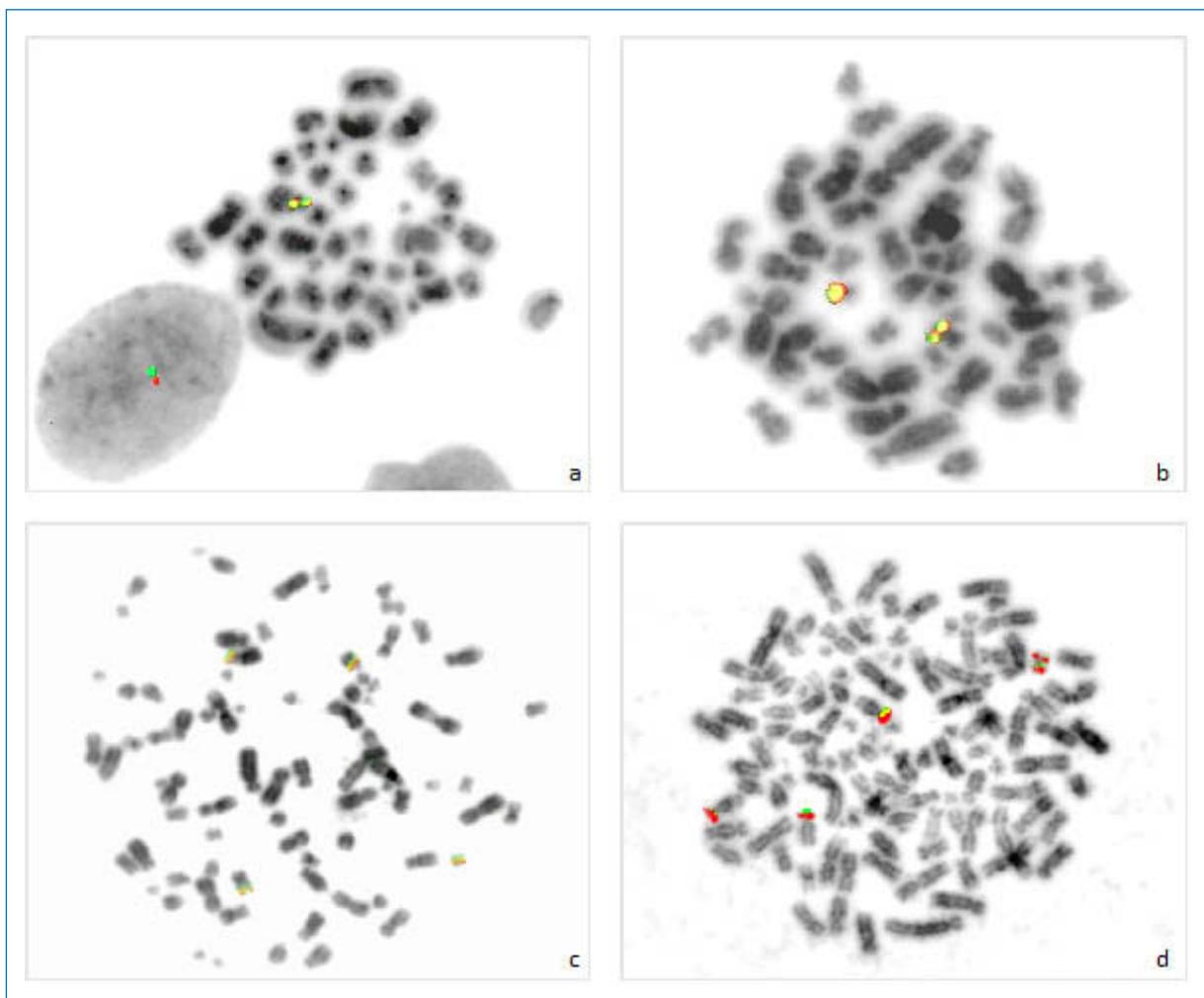


Abbildung 4.24: Metaphasen der Zelllinien KPD, OSA, U-2OS und TPXM nach Hybridisierung mit der Sonde 'EWSR1 break probe'. a) Die Zelllinie KPD weist nur eine Kopie des Gens auf. b) Bei der Zelllinie OSA liegen 2 Kopien des *EWSR1*-Gens vor. c) Die Zelllinie U-2OS weist 4 Kopien des Gens auf. d) Die Zelllinie TPXM hat insgesamt 5 Kopien des Gens, wobei sich 2 Kopien auf demselben Chromosom 22 befinden.

Insgesamt zeigten die Analysen, dass bei den in dieser Arbeit benutzten Zelllinien keine spezifischen *EWSR1*-Translokationen mit Genfusionen detektiert werden konnten.

4.4 Rekurrente chromosomale Bruchpunkte

Bereits die SKY-Analyse und anschließende Datenaufarbeitung mit dem Programm 'CyDAS' zeigte eine hohe Rate an Bruchereignissen von 650 detektierten Brüchen, bei der Analyse der aCGH-Ergebnisse wurden zusätzlich besonders viele kleine Aberrationen aufgedeckt. Insgesamt konnten bei der Bruchpunktanalyse der aCGH-Ergebnisse 4266 Brüche bei 19 Zelllinien beobachtet werden (Tabelle 4.7). Von allen Zelllinien war die Zelllinie MG63 am häufigsten mit einer Anzahl von 326 Chromosomenbrüchen betroffen und die Zelllinie OS18 mit einer Anzahl von 72 Bruchereignissen am geringsten. Das Chromosom 8 war mit 340 Brüchen am häufigsten in Bruchereignisse involviert und das Chromosom 22 war mit einer Anzahl von 74 Brüchen am geringsten betroffen. Bei der Analyse auf Chromosomenarmebene zeigte sich eine gehäufte Verteilung der Brüche auf die langen Arme der Chromosomen, lediglich bei den Chromosomen 6, 9 und 16 überwog die Anzahl der Brüche auf den kurzen Armen. Die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22 können mittels 44k-Oligonukleotidarray nicht aufgelöst werden und wurden deshalb bei der Analyse nicht berücksichtigt. Der am häufigsten von Brüchen betroffene Chromosomenarm war mit einer Anzahl von 281 Bruchereignissen der lange Arm von Chromosom 8. Die geringste Anzahl von chromosomalen Brüchen ereignete sich mit einer Anzahl von 31 Brüchen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 10. Die statistische Analyse der Bruchpunkte zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen beobachteten und erwarteten Werten vor allen bei den Chromosomen der Gruppen D-G (Tabelle 4.8). Bei einer zufälligen Verteilung der Bruchereignisse würde man eine Verteilung der Brüche nach prozentualem Größenanteil des Chromosoms am Genom erwarten. Es zeigte sich aber, dass die kleineren Chromosomen deutlich mehr Brüche aufwiesen als erwartet.

Tabelle 4.7: Bruchereignisse bei den OS-Zelllinien nach aCGH-Analyse aufgelistet nach Zelllinie und Chromosom. Insgesamt konnten 4266 Brüche detektiert werden. Die Zelllinie MG63 zeigte mit einer Anzahl von 326 Brüchen die größte Anzahl an Bruchereignissen und die Zelllinie OS18 mit einer Anzahl von 72 Brüchen die geringste Anzahl an Bruchereignissen. Das Chromosom 8 war mit einer Anzahl von 340 Brüchen am häufigsten betroffen und das Chromosom 22 mit einer Anzahl von 74 Brüchen am geringsten.

Zelllinie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	Summe
HAL	6	2	14	18	4	14	16	10	10	8	4	42	10	18	6	4	12	6	20	4	10	2	240
HOS	8	8	2	4	6	4	16	2	6	0	30	4	0	6	0	6	11	4	8	8	2	0	135
KPD	2	2	8	23	6	38	20	0	20	16	4	34	4	2	6	10	12	0	10	8	2	8	235
MG63	6	5	2	31	2	38	24	46	25	20	14	14	6	8	12	27	8	8	18	8	2	2	326
MHM	14	4	4	8	12	2	6	5	4	4	36	50	0	22	2	12	10	2	16	4	2	2	221
MOS	28	20	30	4	6	14	8	25	8	5	4	4	6	2	36	12	8	2	10	4	8	6	250
OHS	26	20	4	0	4	24	12	26	2	13	8	2	20	12	31	2	40	0	4	5	12	8	275
OS09	6	20	2	2	6	20	18	8	51	2	22	2	20	12	2	10	22	4	2	2	4	0	237
OS10	10	40	2	2	18	6	24	18	12	2	2	0	24	0	14	0	26	8	8	8	2	4	230
OS14	14	4	12	14	15	6	2	14	10	10	8	8	6	2	2	4	10	4	4	8	4	0	161
OS15	8	18	14	22	2	14	18	19	6	10	10	14	8	72	2	6	18	13	6	18	10	2	310
OS18	4	4	0	4	2	4	8	0	4	0	14	2	0	2	0	2	8	4	4	4	2	0	72
OSA	15	0	4	14	24	0	16	8	2	2	24	24	36	0	2	0	8	0	4	0	0	0	183
OST	6	2	6	6	6	14	10	2	10	4	22	2	2	2	4	12	0	16	10	12	0	4	152
SAOS2	14	10	10	6	4	12	4	8	4	2	2	12	14	4	8	6	6	4	18	6	2	4	160
SARG	16	12	20	6	6	6	30	38	8	6	42	6	2	4	2	4	8	6	27	4	6	10	269
TPXM	20	14	14	6	4	16	12	38	6	14	12	4	16	16	24	10	32	10	6	7	12	2	295
U-2OS	12	8	6	10	8	6	21	17	8	8	8	14	7	8	6	4	8	18	6	6	8	14	211
ZK-58	9	6	8	18	6	12	17	56	18	12	16	24	16	6	2	10	8	12	24	6	12	6	304
Summe	224	199	162	198	141	250	282	340	214	138	282	262	197	198	161	141	255	121	205	122	100	74	4266

Tabelle 4.8: Auflistung der Bruchereignisse getrennt nach p- und q-Arm der 19 OS-Zelllinien nach aCGH-Analyse. Es zeigte sich eine höhere Anzahl von Bruchereignissen auf den q-Armen der Chromosomen, außer bei den Chromosomen 6, 9 und 16 bei denen mehr Brüche auf den p-Armen als auf den q-Armen der Chromosomen beobachtet wurden. Des Weiteren wurde die überprüft, ob die beobachteten Brüche signifikant von den erwarteten Brüchen abweichen. (*)= schwach signifikant ($p < 0,1$), *= signifikant ($p < 0,05$), **= hoch signifikant ($p < 0,01$), ***= höchst signifikant ($p < 0,001$).

Chromosom	Gruppe	Beobachtet	Erwartet	p-Wert (korrigiert)
1p		86	190	1,000000
1q		138	188	1,000000
2p	A	57	142	1,000000
2q		142	228	1,000000
3p		56	140	1,000000
3q		106	165	1,000000
4p		48	77	1,000000
4q	B	150	215	1,000000
5p		52	73	1,000000
5q		89	203	1,000000
6p		148	92	0,000002***
6q		102	169	1,000000
7p		119	90	0,051193(*)
7q		163	152	1,000000
8p		59	69	1,000000
8q		281	154	0,000000***
9p	C	121	79	0,000221***
9q		93	135	1,000000
10p		31	62	1,000000
10q		107	145	1,000000
11p		113	81	0,011245*
11q		169	124	0,002583**
12p		78	54	0,031910*
12q		184	148	0,051631(*)
13q		197	150	0,003759*
14q	D	198	139	0,000039***
15q		161	127	0,051193(*)
16p		78	58	0,166165
16q		63	77	1,000000
17p	E	123	34	0,000000***
17q		132	86	0,000097***
18p		42	25	0,023138*
18q		79	92	1,000000
19p		80	43	0,000016***
19q	F	125	54	0,000000***
20p		44	41	1,000000
20q		78	54	0,031665*
21q	G	100	53	0,000000***
22q		74	58	0,457861

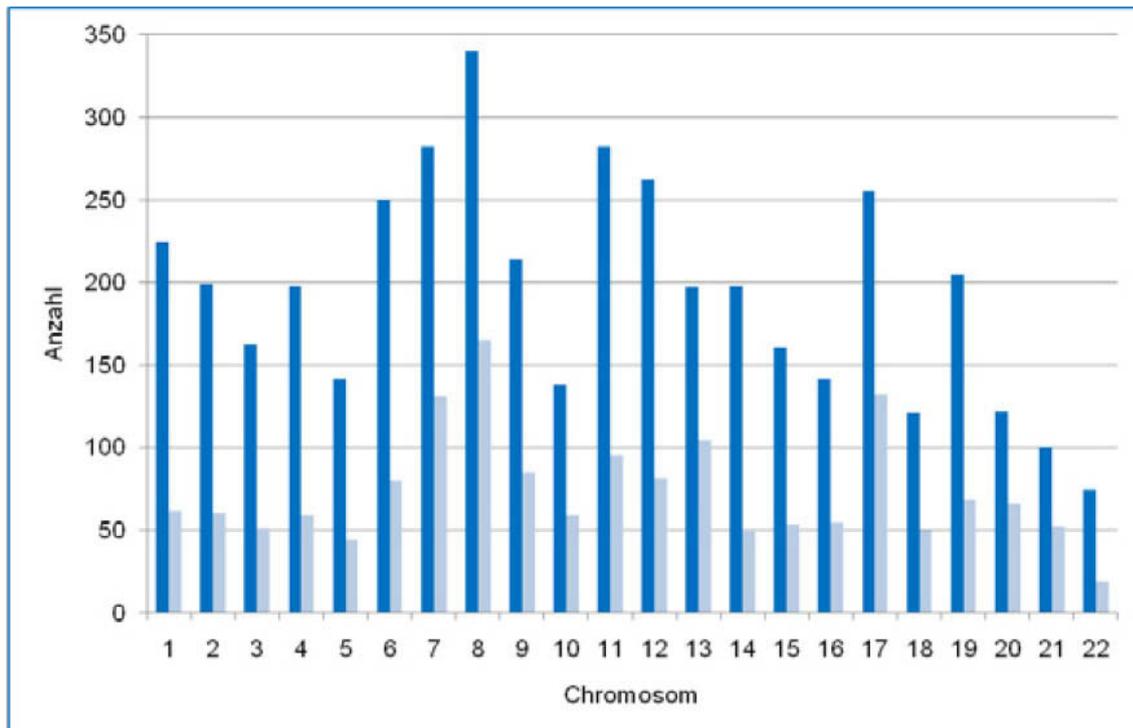


Abbildung 4.25: Verteilung der absoluten Häufigkeiten von Bruchereignissen pro Chromosom. Die Gesamtzahl der Bruchpunkte pro Chromosom ist in dunkelblau dargestellt und die Anzahl der rekurrenten Brüche in hellblau. Insgesamt konnten 1620 rekurrente Brüche detektiert werden.

Die Mehrzahl der Brüche war über die gesamten Chromosomen verteilt, es gab aber auch einige Regionen die rekurrent von Brüchen betroffen waren. Bei der Analyse der Bruchpunkte zeigte sich mit einer Anzahl von 907 Bruchereignissen (22%) eine Häufung der Brüche im Centromer oder in Centromernähe (Chromosomenbanden p12-p11 und q11-q12). Des Weiteren konnten bei Analyse der Bruchpunkte innerhalb der 4266 Bruchereignisse 1620 (38%) rekurrente Brüche identifiziert werden (Abbildung 4.25).

4.5 Rekurrente Bruchpunkte in einzelnen Genen

Über die Datenbankanalysen konnten von den 1620 rekurrenten Bruchpunkten, die teilweise in Genen lagen und teilweise in genleeren Bereichen 57 Gene, die 168 der Bruchereignisse ausmachten, auf Grund interessanter Funktionen ausgewählt werden.

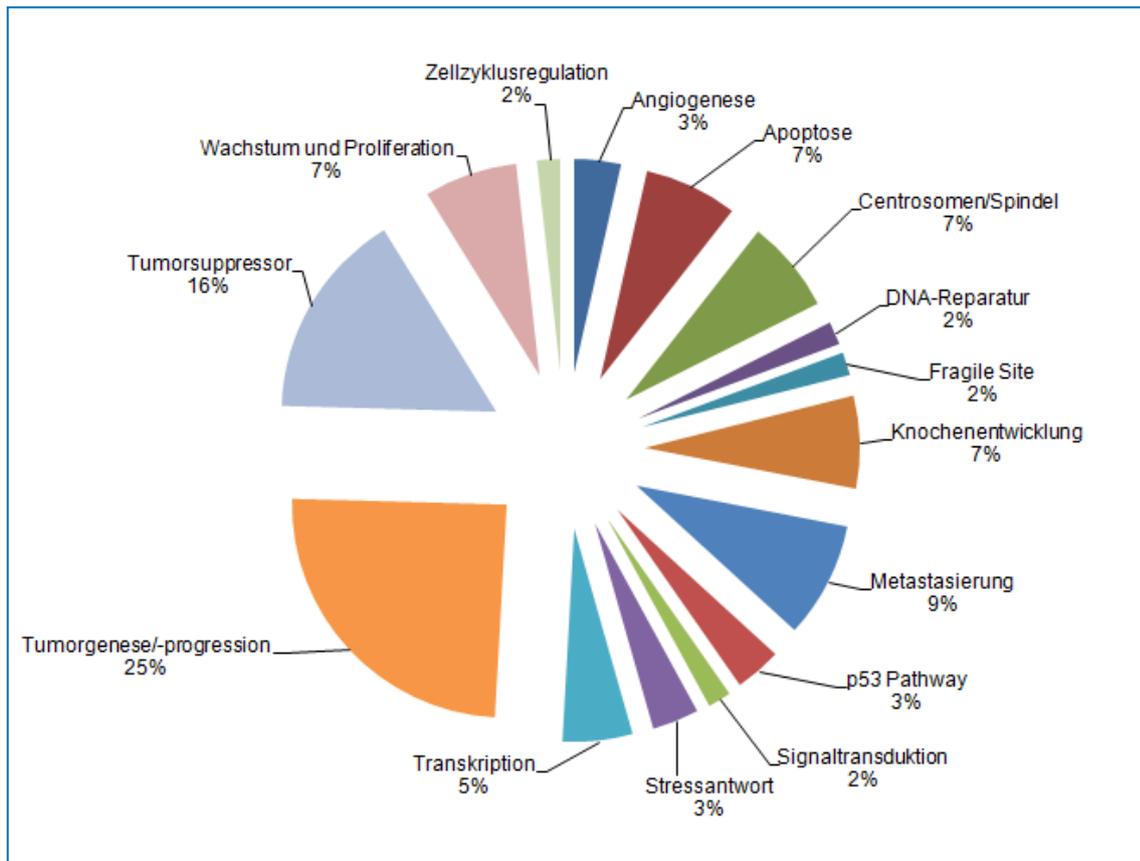


Abbildung 4.26: Anteile der Funktionsgruppen, zu denen die in den rekurrenten Bruchpunktregionen lokalisierten Gene zuzuordnen sind. Von den insgesamt 57 Genen sind die meisten bei der Tumorigenese oder Progression involviert. Tumorsuppressorgene, sowie Gene die bei Proliferation, Apoptose oder dem Aufbau des Mitoseapparates involviert sind waren ebenfalls häufig betroffen.

Die Gene konnten sich verschiedenen Kategorien (Abbildung 4.26) zuordnen lassen, der größte Anteil der Gene ist in die Tumorigenese bzw. Progression involviert (25%). Es wurden aber auch einige Gene gefunden, die als Tumorsuppressor fungieren (16%), die bei Wachstum und Proliferation von Zellen, Knochenentwicklung oder dem Aufbau des Centrosomen- bzw. Spindelapparates beteiligt sind (6%). Mit einem Anteil von 9% konnten Gene gefunden werden, bei denen Aberrationen die Metastasierung von Tumoren begünstigen. Eine Liste mit allen Genen, die rekurrent von Bruchereignissen betroffen sind findet sich in Tabelle 4.9. Auf einzelne Gene wird in der Diskussion genauer eingegangen.

Tabelle 4.9: Auflistung der rekurrent von Brüchen betroffenen Gene nach Chromosomenlokalisierung.

Chromosom	Gensymbol	Genname	Anzahl Brüche	Gruppe
2p25.1	<i>GREB1</i>	growth regulation by estrogen in breast cancer 1	3	Wachstum und Proliferation
2q14.2	<i>CLASP1</i>	cytoplasmic linker associated protein 1	4	Centrosomen/Spindel
2q34	<i>ERBB4</i>	v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4	3	Tumorgenese/Tumorprogression
3p14.2	<i>FHIT</i>	fragile histidine triad gene	2	Fragile Site
3q13.31	<i>LSAMP</i>	limbic system-associated membrane protein	2	Tumorsuppressor
4q35.2	<i>FRG1</i>	FSHD region gene 1	7	Transkription
5p15.2	<i>ANKH</i>	ankylosis, progressive homolog	2	Knochenentwicklung
5q21.3	<i>EFNA5</i>	ephrin-A5	2	Tumorgenese/Tumorprogression
5q34	<i>ODZ2</i>	odz, odd Oz/ten-m homolog 2	4	Tumorgenese/Tumorprogression
6p21.2	<i>GLO1</i>	glyoxalase I	2	Stressantwort
6p21.31	<i>SCUBE3</i>	signal peptide, CUB domain, EGF-like 3	2	Knochenentwicklung
6p25.3	<i>IRF4</i>	interferon regulatory factor 4	6	Tumorgenese/Tumorprogression
6q27	<i>PCD2</i>	programmed cell death 2	5	Apoptose
7p14.3	<i>BBS9</i>	Bardet-Biedl syndrome 9	4	Knochenentwicklung
7q21.3	<i>LMTK2</i>	lemur tyrosine kinase 2	3	Wachstum und Proliferation
8p21.3	<i>TNFRSF10B</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	2	Tumorgenese/Tumorprogression
8p22	<i>PSD3</i>	pleckstrin and Sec7 domain containing 3	2	Metastasierung
8p23.2	<i>CSMD1</i>	CUB and Sushi multiple domains 1	6	Metastasierung
8q13.2	<i>CSPP1</i>	centrosome and spindle pole associated protein 1	3	Centrosomen/Spindel
8q24.11	<i>RAD21</i>	RAD21 homolog	2	Centrosomen/Spindel
9p21.3	<i>MTAP</i>	methylthioadenosine phosphorylase	4	Tumorgenese/Tumorprogression
9p23	<i>PTPRD</i>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, D	6	Wachstum und Proliferation
9q33.1	<i>PAPPA</i>	pregnancy-associated plasma protein A, pappalysin 1	2	Knochenentwicklung
10q11.21	<i>CXCL12</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)	2	Metastasierung
10q23.1	<i>NRG3</i>	neuregulin 3	3	Tumorgenese/Tumorprogression
11p13	<i>WT1</i>	Wilms tumor 1	2	Tumorsuppressor
11p15.4	<i>PHLDA2</i>	pleckstrin homology-like domain, family A, member 2	7	Tumorsuppressor
11p15.4	<i>NAP1L4</i>	nucleosome assembly protein 1-like 4	2	Tumorsuppressor

Chromosom	Gensymbol	Genname	Anzahl Brüche	Gruppe
11q12.1	<i>AGTRL1</i>	apelin receptor	2	Angiogenese
11q22.2	<i>BIRC2</i>	baculoviral IAP repeat-containing 2	2	Angiogenese
11q23.2	<i>CADM1</i>	cell adhesion molecule 1	3	Tumorsuppressor
12p11.21	<i>PKP2</i>	plakophilin 2	2	Tumorgenese/Tumorprogression
12q23.1	<i>NEDD1</i>	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 1	2	Centrosomen/Spindel
13q12.11	<i>CRYL1</i>	crystallin, lambda 1	3	Tumorgenese/Tumorprogression
13q14.2	<i>RB1</i>	retinoblastoma 1	3	Tumorsuppressor
13q34	<i>TFDP1</i>	transcription factor Dp-1	3	Transkription
14q23.1	<i>PPM1A</i>	protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1A	2	Stressantwort
14q32.33	<i>MTA1</i>	metastasis associated 1	3	Metastasierung
15q15.1	<i>BMF</i>	Bcl2 modifying factor	3	Apoptose
15q24.2	<i>NRG4</i>	neuregulin 4	2	Tumorgenese/Tumorprogression
15q26.3	<i>MEF2A</i>	myocyte enhancer factor 2A	4	Apoptose
16q22.2	<i>MTSS1L</i>	metastasis suppressor 1-like	3	Metastasierung
16q23.1	<i>WWOX</i>	WW domain containing oxidoreductase	2	Tumorsuppressor
16q24.3	<i>GAS8</i>	growth arrest-specific 8	2	Tumorsuppressor
17p13.1	<i>TP53</i>	tumor protein p53	6	Tumorsuppressor
17p13.2	<i>XAF1</i>	XIAP associated factor 1	3	Apoptose
17q21.31	<i>MPP2</i>	membrane protein, palmitoylated 2	2	Signaltransduktion
18q11.1	<i>ROCK1</i>	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1	2	Tumorgenese/Tumorprogression
19p13.3	<i>BSG</i>	Basigin	2	Tumorgenese/Tumorprogression
19q13.31	<i>XRCC1</i>	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1	3	DNA-Reparatur
19q13.33	<i>KLK13</i>	kallikrein-related peptidase 13	2	Tumorgenese/Tumorprogression
19q13.33	<i>KLK14</i>	kallikrein-related peptidase 14	2	Tumorgenese/Tumorprogression
20p13	<i>ADRA1D</i>	adrenergic, alpha-1D-, receptor	2	Wachstum und Proliferation
20q11.21	<i>PDRG1</i>	p53 and DNA-damage regulated 1	2	p53 Pathway
21q22.12	<i>MORC3</i>	MORC family CW-type zinc finger 3	2	p53 Pathway
22q12.2	<i>EWSR1</i>	Ewing sarcoma breakpoint region 1	2	Transkription
22q12.3	<i>MCM5</i>	minichromosome maintenance complex component 5	3	Zellzyklusregulation

4.6 Rekurrente Zugewinne und Verluste

Bei der Analyse der aCGH-Karyotypen (siehe Anhang Tabelle 1) zeigte sich eine Gesamtzahl von 2072 Zugewinnen und 1712 Verlusten chromosomalen Materials bei einer Auflösung von 368 bphs. Ebenfalls zeigte sich, dass nahezu alle Chromosomenbanden von genomischen Imbalancen betroffen waren (Abbildung 4.27). Die großen Bereiche, wie Ganzarmverluste oder -Zugewinne stimmten mit denen der SKY-Analyse überein.

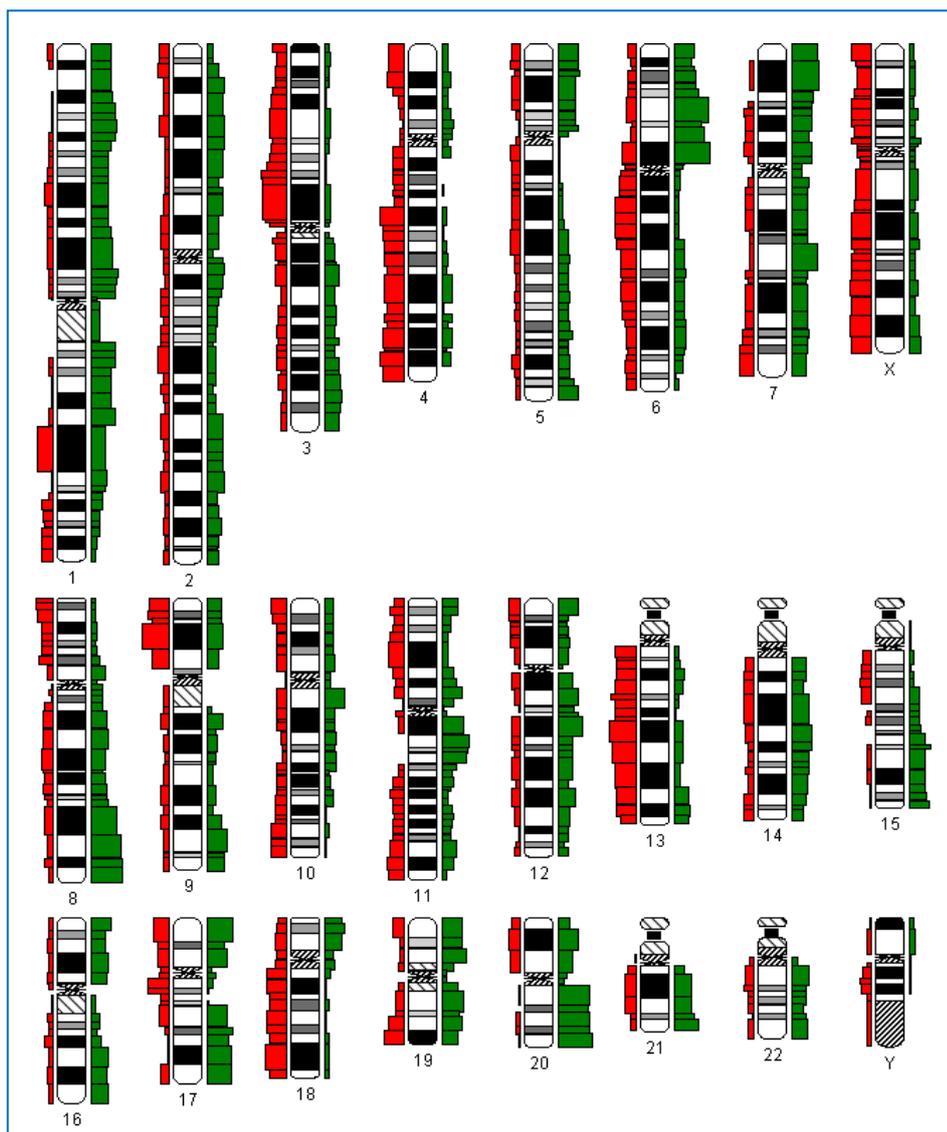


Abbildung 4.27: Verteilung der Netto-Zugewinne und -Verluste chromosomalen Materials der Zelllinien auf Basis des aCGH-Karyotyps, bezogen auf eine Auflösung von 550 bphs. Die Zugewinne sind in grün dargestellt und die Verluste in rot. Die Höhe der Balken zeigt die Häufigkeit der Ereignisse an.

Zusätzlich konnten über die 'CyDAS'-Analyse kleine Zugewinne von chromosomalem Material besonders der Chromosomenbanden 6p21-6p12, 8q24, 19q13 und 20q13 detektiert werden. Verluste traten gehäuft in den Chromosomenbanden 3p14, 9p21, 13q14-13q21, 17q11, 18q11 und 19q13 auf. Beim Vergleich der aCGH-Daten der Zelllinien untereinander im sogenannten 'penetrance plot', einer kumulativen Darstellung der Zugewinne und Verluste, fielen einige Bereiche mit Zugewinnen von chromosomalem Material besonders auf (Abbildung 4.28). Die Ansicht der Aberrationen auf diese Weise ermöglicht auch die Detektion rekurrenter kleiner Aberrationen, da hier eine höhere Auflösung als bei der höchsten Auflösung von 'CyDAS' mit 550-Banden erreicht wird. Die 'penetrance plots' für die einzelnen Chromosomen können im Anhang (Abbildungen 1-24) eingesehen werden. Bei der Analyse zeigte sich, dass die Regionen 1p34.1, 1p13.3, 6p21.2, 6p12.2, 7q22.2, 8q24.3, 11q13.1, 17p11.2 und 19p13.12 in 60-75% der Zelllinien von Zugewinnen betroffen waren. Bei den Chromosomenbanden 3p14.1, 4q22.1, 6q14.3, 7q35, 9p21.3, 13q21.33 und 17q12 kam es in 60-75% der Zelllinien zu Verlusten. Die nachfolgenden Abschnitte zeigen die Ergebnisse der Analysen von Regionen, die bei vielen Zelllinien von Zugewinnen oder Verlusten betroffen waren oder die sich durch besonders hohe \log_2 ratios auszeichneten.

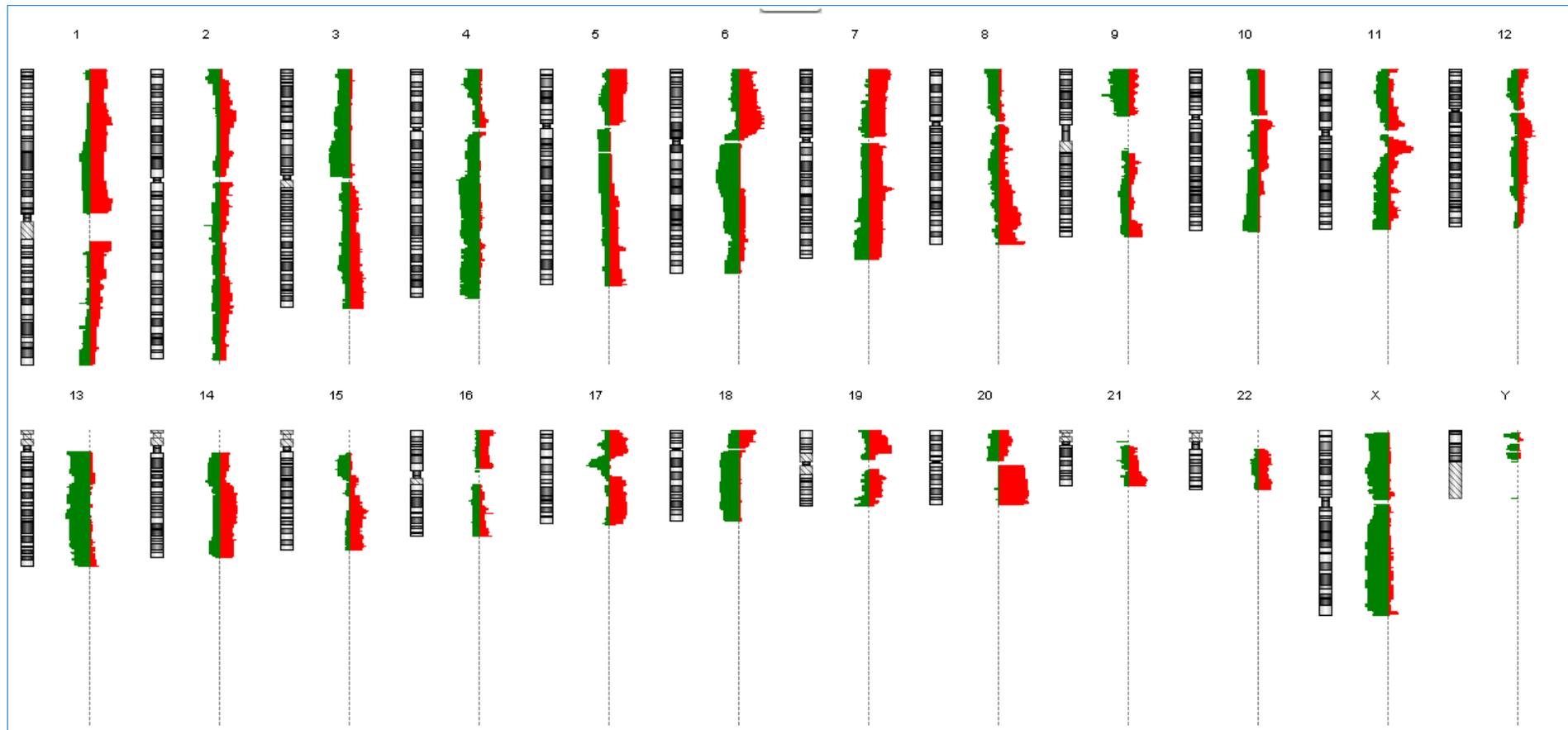


Abbildung 4.28: Verteilung der Zugewinne und Verluste chromosomalen Materials aller 19 Zelllinien nach aCGH-Analyse dargestellt als 'penetrance plot' der einzelnen Chromosomen. Diese Ansicht ermöglicht auch die Darstellung kleiner Aberrationen, die in der größeren Bandenansicht des Programms 'CyDAS' nicht möglich ist. Die Zugewinne sind in rot und die Verluste in dargestellt. Die Höhe der Balken gibt den prozentualen Anteil der Zugewinne oder Verluste der Chromosomenregionen bezogen auf alle Zelllinien an.

4.6.1 6p-Zugewinne

Im chromosomalen Bereich 6p21.33-6p12.1 konnte bei 16 Zelllinien eine Duplikation oder Amplifikation chromosomalen Materials mittels aCGH detektiert werden. Unter Berücksichtigung der Verwandtschaft der Zelllinien HOS und MNNG-HOS musste die endgültige Zahl der Zelllinien mit Zugewinn von chromosomalem Material der Region 6p21.33-6p12.1 auf 15/19 korrigiert werden, somit waren 79% der untersuchten Zelllinien betroffen. Zum Teil war der gesamte Bereich 6p21.33-6p12.1 vermehrt vorhanden oder aber kleine Regionen, die nur 72 kb groß waren. Die Bande 6p12 war in 7 Zelllinien vermehrt, hierbei wurden Aberrationen gefunden die zwischen 3 und 113 Oligonukleotidproben betrafen und eine Größe von 83,5 kb bis hin zu 10,6 Mb hatten. Die medianen \log_2 ratios reichten von 0,21 bis 1,80. In 15 Zelllinien konnte eine Vermehrung der Bande 6p21 identifiziert werden, der Zugewinn erstreckte sich über 3 bis 238 Oligonukleotide und hatte eine Größe von 72,1 kb bis 12,3 Mb. Die mittleren \log_2 ratios waren wesentlich höher, als die für den Bereich 6p12 und wiesen Werte von 0,26 bis 3,37 auf. Zur genaueren Analyse der Zugewinne wurden zwei verschiedene FISH-Sonden für den in allen betroffenen Zelllinien vermehrten Bereich 6p21.1 verwendet. Hierbei handelt es sich um die BAC-Sonden RP11-720D9 für das Gen *CCND3* und RP11-152M23 für das Gen *CDC5L*. Die Analyse zeigte für 12 Zelllinien einfache Duplikationen in dem Bereich, bei einer Zelllinie wurde eine leiterförmige Anordnung der Duplikation beobachtet und bei zwei Zelllinien konnten hochgradige intrachromosomale Amplifikationen gezeigt werden (Tabelle 4.10). Für die Zelllinien OS09 (Abbildung 4.29), TPXM (Abbildung 4.30) und MG63 (Abbildung 4.31) wird die Bestätigung der Vermehrung des Bereichs 6p21.1 in den nachfolgenden Abbildungen gezeigt.

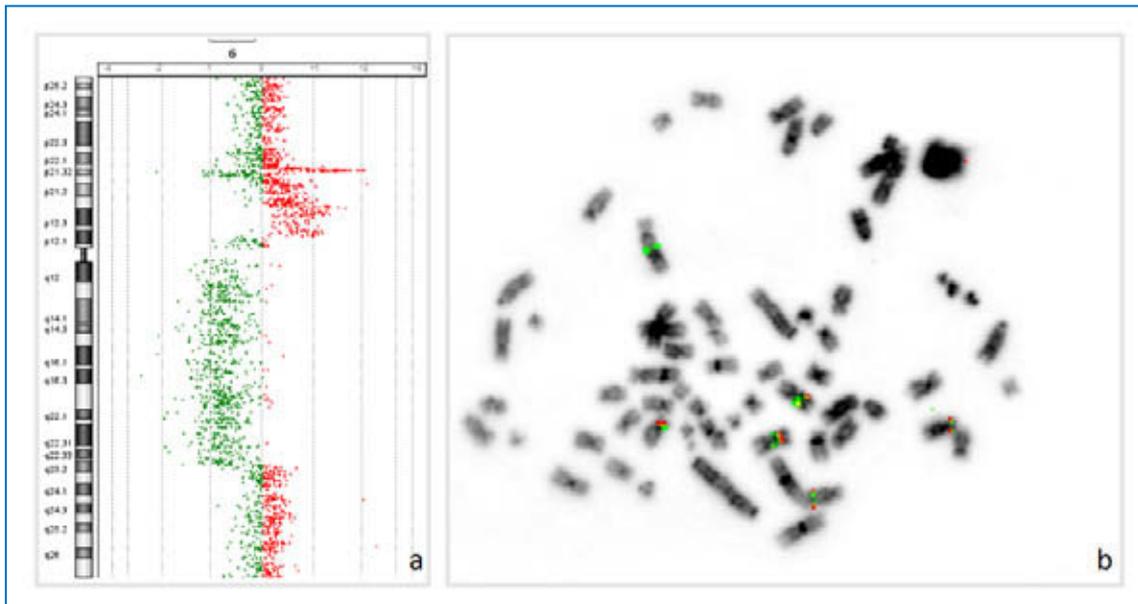


Abbildung 4.29: 6p-Zugewinn der Zelllinie OS09. a) aCGH-Profil mit Zugewinn von Chromosom 6p. b) Metaphase nach FISH mit den BAC-Sonden RP11-720D9 (*CCND3*, rot) und RP11-152M23 (*CDC5L*, grün) aus der Region 6p21.1. Die Signale der Sonde für *CCND3* sind auf 5 und die für *CDC5L* auf 6 unterschiedlichen Chromosomen vorhanden.

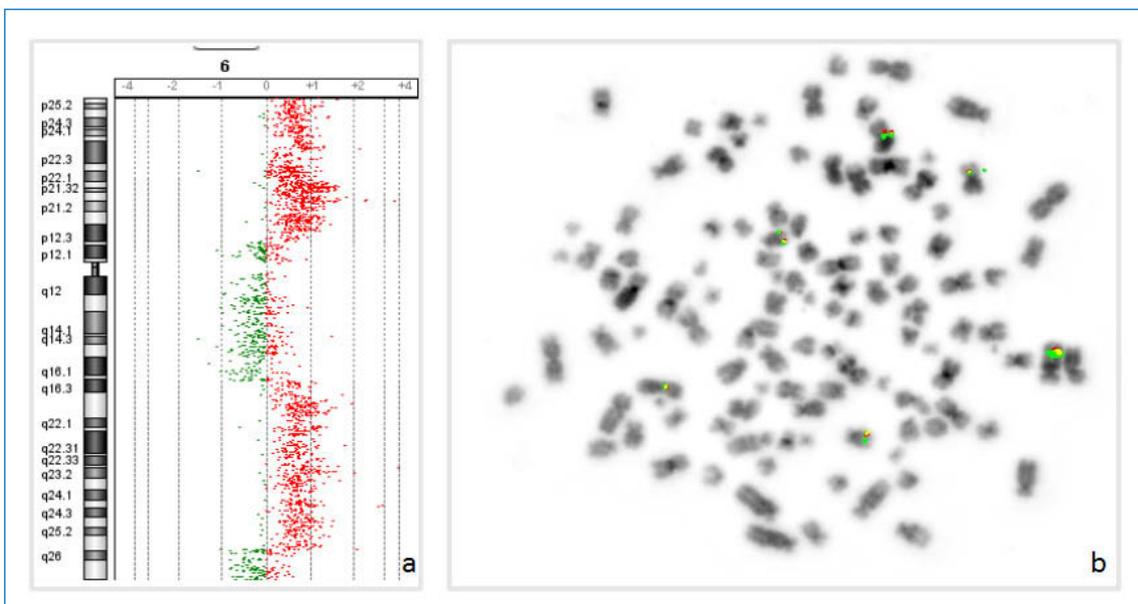


Abbildung 4.30: 6p-Zugewinn der Zelllinie TPXM. a) aCGH-Profil mit Zugewinn von Chromosom 6p. b) Metaphase nach FISH mit den BAC-Sonden RP11-720D9 (*CCND3*, rot) und RP11-152M23 (*CDC5L*, grün) aus der Region 6p21.1. Die Signale der Sonden sind auf insgesamt 6 verschiedenen Chromosomen vorhanden.

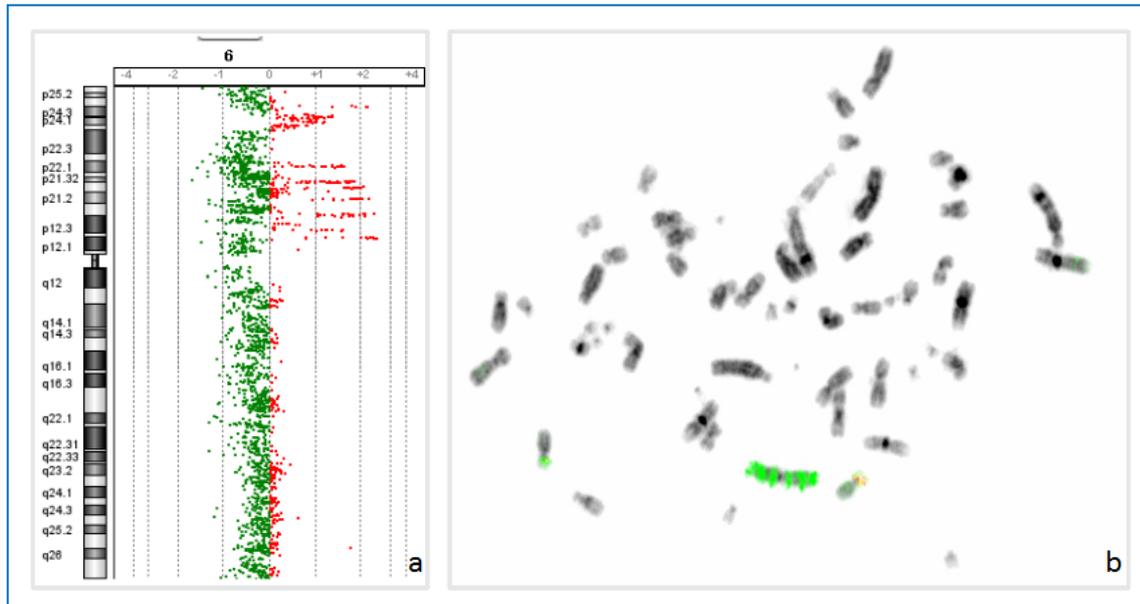


Abbildung 4.31: 6p-Zugewinn der Zelllinie MG63. a) aCGH-Profil mit Zugewinn von Chromosom 6p. b) Metaphase nach FISH mit den BAC-Sonden RP11-720D9 (*CCND3*, rot) und RP11-152M23 (*CDC5L*, grün) aus der Region 6p21.1. Für das Gen *CDCL5* liegen zusätzlich zu den zwei Signalen auf den Chromosomen 6, mindestens sechs Signale in leitertypischer Anordnung auf einem derivativen Chromosom vor. Für das Gen *CCND3* sind 2 Signale vorhanden.

4.6.2 12q-Zugewinne

In bis zu 11 Zelllinien konnte eine Vermehrung chromosomalen Materials im Bereich der Banden 12q13-12q15 identifiziert werden. Der Bereich 12q13.3-12q14 war bei 11 Zelllinien betroffen (58%) und der Bereich 12q15 bei 8 Zelllinien (42%). Die Aberrationen im Bereich 12q13.3-12q14 zeichneten sich durch besonders hohe \log_2 -ratios aus, die von 0,20 bis hin zu 36,7 reichten. Es waren 3 bis 485 Oligonukleotide betroffen und die Größe der Aberrationen lag zwischen 5,0 kb und 18,8 Mb. Die Zugewinne wurden mittels FISH-Analysen überprüft. Hierzu wurden die BAC-Sonden RP11-181L23 für den Bereich 12q13.3 und RP11-66N19 für die Bande 12q14 verwendet. In diesen Bereichen liegen viele Gene, wie zum Beispiel: *GLI1*, *MARS*, *DDIT3*, *DTX3*, *OS9*, *CENTG1*, *TSPAN31*, *CDK4*, *MDM2*, *AVIL* und *HMG2A*. Besonders auffällig war der Zugewinn von 12q bei der Zelllinie OSA. Bei der SKY-Analyse wurde das Chromosom 12 als unauffällig eingestuft, in der aCGH-Analyse zeigte sich jedoch ein enormer Zugewinn der Region 12q13.3-12q14. Die Bestätigung dieser Aberration mittels FISH-Analyse zeigte multiple Signale auf einem derivativen Chromosom, das laut SKY-Analyse aus dem langen Arm des Chromosoms 4 und fast dem kompletten Chromosom 7 bestehen sollte.

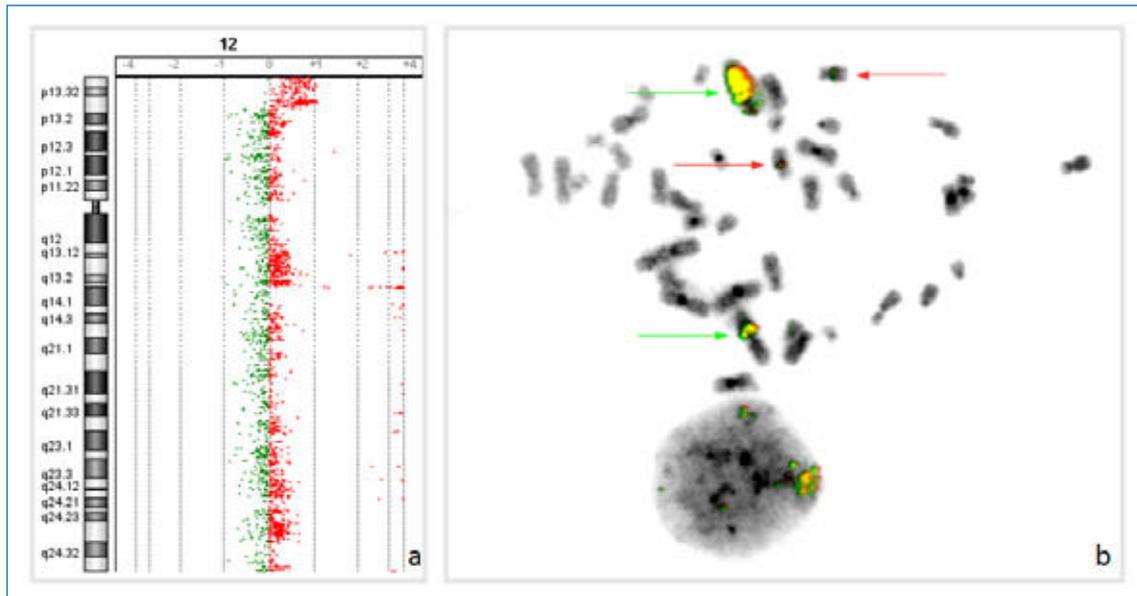


Abbildung 4.32: 12q-Zugewinn der Zelllinie OSA. a) aCGH-Profil mit Zugewinn von Chromosom 12q. b) Metaphase nach FISH mit den BAC-Sonden RP11-66N19 (rot) und RP11-181L23 (grün). Der Bereich 12q13.3-12q14 ist auf beiden normalen Chromosomen 12 vorhanden (rote Pfeile), zusätzlich konnte ein erheblicher Zugewinn für beide Sonden auf dem derivativem Chromosom 4 und dem derivativen Chromosom 5 detektiert werden (grüne Pfeile).

Um zu überprüfen, aus welchem Material das derivative Chromosom besteht, wurde eine Mikrodisektion des Chromosoms vorgenommen. Nach Amplifikation und Markierung (Abschnitt 3.4.2.3) der mikrodisektierten chromosomalen DNA wurde eine reverse FISH (rFISH) durchgeführt. Hierbei wurde die DNA des mikrodisektierten Chromosoms mit den Chromosomen einer gesunden Testperson hybridisiert. Es zeigten sich nur Signale auf dem kurzen Arm von Chromosom 4 und auf dem langen Arm von Chromosom 12. Keine weiteren Chromosomen wiesen Signale der reversen Sonde auf. Dies könnte bedeuten, dass das derivative Chromosom nur aus amplifiziertem Material von Chromosom 4p und 12q besteht (Abbildung 4.33 a).

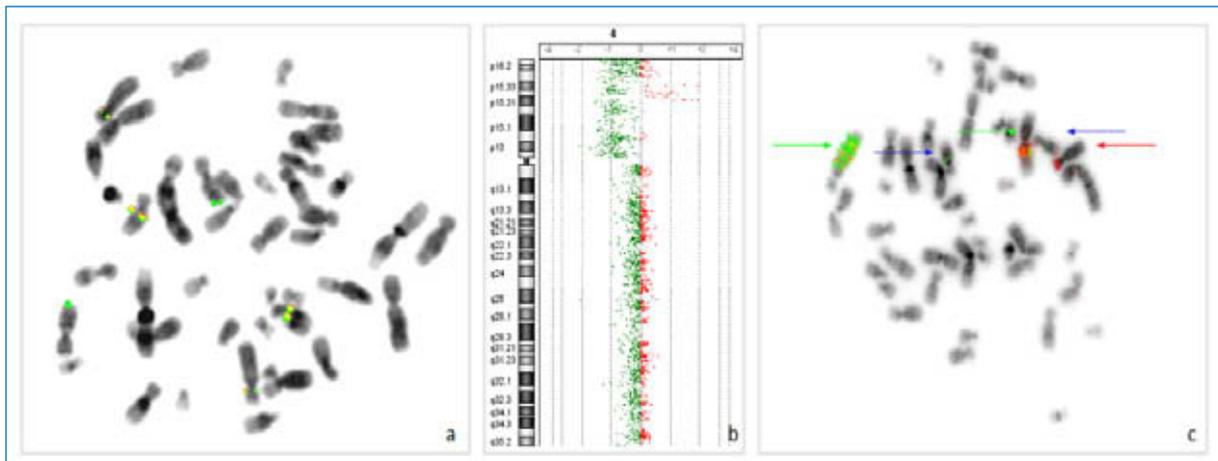


Abbildung 4.33: 12q- und 4p-Zugewinn der Zelllinie OSA. a) Hybridisierung der DNA des mikrodisektierten derivativen Chromosoms mit Normalchromosomen. Die Kontrollsonden für 4p14 (RP11-395I6), 7qter (GS-3K-23) und 12q13.3 (RP11-181L23) sind in grün markiert. Die DNA des mikrodisektierten Chromosoms wurde rot markiert. Die Sonde des derivativen Chromosoms erbrachte Signale auf 4p und 12q, nicht aber auf 7q. b) aCGH-Profil mit Zugewinn von Chromosom 4p. c) Metaphase der Zelllinie OSA nach FISH mit den BAC-Sonden RP11-282C14 (grün, 4p15.31) und RP11-66N19 (rot, 12q14). Der Bereich 4p ist auf einem normalen Chromosomen 4 vorhanden (roter Pfeil), zusätzlich konnte ein erheblicher Zugewinn von 4p15.31 auf dem derivativem Chromosom 4, welches sich aus 4p und 12q zusammensetzt und dem derivativen Chromosom 5 detektiert werden (grüne Pfeile). Die normalen Chromosomen 12 sind durch blaue Pfeile gekennzeichnet.

Um den amplifizierten Bereich von 4p genauer einzugrenzen wurden die aCGH-Daten auf Amplifikationen überprüft. Hier zeigte sich ein Zugewinn der Region 4p15.33-4p15.31 (Abbildung 4.33 b). Die Aberration wurde mittels FISH-Analyse mit der BAC-Sonde RP11-282C14, die in dem Bereich 4p15.31 bindet, bestätigt. Es zeigte sich, dass das derivative Chromosom nur aus amplifiziertem Material der Regionen 4p15.33-4p15.31 und 12q13.3-12q14 bestehen könnte (Abbildung 4.33 c). Um die genaue Zusammensetzung des Chromosoms zu identifizieren, müsste das Chromosom sequenziert, oder auf einen hochauflösenden Oligonukleotidarray hybridisiert werden.

Die detaillierten Ergebnisse der Bestätigung der Zugewinne von 12q13.3 und 12q14 aller Zelllinien befinden sich in Tabelle 4.10. Die Zugewinne präsentierten sich in sieben Zelllinien als einfache Duplikationen und bei vier Zelllinien als hochgradige intrachromosomale Amplifikation.

4.6.3 17p-Zugewinne

Auf Chromosom 17 konnten im Bereich der Chromosomenbanden 17p13.3-17p11.2 Zugewinne chromosomalen Materials in 15 Zelllinien detektiert werden. Der häufigste betroffene Bereich konnte auf die Region 17p12-p11.2 eingegrenzt werden, die bei 12 Zelllinien einen Zugewinn zeigte. Nimmt man die Tochterzelllinien der Zelllinie HOS aus diesem Resultat heraus, so ergibt sich eine finale Anzahl von 10 Zelllinien (53%), bei denen eine Vermehrung von Material der Chromosomenbanden 17p12-17p11.2 vorliegt. Bei 4 bis 590 Oligonukleotiden wurde eine Aberration angezeigt, wobei die Größen der Imbalancen von 40,0 kb bis zu 20,4 Mb reichten. Die medianen \log_2 ratios hatten Werte von 0,24 bis 1,79. Die Veränderungen wurden mittels FISH-Analysen mit den BAC-Sonden RP11-136M15 für das Gen *PMP22* (17p12) und RP11-48J10 für das Gen *MAPK7* (17p11.2) begutachtet. In Abbildung 4.34 wird die Vermehrung von chromosomalem Material des Bereichs 17p12 und 17p11.2 bei der Zelllinie OS10 vorgestellt. Abbildung 4.35 zeigt die Ergebnisse der aCGH und die Bestätigung der Vermehrung mittels FISH-Analyse bei der Zelllinie ZK58 und Abbildung 4.36 zeigt die leiterförmig angeordnete Verteilung des zugewonnenen Materials bei der Zelllinie OHS.

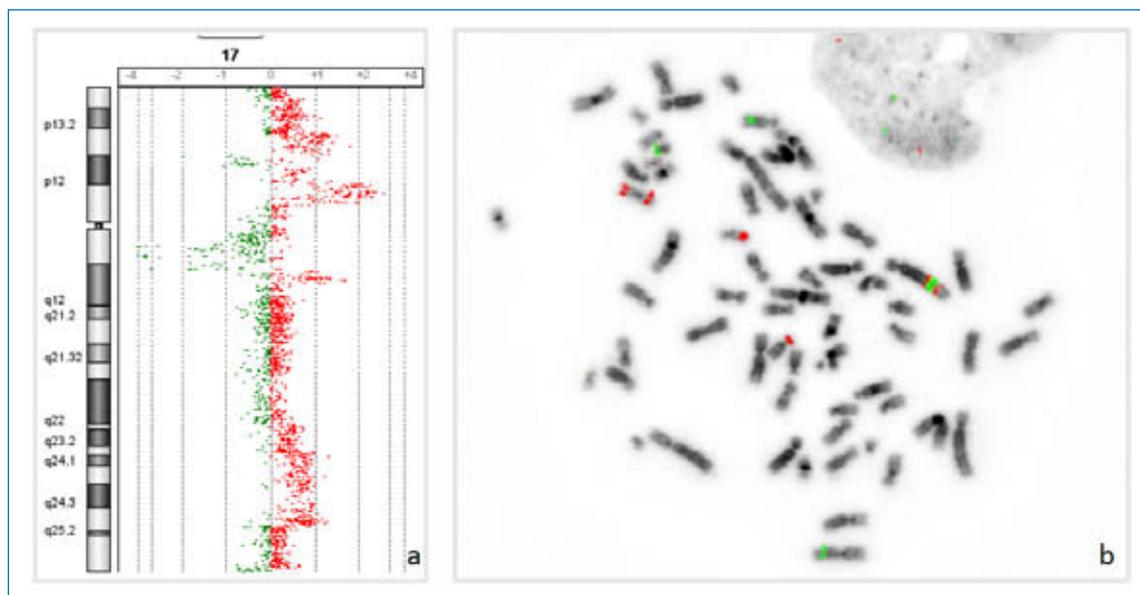


Abbildung 4.34: 17p-Zugewinn der Zelllinie OS10. a) aCGH-Profil mit Zugewinn von Chromosom 17p. b) Metaphase nach FISH mit den BAC-Sonden RP11-136M15 (*PMP22*, grün) und RP11-48J10 (*MAPK7*, rot). Die Signale der Sonde für *PMP22* sind 3 unterschiedlichen Chromosomen vorhanden, auf einem Chromosomen. Die Signale für das Gen *MAPK7* sind auf 4 unterschiedlichen Chromosomen vorhanden, wobei 2 Chromosomen 2 Signale für das Gen aufweisen.

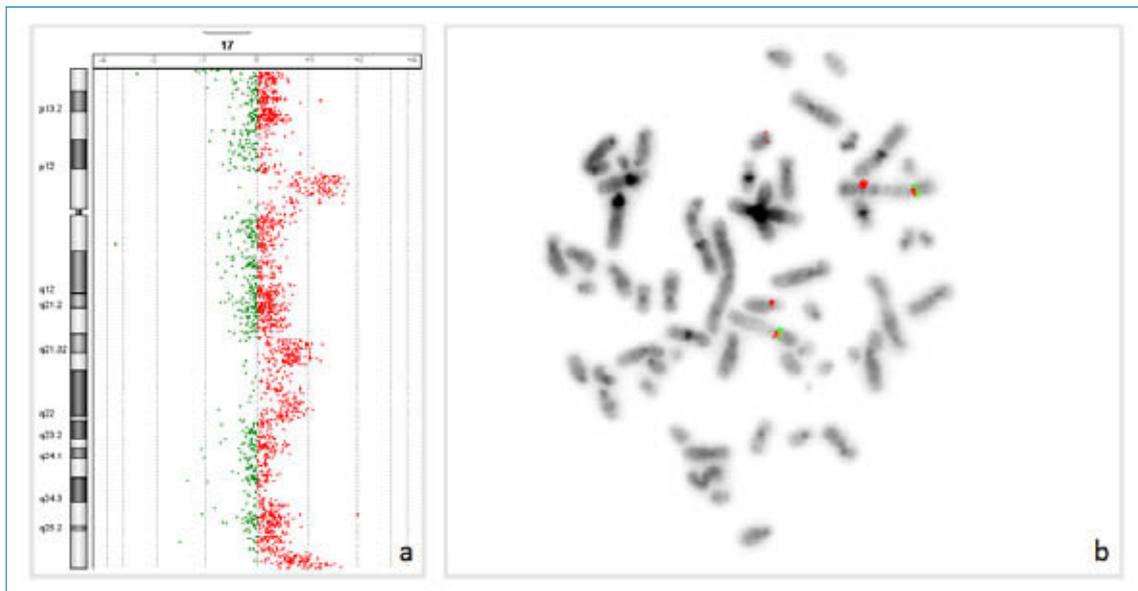


Abbildung 4.35: 17p-Zugewinn der Zelllinie ZK-58. a) aCGH-Profil mit Zugewinn von Chromosom 17p. b) Metaphase nach FISH mit den BAC-Sonden RP11-136M15 (*PMP22*, grün) und RP11-48J10 (*MAPK7*, rot). Die Signale der Sonde für *PMP22* sind auf 2 unterschiedlichen Chromosomen vorhanden. Die Signale für das Gen *MAPK7* sind auf 4 unterschiedlichen Chromosomen vorhanden, wobei 1 Chromosom 2 Signale für das Gen aufweist.

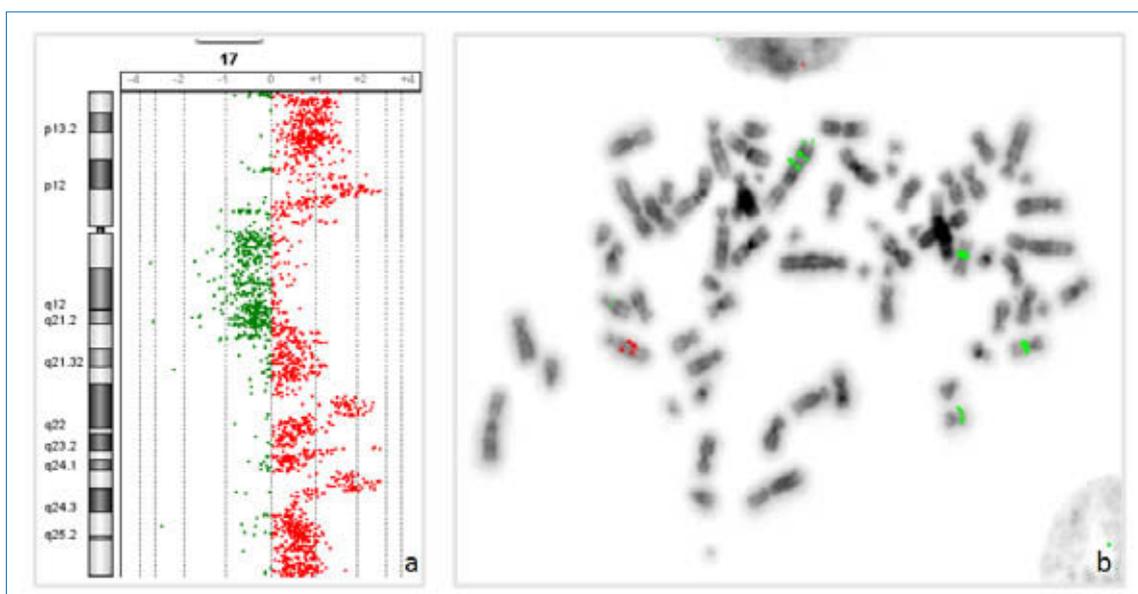


Abbildung 4.36: 17p-Zugewinn der Zelllinie OHS. a) aCGH-Profil mit Zugewinn von Chromosom 17p. b) Metaphase nach FISH mit den BAC-Sonden RP11-136M15 (*PMP22*, grün) und RP11-48J10 (*MAPK7*, rot). Die Signale der Sonde für *PMP22* sind auf 5 unterschiedlichen Chromosomen vorhanden, außerdem zeigte sich eine leitförmige angeordnete Anordnung der Signale auf einem Chromosom. Die Signale für das Gen *MAPK7* sind leitförmig als intrachromosomale Duplikation auf einem Chromosom angeordnet.

Die Zugewinne im Bereich 17p präsentierten sich in 9 Zelllinien als einfache Duplikationen chromosomalen Materials mit einem Zugewinn von einer bis fünf zusätzlichen Kopien. Lediglich bei der Zelllinie OS15 lag zytogenetisch eine 'homogeneously staining region' vor. Bei der Zelllinie OHS und zeigte sich eine leiterförmig angeordnete Vermehrung sowohl von dem Gen *MAPK7*, als auch des Gens *PMP22* auf verschiedenen Chromosomen. Insgesamt wurde bei fünf Zelllinien eine Verlagerung der einzelnen Gene auf verschiedene Chromosomen beobachtet. Dies spricht für einen Translokationsbruchpunkt zwischen den Genen. Der Abstand zwischen den Genen beträgt 4,1 Mb. Eine genaue Abgrenzung der Bruchpunkte und somit die Überprüfung auf einen rekurrenten Bruchpunkt war mit den hier benutzten Arrays mit einer Auflösung von 43 kb nicht möglich. Für diese Region würde sich ein sogenannter 'custom'-Array zur weiterführenden Analyse eignen. Hierbei können die Oligonukleotide aus einer Datenbank selbst gewählt und eine Auflösung zwischen 200 bp und 2 kb erreicht werden.

Die Ergebnisse von allen FISH-Analysen für den Zugewinn der chromosomalen Region 17p11.2 bis 17p12 findet sich in Tabelle 4.10.

Die hier beschriebenen über die aCGH detektierten potentiellen Zugewinne chromosomalen Materials konnten alle mittels FISH-Analysen mit den hier eingesetzten BAC-Sonden bestätigt werden. Es konnten einfache Duplikationen, aber auch 'homogeneously staining regions' beobachtet werden. Bei den Chromosomen 6 und 17 zeigten sich Vermehrungen hauptsächlich als einfache Duplikationen bis hin zu einem 5-fachen Zugewinn der Chromosomenregionen. Die 12q-Zugewinne präsentierten sich in 4 von 11 Fällen als intrachromosomale Amplifikate mit multiplen Kopien, die 6p-Zugewinne in 2 von 15 Zelllinien und bei den 17p-Zugewinnen nur in einer von 10 Zelllinien. Bei den 17p-Zugewinnen konnte rekurrent eine Aufteilung der Signale für die Sonden auf verschiedene Chromosomen beobachtet werden, was auf ein Bruchereignis und Translokationen dieser Region hindeutet.

Tabelle 4.10: 6p-, 12q- und 17p-Zugewinne. Aufgelistet sind die bei der aCGH ermittelten medianen \log_2 ratios für die einzelnen Regionen und die dazugehörigen Ergebnisse der FISH-Analyse. Alle erwarteten Zugewinne konnten bestätigt werden. Die Zugewinne sind in rot dargestellt, die Verluste in grün und die Bereiche mit neutraler Kopienzahl in schwarz. n.a.=nicht analysiert, amp=amplifiziert.

Zelllinie	6p21.1 CCND3 log ₂ ratio	6p21.1 RP11- 720D9	6p21.1 CDC5L log ₂ ratio	6p21.1 RP11- 152M23	12q13.3 GLI1,DDIT3 log ₂ ratio	12q13.3 RP11- 181L23	12q14 TSPAN31,CDK4 log ₂ ratio	12q14 RP11- 66N19	17p12 PMP22 log ₂ ratio	17p12 RP11- 136M15	17p11.2 MAPK7 log ₂ ratio	17p11.2 RP11- 48J10
143b	~0	3	~0	3	~0	n.a.	~0	n.a.	0,553	5	0,870	5
HAL	1,189	5/6	2,089	8-10	3,171	amp	4,013	amp	-0,368	n.a.	~0	n.a.
HOS	0,687	3	0,495	3	0,585	2-3	0,551	2-3	0,972	3	1,295	3
KPD	2,757	amp	2,862	amp	3,834	amp	4,521	amp	~0	n.a.	~0	n.a.
MG63	-0,541	2	1,727	8	~0	n.a.	~0	n.a.	-0,575	1	-0,365	1
MHM	0,546	4	0,268	4	3,008	amp	4,663	amp	~0	n.a.	~0	n.a.
MNNG- HOS	0,438	4	0,583	4	~0	n.a.	~0	n.a.	0,546	3/4	0,656	3/4
MOS	1,152	4	0,454	4	~0	n.a.	~0	n.a.	-0,592	n.a.	-0,473	n.a.
OHS	0,583	5	0,775	5	~0	n.a.	~0	n.a.	1,603	6-8	~0	2/3
OS09	0,477	5	1,030	6	~0	n.a.	~0	n.a.	0,880	6	2,260	7
OS10	0,481	4	0,508	4	~0	n.a.	~0	n.a.	0,593	3-5	0,875	3-5
OS14	0,886	5	0,442	5	1,649	8	1,755	8	1,851	8	1,781	8
OS15	1,186	amp	1,501	amp	0,668	6-7	0,784	6-7	1,634	amp	1,874	amp
OS18	1,053	5-7	0,830	5-7	1,387	5-7	2,398	5-7	1,673	5-6	1,739	5-6
OSA	~0	n.a.	~0	n.a.	4,769	amp	4,635	amp	~0	n.a.	~0	n.a.
OST	0,783	4	-0,851	2	~0	n.a.	~0	n.a.	~0	n.a.	~0	n.a.
SAOS2	~0	n.a.	~0	n.a.	0,746	4	0,964	4	~0	n.a.	~0	n.a.
SARG	0,482	3-5	1,420	6/7	0,451	4-5	1,798	9	1,038	8	1,015	8
TPXM	1,133	6-7	0,981	6-7	~0	n.a.	~0	n.a.	1,253	7	~0	4
U-2OS	~0	n.a.	~0	n.a.	~0	n.a.	~0	n.a.	-0,846	n.a.	~0	n.a.
ZK-58	~0	n.a.	~0	n.a.	0,913	4-5	1,160	5-6	~0	2-3	1,718	4-5

4.6.4 3q-Verluste

In der aCGH fielen bei sieben Zelllinien eine partielle und bei drei Zelllinien komplette Deletionen des Gens *LSAMP* ('limbic system-associated membrane protein'), welches auf Chromosom 3q13.31 (117.001.832-117.647.068 bp) lokalisiert ist, auf (Tabelle 4.11). Bei der partiellen Deletion handelt es sich um das 5'-Ende des *LSAMP*-Gens. Von insgesamt fünf Oligonukleotiden, die für das Gen verfügbar sind war in diesen Fällen nur das Oligonukleotid A_14_P122740 deletiert oder es lag eine zusätzliche Deletion des Oligonukleotides A_14_P126332 vor. Die Deletionen konnten mittels FISH mit den BAC-Sonden RP11-663H6 und RP11-402E20 in sieben Zelllinien bestätigt werden. Hierbei handelt es sich um die drei verwandten Zelllinien HOS, 143b und MNNG-HOS, sowie die Zelllinien HAL und OS14, die eine homozygote Deletion des Gens aufwiesen und die Zelllinien OS15 und OST bei denen eine heterozygote Deletion des Gens vorlag. Nimmt man die Tochterzelllinien der Zelllinie HOS heraus, so zeigten letztendlich fünf Zelllinien eine Deletion von *LSAMP*, dies entsprach einem Anteil von 26 %. Die Ein-Oligonukleotid-Deletionen, die über ein \log_2 ratio nahe dem definierten Mindestwert von 0,2 verfügten konnten nicht bestätigt werden.

Tabelle 4.11: Identifizierte *LSAMP*-Deletionen. Angegeben sind der in der aCGH als potentielle Deletion angezeigte Bereich, sowie die betroffenen Oligonukleotide und die Ergebnisse der FISH-Analysen. Die nicht nachweisbaren Deletionen sind in grau hinterlegt, es handelt sich hierbei um Ein-Oligonukleotid-Deletionen.

Zelllinie	Deletion <i>LSAMP</i> aCGH (Lokalisation bp)	Oligonukleotide	FISH
143b	partiell (117.599.603-117.646.822)	2	Homozygote Deletion
HAL	komplett (117.054.109-117.646.822)	5	Homozygote Deletion
HOS	partiell (117.599.603-117.646.822)	2	Homozygote Deletion
MHM	partiell (117.599.603-117.599.662)	1	Normal
MNNG-HOS	partiell (117.599.603-117.646.822)	2	Homozygote Deletion
MOS	partiell (117.599.603-117.599.662)	1	Normal
OHS	partiell (117.599.603-117.599.662)	1	Normal
OS14	komplett (117.054.109-117.646.822)	5	Homozygote Deletion
OS15	komplett (117.054.109-117.646.822)	5	Heterozygote Deletion
OST	komplett (117.054.109-117.646.822)	5	Heterozygote Deletion
ZK58	partiell (117.599.603-117.599.662)	1	Normal

Die partiellen Deletionen von *LSAMP* konnten nur detektiert werden, indem der selbstdefinierte stringente Aberrationsfilter (mind. 3 Oligonukleotide, mind. durchschnittlicher absoluter \log_2 ratio 0,2), mit dem die Ergebnisse der aCGH-Analysen ausgewertet wurden, ausgeschaltet wurde (Abbildung 4.37 a). Es wurde dann auf Auffälligkeiten geachtet, die bei mehreren Zelllinien auftraten.

Problematisch bei dieser Auswertung ist, dass auch viele falsch positive Aberrationen angezeigt werden.

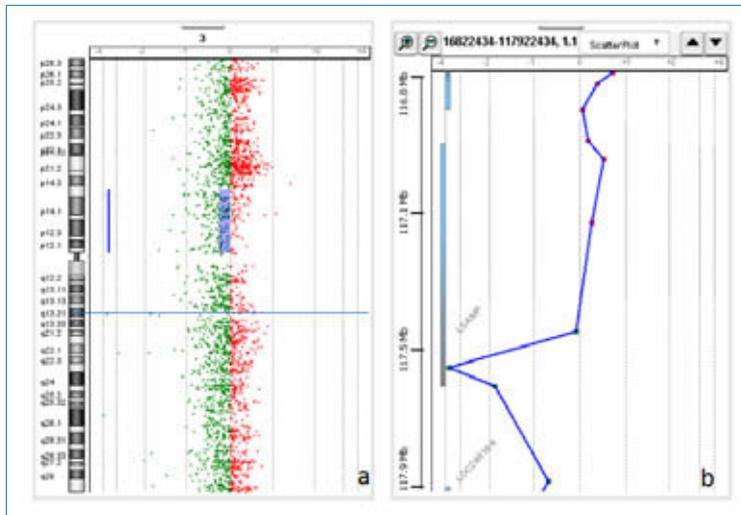


Abbildung 4.37: aCGH-Profil in der Chromosomen- und Gen-Ansicht des Chromosom 3 der Zelllinie HOS. a) Die Deletion in der Region 3q13.31 wird in der Chromosomenansicht mit eingeschaltetem Aberrationsfilter nicht angezeigt (Position blaue horizontale Linie). b) Die detaillierte Ansicht der Region 3q13.31 mit dem Gen *LSAMP* zeigt eine Deletion von zwei Oligonukleotiden, die mittels FISH bestätigt werden konnte.

Die Ergebnisse der FISH-Analysen zeigten, dass bei dieser Deletion mindestens zwei Oligonukleotide in der aCGH betroffen sein mussten, um die Aberration nachweisen zu können (Abbildung 4.37 b).

4.6.5 9p-, 13q- und 17p- Verluste

Bei der Auswertung der aCGH-Daten wurden alle Zelllinien auf Verluste in den bekannten Tumorsuppressorgenen *CDKN2A* (9p21.3), *RB1* (13q14.2) und *p53* (17p13.1) analysiert. Deletionen des Gens *CDKN2A* konnte in 13 von 19 Zelllinien (69%) gefunden werden, wobei sechs (32%) der Zelllinien über eine homozygote Deletion verfügten und sieben (37%) über eine heterozygote Deletion. Für das Gen *RB1* konnte bei 11 der 19 Zelllinien (58%) ein Deletion detektiert werden. Die Zelllinien OS14 verfügte über eine homozygote Deletion, alle anderen Zelllinien hatten eine heterozygote Deletion des Gens. Ein Verlust des Gens *p53* lag bei 5 von 19 Zelllinien vor, was einen Anteil von 26% ausmachte. Interessanterweise waren die Zelllinien meist nur von einem oder zwei der drei Verlustereignisse betroffen, nie aber von allen gleichzeitig (Tabelle 4.12).

Tabelle 4.12: Kopienzahl der Zelllinien für bekannte Tumorsuppressorgene nach aCGH-Analyse. +=Zugewinn, -- =homozygoter Verlust, - =heterozygoter Verlust und norm.=normale Kopienzahl. Die Tochterzelllinien der Zelllinie HOS sind in grau hinterlegt und wurden nicht mit in die Gesamtzahl an detektierten Aberrationen einbezogen.

Zelllinie	9p21.3, <i>CDKN2A</i>	13q14.2, <i>RB1</i>	17p13.1, <i>p53</i>
143b	--	norm.	+
HAL	-	-	norm.
HOS	--	norm.	+
KPD	-	norm.	-
MG63	--	-	norm.
MHM	-	-	norm.
MNNG-HOS	--	norm.	+
MOS	norm.	-	-
OHS	+	+	+
OS09	--	-	norm.
OS10	--	-	+
OS14	+	--	+
OS15	--	-	norm.
OS18	--	norm.	+
OSA	-	norm.	norm.
OST	-	-	norm.
SAOS2	norm.	norm.	-
SARG	-	-	-
TPXM	+	+	+
U-2OS	-	-	-
ZK-58	norm.	norm.	norm.

4.7 Veränderungen des Mitoseapparates

4.7.1 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Bei acht OS-Zelllinien wurden mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung mit anti-Pericentrin und anti- α -Tubulin Centrosomen und Teilungsspindeln auf aberrante Verteilungsmuster untersucht. Die Ergebnisse der Analysen sind in Tabelle 4.13 aufgeführt.

Tabelle 4.13: Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung mit den Antikörpern gegen Pericentrin und α -Tubulin.

Zelllinie	Geclusterte Centrosomen	Numerisch aberrante Centrosomen	Analysierte Spindel	Aberrante Spindel
HOS	-	11%	30	16,6%
MG63	-	7% _n	21	7,8%
MOS	-	-	5	-
OHS	3%	31% _n	4	-
OS15	18%	-	7	28,6%
OS18	23%	13% _n	62	19,4%
OSA	37%	-	52	-
SAOS2	31%	10% _n	61	18%

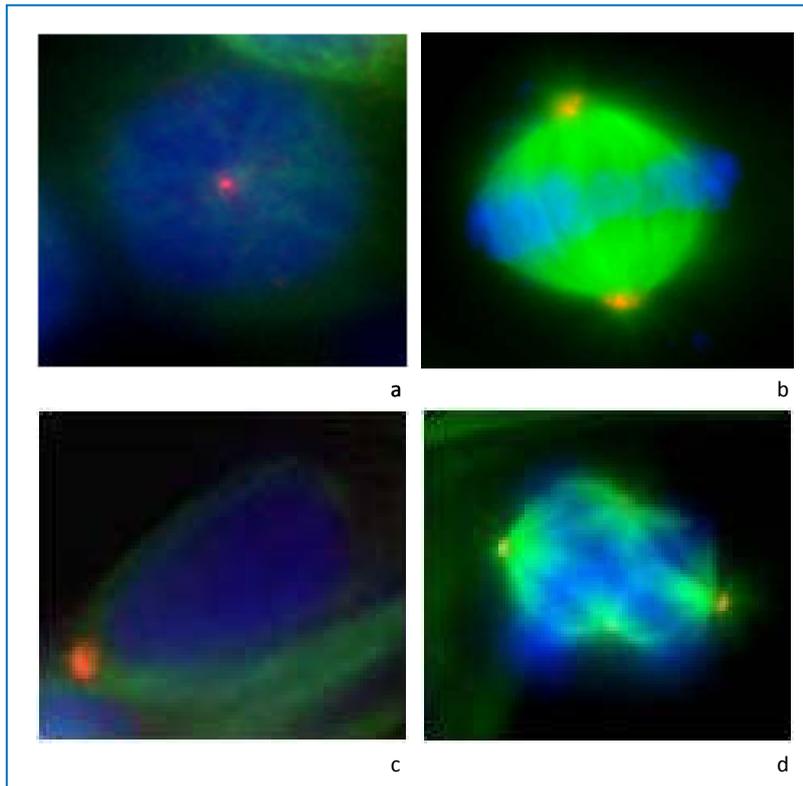


Abbildung 4.38: Immunfluoreszenzfärbung der Zelllinien OSA (a), MG63 (b) und OS18 (c & d). Abbildungen a) und b) zeigen die Centrosomen (Cy3, rot), Abbildungen b) und d) die Spindeln (FITC, grün). Die Zellen wurden mit DAPI gegengefärbt. a) Normales Centrosom der Zelllinie OSA. b) Normale Teilungsspindel der Zelllinie MG63. c) 'clustering' der Centrosomen bei der Zelllinie OS18. d) Multipolare Teilungsspindel der Zelllinie OS18.

Bei fünf Zelllinien konnten numerisch aberrante Chromosomen beobachtet werden. Es lagen keine strukturell aberranten Centrosomen vor. Bei fünf Zelllinien zeigte sich ein 'clustering' der Centrosomen. Des Weiteren konnten in fünf Zelllinien aberrante Spindeln in einem Prozentsatz von bis zu 28,6% detektiert werden. Abbildung 4.38 zeigt die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung bei drei Zelllinien.

5 Diskussion

5.1 Beurteilung der Methodik

5.1.1 SKY

In Rahmen dieser Arbeit wurden 14 Osteosarkomzelllinien mittels kombinierter SKY- und G-Bandenanalyse analysiert. Sie zeigten alle komplexe numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen auf, die nur zum Teil alleine mit Hilfe der Chromosomenbandenanalysen charakterisiert werden konnten. Die spektrale Karyotypisierung erlaubt durch die Darstellung jedes Chromosoms in einer unterschiedlichen Farbe eine detaillierte Analyse von verschiedenen Chromosomenveränderungen, wie Translokationen und Insertionen, sowie die Klassifizierung von Markerchromosomen (Bayani und Squire, 2001). Besonders bei der Analyse solider Tumoren, zum Beispiel beim Ewingsarkom (Carlotti *et al.*, 1999), beim Mammakarzinom (Adeyinka *et al.*, 2000) oder Prostatakarzinom (Beheshti *et al.*, 2000) konnten die komplexen Karyotypveränderungen mittels SKY-Analyse genauer charakterisiert werden. Durch die Verwendung der SKY-Technik war es auch möglich die komplexen Rearrangements beim Osteosarkom genauer zu bestimmen. Als problematisch stellte sich aber die SKY-Analyse von Chromosomen mit hochgradigen Amplifikationen, wie bei einem derivativen Chromosom 12 der Zelllinie OSA heraus. Dieses Chromosom wurde zuerst als Translokationschromosom mit zwei Translokationspartnern klassifiziert. Mittels aCGH- und nachfolgenden FISH-Analysen zur Bestätigung der aCGH-Ergebnisse konnte aber gezeigt werden, dass das Chromosom nur aus Amplifikationen der Chromosomenregionen 4p15.33-4p15.31 und 12q13.3-12q14 bestehen könnte. Zytogenetisch präsentierten sich die Amplifikationen als sogenannte 'homogeneously staining regions' (HSRs), homogen anfärbbare Regionen. Diese Regionen setzen sich aus einer Vervielfachung einzelner Gene zusammen und wirken deshalb bei der Bänderung homogen. Da sich Amplifikate zum Teil aus Genen von unterschiedlichen Chromosomen zusammensetzen, können bei der SKY-Analyse DNA-Sequenzen von unterschiedlichen Chromosomen binden, so dass die Zuordnung der Farbkombinationen zu bestimmten Chromosomen fehlerhaft oder nicht eindeutig ist. In einer Studie konnten Lee und Kollegen zeigen, dass es Limitierungen bei der Chromosomenklassifikation mittels vielfarbiger Karyotypisierung gibt (Lee *et al.*, 2001). Innerhalb dieser Publikation wurden neun verschiedene Fälle vorgestellt, bei denen es zu irreführenden oder falschen Ergebnissen bei der vielfarbigen

Karyotypisierung kam. Obwohl es sich hierbei um unterschiedliche Veränderungen handelte, basierten die Fehler wahrscheinlich auf der gleichen technischen Grundlage. Dieses Phänomen wird als sogenannter 'flaring-Effekt' beschrieben. Hierbei kommt es durch Translokationen oder Verdopplung von chromosomalem Material zu einer Überlappung der Fluoreszenz an den Nahtstellen der Translokationen, so dass die Auswertung des Fluoreszenzsignales hier zu Fehlinterpretationen führt (Lu *et al.*, 2000).

Auf Grund der relativ geringen Auflösung können kleine Insertionen oder Deletionen mittels SKY oder mFISH erst ab einer Größe von etwa 1-2 Mb detektiert werden (Schröck *et al.*, 1996; Fan *et al.*, 2000). Aus diesem Grund konnten Duplikationen (siehe 5.2.6.1, 5.2.6.2, 5.2.6.3) und Deletionen (siehe 5.2.6.4 und 5.2.6.5) von kleinen chromosomalen Bereichen nur mittels aCGH aufgefunden und mit Hilfe der FISH bestätigt werden, die mittels SKY nicht detektiert werden konnten.

In dieser Arbeit zeigte sich bei manchen Zelllinien erst durch die aCGH- und FISH-Analysen, dass einige Chromosomen über die SKY fehlklassifiziert worden sind. Deshalb ist es bei komplexen Karyotypen erforderlich eine Kombination verschiedener Analysemethoden zu verwenden, um die vorhandenen zytogenetischen Veränderungen möglichst umfassend zu charakterisieren.

5.1.2 aCGH

Die aCGH mit den DNA-Microarrays der Firma Agilent Technologies zeigte sich als zuverlässige Methode zur Identifizierung von genomischen Zugewinnen und Verlusten. Besonders bei kleinen Aberrationen, die mittels SKY nicht identifiziert werden konnten zeigte sich der Vorteil der hohen Auflösung der aCGH. Eine neue Vergleichsstudie zeigte ebenfalls, dass die benutzte Microarrayplattform für komparative genomische Vergleiche die besten Ergebnisse lieferte (Curtis *et al.*, 2009).

Die Qualität der Microarrays wurde über die von der Software 'Genomic Workbench' ausgegebenen Qualitätsreporte begutachtet. Einer der wichtigsten Werte ist der DLRS-Wert, er misst Experiment-bedingte Schwankungen der Fluoreszenzintensitäten zwischen einzelnen Oligonukleotidproben und lag bei den meisten Zelllinien (68%) im exzellenten bis guten Bereich (Agilent Protokoll Vers. 6.2.1). Ein zu hoher Wert weist auf eine unzureichende DNA-Qualität der Probe hin. Bei der Analyse der DNA-Qualität zeigte sich, dass nur die DNA der Zelllinie OS18,

die bei der aCGH über einen sehr schlechten DLRS-Wert verfügte teilweise degradiert war. Die DNA der Zelllinie OS18 wurde aus diesem Grund erneut präpariert und hybridisiert. Der DLRS-Wert der zweiten Hybridisierung war besser, dennoch kam es bei einigen anderen Werten zu Abweichungen in den schlechten Bereich.

Der Wert für die Signalintensität, sowohl für die Farbe Grün, als auch für die Farbe Rot war fast bei allen Hybridisierungen gut. Eine zu niedrige Signalintensität geht auf zu geringe DNA-Ausgangsmengen, Verlust der DNA bei der Aufreinigung oder eine mangelhafte Fluoreszenzmarkierung zurück (de Witte, 2006). Die eingesetzten DNA-Mengen waren bei allen Experimenten gleich und auch die Ausbeute stimmte mit den zu den erwartenden Werten nach der Markierung überein, so dass ein Verlust der DNA bei der Aufreinigung ausgeschlossen werden kann. Somit kann eine schlechte Signalintensität in dieser Arbeit am ehesten auf eine unzureichende Markierung der DNA zurückzuführen sein.

Ein hohes Hintergrundrauschen in den Farben kann mit Problemen bei den Waschschrritten oder einer Kontamination der bei der Bearbeitung des Microarrays genutzten Reagenzien zusammenhängen (de Witte, 2006). Bei allen Experimenten wurde ein exzellenter bis guter Wert für das Hintergrundrauschen der Farbe Grün beobachtet, aber ein schlechter Wert in 31,8% der Experimente für das Hintergrundrauschen der Farbe Rot. Das hohe Hintergrundrauschen könnte mit der Anfälligkeit für Ozondegradierung von Cyanin 5 zusammenhängen.

Die Werte für das Verhältnis von spezifischen Signalen zu unspezifischen Hintergrundsignalen, 'signal to noise ratio' (SNR), ergeben sich aus der Division der Werte für die Signalintensität insgesamt durch die Werte für die Intensität der unspezifischen Hintergrundsignale. Ein Wert über 30 wird hier angestrebt, um sicher zwischen biologischen Aberrationen und zufälligem technischem Rauschen unterscheiden zu können. Somit bietet der Wert für diesen Qualitätsparameter eine Orientierung, ob die beobachtete Signalabweichung eine genomische Abweichung anzeigt (Vacha, 2006). Bei den meisten Zelllinien (77-90%) waren diese Werte sehr gut. Die Zelllinie OS18 zeigte hier bei beiden aCGH-Analysen zu niedrige Werte, was die große Streuung der Oligonukleotide auf Grund zu hoher Intensitäten der Hintergrundsignale erklären könnte. Trotzdem konnten Aberrationen detektiert werden.

Der letzte wichtige Wert des Qualitätsreports gibt Aufschluss über die Reproduzierbarkeit. Er wird über die \log_2 ratios der 200 triplizierten Kontroll-Oligonukleotidproben, die über den gesamten Microarray verteilt sind, berechnet (Agilent Protokoll Vers. 6.2.1). In den jeweils gleichen Oligonukleotiden sollten die \log_2 ratio-Werte möglichst wenig voneinander abweichen. Zu hohe Werte können auf Grund von schlechtem Mischen des Hybridisierungsansatzes, großen Luftblasen in den Microarraykammern oder durch Verlust der Probe über undichte Hybridisierungskammern entstehen (de Witte, 2006). Die Reproduzierbarkeit war bei allen Experimenten gut, außer bei einem Experiment mit der Zelllinie SAOS2, die aber bei keinem der anderen Qualitätsparameter einen schlechten Wert zeigte, so dass dieses Experiment nicht wiederholt wurde.

Die Wiederholung von aCGH-Experimenten an der gleichen Zelllinie nach verschiedenen Kulturpassagen erbrachte identische Ergebnisse. Daher konnte geschlossen werden, dass die aCGH eine sehr verlässliche Methode ist. Darüber hinaus zeigte sich bei den 'dye swap'-Experimenten mit der Zelllinie OSA, dass der Nachweis von genomischen Imbalancen unabhängig von den gewählten Farbstoffen erfolgt.

Mittlerweile wird die Methode der aCGH auch für diagnostische Fragestellungen eingesetzt, z.B. bei geistiger Entwicklungsverzögerung unklarer Ursache (Shinawi und Cheung, 2008). Auf Grund der vielen verschiedenen Auswertelgorithmen, die für die aCGH-Analyse zur Verfügung stehen (Hupé *et al.*, 2004; Chi *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005; Myers *et al.*, 2005), die aber durchaus verschiedene Ergebnisse liefern können, muss zusätzlich eine Bestätigung der Ergebnisse mittels einer zweiten unabhängigen Methode erfolgen. Hier eignen sich besonders die FISH, über die auch die chromosomale Lokalisation von Zusatzkopien möglich ist, als auch die Analyse der Kopienzahl über eine quantitative PCR (Yu *et al.*, 2009). Desweiteren zeigte sich bei den Auswertungen der aCGH-Analysen und deren Bestätigung über FISH und dem Vergleich mit den SKY-Ergebnissen, dass benutzte Auswertelgorithmen und Filter variiert werden sollten, um kleine Aberrationen nicht zu übersehen oder aber um nicht zu viele falsch-positive Aberrationen angezeigt zu bekommen.

5.2 Zytogenetische und molekularzytogenetische Veränderungen der Zelllinien

5.2.1 Numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen

In dieser Arbeit wurden insgesamt 14 Osteosarkomzelllinien einer umfassenden Chromosomenbanden- und SKY-Analyse und 21 einer aCGH-Analyse unterzogen. Damit handelt es sich um die bislang größte Serie von zytogenetisch charakterisierten Osteosarkomzelllinien. Bisher wurden nur 8 der Zelllinien mittels CGH und SKY oder mFISH analysiert (Ozaki *et al.*, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Vielzahl von Aberrationen aufgedeckt werden, die in diesem Ausmaß noch nicht für die Osteosarkomzelllinien beschrieben waren.

Die numerischen Aberrationen betrafen vorwiegend ganze Chromosomensätze, aber auch Zugewinne einzelner Chromosomen wurden beobachtet. Die Ploidiegrade reichten von hypodiploid bis hyperhexaploid. Bei Osteosarkompatienten konnten ebenfalls polyploide Chromosomensätze beobachtet werden (Aurias, 1988; Biegel *et al.*, 1989; Mertens *et al.*, 1993; Ozisik *et al.*, 1994; Bridge *et al.*, 1997; Batanian *et al.*, 2002). Die Chromosomen bzw. Chromosomenarme 1q, 3p, 5p, 6, 7, 8q, 9p, 11 und 15q waren gehäuft vermehrt vorhanden. Ein Verlust lag häufig von den Chromosomen 4, 9 und 18 bzw. der Chromosomenarme 1q, 5q, 10p, 11q, 17p und 19p vor. CGH-Analysen bei Osteosarkompatienten zeigten ebenfalls gehäuft Zugewinne oder Verluste dieser Chromosomen (Tarkkanen *et al.*, 1993; Tarkkanen *et al.*, 1995; Bridge *et al.*, 1997; Larramendy *et al.*, 1997; Tarkkanen *et al.*, 1998; Bayani *et al.*, 2002; Ozaki *et al.*, 2002).

Mittels aCGH konnten die Regionen, die von Zugewinnen und Verlusten betroffen waren, weiter eingegrenzt werden. Es stellte sich heraus, dass besonders die Bereiche 6p21-6p12, 8q24, 12q13-12q15, 17p12-17p11.2, 19q13 und 20q13 vermehrt vorlagen. Eine verminderte Kopienzahl zeigten die Bereiche 3p14, 9p21, 13q14-13q21, 17q11, 18q11 und 19p13. Neuere Studien an Osteosarkompatienten konnten ebenfalls eine Häufung von Zugewinnen der Regionen von Chromosom 6p, 8q, 12q und 17p zeigen (Sandberg und Bridge, 2003; Man *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2005; Selvarajah *et al.*, 2007; Selvarajah *et al.*, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in jeder Zelllinie fast alle Chromosomen von kleinsten Veränderungen betroffen waren. Es ist somit wahrscheinlich, dass weitere hochauflösende Analysen bei den Tumoren der Patienten ebenfalls Aberrationen bei ursprünglich normal eingestuften Chromosomen aufdecken werden. Die

Osteosarkomzelllinien wiesen eine hohe Ähnlichkeit zu Tumoren der Patienten auf, so dass sie ein gutes Modellsystem darstellen, um genetische Veränderungen von Osteosarkomen zu studieren.

Auf einige im Rahmen dieser Arbeit detektieren rekurrenten Bruchereignisse, sowie Zugewinne und Verluste chromosomalen Materials wird im Verlauf der Diskussion genauer eingegangen.

5.2.2 Balancierte und unbalancierte Chromosomenaberrationen

Die Analyse der Osteosarkomzelllinien zeigte, dass alle gefundenen Veränderungen unbalanciert vorlagen. Balancierte Translokationen oder Inversionen sind vor allem ein Subtypen-spezifisches Charakteristikum von hämatologischen Neoplasien. Hier hat besonders die Bildung von Fusionsgenen eine hohe Bedeutung, da diese durch Insertionen von Promotoren zur Aktivierung oder Inaktivierung von Genen führen können. Durch die Aufnahme dieser spezifischen Aberrationen in das internationale Klassifikationssystem der WHO kann den Patienten eine bessere Diagnose und Therapie der Erkrankung gewährleistet werden (Vardiman, 2009). Unbalancierte Translokationen treten häufig bei Tumoren epithelialen Ursprungs, wie zum Beispiel dem Ovarialkarzinom (Despierre *et al.*, 2010) oder beim hepatozellulären Karzinom (Keck *et al.*, 1999) auf. Bei Osteosarkompatienten sind bisher auch keine balancierten Translokationen beschrieben. Dies weist darauf hin, dass andere Aberrationen die spezifischen Charakteristika der Osteosarkome ausmachen.

5.2.3 Spezifische Chromosomenaberrationen

Beim Ewingsarkom sind spezifische Translokationen beschrieben, bei denen das Gen *EWSR1* ('Ewing Sarcoma 1'; 22q12) Genfusionen mit einer Vielzahl von Translokationspartnern bildet (Urano *et al.*, 1998; Dagher *et al.*, 2001; Khoury, 2007). Diese Genfusionen führen zu onkogenen Fusionsproteinen (Sandberg und Bridge, 2001; Khoury, 2007). Bei hämatologischen Neoplasien zeigen verschiedene Subtypen der Erkrankungen teilweise Translokationsfusionen, bei denen die gleichen Gene involviert sind. So kann bei 90-95% der Patienten mit einer chronisch-myeloischen Leukämie und bei 20% der Patienten mit einer akuten lymphatischen Leukämie eine Translokation der langen Arme 9 und 22 beobachtet werden (Kurzrock *et al.*, 2003). Das hierbei entstehende 'Philadelphia-Chromosom' resultiert aus der reziproken Translokation $t(9;22)(q34.1;q11.23)$. Hierdurch fusionieren die

Gene *BCR* ('breakpoint cluster region') und *ABL1* ('c-abl oncogene 1'). Aus dem chimären Transkript wird ein Fusionsprotein gebildet, das als konstitutiv aktivierte Tyrosinkinase fungiert (Rowley, 1990). FISH-Analysen sollten zeigen, ob es analog zu den Aberrationen bei hämatologischen Neoplasien auch bei Sarkomen zu gleichen spezifischen Aberrationen kommt. Die Analyse der Osteosarkomzelllinien konnte zeigen, dass außer bei der Zelllinie OS10 kein Translokationsbruch im Gen *EWSR1* vorlag. Mittels RT-PCR konnte kein Fusionstranskript in der Zelllinie OS10 nachgewiesen werden. Insgesamt zeigten die Analysen, dass die *EWSR1*-Translokationen kein spezifisches Merkmal für Osteosarkome sind.

5.2.4 Rekurrente chromosomale Bruchpunkte

In dieser Arbeit konnten mittels 'CyDAS'-Analysen 650 Bruchereignisse aus den SKY-Karyotypen extrahiert werden. Es handelte sich hierbei zwar um teilweise rekurrente Bruchereignisse in einigen Chromosomenbanden, die Translokationen waren aber alle unbalanciert und rekurrente Translokationen konnten nicht beobachtet werden. Durch die aCGH-Analysen konnten die Bruchpunkte genauer eingegrenzt und zusätzliche Bruchereignisse detektiert werden. Insgesamt wurden hierbei 4266 Brüche detektiert. Diese waren oft im Centromer oder in Centromernähe lokalisiert. Interstitielle Brüche konnten vor allen bei kleineren Regionen mit rekurrenten Zugewinnen und Verlusten beobachtet werden. Gisselsson und Kollegen konnten zeigen, dass niedrigmaligne Tumore, oder Tumore mit geringfügig aberrantem Karyotyp eher Chromosomenbrüche in Telomernähe aufweisen und karyotypisch hochkomplexe Tumore, wie z.B. die Osteosarkome eher über interstitielle und Centromerbrüche verfügen (Gisselsson *et al.*, 2000). Diese Beobachtung und das Vorhandensein von dicentrischen Chromosomen, sowie 'homogeneously staining regions' zeigt die chromosomale Instabilität der Osteosarkome, deren Ursachen in Abschnitt 5.4 genauer erläutert werden. Bei den Analysen der Bruchereignisse konnte festgestellt werden, dass meist die q-Arme der Chromosomen im Verhältnis zu den p-Armen gehäuft betroffen waren, was man auf Grund der größeren Länge auch erwarten würde, zusätzlich konnte aber beobachtet werden, dass die kleineren Chromosomen der Gruppen D-G signifikant höher von Chromosomenbrüchen betroffen waren als erwartet. Hier hätte man auf Grund des geringeren Basenpaaranteils am Gesamtgenom bei einer zufälligen Verteilung erwartet, dass mehr Brüche auf den großen Chromosomen auftreten, es konnte aber

gezeigt werden, dass alle q-Arme der Chromosomen in etwa gleich häufig von Brüchen betroffen waren. Insgesamt konnten bei den Bruchpunktanalysen 1620 (38%) rekurrente Brüche, also Brüche, die entweder die gleiche Oligonukleotidprobe, oder das gleiche Gen bei mindestens zwei Zelllinien betrafen, detektiert werden.

5.2.5 Rekurrente Bruchpunkte in einzelnen Genen

Mittels Datenbankanalysen konnten 57 rekurrent von Brüchen betroffene Gene herausgefunden werden. Bei einem Teil der Gene ist bereits eine Beteiligung bei Tumoren bekannt bzw. auf Grund der Funktion eine Wirkung bei der Entstehung des Osteosarkoms denkbar. Auf diese wird nachfolgend näher eingegangen. Einige der Gene sind bei anderen Tumorentitäten auf verschiedene Arten bei der Tumorentstehung involviert, andere hingegen haben Funktionen inne, die besonders bei der Knochenentwicklung oder aber dem Aufbau des Mitoseapparates eine Rolle spielen und somit interessant für die Tumorgenese und Progression beim Osteosarkom sein könnten. Problematisch bei der Bruchpunktanalyse war, dass die Brüche in einem Oligonukleotid auftreten können, aber auch zwischen zwei oder mehr Oligonukleotiden, da es sich auf Grund der einzelnen Schwankungen zwischen den \log_2 ratios nicht immer genau abgrenzen ließ, wo der Bruch stattgefunden hat. Desweiteren ist die mediane Auflösung der 44k-Microarrays mit 43 kb noch relativ grob, so dass für eine genaue Eingrenzung und Charakterisierung der Bruchpunkte weitere Analysen mit hochauflösenderen Arrays, FISH-Analysen oder PCR-Analysen bzw. Sequenzierungen nötig sind. Bei den hier vorgestellten Bruchereignissen, der über die Datenbankanalysen herausgefilterten interessanten Gene handelt es sich also putative Brüche, die noch genauer untersucht werden müssen.

5.2.5.1 Tumorgenese

Den größten Anteil (25%) der Gene, die in Bruchereignisse involviert waren machten Gene aus, die bei der Tumorgenese bzw. Progression involviert sind. Das Gen *ODZ2* (5q34) wurde als Partner bei IGH-Translokationen in MALT-Lymphomen identifiziert. Bei IGH-Translokationen gelangen Protoonkogene unter den Einfluss von Enhancern der Immunglobulingene auf Chromosom 14q32.33, was meist zu einer Überexpression des translozierten Gens führt. Bei den MALT-Lymphomen wird *ODZ2* deshalb eine onkogene Funktion zugeschrieben (Vinatzer *et al.*, 2008). Ein Bruch, der in dieser Arbeit bei vier Zelllinien beobachtet wurde und eine

Translokation dieses Gens könnte also auch bei den Osteosarkomen eine Aktivierung des potentiellen Protoonkogens bedeuten.

Ein umgekehrter Effekt, also ein Funktionsverlust, wurde für das Gen *MTAP* (9p21.3) bei Non-Hodgkin-Lymphomen beobachtet. Hier liegt es kodeletiert mit den Genen *CDKN2A* (p16^{INK4A}) und *CDKN2B* (p15^{INK4B}) vor und wurde als Tumorsuppressor beschrieben (Nobori *et al.*, 1996; Dreyling *et al.*, 1998). Ein Verlust der Funktion wurde mit der Transformation niedrigmaligner Non-Hodgkin-Lymphome in hochmaligne diffuse großzellige B-Zell-Lymphome assoziiert. Der Funktionsverlust des Gens könnte also ein spätes Ereignis bei der Tumorgenese darstellen. Ein Bruch wurde in dem Gen in 4 Zelllinien beobachtet.

Es konnten 3 rekurrente Brüche in dem Gen *CRYL1* (13q12.11) bei der Bruchpunktanalyse beobachtet werden. Eine reduzierte Expression des Gens ist mit der Tumorprogression bei hepatozellulären Karzinomen assoziiert. So zeigten Patienten mit gehemmter *CRYL1*-Funktion größere Tumoren und eine kürzeres krankheitsfreies Überleben, als Patienten mit normaler Expression (Chen *et al.*, 2003a; Cheng *et al.*, 2010).

Ein weiteres Gen in dem 4 rekurrente Brüche auftraten war *NRG4* (15q24.2). Eine Expression dieses Gens konnte mit einer besseren Prognose beim Blasenzellkarzinom korreliert werden (Memon *et al.*, 2004). Bruchereignisse in diesem Gen könnten also die Expression positiv, als auch negativ beeinflussen.

Eine Überexpression des Gens *BSG* (19p13.3) konnte bei malignen Melanomen oder beim Prostatakarzinom mit der Tumorprogression, Tumorinvasivität und Medikamentenresistenz assoziiert werden (Kanekura und Chen, 2010; Hao *et al.*, 2010). Eine Umlagerung des Gens an einen Promotor oder Enhancer könnte auch beim Osteosarkom eine Überexpression des Gens bedeuten.

5.2.5.2 Tumorsuppressorgene

Bruchereignisse konnten ebenfalls gehäuft in Tumorsuppressorgenen, wie *RB1* und *p53* (Abschnitt 5.2.6.5) beobachtet werden. Ein weiteres interessantes Tumorsuppressorgen, in dem 2 Brüche stattgefunden haben ist das Gen *WWOX* ('WW domain containing oxidoreductase'), welches auf Chromosome 16q23.1 lokalisiert ist. Es kodiert für ein Protein, welches zwei WW-Domänen besitzt. WW-Domänen sind Proteindomänen, die aus zwei hochkonservierten Tryptophanen bestehen und prolinreiche Proteinmotive binden können (Ramos und Aldaz, 2006).

Proteininteraktionen von *WWOX* mit anderen Peptiden, die als Apoptoseregulatoren und Transkriptionsfaktoren dienen sind beschrieben worden (Bednarek *et al.*, 2001). Ebenso konnte gezeigt werden, dass das Gen in der zweithäufigsten fragilen Region des Genoms, FRA16D liegt (Bednarek *et al.*, 2001; Ramos und Aldaz, 2006), was die häufigen Brüche in dem Gen erklären könnte. Der Verlust des Gens konnte beim Ovarial-, Mamma-, Hepatocellulär- und Prostatakarzinom mit der Tumorprogression korreliert werden (Yang und Zhang, 2008). Beim Osteosarkom zeigten erste Studien eine Deletion des Gens in bis zu 30% (Squire *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2009) und ein Verlust der Proteinexpression in 62% der analysierten Fälle (Yang *et al.*, 2009). Weitere Analysen bei Osteosarkompatienten werden zeigen, wie *WWOX* die Tumorgenese, Progression und Prognose beeinflusst.

5.2.5.3 Metastasierung

In Genen deren Fehlfunktion mit Metastasierung assoziiert sind konnten ebenfalls Brüche festgestellt werden. Hierbei handelt es sich zum Beispiel um *CSMD1* ('CUB and Sushi multiple domains 1'; 8p23.2), welches bei colorectalen Adenokarzinomen (Farrell *et al.*, 2008) und *MTA1* ('metastasis associated 1'; 14q32.33), das bei Mammakarzinomen mit Tumorprogression und Metastasierung korreliert wurde (Gururaj *et al.*, 2006). Es konnten jeweils 6 und 3 Brüche in diesen Genen beobachtet werden.

5.2.5.4 Knochenentwicklung

In vier Genen die bei der Knochenentwicklung eine Rolle spielen, konnten ebenfalls Brüche detektiert werden. Die Gene *SCUBE3* ('signal peptide, CUB domain, EGF-like 3'; 6p21.31) und *BBS9* ('Bardet-Biedl syndrome 9'; 7p14.3) sind mit der Stimulation der Osteoblasten und Knochenresorption und -Formation assoziiert (Adams *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2004). Fehlfunktionen in diesen Genen könnten zu einer begünstigten Zellproliferation beim Osteosarkom führen. Ein Bruchereignis im Gen *SCUBE3* konnte zweimal und im Gen *BBS9* viermal beobachtet werden.

5.2.5.5 Mitoseapparat

Die Brüche in den Genen *CLASP1* ('cytoplasmic linker associated protein 1'; 2q14.2), *RAD21* ('RAD21 homolog'; 8q24.11) und *NEDD1* ('neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 1'; 12q23.1) könnten durch ihre Funktionen beim

Aufbau des Spindel- und Kinetochorapparates, der Chromosomenbindung oder bei der Centrosomenorganisation (Pereira *et al.*, 2006; Beauchene *et al.*, 2010; Manning *et al.*, 2010) einen Einfluss auf die Funktionalität des Mitoseapparates und somit auf die Chromosomenintegrität und -Stabilität beim Osteosarkom haben.

5.2.6 Rekurrente Zugewinne und Verluste

5.2.6.1 Zugewinne 6p21.33-6p12.1

In dieser Arbeit konnten mittels aCGH und FISH in 15 der 19 Zelllinien (79%) Duplikationen oder Amplifikationen in der chromosomalen Region 6p21.33-6p12.1 nachgewiesen werden. Wolf *et al.* zeigten über cDNA-Microarrayanalysen eine Hochregulation des Gens *HSP90 β* ('heat shock protein 90 β '; 6p21.1) in den Zelllinien OS09, OS10 und OS15 (Wolf *et al.*, 2000). Die Hochregulation für *HSP90 β* konnte ebenfalls bei drei Patienten nachgewiesen werden, die auch im Rahmen dieser Publikation untersucht wurden. Durch Bindung an hydrophobe Regionen von neusynthetisierten oder fehlgefalteten Proteinen hilft das Protein HSP90 β bei der korrekten Faltung. Proteine dieser Art bezeichnet man als Chaperone. Eine Überexpression der HSP-Proteine kann durch Hitzeschock induziert werden, daher rührt der Name 'heat shock protein'. Eine Studie konnte zeigen, dass das Protein eine Rolle bei der Regulation des Mikrotubuliumauf- und Abbaus spielt (Garnier *et al.*, 1998). Hierbei wird die Tubulinpolymerisation inhibiert und somit die Zellteilung behindert. Eine Überexpression von HSP90 α , einem anderen Mitglied der HSP-Familie, wurde bei Mammakarzinomen beschrieben und ist hier mit einer schlechteren Überlebensrate assoziiert (Jameel *et al.*, 1992). Ebenfalls wurde eine erhöhte Expression von *HSP90* bei Ovarialkarzinomen beschrieben (Mileo *et al.*, 1990). Die Rolle der HSP-Proteine beim Osteosarkom ist noch weitgehend unbekannt. Es wurde eine Überexpression von *HSP27*, die mit einer schlechten Prognose einhergeht von Uozaki und Kollegen beschrieben (Uozaki *et al.*, 1997). In einer neueren Studie konnte gezeigt werden, dass *HSP90* ein potentielles Ziel für therapeutische Ansätze beim Ewingsarkom ist. Hier kam es bei der Inhibierung von HSP90 allein oder in Kombination mit Inhibierung von *IGF1R* durch 17-AAG (17-Allylamino-17-Demethoxygeldanamycin) und siRNA zu einem signifikant verringertem Tumorwachstum (Martins *et al.*, 2008).

Amplifikationen in den Regionen 6p21-6p12 wurden bei Osteosarkompatienten von Lau *et al.* bei 7 der 20 untersuchten Patienten (28%) beschrieben (Lau *et al.*, 2004).

In dieser Studie wurden die Patienten mittels CGH, SKY und FISH untersucht. Das Gen *CDC5L* ('cell division cycle 5-like protein'; 6p21.1) wurde hier als Kandidatengen ausgewählt, da es eine wichtige Rolle als positiver Zellzyklusregulator bei dem Übergang von der prämitotischen G₂-Phase in die Mitose spielt (Bernstein und Coughlin, 1998). Bei Patienten mit einer 6p-Amplifikation zeigte sich ein Trend zu einem kürzeren ereignisfreien Überleben, als bei Patienten ohne Amplifikation (Overholtzer *et al.*, 2003). Die Zugewinne im Bereich 6p21-6p12 konnten kurze Zeit später auch mittels BAC-Arrayanalysen bei 33/48 Patienten (65%) nachgewiesen werden. Bei 25% der Patienten mit einem chromosomalem Zugewinn dieser Region wurden hochgradige Amplifikationen beschrieben (Man *et al.*, 2004). Die Amplifikationen konnten in allen Proben (Biopsie, resektierter Tumor und metastatische Läsionen) nachgewiesen werden, so dass die Vermutung nahe liegt, dass es sich hierbei um ein frühes Ereignis in der Pathogenese der Osteosarkome handelt. Im Jahr 2008 untersuchte dieselbe Arbeitsgruppe die Rolle von *CDC5L* als Kandidatengen des 6p-Amplikons genauer (Lu *et al.*, 2008). Hierbei konnte die amplifizierte Region auf 7.9 Mb eingegrenzt werden. Zahlreiche Gene liegen in der amplifizierten Region, dennoch konnte über qRT-PCR-Analysen eine signifikante Überexpression nur in den Genen *CCND3*, *CDC5L* und *RUNX2* nachgewiesen werden, auf Proteinebene erwies sich nur die Menge von *CDC5L* als signifikant überexprimiert, so dass sich hier erneut *CDC5L* als das potentiell interessanteste Kandidatengen für diese Region herausstellte. Die aCGH-Analysen dieser Arbeit zeigten bei 15 Zelllinien eine minimale übereinstimmende Region auf Chromosom 6p21.1, in der das Gen *CDC5L* enthalten war.

Das Gen *CCND3* ('cyclin D 3') ist lokalisiert auf Chromosom 6p21.1 und kodiert ein Protein der Cyclinfamilie. Cycline fungieren als Regulatoren der CDK-Kinasen (siehe Abbildung 5.1). Das Protein *CCND3* bildet Komplexe und fungiert als regulatorische Untereinheit der Proteine CDK4 und CDK6, deren Aktivitäten für den G₁- zu S-Phasenübergang notwendig sind (Sherr, 1993). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass das Protein bei der Phosphorylierung des Tumorsuppressors *RB1* involviert ist (Møller *et al.*, 2000). Somit handelt es sich bei dem Gen *CCND3* ebenfalls um ein interessantes Kandidatengen aus der amplifizierten Region des kurzen Arms von Chromosom 6. In den in dieser Arbeit durchgeführten FISH-Analysen der Gene *CCND3* und *CDC5L* wurde deutlich, dass es nicht nur zu Duplikationen, sondern auch zu hochgradigen Amplifikationen, wie in den Zelllinien KPD und MG63, kam.

Das Vorliegen dieser homogen anfärbbaren Regionen oder ähnlichen Korrelaten von Amplifikationen genetischen Materials, wie zum Beispiel 'double minutes', sind ein Hinweis auf die Instabilität beziehungsweise Heterogenität der Karyotypen der Osteosarkome. Auf die Ursachen von chromosomaler Instabilität wird im späteren Verlauf der Diskussion genauer eingegangen.

Ein weiteres Kandidatengen aus der vermehrten Region ist das Gen *RUNX2* ('runt-related transcription factor 2'), welches auf 6p21.3 lokalisiert ist. Die Mitglieder der RUNX-Familie sind Transkriptionsfaktoren. *RUNX2* kodiert ein nukleares Protein mit einer Runt-DNA-Bindedomäne. Das Protein ist essentiell für die osteoblastische Differenzierung und Skelettmorphogenese (Olfa *et al.*, 2010; Pratap *et al.*, 2003). Mutationen im Gen *RUNX2* sind mit Erkrankungen mit Knochenbildungsstörungen wie zum Beispiel der Cleidocranialen Dysplasie assoziiert. Beim Osteosarkom konnte die häufig vorliegende Überexpression von *RUNX2* mit Metastasierung und einer schlechten Prognose korreliert werden (Andela *et al.*, 2005; Galindo *et al.*, 2005; Nathan *et al.*, 2009; Won *et al.*, 2009). Eine Amplifikation der Region 6p21.3 könnte bei den hier analysierten Osteosarkomzelllinien ebenfalls eine Überexpression bedeuten, die sowohl in frühen Schritten, also bei der Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen, als auch bei späten Ereignissen, wie der Metastasierung eine Rolle spielt (siehe Abbildung 5.2).

5.2.6.2 Zugewinne 12q13-12q15

Besonders auffällig zeigte sich der chromosomale Bereich 12q13-12q15 in den aCGH-Analysen. Hier lagen in 11 der 19 (58%) Zelllinien Vermehrungen von genetischem Material vor. Oft handelte es sich um hochgradige Amplifikationen, die sich bei der nachfolgenden FISH-Analyse als homogen anfärbbare Regionen präsentierten. Amplifikationen für den chromosomalen Bereich 12q13-12q15 sind in der Literatur häufig für die unterschiedlichsten Tumorentitäten, wie z.B. Neuroblastome (Corvi *et al.*, 1995), maligne fibröse Histiozytome, Liposarkome (Nakayama *et al.*, 1995), Hodenkarzinome (Riou *et al.*, 1995), Blasenkarzinome (Simon *et al.*, 2002) und maligne Melanome (Muthusamy *et al.*, 2006) beschrieben. In dieser Region liegt eine Vielzahl von potentiellen Kandidatengenen, die auch bei der Tumorgenese der Osteosarkome eine Rolle spielen könnten. Roberts *et al.* zeigten 1989 über *in situ* Analysen eine 15-fache Amplifikation des Gens *GLI1* ('GLI family zinc finger 1') bei der Osteosarkomzelllinie OSA (Roberts *et al.*, 1989), eine

Überexpression des Gens konnte 1994 bewiesen werden (Forus *et al.*, 1994). Das Gen ist lokalisiert auf 12q13.2-12q13.3, kodiert für eine 4.0 kb mRNA und wurde ursprünglich beim Glioblastom identifiziert (Kinzler *et al.*, 1987). Es ist ein Mitglied der Krüppel-Zinkfingerfamilie und ein Transkriptionsfaktor, der durch die 'Sonic-Hedgehog'-Signaltransduktionskaskade aktiviert wird und die Stammzellproliferation reguliert (Bigelow *et al.*, 2004). Insbesondere bei den kindlichen Sarkomen konnte eine signifikant erhöhte Expression des Gens gezeigt werden, die mit der Tumorgenese und dem Tumorgrad korreliert (Stein *et al.*, 1999). Die Amplifikation oder Duplikation des *GLI1*-Gens konnte in dieser Arbeit für alle Zelllinien mit einer Vermehrung des chromosomalen Bereichs 12q13-12q15 nachgewiesen werden.

Ein weiteres interessantes Gen ist *MDM2* ('murine double minute p53 binding protein homolog'), welches in der Region 12q14.3-12q15 lokalisiert ist. Die beobachtete Anzahl von 42% Amplifikationen des Gens in den in dieser Arbeit analysierten Zelllinien liegt etwas höher, als bisher in der Literatur beschrieben. Hier konnte eine Amplifikation von 4.4%-20% und eine bis zu 30-fach erhöhte Expression beim Osteosarkom von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben werden (Oliner *et al.*, 1992; Ladanyi *et al.*, 1993; Flørenes *et al.*, 1994; Nakayama *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1996b; Szymanska *et al.*, 1997; Tarkkanen *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 1999; Lau *et al.*, 2004). *MDM2* bildet Komplexe mit *p53*. Es kann die von *p53* regulierte Wachstumskontrolle über seine E3-Ubiquitin-Ligaseaktivität durch proteasomale Degradation von *p53* abschalten. Dies führt zu einer erniedrigten Apoptoserate (Meltzer *et al.*, 1991; Momand *et al.*, 1992; Picksley und Lane, 1993; Levine *et al.*, 1994; Deb, 2003). Außerdem konnte eine Interaktion von *MDM2* mit *RB1* gezeigt werden (Xiao *et al.*, 1995), bei der ebenfalls die wachstumsregulierende Funktion von *RB1* inhibiert wird (Deb, 2003). Die Amplifikation und Überexpression des *MDM2*-Gens ist meist mit einer schlechten Prognose bei den Sarkomen assoziiert (Onel und Cordon-Cardo, 2004). Beim Osteosarkom konnten Amplifikationen und eine erhöhte Expression des Gens sowohl bei fortgeschrittenen metastasierenden OS (Ladanyi *et al.*, 1993; Flørenes *et al.*, 1994; Berner *et al.*, 1997a), als auch bei primären Läsionen (Nakayama *et al.*, 1995) und gehäuft bei parostealen OS mit niedrigem histologischem Grad beobachtet werden (Gisselsson *et al.*, 2002). Bei Patienten mit klassischem Osteosarkom mit einer Amplifikation zeigte sich ein erhöhtes Erkrankungsalter und eine weibliche Präferenz im Gegensatz zu Patienten ohne Amplifikation (Mejia-Guerrero *et al.*, 2010). Eine Amplifikation mit der mehr als 10-

fachen Anzahl des Gens und eine erhöhte Expression des Gens konnte bei der Zelllinie OSA gezeigt werden (Forus *et al.*, 1994; Henriksen *et al.*, 2003), eine moderate Expression liegt bei der Zelllinie U-2OS bei normaler Kopienzahl vor (Henriksen *et al.*, 2003). Auf Grund der ursprünglichen Beobachtung, dass *MDM2*-Amplifikationen nicht parallel zu *p53*-Mutationen auftreten wurde postuliert, dass es sich bei der *MDM2*-Amplifikation um einen alternativen Mechanismus handelt, um der Wachstumskontrolle zu entgehen (Oliner *et al.*, 1992). Auch in späteren Studien wurde das parallele Auftreten von *MDM2*-Amplifikationen und *p53*-Mutationen äußerst selten beobachtet (Flørenes *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1996b; Lonardo *et al.*, 1997; Landers *et al.*, 1997). Deletionen des Gens *p53* konnten im Rahmen dieser Arbeit mittels aCGH nur in fünf Zelllinien (KPD, MOS, SAOS2, SARG, U-2OS) gefunden werden, ein paralleler Zugewinn des Gens *MDM2* trat bei den Zelllinien SAOS2, SARG und U-2OS auf, allerdings nur mit geringer zusätzlicher Kopienzahl. Dies lässt die Vermutung zu, dass bereits eine Aberration in einem Gen, welches die Wachstumskontrolle reguliert, für die Initiation der Tumorgenese bei den Osteosarkomen ausreicht.

Ein weiteres Gen, welches ebenfalls in der amplifizierten Region 12q14.1 liegt ist das Gen *CDK4* ('cyclin-dependent kinase 4') (Berner *et al.*, 1997a). Es kodiert für ein Protein der Serin-Threonin-Proteinkinasefamilie, welches die katalytische Untereinheit des CDK4-Cyclin D-Komplexes bildet. Das Protein reguliert die Zellzyklusprogression von der G₁-Phase in die S-Phase (Sherr, 1993). Die Aktivität des Proteins wird unter anderem durch den CDK-Inhibitor p16^{INK4A} und durch Proteine der Cyclinfamilie kontrolliert. Über Phosphorylierung kann das CDK4-Protein als Komplex mit CCND1 die Funktion von *RB1* inhibieren (Ewen *et al.*, 1993; Kato *et al.*, 1993; Matsushime *et al.*, 1994). Eine Vermehrung der Kopienzahl konnte in dieser Arbeit in insgesamt 58% der Zelllinien nachgewiesen werden, bei 21% der Zelllinien lagen multiple Kopien vor. Eine Koamplifikation des Gens *MDM2* lag bei 37% der Zelllinien vor. Bei Glioblastomen und anaplastischen Astrozytomen konnte ebenfalls eine Amplifikation beider Gene beobachtet werden, nicht jedoch eine Koamplifikation (Reifenberger *et al.*, 1993; Reifenberger *et al.*, 1996), welches zur Vermutung führte, dass es sich bei den beiden Genen um unabhängige Amplifikationsziele handeln könnte. Diese Annahme konnte für die unterschiedlichsten Sarkomen, einschließlich Osteosarkome bestätigt werden (Khatib *et al.*, 1993; Elkahloun *et al.*, 1996; Berner *et al.*, 1997a; Italiano *et al.*, 2008). Eine

Koamplifikation beider Gene wurde dennoch sehr oft bei parostealen Osteosarkomen beschrieben, nicht jedoch bei klassischem Osteosarkom (Mejia-Guerrero *et al.*, 2010).

Die Gene *CDK4* und *SAS/TSPAN31* sind auf Grund der räumlichen Nähe vermehrt koamplifiziert (Elkahloun *et al.*, 1996). Das Gen *TSPAN31* ('tetraspanin 31') ist eine Mitglied der Transmembran-4-Superfamilie und liegt ebenfalls wie *CDK4* auf Chromosom 12q14.1 (Oliner *et al.*, 1992). Das an der Zelloberfläche gelegene Protein spielt bei der Wachstumsregulation und Signaltransduktion eine Rolle (Jankowski *et al.*, 1994). Eine Koamplifikation des Gens mit *CDK4* konnte in dieser Arbeit bei allen Fällen mit Amplifikationen in diesem Bereich beobachtet werden. In der Literatur sind Amplifikationen und Koamplifikationen besonders bei niedrigmalignen Oberflächen-Osteosarkomen beschrieben, wie z.B. bei den parostealen Osteosarkomen, seltener hingegen bei den intramedullären Osteosarkomen mit hoher Malignität (Noble-Topham *et al.*, 1996; Wunder *et al.*, 1999). Dies weist darauf hin, dass *TSPAN31*- bzw. *CDK4*-Amplifikationen eher frühe Ereignisse bei der Tumorgenese der Osteosarkome sind (siehe Abbildung 5.2). Ebenfalls häufig koamplifiziert mit *CDK4* und *TSPAN31* liegt das Gen *PRIM1* vor. Es ist lokalisiert auf Chromosom 12q13.3 und eine Amplifikation wurde in 41% der Osteosarkome beobachtet (Yotov *et al.*, 1999). *PRIM1* ('DNA primase 1') kodiert für eine Enzymuntereinheit, die eine Komponente des DNA-Polymerase- α -Komplexes ist. Das Enzym Primase, welches ein Heterodimer aus einer kleinen und einer großen Untereinheit ist, synthetisiert kleine RNA-Primer für die Okazaki-Fragmente, die während der diskontinuierlichen DNA-Replikation hergestellt werden. Das Protein, welches von dem Gen *PRIM1* kodiert wird ist die kleine Untereinheit von Primase mit einer molekularen Größe von 49kDa (DePamphilis, 1996). Das Enzym spielt eine wichtige Rolle bei der Initiation der DNA-Replikation, da die DNA-Polymerase die Polymersynthese nicht alleine initiieren kann (Cloutier *et al.*, 1997). Aberrationen im Gen *PRIM1* könnten ebenfalls eine ausschlaggebende Rolle bei der Tumorgenese durch den Einfluss des Gens auf den Zellzyklusübergang von G₁- in S-Phase innehaben (Yotov *et al.*, 1999).

Das Gen *CHOP/DDIT3* ('DNA-damage-inducible transcript 3'), welches auf Chromosom 12q13.1-12q13.2 lokalisiert ist zeigt eine Überexpression beim Osteosarkom, die mit der Amplifikation des Gens *CDK4* korreliert ist (Forus *et al.*, 1994; Italiano *et al.*, 2008). Der Bruch liegt in der 5'-Region des Gens *DDIT3*, so dass

vermutet wird, dass dieser Bereich eine fragile Stelle ist, die den Ursprung des *CDK4-TSPAN31*-Amplikons darstellt und die Expression von *DDIT3* selbst dysreguliert (Italiano *et al.*, 2008). Desweiteren konnte die gleiche Arbeitsgruppe zeigen, dass es sich bei den 12q-Amplikons um mindestens zwei unabhängige Amplikons handelt. Das eine um *CDK4* und *TSPAN31* in der Region 12q13-12q14 und das andere um *MDM2* und *HMGA2* in der Region 12q15. Dies erklärt auch, warum die Gene *CDK4* und *MDM2* in unterschiedlicher Anzahl bei den in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien dupliziert oder amplifiziert vorlagen.

Das Gen *HMGA2/HMGIC* ('high mobility group AT-hook 2') ist lokalisiert auf Chromosom 12q15 und liegt zwischen den Genen *CDK4* und *MDM2*. Es ist kodiert für einen positiven als auch negativen Transkriptionsregulator und bindet in der kleinen Furche A-T-reicher DNA (Reeves und Nissen, 1990). Besonders bei gut-differenzierten und dedifferenzierten Liposarkomen liegt dieses Gen amplifiziert und rearrangiert vor (Italiano *et al.*, 2008), aber auch bei anderen sowohl gutartigen, als auch bösartigen Sarkomen konnte eine Amplifikation in bis zu 10% beschrieben werden (Berner *et al.*, 1997b; Cleynen und van de Ven, 2008). Für die Zelllinie OSA konnten Kools *et al.* 1996 ein Rearrangement des Gen *HMGA2* zeigen (Kools und van de Ven, 1996). Eine Trunkierung und Amplifikation dieses Gens könnte Auswirkungen bei der Wachstumskontrolle von Tumorzellen haben. Ebenfalls weisen Brüche in dem Gen und Rearrangements von *HMGA2*, auf den potentiellen Ursprung des 12q15-Amplikons hin. In einer neueren Publikation konnten Polymorphismen in dem Gen *HMGA2* mit unterschiedlicher trabekulärer Knochenmineralisierungsdichte assoziiert werden (Kuipers *et al.*, 2009). Weitere Funktionen von *HMGA2* im Metabolismus des Knochens bedarfen aber noch genauerer Abklärung.

Insgesamt spielen die Amplifikationen der Bereiche 12q13-12q14 und 12q15 wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese verschiedener Sarkome (Ladanyi *et al.*, 1995; Forus *et al.*, 2001; Lopes *et al.*, 2001; Mejia-Guerrero *et al.*, 2010). Bei benignen Sarkomen konnten auch Zugewinne in diesen Bereichen beobachtet werden, allerdings nur zu einem sehr geringen Anteil (Hostein *et al.*, 2004). Besonders die niedrigmalignen parostealen Osteosarkome sind durch Amplifikationen in dieser Region ausgezeichnet (Tarkkanen *et al.*, 1995; Szymanska *et al.*, 1997; Lonardo *et al.*, 1997; Wunder *et al.*, 1999; Gamberi *et al.*, 2000). Die Beobachtungen, dass die Amplifikationen eher bei niedrigmalignen Osteosarkomen, als bei hochmalignen Osteosarkomen auftreten zeigen, dass die Amplifikationen der

Gene aus dem Bereich 12q wohl ein frühes Ereignis bei der Tumorgenese (siehe Abbildung 5.2) der Osteosarkome darstellen. Für die Aggressivität der hochmalignen Osteosarkome scheinen zusätzliche Aberrationen notwendig zu sein (Gamberi *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2004; Mejia-Guerrero *et al.*, 2010). Das Zusammenspiel der Gene der 12q-Amplifikationen mit anderen Genen, die bei der Tumorgenese der Osteosarkome eine Rolle spielen kann der Abbildung 5.1 entnommen werden.

5.2.6.3 Zugewinne 17p12-17p11.2

Ein weiterer gut abgrenzbarer Bereich, der sich durch hohe \log_2 ratios auszeichnete war die Chromosomenregion 17p12-17p11.2. Zugewinne von chromosomalem Material in diesen Banden konnten in 10 (53%) Zelllinien identifiziert werden. Die Aberrationen traten hier anders als bei den 6p- und 12q-Amplifikationen auf vielen verschiedenen Chromosomen verteilt als inserierte Duplikationen auf. Homogen anfärbare Regionen wurden nur bei der Zelllinie OS15 beobachtet. Die Verlagerung einzelner Gene der gleichen Chromosomenbande auf verschiedene Chromosomen in fünf Zelllinien ist ein Hinweis für einen Translokationsbruchpunkt zwischen den Genen *PMP22* und *MAPK7*. Eine hochauflösende Analyse der Bruchpunktregion (~4 Mb) könnte zeigen, ob es sich hierbei um die gleichen Bruchpunkte handelt. Für die Region 17p12 ist eine fragile Stelle beschrieben (Kähkönen *et al.*, 1989). FRA17A lässt sich bei 0,5% gesunder Individuen mittels Distamycin A induzieren und zählt zu den raren fragilen Stellen (Debacker und Kooy, 2007). Die Fragilität dieser Region könnte zu den Brüchen und Genumlagerungen führen, die in dieser Arbeit beobachtet wurden. Ebenso bieten fragile Stellen Voraussetzungen für 'Breakage-Fusion-Bridge-Zyklen', die zu intrachromosomalen Genamplifikationen führen (Abschnitt 5.4). Zugewinne für den kurzen Arm von Chromosom 17 sind für unterschiedliche Entitäten beschrieben. So ist ein Zugewinn des Bereichs 17p12-17p11.2 in 5% der Astrozyome (Hulsebos *et al.*, 1997; van Dartel *et al.*, 2003), bei 24% der Leiomyosarkome (El-Rifai *et al.*, 1998; Kaur *et al.*, 2007), bei 38% der Chondrosarkome (Larramendy *et al.*, 1997) und ebenso bei multiplen Myelomen (Fabris *et al.*, 2007) beschrieben. Diese hohe Anzahl an Tumoren mit Amplifikation in der Region 17p12-17p11.2 zeigt die hohe Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein eines Onkogens in diesem Bereich. Bei hochgradigen Osteosarkomen zeigen 13-32% der Fälle eine 17p12-17p11.2 Amplifikation (Tarkkanen *et al.*, 1995; Forus *et al.*, 1996; López-Ginés *et al.*, 1996; Szymanska *et al.*, 1997; Tarkkanen *et al.*, 1998;

Tarkkanen *et al.*, 1999; Stock *et al.*, 2000; Zielenska *et al.*, 2001; van Dartel *et al.*, 2004; van Dartel und Hulsebos, 2004; Lau *et al.*, 2004). Zwei Studien konnten sogar deutlich höhere Amplifikationsraten mit 45% der Fälle (Hulsebos *et al.*, 1997) bzw. 77% (7/9) der Fälle (Squire *et al.*, 2003) zeigen, allerdings waren hier die Kollektive sehr klein. Bei der Eingrenzung eines Zielgens erwies sich die Suche nach einem Kandidaten zuerst als sehr kompliziert, da in der Chromosomenregion viele Gene liegen (Wolf *et al.*, 1999). Van Dartel *et al.* haben diese im Jahr 2002 auf die drei Kandidatengene *PMP22*, *TOP3A* und *MAPK7* eingegrenzt (van Dartel *et al.*, 2002; van Dartel *et al.*, 2004). *PMP22* ('peripheral myelin protein 22') kodiert für ein 22kDa großes peripheres Myelinprotein. Eine genaue Funktion des Gens bei der Tumorgenese ist bisher noch nicht bekannt.

Ein weiteres Kandidatengen, lokalisiert auf 17p11.2 ist das Gen *COPS3* ('COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 3'), dass in einer Studie gehäuft überexprimiert bei Osteosarkomen gefunden werden konnte (Henriksen *et al.*, 2003). *COPS3* codiert für eine Untereinheit des COP9-Signalosoms (CSN) (Elsea *et al.*, 1999), welches im Zusammenhang mit vielen regulatorischen Prozessen, unter anderem mit der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse (Bech-Otschir *et al.*, 2002) steht. Die Phosphorylierung des CSN steuert die *MDM2*-vermittelte Ubiquitinierung von *p53* und anschließende Degradation durch das 26S-Proteasom von *p53* (Bech-Otschir *et al.*, 2001). Das Zusammenspiel (siehe Abbildung 5.1) zwischen *MDM2* und *p53* macht *COPS3* zu einem interessanten Kandidatengen für die Region 17p (Henriksen *et al.*, 2003). In dieser Arbeitsgruppe wurde postuliert, dass eine Aberration, 17p12-17p11.2-Zugewinn, 12q12-12q15-Zugewinn oder 17p13.1-Verlust bzw. Mutation in *p53*, ausreicht, da alle Gene in der betroffenen Region bei der *p53*-vermittelten Apoptose involviert sind. Bei der Analyse von 61 Genen aus der Region konnte eine Amplifikation und signifikante Überexpression der Gene *COPS3* und *PMP22* beim Osteosarkom nachgewiesen werden (van Dartel und Hulsebos, 2004). In einer Studie mit 155 OS-Patienten konnte bei 31% der Fälle eine *COPS3*-Amplifikation beobachtet werden (Yan *et al.*, 2007). Desweiteren konnte hier die Amplifikation mit großer Tumorgröße sowie einer kürzeren Zeitspanne zur Metastasierung der Tumoren und somit mit einer schlechteren Prognose bei den Patienten korreliert werden. Die These, dass eine Aberration in der Region genügt, konnte hier nicht bestätigt werden, vielmehr wurden häufig gleichzeitig *COPS3*-Amplifikationen und *p53*-Mutationen in denselben Tumoren gefunden werden. Für die

Osteosarkomzelllinien OSA und U-2OS konnte eine moderate Expression des Gens *COPS3* bei normaler Kopienzahl beobachtet werden (Henriksen *et al.*, 2003). Bei den hier in der Arbeit benutzten 44k-Arrays ist das Gen *COPS3* nur durch ein Oligonukleotid repräsentiert, so dass keine Aussage über den Kopienzahlstatus des Gens getroffen werden konnte. Bei konstitutionellen Erkrankungen konnten Aberrationen in der Chromosomenregion 17p12-17p13 mit genomischer Instabilität assoziiert werden (Ji *et al.*, 2000). Zu den konstitutionellen Erkrankungen mit 17p-Aberrationen gehört zum Beispiel der autosomal-dominant vererbte Morbus Charcot-Marie-Tooth (Hereditäre motorisch-sensible Neuropathie Typ I), bei dem es im Gen *PMP22* zu einer Duplikation kommt (Hühne *et al.*, 1999; Kabzinska *et al.*, 2009). Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Zugewinne im Bereich 17p12-17p11.2 wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese der Osteosarkome spielen, der Zusammenhang zwischen Tumorgröße und kurzer Zeitspanne zur Metastasierung bei Amplifikationen von Genen aus der Region könnte auf ein späteres Ereignis bei der Tumorgenese hindeuten (siehe Abbildung 5.2).

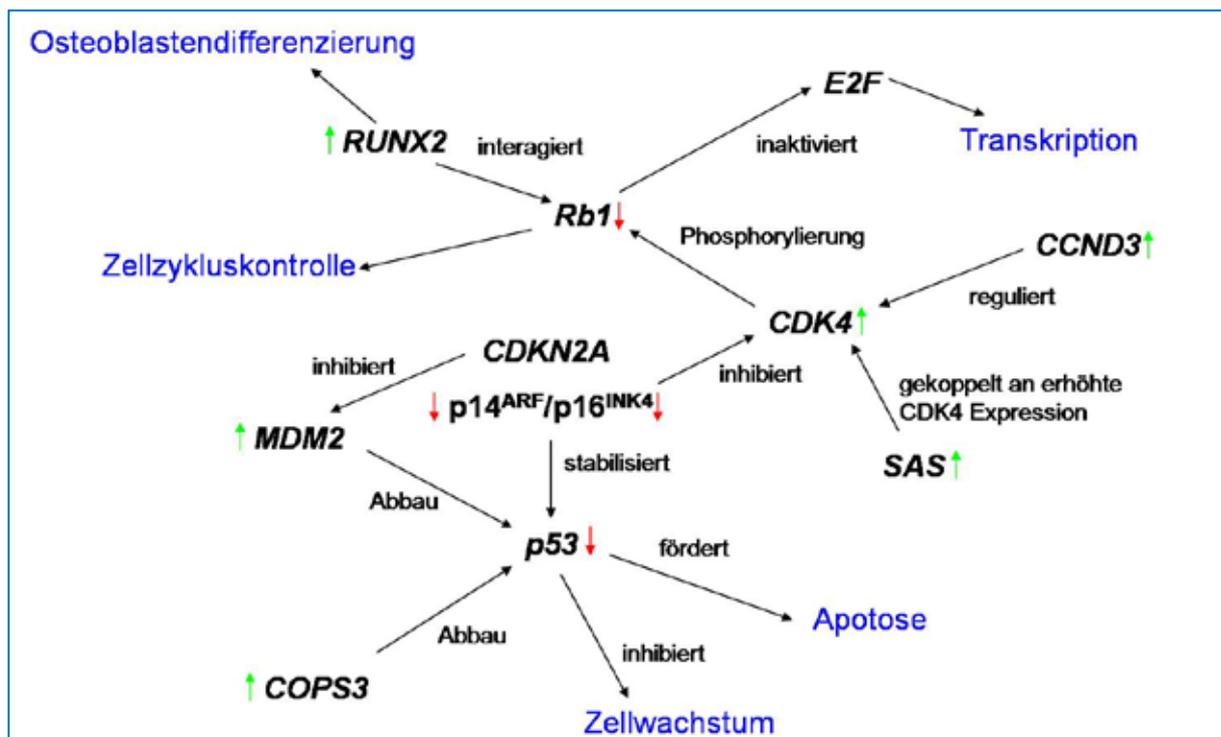


Abbildung 5.1: Ausschnitt über das komplexe Zusammenspiel molekulargenetischer Pfade bei der Tumorgenese der Osteosarkome. Grüner Pfeil=Amplifikation/Überexpression/Funktionszugewinn, roter Pfeil=Deletion/Mutation/Funktionsverlust.

5.2.6.4 Verluste 3q13.31

Zu Beginn dieser Arbeit waren noch keine Deletionen im Bereich 3q13.31 beschrieben, die sich mit der Rolle von *LSAMP* als potentiell Tumorsuppressor bei der Pathogenese der Osteosarkome beschäftigen. Das 'limbic system-associated membrane protein'-Gen (*LSAMP*) kodiert für ein neuronales Oberflächenprotein, das in den kortikalen und subkortikalen Regionen des limbischen Systems exprimiert wird. In dieser Arbeit konnten Deletionen in der chromosomalen Region 3q13.31 und speziell des *LSAMP*-Gens in 5 Zelllinien (26%) aufgedeckt und bestätigt werden. Es konnten heterozygote, sowie homozygote Deletionen des kompletten Gens identifiziert werden, des Weiteren wurde in einer Zelllinie eine homozygote partielle Deletion des Gens gefunden werden. Eine veränderte Kopienzahl oder ein Verlust der Heterozygotie des Chromosomes 3 wurden für Osteosarkome schon häufig beschrieben (Yamaguchi *et al.*, 1992; Tarkkanen *et al.*, 1995; Zielenska *et al.*, 2001; Ozaki *et al.*, 2002). Auf Grund des Auflösungsvermögens der eingesetzten Techniken wurde die kleine Deletion aber übersehen. Ein Verlust der Region 3q13.31 wurde 2007 bei der Zelllinie HOS beschrieben (Selvarajah *et al.*, 2007). Die Zelllinie wurde im Vergleich zu den Zelllinien MG63, SAOS2 und U-2OS mittels aCGH und multicolor-Banding auf gemeinsame Mikroaberrationen untersucht. Da die übrigen Zelllinien keine Deletion im Bereich 3q13.31 aufweisen wurde diese Region nicht genauer betrachtet. In einer Studie einer Kooperation mehrerer Arbeitsgruppen, aus Oslo, Düsseldorf und Bologna, die innerhalb des EU-Verbundes EuroBoNet an Knochentumoren forschen, wurden 36 Patienten mit Osteosarkom und 20 Zelllinien mittels aCGH mit einem BAC/PAC-Array mit einer Auflösung von 1 Mb analysiert (Kresse *et al.*, 2009). Hierbei zeigte sich in 56% der Fälle eine Deletion eines Klons in der Chromosomenregion 3q13.31. Nach zusätzlichen Analysen mit quantitativer real time RT-PCR und Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung zeigte sich, dass das Gen *LSAMP* ein potentieller Kandidat für ein neues Tumorsuppressorgen beim Osteosarkom ist. Die Expression des Gens war im Vergleich zu normalen Knochenproben in 6/15 Tumoren und in 5/9 Zelllinien mit *LSAMP*-Deletion und in 5/14 Tumoren und 3/11 Zelllinien mit einer normalen Kopienzahl oder einem Zugewinn heruntersgesetzt. Eine partielle oder komplette Methylierung des Promotors von *LSAMP* konnte bei 3/30 Tumoren und 7/20 Zelllinien bei den untersuchten CpG-Inseln gezeigt werden. Eine Methylierung des Promotors hat zur Folge, dass das Gen nicht mehr abgelesen werden kann, bei Tumorsuppressorgen wird somit auch

die zellzykluskontrollierende Funktion abgeschaltet. In dieser Studie konnte außerdem eine geringe Expression von *LSAMP* mit einer niedrigen Überlebensrate assoziiert werden. In einer weiteren Studie einer Arbeitsgruppe aus Taiwan, die kurz darauf publiziert wurde, wurden 37 Patienten und 5 Zelllinien mittels SNP-Arrays, FISH und qRT-PCR untersucht, auch hier konnte die Deletion und reduzierte Expression von *LSAMP* nachgewiesen werden (Yen *et al.*, 2009). Die identifizierten Deletionen der Region 3q13.31 wurden hier in Typ I und Typ II Deletionen unterteilt. Typ I Deletionen betrafen hierbei die Region 118,05-118,13 Mb und Typ II Deletionen die größere Region 117,46-118,13 Mb. Bei 6/11 (54%) primären Tumoren und 3/5 (60%) Zelllinien konnten sowohl hetero-, als auch homozygote Deletionen des Gens mit FISH nachgewiesen werden. Die homozygote Deletion von *LSAMP* in der Zelllinie HOS, die innerhalb dieser Arbeit gefunden wurde, wurde auch hier beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass diese Deletionen somatischer Natur waren, da sie in DNAs aus peripheren Blutlymphozyten der Patienten nicht gefunden werden konnten. Die aktuellste Publikation einer Arbeitsgruppe aus Toronto bestärkt ebenfalls die These, dass es sich bei *LSAMP* um ein Tumorsuppressorgen beim Osteosarkom handelt (Pasic *et al.*, 2010). In dieser Studie wurden 49 Kinder, Jugendliche und junge Erwachsene unter 31 Jahren mit Osteosarkom, sowie die Zelllinien U2-OS, SAOS2, HOS und MNNG-HOS untersucht. Die Patientenproben wurden zum Teil mittels DNA-Microarrays (Affymetrix genome-wide 6.0 Microarrays), qRT-PCR-Analysen oder FISH-Analysen analysiert. Bei 51,9% der Patienten konnte mittels Microarrayanalyse ein Verlust der chromosomalen Region 3q13.31 festgestellt werden. Durch die parallele Analyse von Blut-DNA der Patienten wurde gezeigt, dass es sich bei den Kopienzahlveränderungen dieser Region um ein *de novo* Ereignis handelt. Die Überlappungsregion der Deletionen wurde mit einer Größe von etwa 0,5 Mb zwischen 117,8-118,3 Mb eingegrenzt. Dies entspricht in etwa der Region der Typ II Deletionen, die von Yen *et al.*, 2009 beschrieben wurden. Über qPCR-Analysen konnte gezeigt werden, dass heterozygote Deletionen der Region weitaus häufiger sind als homozygote Verluste. Desweiteren zeigte sich, dass ein Verlust der Heterozygotie häufig in Tumoren mit homozygoten Deletionen vorliegt. Die betroffene Region enthält neben dem Gen *LSAMP* auch die nicht-kodierenden RNAs (ncRNAs) *LOC285194* und *BC040587*. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Gene in Osteoblasten exprimiert werden, was eine mögliche Rolle bei der Knochenentwicklung der Gene bedeuten könnte. Die Expression von *LSAMP*

war in 64,6%, die von *LOC285194* in 81,2% und die von *BC040587* in 77,1% der analysierten Proben heruntergesetzt. Es wurde bereits gezeigt, dass eine verringerte Expression von *LSAMP* mit einer schlechteren Überlebensrate assoziiert ist (Kresse *et al.*, 2009; Yen *et al.*, 2009), in dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Deletionen von *LOC285194* und *BC040587* ebenfalls mit einer dramatische Abnahme der Überlebensrate assoziiert sind. Bei Fällen mit einer Überexpression des Gens konnte jedoch nicht gezeigt werden, dass die erhöhte Expression Effekte auf Proliferation, Überleben, Zellzykluskontrolle oder Apoptoserate hatte, es konnte aber gezeigt werden, dass der Abbau von *LSAMP* und *LOC285194* einen Anstieg der Zellpopulationen in der G₁- oder S-Phase und somit einen Anstieg der Proliferation der untersuchten Osteoblasten zur Folge hatte. Dies weist darauf hin, dass diese Gene eine Funktion als Wachstumssuppressor innehaben. Unabhängig von einander wurde von drei Arbeitsgruppen gezeigt, dass die Deletion von 3q13.31 eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Osteosarkome spielt.

Auch bei anderen Tumoren wurde *LSAMP* als Tumorsuppressorgen beschrieben. So ist es beim Nierenzellkarzinom als Translokationspartner von *NORE1* (*RASSF5*, 'Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 5') in der Translokation t(1;3)(q32.1;q13.3) beteiligt (Chen *et al.*, 2003b). Hierdurch wird die Expression von *LSAMP* und *NORE1* heruntergesetzt, was eine erhöhte Zellproliferation zur Folge hat. Das Expressionslevel von Mitgliedern der IgLON-Familie (Immunoglobulin-Superfamilie-Untergruppe mit *LSAMP*, *OPCML* & *NTM*) ist ebenso bei epithelialen Ovarialkarzinomen signifikant herunter gesetzt (Ntougkos *et al.*, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass das Expressionslevel von *LSAMP* negativ mit dem Gesamtüberleben der Patienten verknüpft ist. Diese verschiedenen Analysen zeigen, dass *LSAMP* mit einer Deletionsrate von bis zu 60% und einem verringerten Expressionslevel in bis zu 65 % der untersuchten Fälle, ein gutes Kandidatengen als Tumorsuppressor beim Osteosarkom ist. Das Zusammenspiel mit *LOC285194* und *BC040587* als putative Tumorsuppressoreinheit bedarf noch genauerer Abklärung.

5.2.6.5 Verluste 9p21.3, 13q14.2 und 17p13.1

Beim Osteosarkom sind häufige Verluste in den Bereichen der Chromosomen 9p, 13q und 17p beschrieben (Bridge *et al.*, 1997; Sandberg und Bridge, 2003). In diesen Regionen befinden sich die Tumorsuppressorgene *CDKN2A*, *RB1* und *p53*, die alle eine wichtige Rolle bei der Zellzykluskontrolle spielen. Das Gen *CDKN2A* ('cyclin-

dependent kinase inhibitor 2A') oder der sogenannte *INK4a/ARF*-Lokus ist lokalisiert auf Chromosom 9p21.3 und kodiert die Proteine p16^{INK4A} und p14^{ARF}. Diese verschiedenen Proteine werden über bicistronische Transkription und differentielles Spleißen über ein alternatives Leseraster hergestellt (Quelle *et al.*, 1995; Sharpless, 2004). p16^{INK4A} und p14^{ARF} stabilisieren das p53-Protein durch Inhibition von *CDK4* oder *MDM2* (siehe Abbildung 5.1), infolgedessen kommt es zu einem Zellzyklusarrest in der G₁-Phase (Benassi *et al.*, 1999; Maitra *et al.*, 2001). Die Phosphorylierung von *RB1* durch *CDK4* wird ebenfalls gehemmt und somit wird ein weiterer Kontrollmechanismus abgeschaltet (Swanton, 2004). Über Deletionen oder Mutationen in dem Gen *CDKN2A* kommt es also sowohl zu einer herabgesetzten Aktivität von p53, als auch von RB1. Bei Osteosarkomen wurde eine Inaktivierung des Gens *CDKN2A* in 10%-15% der Patienten beobachtet (Maelandsmo *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1996a; Nielsen *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 1999). Hierbei wurden Deletionen des Gens häufiger detektiert als Punktmutationen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte der homozygote Verlust von *CDKN2A* in 32% der Zelllinien und der heterozygote Verlust des Gens in 37% der Zelllinien detektiert werden. Ein heterozygoter Verlust trat oft parallel mit einer Amplifikation der Gene *MDM2* oder *CDK4* auf, homozygote Deletionen des Gens konnten eher bei Zelllinien mit normaler Kopienzahl für die Gene der Region 12q detektiert werden.

Ein Tumorsuppressorgen bei dem ebenfalls häufig Aberrationen beim Osteosarkom beobachtet wurden ist *RB1* ('retinoblastoma 1'), welches auf Chromosom 13q14.2 lokalisiert ist. Das Gen reguliert den Übergang von G₁- zu S-Phase, indem es an Gene der E2F-Familie bindet und diese inaktiviert (Nevins *et al.*, 1997; Sharpless, 2004). Die Gene der E2F-Familie fungieren als Transkriptionsfaktoren und haben somit regulatorischen Einfluss während des Zellzyklus (Chen *et al.*, 2009). Die Suppression der Funktion wird erst aufgehoben, wenn *RB1* durch den CDK4/Cyclin D1-Komplex phosphoryliert wird (Abbildung 5.1). Eine Funktion von *RB1* während der mitotischen Progression, der Segregation der Chromosomen und Chromatinremodellierung, die dem Erhaltung der genomischen Integrität dient konnte ebenfalls gezeigt werden (Zheng und Lee, 2001). Beim Retinoblastom, einem malignem Tumor der Retina, der bei Kindern bis zum 5. Lebensjahr auftritt, kommt es zu Mutationen in diesem Gen. Etwa 45% der Retinoblastompatienten haben die erbliche Form der Erkrankung, die erste Mutation im Gen *RB1* wurde autosomal-dominant vererbt, jedoch liegt eine unvollständige Penetranz vor. In nahezu 95%

dieser Patienten kommt es zu einer zweiten somatischen Mutation. Der zweite Verlust eines funktionstüchtigen Allels löst die Entstehung des Tumors aus. Patienten mit hereditärem Retinoblastom haben verglichen mit der Normalbevölkerung ein 1000-fach erhöhtes Risiko an einem Osteosarkom zu erkranken (Kitchin und Ellsworth, 1974; Abramson *et al.*, 1979; Abramson *et al.*, 1984; Longhi *et al.*, 2001). Sporadische Osteosarkome zeigen in bis zu 70% der Fälle Aberrationen im Gen *RB1* (Araki *et al.*, 1991; Scholz *et al.*, 1992; Wadayama *et al.*, 1994; Sandberg und Bridge, 2003). Ein Verlust der Heterozygotie liegt bei 39-70% der Tumore vor (Yamaguchi *et al.*, 1992; Feugeas *et al.*, 1996; Heinsohn *et al.*, 2007). Strukturelle Rearrangements (30%) und Punktmutationen (10%) treten seltener auf (Araki *et al.*, 1991; Wunder *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1996b; Wadayama *et al.*, 1994). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass ein Verlust der Heterozygotie mit einer schlechteren Prognose bei Osteosarkompatienten korreliert (Feugeas *et al.*, 1996; Benassi *et al.*, 1999; Marina *et al.*, 2004). Eine heterozygote Deletion des Gens *RB1* lag in 58% der im Rahmen dieser Arbeit analysierten Zelllinien vor. Zusätzlich lagen bei den zwei Zelllinien OHS und TPXM Brüche in dem Gen vor, die ebenfalls mit einem Funktionsverlust des Gens assoziiert sein könnten.

Eines der wichtigsten Tumorsuppressorgene ist *p53*, welches auf Chromosom 17p13.1 lokalisiert ist. Eine Veränderung von diesem Gen ist bei der Tumorgenese vieler Tumorentitäten involviert (McBride *et al.*, 1986; Levine *et al.*, 1991; Hollstein *et al.*, 1991; Bennett *et al.*, 1992; Olivier *et al.*, 2010). Es kodiert für ein DNA-bindendes Protein, welches über eine Transkriptionsaktivierende-, eine DNA-bindende- und eine Oligomerisierungsdomäne verfügt. Das *p53*-Protein induziert die Transkription einer Vielzahl von Genen, die bei der Zellzykluskontrolle oder Apoptose involviert sind (Hung und Anderson, 1997; el-Deiry, 1998). Neuere Studien konnten eine zusätzliche Rolle von *p53* bei der Inhibierung der Angiogenese zeigen (Teodoro *et al.*, 2007; Yamakuchi *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010). Beim Osteosarkom kann ein Funktionsverlust des Gens *p53* sowohl durch Allelverlust (75-80%) und Genrearrangements (10-20%), als auch durch Punktmutationen (20-30%) erfolgen (Toguchida *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 1996b; Radig *et al.*, 1998). Hierbei machen Missensmutationen in Exon 5-8 den Hauptteil der Punktmutationen aus (Gokgoz *et al.*, 2001; Ragland *et al.*, 2002). Der Abbau des Gens *p53* wird von den Genen *MDM2* und *CDK4* gefördert und durch Inhibierung der beiden Gene durch *CDKN2A* verhindert (Abbildung 5.1). Bei Osteosarkompatienten konnten in vielen Studien

Aberrationen von *p53* in 15-50% der Fälle gezeigt werden (Masuda *et al.*, 1987; Guo *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1996b; Lonardo *et al.*, 1997; Gokgoz *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2004). Die Alterationen treten bereits in den Primärtumoren auf, so dass sie wahrscheinlich frühe Ereignisse bei der Tumorentstehung der Osteosarkome sind (Sandberg und Bridge, 2003). Ein erhöhtes Risiko an einem Osteosarkom zu erkranken konnte bei Patienten mit dem Li-Fraumeni-Syndrom beobachtet werden (McIntyre *et al.*, 1994). Bei dieser Erkrankung, die mit multiplen Tumoren einhergeht tragen die Patienten eine Keimbahnmutation im *p53*-Gen (Li *et al.*, 1988; Srivastava *et al.*, 1990). Bei Patienten mit sporadischem Osteosarkom konnte eine Keimbahnmutation bei 3% beobachtet werden (Kleihues *et al.*, 1997). Studien zur prognostischen Signifikanz von *p53*-Mutationen konnten eine schlechtere Prognose mit dem Funktionsverlust von *p53* korrelieren (Pakos *et al.*, 2004; Wunder *et al.*, 2005; Bakhshi und Radhakrishnan, 2010). In dieser Arbeit konnte eine heterozygote Deletion nur bei den 5 (26%) Zelllinien KPD, MOS, SAOS2, SARG und U2-OS beobachtet werden. Bei diesen Zelllinien lag meist keine parallele Amplifikation der Gene *CDK4* und *MDM2* vor. Desweiteren konnten in den 5 (26%) Zelllinien HAL, KPD, OS10, OS15, SAOS2 Brüche im Gen *p53* beobachtet werden, die auch zu einer Inaktivierung führen könnten. Insgesamt könnte die Funktion des Gens also bei 8 (42%) Zelllinien gestört sein. Eine ausführliche Studie zu *p53*-Mutationen bei den Osteosarkomzelllinien zeigte eine Mutation in sieben von siebzehn (41%) analysierten Osteosarkomzelllinien. Es handelt sich hierbei um die Zelllinien HOS, MOS, OHS, OS10, OS18, SAOS2 und SARG (Ottaviano *et al.*, 2010). Da nicht alle Zelllinien von *p53*-Alterationen betroffen waren ist es möglich, dass die Zellzykluskontrolle über Veränderungen in anderen Genen wie zum Beispiel *MDM2*, *CDK4*, *CDKN2A* oder *RB1* umgangen wird.

5.3 Entstehung und Progression der Osteosarkome

Die in Abschnitt 5.2 beschriebenen Veränderungen zeigen das komplexe Zusammenspiel von Genen, die bei der Entstehung der Osteosarkome beteiligt sind. Einige Veränderungen stellen eher frühe Ereignisse bei der Tumorgenese dar und andere hängen mit der Progression und Metastasierung zusammen. Einen zusammenfassenden Überblick der in dieser Arbeit beschriebenen putativen Mechanismen bei der Tumorgenese soll Abbildung 5.2 geben. Bisher konnten fast nur Gene identifiziert werden, die auch bei anderen Tumoren eine Rolle bei der

Pathogenese spielen. Gene, die als Marker dienen könnten, die die spezifische Diagnose beim Osteosarkom erleichtern würden konnten bis jetzt noch nicht identifiziert werden.

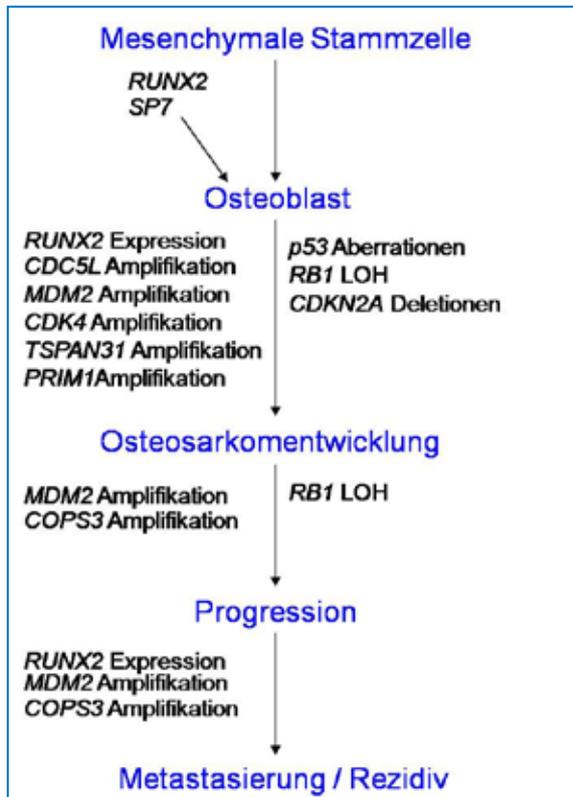


Abbildung 5.2: Überblick der genetischen Mechanismen bei der Entstehung und Progression vom Osteosarkom nach Papachristou und Papavassiliou, 2007. LOH=Verlust der Heterozygotie.

5.4 Ursachen von Zugewinnen und Verlusten chromosomalen Materials - Chromosomeninstabilität

Die chromosomale Instabilität ist eines der fundamentalsten Merkmale von humanen Tumorzellen. Besonders bei soliden Tumoren wird oft eine Heterogenität der Karyotypen beschrieben. Genamplifikationen mit den zytogenetisch identifizierbaren Strukturen der extrachromosomalen 'double minutes' (DMs) oder auch doppelte Kleine und den intrachromosomalen 'homogeneously staining regions' (HSRs) bzw. homogen anfärbaren Regionen werden häufig beobachtet. 'Double minutes' sind einige Mb große acentrisch-atelomerische Doppel-Chromatinstücke (Spriggs *et al.*, 1962; Mark, 1967; Kaufman *et al.*, 1979; Barker, 1982; Stark und Wahl, 1984). Sie besitzen einen Durchmesser von 0,3-0,5 μm und werden nur bei Tumoren beobachtet (Barker *et al.*, 1980 und stellen hier eher frühe Ereignisse vor den HSRs dar (Reddy, 2007). Ursprünglich nahm man an, dass sie *de novo* bei jeder Mitose (Levan *et al.*, 1976) oder durch Fragmentierung aus den HSRs (Balaban-Malenbaum

und Gilbert, 1977) entstehen. Die Theorie, dass DMs aus intramolekularer homologer Rekombination und Dimerisierung von Episomen hervorgehen, wurde von Carroll *et al.*, 1988 im 'Episomenmodell' aufgestellt und später bestätigt (Schoenlein *et al.*, 1992). Episomen sind etwa 250 kb große circuläre extrachromosomale Strukturen, die durch chromosomale Deletionen entstehen (von Hoff *et al.*, 1988; Wahl, 1989). Sie sind in ihrer ursprünglichen Form zu klein für die konventionelle Lichtmikroskopie und können so bei der Chromosomenbandenanalyse nicht detektiert werden (Carroll *et al.*, 1987; Maurer *et al.*, 1987; Windle *et al.*, 1991). Carroll *et al.* konnten 1987 und 1993 zeigen, dass sie einen eigenen Replikationsursprung besitzen, der dem der Chromosomen gleicht. Solch einen 'origin of replication (ORI)' konnte man auch bei DMs nachweisen, ebenso, dass sie einmal pro Zellteilungszyklus in früher oder mittlerer S-Phase mitrepliziert werden (Barker *et al.*, 1980; Barker, 1982; Stark und Wahl, 1984). Ebenso verfügen sie über eine sogenannte 'Matrix attachment region' (MAR) mit deren Hilfe sie sich von der Anaphase bis zur Telophase distal an die Chromosomen anheften können (Kanda *et al.*, 2001; Shimizu *et al.*, 2001; Jenke *et al.*, 2004), die mitotische Segregation der DMs ist dennoch zufällig. Sowohl die Gabe von Hydroxyharnstoff bei vorgeschrittenen Ovarialkarzinomen (Raymond *et al.*, 2001), als auch ionisierende Strahlung bei Colonkarzinomen reduzierte die Anzahl der DMs (Schoenlein *et al.*, 2003). Sie werden hierbei über Micronuclei aus Zelle eliminiert, dies wurde z.B. bei Neuroblastomen beobachtet (Valent *et al.*, 2001). HSRs werden im Gegensatz zu den DMS eher bei hochgradigen Tumoren mit komplexen Karyotypen, wie bei den Osteosarkomen beobachtet (Wahl, 1989; Benner *et al.*, 1991; Menghi-Sartorio *et al.*, 2001) und kaum bei Tumoren mit spezifischen Aberrationen, wie z.B. rekurrenten Translokationen (Gisselsson *et al.*, 2000; Myllykangas und Knuutila, 2006). HSRs sind Regionen auf einem Chromosom, bei denen kein typisches G-Bandenmuster vorliegt, die Banden also homogen erscheinen (Biedler und Spengler, 1976; Hamlin *et al.*, 1984). Diese Regionen werden normal repliziert (Stark und Wahl, 1984). Man kann sich sowohl vorstellen, dass HSRs durch Reintegration von DMs in das Chromosom entstehen (Kohl *et al.*, 1983), als auch dass sie direkt im Chromosom entstehen. Das anerkannteste Modell für die intrachromosomale Entstehung ist das des 'Breakage-Fusion-Bridge-Cycle' (BFB) (McClintock, 1941, McClintock, 1951; Debatisse und Malfoy, 2005). Hierbei wird postuliert, dass einem Chromosomendoppelstrangbruch die Replikation und End-zu-End-Fusion von Schwesterchromatiden folgt. Hierdurch werden mitotisch

instabile dicentrische Chromosomen oder Ringchromosomen generiert. Dies wiederum führt zu einer Anaphasenbrückenformation und einem erneuten Bruch in der Nähe des ersten Bruches (Gisselsson *et al.*, 2000). Multiple Zyklen dieser Bruch-Fusion-Brückenformationsereignisse führen zu einer Multiplikation von Genen nahe der Bruchpunkte (Abbildung 5.3). Die BFB-auslösenden Chromosomendoppelstrangbrüche (Smith *et al.*, 1992; Toledo *et al.*, 1992; Toledo *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 1993; Poupon *et al.*, 1996) können durch verschiedene Faktoren wie Folsäure-Defizienz (Crott *et al.*, 2001; Kimura *et al.*, 2004), Telomerfehlfunktionen, die zu genomischer Instabilität führen (Gisselsson, 2003) und Hypoxie (Coquelle *et al.*, 1998) begünstigt werden. Folsäure ist die Vorstufe des Coenzym Tetrahydrofolsäure (THF), welches wichtig bei der Synthese von Purinbasen während DNA-Replikation ist.

Telomere sind die 5-15 kb langen einzelsträngigen Chromosomenenden aus TTAGGG-Repeats (Allshire *et al.*, 1988). Sie schützen die Chromosomenenden und beugen Chromosomenfusionen vor (de Lange T., 1995; Blackburn, 2001). Eine Verkürzung, um 40-50 bp pro Zellgeneration führt zur Unfähigkeit die schützende Kappe zu formen, was ab einer kritischen Länge von 4 kb zu Seneszenz und Apoptose der Zellen führt (Albertson, 2006; Karlseder *et al.*, 2002). In Keimbahnzellen werden die Telomere durch das Enzym Telomerase verlängert (Greider und Blackburn, 1985; Yu und Blackburn, 1991; McEachern *et al.*, 2000), in somatischen Zellen kommt es zur Verkürzung durch eingestellte Telomeraseaktivität. Der Verlust der Schutzfunktion der Telomere führt zu Schwesterchromatidfusionen und dadurch zu BFB-Zyklen (Murnane, 2006). In Tumoren wurde eine Telomeraseaktivität beobachtet, was zu erhöhter Wachstumsaktivität oder Immortalität der Tumorzellen führt (Counter *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1994; Harley, 1995; Shay und Wright, 1996). Bei Tumoren ohne Telomeraseaktivität konnte ein alternativer Mechanismus beobachtet werden, der zu Verlängerung der Telomere führt (Murnane *et al.*, 1994; Bryan *et al.*, 1995; Bryan *et al.*, 1997). Beim ALT-Mechanismus ('alternative lengthening of telomeres') werden die Telomere über Rekombination durch intrachromosomale Austausch von Telomersequenzen verlängert, der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht bekannt (Dunham *et al.*, 2000). ALT wurde häufig bei Osteosarkomen beobachtet und ist hier mit Telomerfehlfunktionen und chromosomaler Instabilität assoziiert (Scheel *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu Osteosarkomen mit Telomeraseaktivität zeigen die Osteosarkome

mit ALT-Phänotyp höhere Proportionen und eine höhere Gesamtzahl von komplexen Rearrangements (Scheel und Poremba, 2002). Gisselsson und Kollegen konnten zeigen, dass eine kurze Telomerrepeatlänge bei malignen Tumoren zu terminalen Brüchen führt (Gisselsson *et al.*, 2001). Hierbei fusionieren vorzugsweise die Chromosomenarme mit den kürzesten Telomeren und sind somit BFB-Zyklen ausgesetzt (der-Sarkissian *et al.*, 2004). Bei gesunden Individuen sind die Telomerlängen heterogen zwischen den verschiedenen Chromosomen, aber gleich bei allen Zellen eines Individuums (Londoño-Vallejo, 2004). Die initiale Verteilung der Telomerlängen könnte somit den Karyotyp von Tumoren bestimmen. Das Fehlen der Telomerverlängerungsmechanismen über Telomerase oder ALT ist bei Patienten mit Osteosarkom mit einem längeren krankheitsfreien Überleben assoziiert (Ulaner *et al.*, 2003; Sanders *et al.*, 2004). Die Telomerfehlfunktionen stellen also einen wichtigen Schritt bei der Tumorgenese der Osteosarkome dar.

Doppelstrangbrüche (DSB) sind desweiteren oft an sogenannten 'common fragile sites' (CFS), also häufigen fragilen Stellen, beschrieben (Coquelle *et al.*, 1997; Ciullo *et al.*, 2002; Hellman *et al.*, 2002). Diese fragilen Stellen sind langsam replizierende Bereiche, die anfällig für spontane Brüche in der S-Phase sind (Arlt *et al.*, 2004). Der Konsum von Tabak, Ethanol und Koffein induziert DSBs an CFS (Ban *et al.*, 1995; Kuwano und Kajii, 1987; Rao *et al.*, 1988). Beim BFB brechen die Anaphasenbrücken meist an spezifischen Stellen, was ein Hinweis auf fragile Stellen sein könnte (Shimizu *et al.*, 2005).

Bei der Zellteilung werden die instabilen Chromosomen, die über die BFBs entstehen auf die Tochterzellen verteilt. So bekommt eine Tochterzelle das Chromosom mit der Duplikation und eines das mit der Deletion (Murnane, 2006)(Abbildung 5.3). Die in die BFB involvierten Chromosomen nehmen immer wieder an BFBs teil. Die Anaphasenbrücken sind hochelastisch, die Länge der Spindelachsen bestimmt Länge der HSRs und begrenzt somit die Anzahl der Zyklen (Shimizu *et al.*, 2005). Die Repeats in den HSRs sind palindromisch organisiert (Saunders *et al.*, 2000; Shuster *et al.*, 2000; Gisselsson *et al.*, 2000; Ciullo *et al.*, 2002; Hellman *et al.*, 2002), was ein weiteres Indiz für die Entstehung der HSRs über BFB-Zyklen ist.

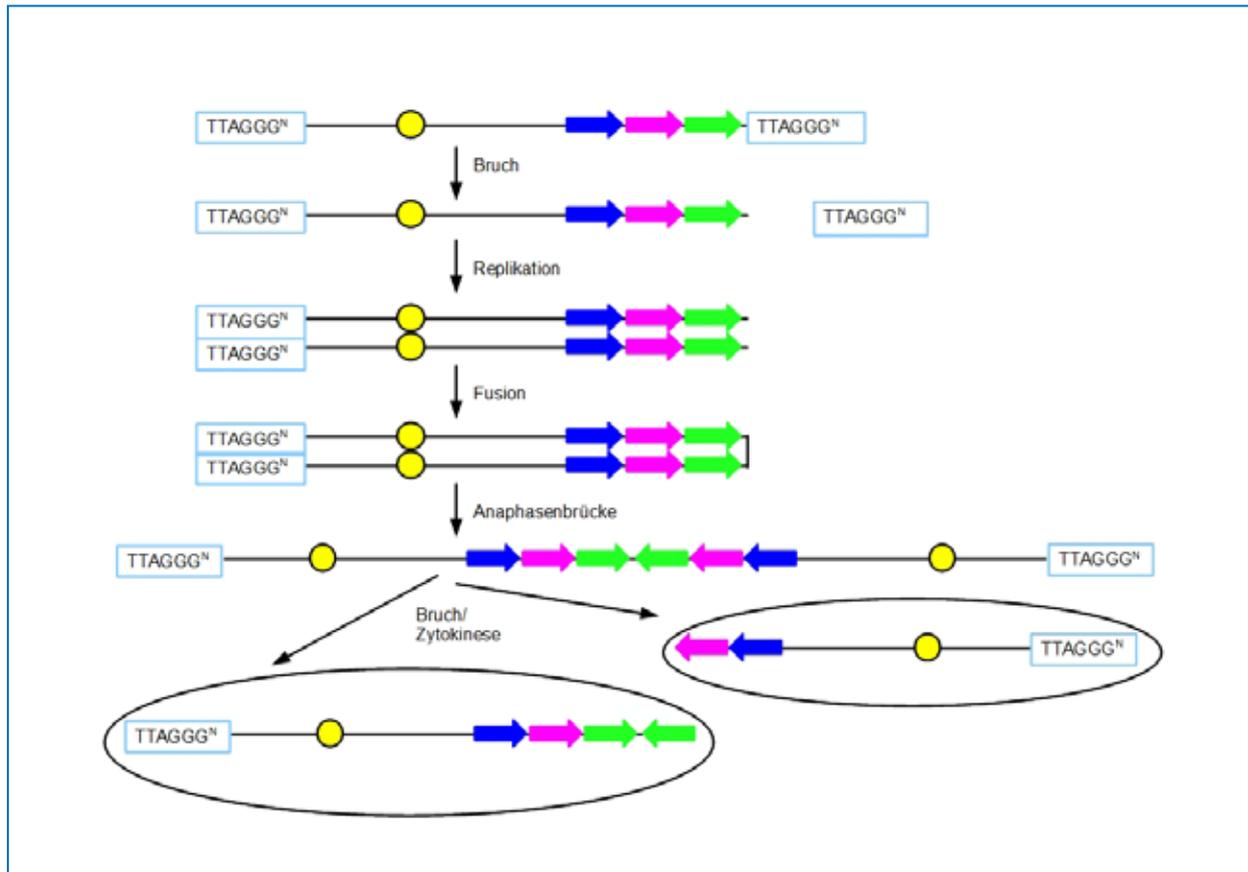


Abbildung 5.3: BFB-Zyklus nach McClintock. Dargestellt ist zuerst das intakte Chromosom mit Telomeren (TTAGGG^N), dem Centromer (gelber Kreis) und einigen Genen (blauer, pinker und grüner Pfeil). Der primäre Verlust eines Telomers erfolgt über einen Chromosomendoppelstrangbruch. Nach der Replikation lagern sich die Chromosomenenden ohne Telomere aneinander. Während der Anaphase werden Brücken ausgebildet, da das dicentriche Chromosom mit jedem Centromer zu den Spindelpolen gezogen wird. Die Anaphasenbrücken brechen und es entstehen sowohl Chromosomen mit Duplikation, als auch mit Gen-Deletionen. Die Chromosomen nehmen immer wieder an BFBs teil, bis die Länge der Spindeln die Größe der entstandenen HSRs begrenzt.

Die vorerst instabilen Chromosomen, die durch die BFBs entstehen, werden in komplex aberranten Tumoren weniger eliminiert, als bei normalen Zellen, in denen sie durch γ -Strahlung induziert worden sind. Die erhöhte Toleranz der DNA-Schädigung führt zu konstanter genomischer Reorganisation und damit zu klonaler Evolution und Progression (Gisselsson *et al.*, 2000).

Eine weitere Voraussetzung für BFBs ist eine Störung an ein oder mehreren Stellen des Zellzyklus-Kontrollpunkt-Systems z.B. durch eine Mutation in *p53* (5.2.6.5), die häufig bei Osteosarkomen gefunden werden (Gisselsson *et al.*, 2000). Hoch maligne komplex aberrante Tumoren wie das Osteosarkom zeigen mehr Anaphasenbrückenkondensationen (ABC) und oft dicentriche Chromosomen. Eine

Tumorprogression sowohl in benignen als auch malignen Tumoren durch ständig wiederholende BFBs ist bei vielen Entitäten wie bei der Colitis ulcerosa (O'Sullivan *et al.*, 2002), dem Ovarialkarzinom (Höglund *et al.*, 2003), beim Renalzellkarzinom (Gisselsson *et al.*, 2004a), dem Mammakarzinom (Chin *et al.*, 2004) und auch bei Knochen- und Weichteilsarkomen (Gisselsson *et al.*, 2004b) beschrieben worden. Bei den Osteosarkomzelllinien HOS, SAOS2, U-2OS und MG63 konnte eine erhöhte Anzahl von Anaphasenbrücken (10,3%-35,7%), dicentrischen Chromosomen (1,8-3,5 auf 46 Chromosomen), centrosomalen Anomalien und multipolaren mitotischen Figuren nachgewiesen werden (Selvarajah *et al.*, 2006). In der gleichen Arbeit wurde postuliert, dass die Breakage-Fusion-Bridge-Zyklen für die chromosomale Instabilität (CIN) bei Osteosarkom verantwortlich sind. Die zahlreichen Bruchereignisse und strukturellen chromosomalen Aberrationen hängen direkt mit der chromosomalen Instabilität und mit Fehlern im DNA-Reparaturmechanismus zusammen. Nach einem Bruchereignis werden zwei instabile Chromosomenstücke frei, die in der Regel durch Reparaturmechanismen ohne Verluste wieder zusammengefügt und repariert werden. Bei mehreren Bruchereignissen kann der Reparaturmechanismus die einzelnen Bruchenden mitunter nicht mehr unterscheiden und es kann zu Verlusten von Bruchstücken oder aber falschen Chromosomenverbindungen kommen. Auf diese Weise können Translokationen, Inversionen und Insertionen oder aber dicentrische Chromosomen entstehen (Jackson, 2002).

5.5 Veränderungen des Mitoseapparates

Mono- oder Polysomien einzelner Chromosomen können über eine mitotische 'Non-Disjunction', also eine fehlende Trennung der Schwesterchromatiden während der Metaphase entstehen. Aneuploidien oder Polyploidien gehen eher auf Probleme beim Aufbau des Mitoseapparates zurück. Die Centrosomen spielen bei der Organisation der mitotischen Spindeln, bipolaren Chromosomensegregation und dem Erhalt der genetischen Stabilität eine fundamentale Rolle (Giehl *et al.*, 2005; Fabarius *et al.*, 2008). Sie sind zelluläre Organellen, die aus je aus einem Paar rechtwinklig angeordneter zylinderförmiger Microtubuli, den sogenannten Centriolen bestehen (Bornens, 2002). Die Centriolen sind in der amorphen pericentriolaren Matrix eingebettet (Andersen *et al.*, 2003). Die Duplikation der Centrosomen erfolgt während der S-Phase und wird durch die Proteine CDK2 und RB1 gesteuert (Krämer und Ho, 2001). In der Prophase wandern die Centriolen zu den Zellpolen. Um die

Centriolen herum findet man in der Metaphase sternförmig angeordnete Microtubuli-Bündel, die Astralfasern, und zwischen den Centriolen ausgespannt die Kinetochor-Microtubuli, also die Teilungsspindeln und die Polfasern, mit denen die Centriolen untereinander in Kontakt stehen (Seyffert und Balling, 1998). Veränderungen in G₁- oder S-Phase-Regulatoren, wie *CDKN2A*, *p53* und *RB1* könnten somit auch die Centrosomenfunktion beeinflussen. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Centrosomen als regulatorische Einheiten bei der Mitose dienen (Tritarelli *et al.*, 2004). Ein Defekt der Einfluss auf die Centrosomenfunktion hat könnte also die Zellproliferation beeinflussen (Krämer *et al.*, 2004). Über die immunhistologischen Untersuchungen mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung gegen Pericentrin und α -Tubulin konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass 63% der Zelllinien über numerisch aberrante Centrosomen verfügen. Bei fünf Zelllinien lag ein 'clustering', also eine Gruppierung der Centrosomen vor. Bei normalen Zellen führen überzählige Centrosomen zu multipolaren Spindeln und die aberranten Zellen gehen in Apoptose. In Tumorzellen allerdings liegen häufig zusätzliche Centrosomen vor, dennoch können sich die Zellen normal teilen (Godinho *et al.*, 2009). Die Gruppierung von Centrosomen wurde bei soliden Tumoren und hämatologischen Neoplasien häufig beobachtet (Lingle *et al.*, 1998; Giehl *et al.*, 2005). Bei einer kleinen Anzahl überzähliger Centrosomen gehen wenige Zellen multipolare Mitosen ein und sterben, was einen minimalen Einfluss auf das Tumorwachstum haben sollte. In Tumoren mit einer vermehrten Anzahl zusätzlicher Centrosomen kommt es durch die Entfernung von überzähligen Centrosomen, Centrosomeninaktivierung oder Gruppierung der Centrosomen zu einer normalen bipolaren Teilung (Ring *et al.*, 1982; Duensing, 2005; Godinho *et al.*, 2009). Die Gruppierung der Centrosomen ist ein komplexer Prozess bei dem eine Vielzahl von Proteinen mit unterschiedlichen zellulären Funktionen involviert ist (Gergely und Basto, 2008). Die Gruppierung der Centrosomen kann durch das Zytotoxin Griseofulvin aufgehoben werden, was bei der Therapie von Tumoren ein vielversprechender Ansatz ist (Rebacz *et al.*, 2007; Krämer *et al.*, 2008; Rønneest *et al.*, 2009). Eine erhöhte Anzahl von chromosomalen Aberrationen wurde in dieser Arbeit bei den Zelllinien ohne oder bei geringem 'clustering' beobachtet. Die Gruppierung der Centrosomen und der relativ niedrige Prozentsatz an aberranten Teilungsspindeln, bei den hier analysierten Osteosarkomzelllinien, könnte erklären weshalb die Karyotypen der polyploiden Zelllinien relativ stabil sind.

5.6 Zusätzliche Analysemethode zur Aufklärung komplexer Aberrationen

5.6.1 Durchflusszytometrische Karyotypisierung und Sortierung von Chromosomen

Die durchflusszytometrische Karyotypisierung und nachfolgende Sortierung der Chromosomen erwies sich als sehr schöne Methode, um die aberranten Chromosomen der Zelllinie OSA zu vereinzeln. Diese ersten Schritte sind hilfreich für nachfolgende Analysen einzelner Chromosomen. Markerchromosomen könnten so sowohl über die reverse FISH, als auch über Hybridisierung der DNA auf hochauflösende Microarrays charakterisiert werden. Diese Methode wird als 'Array Painting' bezeichnet. Desweiteren könnten die Bruchpunkte von Translokationschromosomen mittels 'Array Painting' genauer eingegrenzt werden. So wurden sowohl Bruchpunkte unbalancierter Translokationen, als auch balancierter Translokationen schon mittels aCGH von durchflusszytometrisch sortierten Chromosomen untersucht (Veltman *et al.*, 2003; Fiegler *et al.*, 2003; Gribble *et al.*, 2007). Für gewöhnlich können über die aCGH balancierte Bruchereignisse nicht erfasst werden. Wird die DNA der jeweiligen Translokationspartner einer balancierten Translokation aber mit verschiedenen Fluoreszenzfarben markiert und gegeneinander hybridisiert, so kommt es im Bruchpunkt zu einer Überlappung der Fluoreszenzsignale und das \log_2 ratio ist in diesem Bereich ausgeglichen. Bei Brustkrebszelllinien konnten so balancierte Translokationen mittels 'Array Painting' aufgedeckt und die Bruchpunkte detailliert beschrieben werden (Howarth *et al.*, 2007). Die Vorarbeiten zur Etablierung des Verfahrens der durchflusszytometrischen Karyotypisierung und Sortierung von Chromosomen für Osteosarkomzelllinien eröffnet somit die Möglichkeit für weitere interessante Folgeanalysen.

5.7 Ausblick

Die relativ niedrigen Heilungsraten von 50-70% und die hohe Rate an Metastasen bei Erstdiagnose zeigen (Bacci *et al.*, 2008; Bielack, 2010), dass die Aufdeckung weiterer diagnostischer und prognostischer Marker nötig ist, um die Tumoren der Patienten besser charakterisieren und somit eine zielgerichtetere Therapie entwickeln zu können. Die Vielzahl der Faktoren, die eine Rolle bei der Tumorgenese spielt macht es schwer den Ursprung der Erkrankung aufzudecken.

Die hier angewendeten Methoden wie SKY und aCGH deckten eine Fülle von komplexen Chromosomenrearrangements, Deletionen und Amplifikationen bei den Osteosarkomzelllinien auf. Die aCGH-Profile der Osteosarkomzelllinien und die von Patienten, die mittels CGH, BAC-Arrays oder SNP-Arrays analysiert wurden (Squire *et al.*, 2003; Yen *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009; Kresse *et al.*, 2009, zeigen eine sehr gute Übereinstimmung der Aberrationen. Dies zeigt, dass die hier verwendeten Osteosarkomzelllinien gute Modellsysteme darstellen, die die genetische Konstitution der Patienten repräsentieren.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten rekurrente Brüche in putativ für die Osteosarkomentstehung wichtigen Genen detektiert werden, die in weiterführenden Arbeiten über hochauflösendere Arrays oder Sequenzierung genauer charakterisiert werden sollten. Funktionelle Proteinanalysen, Expressions- oder Methylierungsanalysen könnten zeigen, inwiefern die Funktion der Gene durch die Bruchereignisse beeinflusst wird.

Eine elegante Methode, eine Vielzahl einzelner Chromosomen zu erhalten, ist die durchflusszytometrische Karyotypisierung und Sortierung (Gray *et al.*, 1975; Gray *et al.*, 1987; Arkesteijn *et al.*, 1990). Diese Chromosomen könnten für nachfolgende Analysen wie dem 'Array Painting' oder bei der Sequenzierung eingesetzt werden, um die Zusammensetzung von einzelnen Markerchromosomen oder Translokationschromosomen genauer abzuklären (Fiegler *et al.*, 2003; Howarth *et al.*, 2007). Vorarbeiten zur durchflusszytometrischen Karyotypisierung haben im Rahmen dieser Arbeit stattgefunden und ermöglichen somit weiterführende Analysen.

Neue Methoden wie das 'Next Generation Sequencing' ermöglichen die Sequenzierung von kompletten Genomen. Hierbei werden basierend auf der Pyrosequenzierungs-Technologie Leseraster mit einer Durchschnittslänge von 400-500 Basenpaaren erzeugt. Dadurch ist es möglich etwa 400-600 Millionen

Basenpaare pro Lauf zu sequenzieren (Wheeler *et al.*, 2008). Diese Methode ist im Moment noch relativ kostspielig und mit einer aufwändigen Auswertung großer Datenmengen verbunden. Darum wäre es vorstellbar mit Hilfe der Hochdurchsatzsequenzierung einzelne aberrante Chromosomen, die zuvor über andere Methoden analysiert und vereinzelt wurden, zu charakterisieren.

Die Analyse der Centrosomen zeigte Anomalien bei den hier untersuchten Zelllinien, die Untersuchung der Centrosomen und Mitosespindeln der übrigen Zelllinien und von Osteosarkompatienten könnte Aufschluss über die Stabilität und den Ursprung der Komplexität der Karyotypen geben.

Desweiteren könnte ebenso die Analyse der Telomerstruktur, der Telomeraseaktivität oder das Vorhandensein von ALT-Mechanismen bei den Zelllinien, aber auch bei Patienten mit Osteosarkom eine Erklärung für verschiedene Häufigkeiten von Aberrationen, die Heterogenität und die Stabilität der Karyotypen liefern.

6 Zusammenfassung

Das Osteosarkom (OS) ist der häufigste primäre maligne Knochentumor bei Kindern und Jugendlichen. Bei diesem aggressiven Tumor sind bei 70% der Patienten komplexe chromosomale Veränderungen beschrieben.

In dieser Arbeit wurden Osteosarkomzelllinien (OSZL) auf Osteosarkom-spezifische chromosomale Aberrationen untersucht.

Bei den Analysen numerischer und struktureller Chromosomenaberrationen konnten mittels spektraler Karyotypisierung (SKY) haploide bis hexaploide Karyotypen mit komplexen Chromosomenaberrationen bei 14 OSZL aufgedeckt werden, die auf genomischer Ebene unbalanciert waren. Rekurrente spezifische Translokationen wie z.B. die, die den *EWSR1*-Lokus mit einbeziehen, konnten nicht beobachtet werden.

Es wurden 1620 (38%) wiederholt auftretende Brüche bei insgesamt 4266 Bruchereignissen bezogen auf eine Auflösung von 850 Banden per haploidem Chromosomensatz (bphs) mittels vergleichender genomischer Hybridisierung auf DNA-Microarrays (aCGH) detektiert. Anhand von Datenbankanalysen konnten 57 Gene, die sich auf Grund ihrer Funktion bei der Tumorgenese, Zellzykluskontrolle, dem Knochenwachstum und der Organisation des Mitoseapparates als Kandidatengene eignen, identifiziert werden.

Die aCGH-Analysen zeigten eine hohe Anzahl von Zugewinnen (2072) und Verlusten (1712) bei 19 OSZL bezogen auf eine Auflösung von 368 bphs. Die detaillierten Analysen mittels aCGH und FISH (Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung) der drei auffälligen Regionen 6p21.33-6p12.1, 12q13-12q15 und 17p12-17p11.2 mit wiederholten chromosomalen Zugewinnen in 79%, 58% und 53% der OSZL zeigte, dass sich die Genvermehrungen als intrachromosomale Amplifikationen oder Duplikationen präsentierten. Die innerhalb dieser Regionen amplifizierten Gene *MDM2*, *CDK4*, *CCND3* und *COPS3*, die Regulatoren der RB1- und p53-Pathways sind, könnten durch Verlust der Zellzyklusregulationskontrolle und der chromosomalen Instabilität (CIN) zur Tumorgenese der OS führen. Die hohe Rate an Amplifikationen könnte durch die CIN und anschließenden 'Breakage-Fusion-Bridge'-Zyklen begünstigt werden. Die Analyse der Kopienzahl bekannter Tumorsuppressorgene zeigte einen Verlust von *CDKN2A* (9p21.3) in 69%, *RB1* (13q14.2) in 58% und *p53* (17p13.1) in 26% der Zelllinien. Ein wiederholter Verlust des putativen Tumorsuppressorgens *LSAMP* (3q13.31) konnte bei 26% der OSZL beobachtet werden. Die Vielzahl der genetischen Veränderungen weist darauf hin, dass für die Tumorgenese der OS wahrscheinlich ein komplexes Zusammenspiel von Veränderungen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, ein Verlust der Zellzykluskontrolle und Wachstumsvorteile der aberranten Zellen notwendig ist.

Die Centrosomenanalysen zeigten numerische Aberrationen der Centrosomen (CS) bei 63% der OSZL. Ein 'clustering' der CS, welches die Zellen zu einer regulären bipolaren Teilung befähigt, wurde in 63% der OSZL beobachtet. Dies kann die Stabilität der Aberrationen über mehrere Zellteilungen erklären. Weiterführende Analysen in Hinblick auf die Balance zwischen chromosomaler Instabilität und genetischer Stabilität könnten die Ursachen für die hochkomplexen Karyotypen der OS aufdecken.

Alle hier beschriebenen chromosomalen Aberrationen sind auch bei OS-Patienten beschrieben. Dies zeigt, dass die OSZL sich zur Analyse der genetischen Veränderungen beim OS eignen.

Die durchflusszytometrische Karyotypisierung und Sortierung von Chromosomen eröffnet weitere Möglichkeiten für Analysen einzelner aberranter Chromosomen. Erfolgversprechend ist hierbei die genauere Analyse der hier kartierten Bruchpunkte und chromosomalen Imbalancen auf hochauflösenden Arrays ('Array Painting'), durch Sequenzieren mittels der Technik des 'Next-Generation-Sequencing' oder über Expressionsanalysen. Diese Analysen könnten Aufschluss über die Rolle der Veränderungen bei der Tumorgenese der OS geben.

7 Abstract

Osteosarcoma (OS) is the most common primary malignant bone tumour in children and adolescents. In this aggressive tumour chromosomal changes are described in up to 70%.

In this thesis osteosarcoma cell lines (OSCL) were investigated for osteosarcoma-specific chromosomal aberrations. The analysis of numerical and structural chromosomal aberrations (CA) with spectral karyotyping (SKY) revealed haploid to hexaploid karyotypes with complex unbalanced CA in 14 OSCL. Recurrent specific translocations e.g. involving the *EWSR1*-locus were not observed.

Analyses with comparative genomic hybridisation with oligonucleotide arrays (aCGH) showed a number of 1620 (38%) recurrent chromosomal breaks in a total of 4266 breakage events at a resolution of 850 bands per haploid set (bphs). With the help of database search 57 genes were identified, which could be interesting candidate genes according to their function in tumourgenesis, cell cycle control, bone development and organisation of the mitosis apparatus.

ACGH analyses showed a high number of gains (2072) and losses (1712) of chromosomal material at a resolution of 368 bphs in 19 OSCL. The regions 6p21.33-6p12.1, 12q13-12q15 and 17p12-17p11.2 showed a recurrent chromosomal gain in 79%, 58% and 53%, respectively. Extensive aCGH and FISH (fluorescence *in situ* hybridisation) analyses showed an intrachromosomal localisation of the gene amplifications and duplications. Amplification in regulators of the RB1 and p53-pathways, like *MDM2*, *CDK4*, *CCND3* and *COPS3*, which were amplified within these regions, could drive tumourgenesis via loss of cell cycle control and chromosomal instability (CIN). CIN and breakage-fusion-bridge cycles could be responsible for the high rate of amplifications in OS. Copy number analyses in common tumour suppressor genes (TSG) showed a loss of *CDKN2A* (9p21.3) in 69%, *RB1* (13q14.2) in 58% and *p53* (17p13.1) in 26% of OSCL. Repeated loss was also detected in the putative TSG *LSAMP* (3q13.31) in 26% of the OSCL. The multitude of genetic changes indicates that a complex interaction of alterations in oncogenes and TSGs is needed for loss of cell cycle control and proliferative advantage of the aberrant cells.

Immunofluorescent staining analyses with 8 OSCL showed numerical aberrations in 63% of the centrosomes (CS). A clustering of CS, which allows regular bipolar mitosis, was observed in 63% of the OSCL. Centrosome clustering could be the reason for the stability of the aberrations over several cell divisions. Further analyses regarding the balance of CIN and genetic stability could give information about the causes of the complex karyotypes of the OSCL.

All chromosome aberrations, which were detected in this study have also been observed in OS patients. This indicates that the OSCL are useful to study genetic changes in OS.

Flow karyotyping and sorting of chromosomes provide further alternatives for analyses of single chromosomes. Detailed analyses of the here mapped breakpoints and chromosomal imbalances with high resolution arrays ('array painting'), 'next-generation-sequencing' or expression analyses are promising. These analyses could provide further information about the role of the genetic changes in OS.

8 Literaturverzeichnis

- Abramson D. H.; Ellsworth, R. M.; Kitchin, F. D.; Tung, G. (1984): Second nonocular tumors in retinoblastoma survivors. Are they radiation-induced? In: *Ophthalmology*, Jg. 91, H. 11, S. 1351–1355.
- Abramson D. H.; Ronner, H. J.; Ellsworth, R. M. (1979): Second tumors in nonirradiated bilateral retinoblastoma. In: *American journal of ophthalmology*, Jg. 87, H. 5, S. 624–627.
- Adams A. E.; Rosenblatt, M.; Suva, L. J. (1999): Identification of a novel parathyroid hormone-responsive gene in human osteoblastic cells. In: *Bone*, Jg. 24, H. 4, S. 305–313.
- Adeyinka A.; Kytola, S.; Mertens, F.; Pandis, N.; Larsson, C. (2000): Spectral karyotyping and chromosome banding studies of primary breast carcinomas and their lymph node metastases. In: *International journal of molecular medicine*, Jg. 5, H. 3, S. 235–240.
- Albertson D. G. (2006): Gene amplification in cancer. In: *Trends in genetics : TIG*, Jg. 22, H. 8, S. 447–455.
- Allshire R. C.; Gosden, J. R.; Cross, S. H.; Cranston, G.; Rout, D.; Sugawara, N.; Szostak, J. W.; Fantes, P. A.; Hastie, N. D. (1988): Telomeric repeat from *T. thermophila* cross hybridizes with human telomeres. In: *Nature*, Jg. 332, H. 6165, S. 656–659.
- Andela V. B.; Siddiqui, F.; Groman, A.; Rosier, R. N. (2005): An immunohistochemical analysis to evaluate an inverse correlation between Runx2/Cbfa1 and NF kappa B in human osteosarcoma. In: *Journal of clinical pathology*, Jg. 58, H. 3, S. 328–330.
- Andersen J. S.; Wilkinson, C. J.; Mayor, T.; Mortensen, P.; Nigg, E. A.; Mann, M. (2003): Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. In: *Nature*, Jg. 426, H. 6966, S. 570–574.
- Araki N.; Uchida, A.; Kimura, T.; Yoshikawa, H.; Aoki, Y.; Ueda, T.; Takai, S.; Miki, T.; Ono, K. (1991): Involvement of the retinoblastoma gene in primary osteosarcomas and other bone and soft-tissue tumors. In: *Clinical orthopaedics and related research*, H. 270, S. 271–277.
- Arkesteijn G. J.; van Dekken, H.; Martens, A. C.; Hagenbeek, A. (1990): Clinical applications of flow karyotyping in myelocytic leukemia by stimulation of different subpopulations of cells in blood or bone marrow samples. In: *Cytometry*, Jg. 11, H. 1, S. 196–201.
- Arlt M. F.; Xu, B.; Durkin, S. G.; Casper, A. M.; Kastan, M. B.; Glover, T. W. (2004): BRCA1 is required for common-fragile-site stability via its G2/M checkpoint function. In: *Molecular and cellular biology*, Jg. 24, H. 15, S. 6701–6709.
- Aurias A. (1988): [Cytogenetic data on sarcomas of the bone and soft tissue]. In: *Bulletin du cancer*, Jg. 75, H. 5, S. 423–429.
- Bacci G.; Briccoli, A.; Rocca, M.; Ferrari, S.; Donati, D.; Longhi, A.; Bertoni, F.; Bacchini, P.; Giacomini, S.; Forni, C.; Manfrini, M.; Galletti, S. (2003): Neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremities with metastases at presentation: recent experience at the Rizzoli Institute in 57 patients treated with cisplatin, doxorubicin, and a high dose of methotrexate and ifosfamide. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, Jg. 14, H. 7, S. 1126–1134.
- Bacci G.; Rocca, M.; Salone, M.; Balladelli, A.; Ferrari, S.; Palmerini, E.; Forni, C.; Briccoli, A. (2008): High grade osteosarcoma of the extremities with lung metastases at presentation: treatment with neoadjuvant chemotherapy and simultaneous resection of primary and metastatic lesions. In: *Journal of surgical oncology*, Jg. 98, H. 6, S. 415–420.
- Bakhshi S.; Radhakrishnan, V. (2010): Prognostic markers in osteosarcoma. In: *Expert review of anticancer therapy*, Jg. 10, H. 2, S. 271–287.
- Balaban-Malenbaum G.; Gilbert, F. (1977): Double minute chromosomes and the homogeneously staining regions in chromosomes of a human neuroblastoma cell line. In: *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 198, H. 4318, S. 739–741.
- Ban S.; Cologne, J. B.; Neriishi, K. (1995): Effect of radiation and cigarette smoking on expression of FUDR-inducible common fragile sites in human peripheral lymphocytes. In: *Mutation research*, Jg. 334, H. 2, S. 197–203.
- Barker P. E. (1982): Double minutes in human tumor cells. In: *Cancer genetics and cytogenetics*, Jg. 5, H. 1, S. 81–94.

- Barker P. E.; Drwinga, H. L.; Hittelman, W. N.; Maddox, A. M. (1980): Double minutes replicate once during S phase of the cell cycle. In: *Experimental cell research*, Jg. 130, H. 2, S. 353–360.
- Basaran M.; Bavbek, E. S.; Saglam, S.; Eralp, L.; Sakar, B.; Atalar, A. C.; Bilgic, B.; Ozger, H.; Onat, H. (2007): A phase II study of cisplatin, ifosfamide and epirubicin combination chemotherapy in adults with nonmetastatic and extremity osteosarcomas. In: *Oncology*, Jg. 72, H. 3-4, S. 255–260.
- Batanian J. R.; Cavalli, L. R.; Aldosari, N. M.; Ma, E.; Sotelo-Avila, C.; Ramos, M. B.; Rone, J. D.; Thorpe, C. M.; Haddad, B. R. (2002): Evaluation of paediatric osteosarcomas by classic cytogenetic and CGH analyses. In: *Molecular pathology : MP*, Jg. 55, H. 6, S. 389–393.
- Bayani J.; Squire, J. A. (2001): Advances in the detection of chromosomal aberrations using spectral karyotyping. In: *Clinical genetics*, Jg. 59, H. 2, S. 65–73.
- Bayani J.; Zielenska, M.; Pandita, A.; Al-Romaih, K.; Karaskova, J.; Harrison, K.; Bridge, J. A.; Sorensen, P.; Thorner, P.; Squire, J. A. (2002): Spectral karyotyping identifies recurrent complex rearrangements of chromosomes 8, 17, and 20 in osteosarcomas. In: *Genes, chromosomes & cancer*, Jg. 36, H. 1, S. 7–16.
- Beauchene N. A.; Díaz-Martínez, L. A.; Furniss, K.; Hsu, W.-S.; Tsai, H.-J.; Chamberlain, C.; Esponda, P.; Giménez-Abián, J. F.; Clarke, D. J. (2010): Rad21 is required for centrosome integrity in human cells independently of its role in chromosome cohesion. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, Jg. 9, H. 9.
- Bech-Otschir D.; Kraft, R.; Huang, X.; Henklein, P.; Kapelari, B.; Pollmann, C.; Dubiel, W. (2001): COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system. In: *The EMBO journal*, Jg. 20, H. 7, S. 1630–1639.
- Bech-Otschir D.; Seeger, M.; Dubiel, W. (2002): The COP9 signalosome: at the interface between signal transduction and ubiquitin-dependent proteolysis. In: *Journal of cell science*, Jg. 115, H. Pt 3, S. 467–473.
- Bednarek A. K.; Keck-Waggoner, C. L.; Daniel, R. L.; Laffin, K. J.; Bergsagel, P. L.; Kiguchi, K.; Brenner, A. J.; Aldaz, C. M. (2001): WWOX, the FRA16D gene, behaves as a suppressor of tumor growth. In: *Cancer research*, Jg. 61, H. 22, S. 8068–8073.
- Beheshti B.; Karaskova, J.; Park, P. C.; Squire, J. A.; Beatty, B. G. (2000): Identification of a high frequency of chromosomal rearrangements in the centromeric regions of prostate cancer cell lines by sequential giemsa banding and spectral karyotyping. In: *Molecular diagnosis : a journal devoted to the understanding of human disease through the clinical application of molecular biology*, Jg. 5, H. 1, S. 23–32.
- Benassi M. S.; Molendini, L.; Gamberi, G.; Ragazzini, P.; Sollazzo, M. R.; Merli, M.; Asp, J.; Magagnoli, G.; Balladelli, A.; Bertoni, F.; Picci, P. (1999): Alteration of pRb/p16/cdk4 regulation in human osteosarcoma. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer*, Jg. 84, H. 5, S. 489–493.
- Benini S.; Baldini, N.; Manara, M. C.; Chano, T.; Serra, M.; Rizzi, S.; Lollini, P. L.; Picci, P.; Scotlandi, K. (1999): Redundancy of autocrine loops in human osteosarcoma cells. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer*, Jg. 80, H. 4, S. 581–588.
- Benner S. E.; Wahl, G. M.; Hoff, D. D. von (1991): Double minute chromosomes and homogeneously staining regions in tumors taken directly from patients versus in human tumor cell lines. In: *Anti-cancer drugs*, Jg. 2, H. 1, S. 11–25.
- Bennett W. P.; Hollstein, M. C.; Hsu, I. C.; Sidransky, D.; Lane, D. P.; Vogelstein, B.; Harris, C. C. (1992): Mutational spectra and immunohistochemical analyses of p53 in human cancers. In: *Chest*, Jg. 101, H. 3 Suppl, S. 19S-20S.
- Berner J. M.; Forus, A.; Elkahlon, A.; Meltzer, P. S.; Fodstad, O.; Myklebost, O. (1997a): Separate amplified regions encompassing CDK4 and MDM2 in human sarcomas. In: *Genes, chromosomes & cancer*, Jg. 17, H. 4, S. 254–259.
- Berner J. M.; Meza-Zepeda, L. A.; Kools, P. F.; Forus, A.; Schoenmakers, E. F.; van de Ven, W. J.; Fodstad, O.; Myklebost, O. (1997b): HMGIC, the gene for an architectural transcription factor, is amplified and rearranged in a subset of human sarcomas. In: *Oncogene*, Jg. 14, H. 24, S. 2935–2941.
- Bernstein H. S.; Coughlin, S. R. (1998): A mammalian homolog of fission yeast Cdc5 regulates G2 progression and mitotic entry. In: *The Journal of biological chemistry*, Jg. 273, H. 8, S. 4666–4671.

- Biedler J. L.; Spengler, B. A. (1976): Metaphase chromosome anomaly: association with drug resistance and cell-specific products. In: *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 191, H. 4223, S. 185–187.
- Biegel J. A.; Womer, R. B.; Emanuel, B. S. (1989): Complex karyotypes in a series of pediatric osteosarcomas. In: *Cancer genetics and cytogenetics*, Jg. 38, H. 1, S. 89–100.
- Bielack S. S.; Carrle, D. (2008): State-of-the-art approach in selective curable tumors: bone sarcoma. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, Jg. 19 Suppl 7, S. vii155-60.
- Bielack S. S. (2010): Osteosarcoma: Time to move on? In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*.
- Bielack S. S.; Carrle, D.; Hards, J.; Schuck, A.; Paulussen, M. (2008): Bone tumors in adolescents and young adults. In: *Current treatment options in oncology*, Jg. 9, H. 1, S. 67–80.
- Bigelow R. L. H.; Chari, N. S.; Uden, A. B.; Spurgers, K. B.; Lee, S.; Roop, D. R.; Toftgard, R.; McDonnell, T. J. (2004): Transcriptional regulation of bcl-2 mediated by the sonic hedgehog signaling pathway through gli-1. In: *The Journal of biological chemistry*, Jg. 279, H. 2, S. 1197–1205.
- Billiau A.; Edy, V. G.; Heremans, H.; Van Damme, J.; Desmyter, J.; Georgiades, J. A.; De Somer, P. (1977): Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Jg. 12, H. 1, S. 11–15.
- Blackburn E. H. (2001): Switching and signaling at the telomere. In: *Cell*, Jg. 106, H. 6, S. 661–673.
- Böcker, W.; Denk, H.; Heitz, P. U., et al. (Hg.) (2008): *Lehrbuch Pathologie. 4., vollst. überarb. Aufl.* München: Urban & Fischer in Elsevier; Elsevier Urban & Fischer.
- Bornens M. (2002): Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. In: *Current opinion in cell biology*, Jg. 14, H. 1, S. 25–34.
- Bridge J. A.; Nelson, M.; McComb, E.; McGuire, M. H.; Rosenthal, H.; Vergara, G.; Maale, G. E.; Spanier, S.; Neff, J. R. (1997): Cytogenetic findings in 73 osteosarcoma specimens and a review of the literature. In: *Cancer genetics and cytogenetics*, Jg. 95, H. 1, S. 74–87.
- Bruland O.; Fodstad, O.; Pihl, A. (1985): The use of multicellular spheroids in establishing human sarcoma cell lines in vitro. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer*, Jg. 35, H. 6, S. 793–798.
- Bruland O. S.; Fodstad, O.; Stenwig, A. E.; Pihl, A. (1988): Expression and characteristics of a novel human osteosarcoma-associated cell surface antigen. In: *Cancer research*, Jg. 48, H. 18, S. 5302–5309.
- Bryan T. M.; Englezou, A.; Dalla-Pozza, L.; Dunham, M. A.; Reddel, R. R. (1997): Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. In: *Nature medicine*, Jg. 3, H. 11, S. 1271–1274.
- Bryan T. M.; Englezou, A.; Gupta, J.; Bacchetti, S.; Reddel, R. R. (1995): Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. In: *The EMBO journal*, Jg. 14, H. 17, S. 4240–4248.
- Buselmaier W.; Tariverdian, G. (2007): *Humangenetik. (Springer-Lehrbuch)*. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-32678-6>.
- Carlotti C. G.; Drake, J. M.; Hladky, J. P.; Teshima, I.; Becker, L. E.; Rutka, J. T. (1999): Primary Ewing's sarcoma of the skull in children. Utility of molecular diagnostics, surgery and adjuvant therapies. In: *Pediatric neurosurgery*, Jg. 31, H. 6, S. 307–315.
- Carroll S. M.; DeRose, M. L.; Gaudray, P.; Moore, C. M.; Needham-VanDevanter, D. R.; Hoff, D. D. von; Wahl, G. M. (1988): Double minute chromosomes can be produced from precursors derived from a chromosomal deletion. In: *Molecular and cellular biology*, Jg. 8, H. 4, S. 1525–1533.
- Carroll S. M.; Gaudray, P.; Rose, M. L. de; Emery, J. F.; Meinkoth, J. L.; Nakkim, E.; Subler, M.; Hoff, D. D. von; Wahl, G. M. (1987): Characterization of an episome produced in hamster cells that amplify a transfected CAD gene at high frequency: functional evidence for a mammalian replication origin. In: *Molecular and cellular biology*, Jg. 7, H. 5, S. 1740–1750.
- Caudill J. S. C.; Arndt, C. A. S. (2007): Diagnosis and management of bone malignancy in adolescence. In: *Adolescent medicine: state of the art reviews*, Jg. 18, H. 1, S. 62-78, ix.

- Chen H.-Z.; Tsai, S.-Y.; Leone, G. (2009): Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. In: *Nature reviews. Cancer*, Jg. 9, H. 11, S. 785–797.
- Chen J.; Yu, L.; Li, D.; Gao, Q.; Wang, J.; Huang, X.; Bi, G.; Wu, H.; Zhao, S. (2003a): Human CRYL1, a novel enzyme-crystallin overexpressed in liver and kidney and downregulated in 58% of liver cancer tissues from 60 Chinese patients, and four new homologs from other mammals. In: *Gene*, Jg. 302, H. 1-2, S. 103–113.
- Chen J.; Lui, W.-O.; Vos, M. D.; Clark, G. J.; Takahashi, M.; Schoumans, J.; Khoo, S. K.; Petillo, D.; Lavery, T.; Sugimura, J.; Astuti, D.; Zhang, C.; Kagawa, S.; Maher, E. R.; Larsson, C.; Alberts, A. S.; Kanayama, H.-o.; Teh, B. T. (2003b): The t(1;3) breakpoint-spanning genes LSAMP and NORE1 are involved in clear cell renal cell carcinomas. In: *Cancer cell*, Jg. 4, H. 5, S. 405–413.
- Chen W.; Erdogan, F.; Ropers, H.-H.; Lenzner, S.; Ullmann, R. (2005): CGHPRO -- a comprehensive data analysis tool for array CGH. In: *BMC bioinformatics*, Jg. 6, S. 85.
- Cheng I. K.-C.; Ching, A. K.-K.; Chan, T.-C.; Chan, A. W.-H.; Wong, C.-K.; Choy, K.-W.; Kwan, M.; Lai, P. B.-S.; Wong, N. (2010): Reduced CRYL1 expression in hepatocellular carcinoma confers cell growth advantages and correlates with adverse patient prognosis. In: *The Journal of pathology*, Jg. 220, H. 3, S. 348–360.
- Chi B.; DeLeeuw, R. J.; Coe, B. P.; MacAulay, C.; Lam, W. L. (2004): SeeGH--a software tool for visualization of whole genome array comparative genomic hybridization data. In: *BMC bioinformatics*, Jg. 5, S. 13.
- Chin K.; Solorzano, C. O. de; Knowles, D.; Jones, A.; Chou, W.; Rodriguez, E. G.; Kuo, W.-L.; Ljung, B.-M.; Chew, K.; Myambo, K.; Miranda, M.; Krig, S.; Garbe, J.; Stampfer, M.; Yaswen, P.; Gray, J. W.; Lockett, S. J. (2004): In situ analyses of genome instability in breast cancer. In: *Nature genetics*, Jg. 36, H. 9, S. 984–988.
- Ciullo M.; Debily, M.-A.; Rozier, L.; Autiero, M.; Billault, A.; Mayau, V.; El Marhomy, S.; Guardiola, J.; Bernheim, A.; Coullin, P.; Piatier-Tonneau, D.; Debatisse, M. (2002): Initiation of the breakage-fusion-bridge mechanism through common fragile site activation in human breast cancer cells: the model of PIP gene duplication from a break at FRA71. In: *Human molecular genetics*, Jg. 11, H. 23, S. 2887–2894.
- Cleynen I.; van de Ven, W. J. M. (2008): The HMGA proteins: a myriad of functions (Review). In: *International journal of oncology*, Jg. 32, H. 2, S. 289–305.
- Cloutier S.; Hamel, H.; Champagne, M.; Yotov, W. V. (1997): Mapping of the human DNA primase 1 (PRIM1) to chromosome 12q13. In: *Genomics*, Jg. 43, H. 3, S. 398–401.
- Coquelle A.; Pipiras, E.; Toledo, F.; Buttin, G.; Debatisse, M. (1997): Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons. In: *Cell*, Jg. 89, H. 2, S. 215–225.
- Coquelle A.; Toledo, F.; Stern, S.; Bieth, A.; Debatisse, M. (1998): A new role for hypoxia in tumor progression: induction of fragile site triggering genomic rearrangements and formation of complex DMs and HSRs. In: *Molecular cell*, Jg. 2, H. 2, S. 259–265.
- Corvi R.; Savelyeva, L.; Breit, S.; Wenzel, A.; Handgretinger, R.; Barak, J.; Oren, M.; Amler, L.; Schwab, M. (1995): Non-syntenic amplification of MDM2 and MYCN in human neuroblastoma. Nicht online erhältlich! In: *Oncogene*, Jg. 10, H. 6, S. 1081–1086.
- Counter C. M.; Avilion, A. A.; LeFeuvre, C. E.; Stewart, N. G.; Greider, C. W.; Harley, C. B.; Bacchetti, S. (1992): Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. In: *The EMBO journal*, Jg. 11, H. 5, S. 1921–1929.
- Crott J. W.; Mashiyama, S. T.; Ames, B. N.; Fenech, M. F. (2001): Methylene-tetrahydrofolate reductase C677T polymorphism does not alter folic acid deficiency-induced uracil incorporation into primary human lymphocyte DNA in vitro. In: *Carcinogenesis*, Jg. 22, H. 7, S. 1019–1025.
- Curtis C.; Lynch, A. G.; Dunning, M. J.; Spiteri, I.; Marioni, J. C.; Hadfield, J.; Chin, S.-F.; Brenton, J. D.; Tavaré, S.; Caldas, C. (2009): The pitfalls of platform comparison: DNA copy number array technologies assessed. In: *BMC genomics*, Jg. 10, S. 588.
- Dagher R.; Pham, T. A.; Sorbara, L.; Kumar, S.; Long, L.; Bernstein, D.; Mackall, C.; Raffeld, M.; Tsokos, M.; Helman, L. (2001): Molecular confirmation of Ewing sarcoma. In: *Journal of pediatric*

- hematology/oncology : official journal of the American Society of Pediatric Hematology/Oncology, Jg. 23, H. 4, S. 221–224.
- de Lange T. (1995): Telomere dynamics and genome instability in human cancer. In: Blackburn, Elizabeth H.; Greider, Carol W. (Hg.): *Telomeres*. Monograph 29. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.; Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor monograph series, 29), S. 265–293.
- Deb S. P. (2003): Cell cycle regulatory functions of the human oncoprotein MDM2. In: *Molecular cancer research : MCR*, Jg. 1, H. 14, S. 1009–1016.
- Debacker K.; Kooy, R. F. (2007): Fragile sites and human disease. In: *Human molecular genetics*, Jg. 16 Spec No. 2, S. R150-8.
- Debatisse M.; Malfoy, B. (2005): Gene amplification mechanisms. In: *Advances in experimental medicine and biology*, Jg. 570, S. 343–361.
- DePamphilis M. L. (1996): *DNA replication in eukaryotic cells*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor monograph series, 31).
- der-Sarkissian H.; Bacchetti, S.; Cazes, L.; Londoño-Vallejo, J. A. (2004): The shortest telomeres drive karyotype evolution in transformed cells. In: *Oncogene*, Jg. 23, H. 6, S. 1221–1228.
- Despierre E.; Lambrechts, D.; Neven, P.; Amant, F.; Lambrechts, S.; Vergote, I. (2010): The molecular genetic basis of ovarian cancer and its roadmap towards a better treatment. In: *Gynecologic oncology*, Jg. 117, H. 2, S. 358–365.
- Diemel K.-D.; Klippe, H.-J.; Branseheid, D. (2009): Pulmonary metastasectomy for osteosarcoma: is it justified? In: *Adolescent medicine: state of the art reviews*, Jg. 179, S. 183–208.
- Dreyling M. H.; Roulston, D.; Bohlander, S. K.; Vardiman, J.; Olopade, O. I. (1998): Codeletion of CDKN2 and MTAP genes in a subset of non-Hodgkin's lymphoma may be associated with histologic transformation from low-grade to diffuse large-cell lymphoma. In: *Genes, chromosomes & cancer*, Jg. 22, H. 1, S. 72–78.
- Duensing S. (2005): A tentative classification of centrosome abnormalities in cancer. In: *Cell biology international*, Jg. 29, H. 5, S. 352–359.
- Dunham M. A.; Neumann, A. A.; Fasching, C. L.; Reddel, R. R. (2000): Telomere maintenance by recombination in human cells. In: *Nature genetics*, Jg. 26, H. 4, S. 447–450.
- el-Deiry W. S. (1998): Regulation of p53 downstream genes. In: *Seminars in cancer biology*, Jg. 8, H. 5, S. 345–357.
- Elkahloun A. G.; Bittner, M.; Hoskins, K.; Gemmill, R.; Meltzer, P. S. (1996): Molecular cytogenetic characterization and physical mapping of 12q13-15 amplification in human cancers. In: *Genes, chromosomes & cancer*, Jg. 17, H. 4, S. 205–214.
- El-Rifai W.; Sarlomo-Rikala, M.; Knuutila, S.; Miettinen, M. (1998): DNA copy number changes in development and progression in leiomyosarcomas of soft tissues. In: *The American journal of pathology*, Jg. 153, H. 3, S. 985–990.
- Elsa S. H.; Mykityn, K.; Ferrell, K.; Coulter, K. L.; Das, P.; Dubiel, W.; Patel, P. I.; Metherall, J. E. (1999): Hemizyosity for the COP9 signalosome subunit gene, SGN3, in the Smith-Magenis syndrome. In: *American journal of medical genetics*, Jg. 87, H. 4, S. 342–348.
- Ewen M. E.; Sluss, H. K.; Sherr, C. J.; Matsushime, H.; Kato, J.; Livingston, D. M. (1993): Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. In: *Cell*, Jg. 73, H. 3, S. 487–497.
- Fabarius A.; Giehl, M.; Rebacz, B.; Krämer, A.; Frank, O.; Haferlach, C.; Duesberg, P.; Hehlmann, R.; Seifarth, W.; Hochhaus, A. (2008): Centrosome aberrations and G1 phase arrest after in vitro and in vivo treatment with the SRC/ABL inhibitor dasatinib. In: *Haematologica*, Jg. 93, H. 8, S. 1145–1154.
- Fabris S.; Todoerti, K.; Mosca, L.; Agnelli, L.; Intini, D.; Lionetti, M.; Gueneri, S.; Lambertenghi-Deliliers, G.; Bertoni, F.; Neri, A. (2007): Molecular and transcriptional characterization of the novel 17p11.2-p12 amplicon in multiple myeloma. In: *Genes, chromosomes & cancer*, Jg. 46, H. 12, S. 1109–1118.
- Fan Y. S.; Siu, V. M.; Jung, J. H.; Xu, J. (2000): Sensitivity of multiple color spectral karyotyping in detecting small interchromosomal rearrangements. In: *Genetic testing*, Jg. 4, H. 1, S. 9–14.

- Farrell C.; Crimm, H.; Meeh, P.; Croshaw, R.; Barbar, T.; Vandersteenhoven, J. J.; Butler, W.; Buckhaults, P. (2008): Somatic mutations to CSMD1 in colorectal adenocarcinomas. In: *Cancer biology & therapy*, Jg. 7, H. 4, S. 609–613.
- Feugeas O.; Guriec, N.; Babin-Boilletot, A.; Marcellin, L.; Simon, P.; Babin, S.; Thyss, A.; Hofman, P.; Terrier, P.; Kalifa, C.; Brunat-Mentigny, M.; Patricot, L. M.; Oberling, F. (1996): Loss of heterozygosity of the RB gene is a poor prognostic factor in patients with osteosarcoma. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, Jg. 14, H. 2, S. 467–472.
- Fiegler H.; Gribble, S. M.; Burford, D. C.; Carr, P.; Prigmore, E.; Porter, K. M.; Clegg, S.; Crolla, J. A.; Dennis, N. R.; Jacobs, P.; Carter, N. P. (2003): Array painting: a method for the rapid analysis of aberrant chromosomes using DNA microarrays. In: *Journal of medical genetics*, Jg. 40, H. 9, S. 664–670.
- Flørenes V. A.; Maelandsmo, G. M.; Forus, A.; Andreassen, A.; Myklebost, O.; Fodstad, O. (1994): MDM2 gene amplification and transcript levels in human sarcomas: relationship to TP53 gene status. In: *Journal of the National Cancer Institute*, Jg. 86, H. 17, S. 1297–1302.
- Flory M. R.; Moser, M. J.; Monnat, R. J.; Davis, T. N. (2000): Identification of a human centrosomal calmodulin-binding protein that shares homology with pericentrin. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 97, H. 11, S. 5919–5923.
- Fodstad O.; Brøgger, A.; Bruland, O.; Solheim, O. P.; Nesland, J. M.; Pihl, A. (1986): Characteristics of a cell line established from a patient with multiple osteosarcoma, appearing 13 years after treatment for bilateral retinoblastoma. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer*, Jg. 38, H. 1, S. 33–40.
- Forus A.; Flørenes, V. A.; Maelandsmo, G. M.; Meltzer, P. S.; Fodstad, O.; Myklebost, O. (1994): Mapping of amplification units in the q13-14 region of chromosome 12 in human sarcomas: some amplicons do not include MDM2. In: *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, Jg. 4, H. 12, S. 1065–1070.
- Forus A.; Larramendy, M. L.; Meza-Zepeda, L. A.; Bjerkehagen, B.; Godager, L. H.; Dahlberg, A. B.; Saeter, G.; Knuutila, S.; Myklebost, O. (2001): Dedifferentiation of a well-differentiated liposarcoma to a highly malignant metastatic osteosarcoma: amplification of 12q14 at all stages and gain of 1q22-q24 associated with metastases. In: *Cancer genetics and cytogenetics*, Jg. 125, H. 2, S. 100–111.
- Forus A.; Weghuis, D. O.; Smeets, D.; Fodstad, O.; Myklebost, O.; Geurts van Kessel, A. (1996): Comparative genomic hybridization analysis of human sarcomas: II. Identification of novel amplicons at 6p and 17p in osteosarcomas. In: *Genes, chromosomes & cancer*, Jg. 14, H. 1, S. 15–21.
- Galindo M.; Pratap, J.; Young, D. W.; Hovhannisyan, H.; Im, H.-J.; Choi, J.-Y.; Lian, J. B.; Stein, J. L.; Stein, G. S.; van Wijnen, A. J. (2005): The bone-specific expression of Runx2 oscillates during the cell cycle to support a G1-related antiproliferative function in osteoblasts. In: *The Journal of biological chemistry*, Jg. 280, H. 21, S. 20274–20285.
- Gamberi G.; Ragazzini, P.; Benassi, M. S.; Ferrari, C.; Sollazzo, M. R.; Molendini, L.; Merli, M.; Magagnoli, G.; Ruggieri, P.; Ballardelli, A.; Orlando, C.; Bacchini, P.; Pazzagli, M.; Picci, P. (2000): Analysis of 12q13-15 genes in parosteal osteosarcoma. In: *Clinical orthopaedics and related research*, H. 377, S. 195–204.
- Garnier C.; Barbier, P.; Gilli, R.; Lopez, C.; Peyrot, V.; Briand, C. (1998): Heat-shock protein 90 (hsp90) binds in vitro to tubulin dimer and inhibits microtubule formation. In: *Biochemical and biophysical research communications*, Jg. 250, H. 2, S. 414–419.
- Gergely F.; Basto, R. (2008): Multiple centrosomes: together they stand, divided they fall. In: *Genes & development*, Jg. 22, H. 17, S. 2291–2296.
- Giehl M.; Fabarius, A.; Frank, O.; Hochhaus, A.; Hafner, M.; Hehlmann, R.; Seifarth, W. (2005): Centrosome aberrations in chronic myeloid leukemia correlate with stage of disease and chromosomal instability. In: *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, Jg. 19, H. 7, S. 1192–1197.
- Gisselsson D.; Gorunova, L.; Höglund, M.; Mandahl, N.; Elfving, P. (2004a): Telomere shortening and mitotic dysfunction generate cytogenetic heterogeneity in a subgroup of renal cell carcinomas. In: *British journal of cancer*, Jg. 91, H. 2, S. 327–332.
- Gisselsson D.; Jonson, T.; Petersén, A.; Strömbeck, B.; Dal Cin, P.; Höglund, M.; Mitelman, F.; Mertens, F.; Mandahl, N. (2001): Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and

- evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Jg. 98, H. 22, S. 12683–12688.
- Gisselsson D.; Pettersson, L.; Höglund, M.; Heidenblad, M.; Gorunova, L.; Wiegant, J.; Mertens, F.; Dal Cin, P.; Mitelman, F.; Mandahl, N. (2000): Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Jg. 97, H. 10, S. 5357–5362.
- Gisselsson D. (2003): Chromosome instability in cancer: how, when, and why? kein Zugang zum Journal. In: Advances in cancer research, Jg. 87, S. 1–29.
- Gisselsson D.; Pålsson, E.; Höglund, M.; Domanski, H.; Mertens, F.; Pandis, N.; Sciot, R.; Dal Cin, P.; Bridge, J. A.; Mandahl, N. (2002): Differentially amplified chromosome 12 sequences in low- and high-grade osteosarcoma. In: Genes, chromosomes & cancer, Jg. 33, H. 2, S. 133–140.
- Gisselsson D.; Pålsson, E.; Yu, C.; Mertens, F.; Mandahl, N. (2004b): Mitotic instability associated with late genomic changes in bone and soft tissue tumours. In: Cancer letters, Jg. 206, H. 1, S. 69–76.
- Godinho S. A.; Kwon, M.; Pellman, D. (2009): Centrosomes and cancer: how cancer cells divide with too many centrosomes. In: Cancer metastasis reviews, Jg. 28, H. 1-2, S. 85–98.
- Gokgoz N.; Wunder, J. S.; Mousses, S.; Eskandarian, S.; Bell, R. S.; Andrulis, I. L. (2001): Comparison of p53 mutations in patients with localized osteosarcoma and metastatic osteosarcoma. In: Cancer, Jg. 92, H. 8, S. 2181–2189.
- Gray J. W.; Carrano, A. V.; Moore, D. H., 2nd; Steinmetz, L. L.; Minkler, J.; Mayall, B. H.; Mendelsohn, M. L.; Van Dilla, M. A. (1975): High-speed quantitative karyotyping by flow microfluorometry. In: Clinical chemistry, Jg. 21, H. 9, S. 1258–1262.
- Gray J. W.; Langlois, R. G.; Carrano, A. V.; Burkhart-Schulte, K.; Van Dilla, M. A. (1979): High resolution chromosome analysis: one and two parameter flow cytometry. In: Chromosoma, Jg. 73 (1), S. 9–27.
- Gray J. W.; Lucas, J.; Peters, D.; Pinkel, D.; Trask, B.; van den Engh, G.; Van Dilla, M. (1987): Flow karyotyping and sorting of human chromosomes. In: Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology, Jg. 51 Pt 1, S. 141–149.
- Greider C. W.; Blackburn, E. H. (1985): Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. In: Cell, Jg. 43, H. 2 Pt 1, S. 405–413.
- Gribble S. M.; Kalaitzopoulos, D.; Burford, D. C.; Prigmore, E.; Selzer, R. R.; Ng, B. L.; Matthews, N. S. W.; Porter, K. M.; Curley, R.; Lindsay, S. J.; Baptista, J.; Richmond, T. A.; Carter, N. P. (2007): Ultra-high resolution array painting facilitates breakpoint sequencing. In: Journal of medical genetics, Jg. 44, H. 1, S. 51–58.
- Grimer R. J. (2005): Surgical options for children with osteosarcoma. In: The lancet oncology, Jg. 6, H. 2, S. 85–92.
- Guo W.; Wang, X.; Feng, C. (1996): P53 gene abnormalities in osteosarcoma. In: Chinese medical journal, Jg. 109, H. 10, S. 752–755.
- Gururaj A. E.; Singh, R. R.; Rayala, S. K.; Holm, C.; den Hollander, P.; Zhang, H.; Balasenthil, S.; Talukder, A. H.; Landberg, G.; Kumar, R. (2006): MTA1, a transcriptional activator of breast cancer amplified sequence 3. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Jg. 103, H. 17, S. 6670–6675.
- Hamlin J. L.; Milbrandt, J. D.; Heintz, N. H.; Azizkhan, J. C. (1984): DNA sequence amplification in mammalian cells. In: International review of cytology, Jg. 90, S. 31–82.
- Hao J. L.; Cozzi, P. J.; Khatri, A.; Power, C. A.; Li, Y. (2010): CD147/EMMPRIN and CD44 are Potential Therapeutic Targets for Metastatic Prostate Cancer. In: Current cancer drug targets.
- Harley C. B. (1995): Telomeres and aging. In: Blackburn, Elizabeth H.; Greider, Carol W. (Hg.): Telomeres. Monograph 29. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.; Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor monograph series, 29), S. 247–263.
- Harnack G. A. von; Heimann, G. (1994): Kinderheilkunde: Springer Verlag.
- Heare T.; Hensley, M. A.; Dell'Orfano, S. (2009): Bone tumors: osteosarcoma and Ewing's sarcoma. In: Current opinion in pediatrics, Jg. 21, H. 3, S. 365–372.

- Heinsohn S.; Evermann, U.; Zur Stadt, U.; Bielack, S.; Kabisch, H. (2007): Determination of the prognostic value of loss of heterozygosity at the retinoblastoma gene in osteosarcoma. In: *International journal of oncology*, Jg. 30, H. 5, S. 1205–1214.
- Hellman A.; Zlotorynski, E.; Scherer, S. W.; Cheung, J.; Vincent, J. B.; Smith, D. I.; Trakhtenbrot, L.; Kerem, B. (2002): A role for common fragile site induction in amplification of human oncogenes. In: *Cancer cell*, Jg. 1, H. 1, S. 89–97.
- Henriksen J.; Aagesen, T. H.; Maelandsmo, G. M.; Lothe, R. A.; Myklebost, O.; Forus, A. (2003): Amplification and overexpression of COPS3 in osteosarcomas potentially target TP53 for proteasome-mediated degradation. In: *Oncogene*, Jg. 22, H. 34, S. 5358–5361.
- Heremans H.; Billiau, A.; Cassiman, J. J.; Mulier, J. C.; De Somer, P. (1978): In vitro cultivation of human tumor tissues. II. Morphological and virological characterization of three cell lines. In: *Oncology*, Jg. 35, H. 6, S. 246–252.
- Hiller B.; Bradtke, J.; Balz, H.; Rieder, H. (2005): CyDAS: a cytogenetic data analysis system. In: *Bioinformatics (Oxford, England)*, Jg. 21, H. 7, S. 1282–1283.
- Hoff D. D. von; Needham-VanDevanter, D. R.; Yucel, J.; Windle, B. E.; Wahl, G. M. (1988): Amplified human MYC oncogenes localized to replicating submicroscopic circular DNA molecules. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 85, H. 13, S. 4804–4808.
- Höglund M.; Gisselsson, D.; Hansen, G. B.; Säll, T.; Mitelman, F. (2003): Ovarian carcinoma develops through multiple modes of chromosomal evolution. In: *Cancer research*, Jg. 63, H. 12, S. 3378–3385.
- Hollstein M.; Sidransky, D.; Vogelstein, B.; Harris, C. C. (1991): p53 mutations in human cancers. In: *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 253, H. 5015, S. 49–53.
- Hostein I.; Pelmus, M.; Aurias, A.; Pedeutour, F.; Mathoulin-Pélissier, S.; Coindre, J. M. (2004): Evaluation of MDM2 and CDK4 amplification by real-time PCR on paraffin wax-embedded material: a potential tool for the diagnosis of atypical lipomatous tumours/well-differentiated liposarcomas. In: *The Journal of pathology*, Jg. 202, H. 1, S. 95–102.
- Howarth K. D.; Blood, K. A.; Ng, B. L.; Beavis, J. C.; Chua, Y.; Cooke, S. L.; Raby, S.; Ichimura, K.; Collins, V. P.; Carter, N. P.; Edwards, P. A. W. (2007): Array painting reveals a high frequency of balanced translocations in breast cancer cell lines that break in cancer-relevant genes. In: *Oncogene*.
- Hühne K.; Park, O.; Liehr, T.; Rautenstrauss, B. (1999): Expression analysis of the PMP22 gene in glioma and osteogenic sarcoma cell lines. In: *Journal of neuroscience research*, Jg. 58, H. 5, S. 624–631.
- Hulsebos T. J.; Bijleveld, E. H.; Oskam, N. T.; Westerveld, A.; Leenstra, S.; Hogendoorn, P. C.; Bras, J. (1997): Malignant astrocytoma-derived region of common amplification in chromosomal band 17p12 is frequently amplified in high-grade osteosarcomas. In: *Genes, chromosomes & cancer*, Jg. 18, H. 4, S. 279–285.
- Hung J.; Anderson, R. (1997): p53: functions, mutations and sarcomas. In: *Acta orthopaedica Scandinavica. Supplementum*, Jg. 273, S. 68–73.
- Hupé P.; Stransky, N.; Thiery, J.-P.; Radvanyi, F.; Barillot, E. (2004): Analysis of array CGH data: from signal ratio to gain and loss of DNA regions. In: *Bioinformatics (Oxford, England)*, Jg. 20, H. 18, S. 3413–3422.
- Husmann G.; Kaatsch, P.; Katalinic, A.; Bertz, J.; Haberland, J.; Kraywinkel, K.; Wolf, U. (2010): Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2005/2006 - Häufigkeiten und Trends: Robert Koch-Institut.
- Italiano A.; Bianchini, L.; Keslair, F.; Bonnafous, S.; Cardot-Leccia, N.; Coindre, J.-M.; Dumollard, J.-M.; Hofman, P.; Leroux, A.; Mainguéné, C.; Peyrottes, I.; Ranchere-Vince, D.; Terrier, P.; Tran, A.; Gual, P.; Pedeutour, F. (2008): HMGA2 is the partner of MDM2 in well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas whereas CDK4 belongs to a distinct inconsistent amplicon. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer*, Jg. 122, H. 10, S. 2233–2241.
- Jackson S. P. (2002): Sensing and repairing DNA double-strand breaks. In: *Carcinogenesis*, Jg. 23, H. 5, S. 687–696.

- Jameel A.; Skilton, R. A.; Campbell, T. A.; Chander, S. K.; Coombes, R. C.; Luqmani, Y. A. (1992): Clinical and biological significance of HSP89 alpha in human breast cancer. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer*, Jg. 50, H. 3, S. 409–415.
- Jankowski S. A.; Mitchell, D. S.; Smith, S. H.; Trent, J. M.; Meltzer, P. S. (1994): SAS, a gene amplified in human sarcomas, encodes a new member of the transmembrane 4 superfamily of proteins. In: *Oncogene*, Jg. 9, H. 4, S. 1205–1211.
- Jenke A. C. W.; Stehle, I. M.; Herrmann, F.; Eisenberger, T.; Baiker, A.; Bode, J.; Fackelmayer, F. O.; Lipps, H. J. (2004): Nuclear scaffold/matrix attached region modules linked to a transcription unit are sufficient for replication and maintenance of a mammalian episome. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 101, H. 31, S. 11322–11327.
- Ji Y.; Eichler, E. E.; Schwartz, S.; Nicholls, R. D. (2000): Structure of chromosomal duplicons and their role in mediating human genomic disorders. In: *Genome research*, Jg. 10, H. 5, S. 597–610.
- Kaatsch P. (2008): Deutsche Kinderkrebsregister - Jahresbericht 2008. Online verfügbar unter <http://www.kinderkrebsregister.de/>.
- Kabzinska D.; Pierscinska, J.; Kochanski, A. (2009): Screening of the 17p11.2–p12 region in a large cohort of patients with Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease or hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP). In: *Journal of applied genetics*, Jg. 50, H. 3, S. 283–288.
- Kager L.; Zoubek, A.; Pötschger, U.; Kastner, U.; Flege, S.; Kempf-Bielack, B.; Branscheid, D.; Kotz, R.; Salzer-Kuntschik, M.; Winkelmann, W.; Jundt, G.; Kabisch, H.; Reichardt, P.; Jürgens, H.; Gadner, H.; Bielack, S. S. (2003): Primary metastatic osteosarcoma: presentation and outcome of patients treated on neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group protocols. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, Jg. 21, H. 10, S. 2011–2018.
- Kähkönen M.; Tengström, C.; Alitalo, T.; Matilainen, R.; Kaski, M.; Airaksinen, E. (1989): Population cytogenetics of folate-sensitive fragile sites. II. Autosomal rare fragile sites. In: *Human genetics*, Jg. 82, H. 1, S. 3–8.
- Kanda T.; Otter, M.; Wahl, G. M. (2001): Mitotic segregation of viral and cellular acentric extrachromosomal molecules by chromosome tethering. In: *Journal of cell science*, Jg. 114, H. Pt 1, S. 49–58.
- Kanekura T.; Chen, X. (2010): CD147/basigin promotes progression of malignant melanoma and other cancers. In: *Journal of dermatological science*, Jg. 57, H. 3, S. 149–154.
- Karlseder J.; Smogorzewska, A.; Lange, T. de (2002): Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. In: *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 295, H. 5564, S. 2446–2449.
- Kato J.; Matsushime, H.; Hiebert, S. W.; Ewen, M. E.; Sherr, C. J. (1993): Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. In: *Genes & development*, Jg. 7, H. 3, S. 331–342.
- Kaufman R. J.; Brown, P. C.; Schimke, R. T. (1979): Amplified dihydrofolate reductase genes in unstably methotrexate-resistant cells are associated with double minute chromosomes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 76, H. 11, S. 5669–5673.
- Kaur S.; Larramendy, M. L.; Vauhkonen, H.; Böhling, T.; Knuutila, S. (2007): Loss of TP53 in sarcomas with 17p12 to approximately p11 gain. A fine-resolution oligonucleotide array comparative genomic hybridization study. In: *Cytogenetic and genome research*, Jg. 116, H. 3, S. 153–157.
- Keck C. L.; Zimonjic, D. B.; Yuan, B. Z.; Thorgeirsson, S. S.; Popescu, N. C. (1999): Nonrandom breakpoints of unbalanced chromosome translocations in human hepatocellular carcinoma cell lines. In: *Cancer genetics and cytogenetics*, Jg. 111, H. 1, S. 37–44.
- Khatib Z. A.; Matsushime, H.; Valentine, M.; Shapiro, D. N.; Sherr, C. J.; Look, A. T. (1993): Coamplification of the CDK4 gene with MDM2 and GLI in human sarcomas. In: *Cancer research*, Jg. 53, H. 22, S. 5535–5541.
- Khoury J. D. (2005): Ewing sarcoma family of tumors. In: *Advances in anatomic pathology*, Jg. 12, H. 4, S. 212–220.
- Khoury J. D. (2007): Ewing sarcoma family of tumors: a model for the new era of integrated laboratory diagnostics. In: *Expert review of molecular diagnostics*, Jg. 8, H. 1, S. 97–105.

- Kim N. W.; Piatyszek, M. A.; Prowse, K. R.; Harley, C. B.; West, M. D.; Ho, P. L.; Coviello, G. M.; Wright, W. E.; Weinrich, S. L.; Shay, J. W. (1994): Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. In: *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 266, H. 5193, S. 2011–2015.
- Kimura M.; Umegaki, K.; Higuchi, M.; Thomas, P.; Fenech, M. (2004): Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, folic acid and riboflavin are important determinants of genome stability in cultured human lymphocytes. In: *The Journal of nutrition*, Jg. 134, H. 1, S. 48–56.
- Kinzler K. W.; Bigner, S. H.; Bigner, D. D.; Trent, J. M.; Law, M. L.; O'Brien, S. J.; Wong, A. J.; Vogelstein, B. (1987): Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. In: *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 236, H. 4797, S. 70–73.
- Kitchin F. D.; Ellsworth, R. M. (1974): Pleiotropic effects of the gene for retinoblastoma. In: *Journal of medical genetics*, Jg. 11, H. 3, S. 244–246.
- Kjønniksen I.; Winderen, M.; Bruland, O.; Fodstad, O. (1994): Validity and usefulness of human tumor models established by intratibial cell inoculation in nude rats. In: *Cancer research*, Jg. 54, H. 7, S. 1715–1719.
- Kleihues P.; Schäuble, B.; Zur Hausen, A.; Estève, J.; Ohgaki, H. (1997): Tumors associated with p53 germline mutations: a synopsis of 91 families. In: *The American journal of pathology*, Jg. 150, H. 1, S. 1–13.
- Kohl N. E.; Kanda, N.; Schreck, R. R.; Bruns, G.; Latt, S. A.; Gilbert, F.; Alt, F. W. (1983): Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. In: *Cell*, Jg. 35, H. 2 Pt 1, S. 359–367.
- Kools P. F.; van de Ven, W. J. (1996): Amplification of a rearranged form of the high-mobility group protein gene HMGIC in OsA-CI osteosarcoma cells. In: *Cancer genetics and cytogenetics*, Jg. 91, H. 1, S. 1–7.
- Krämer A.; Ho, A. D. (2001): Centrosome aberrations and cancer. In: *Onkologie*, Jg. 24, H. 6, S. 538–544.
- Krämer A.; Lukas, J.; Bartek, J. (2004): Checking out the centrosome. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, Jg. 3, H. 11, S. 1390–1393.
- Krämer A.; Raab, M. S.; Rebacz, B. (2008): Induction of spindle multipolarity by centrosomal cluster inhibition. In: *Cellular oncology : the official journal of the International Society for Cellular Oncology*, Jg. 30, H. 6, S. 505–506.
- Kresse S. H.; Ohnstad, H. O.; Paulsen, E. B.; Bjerkehagen, B.; Szuhai, K.; Serra, M.; Schaefer, K.-L.; Myklebost, O.; Meza-Zepeda, L. A. (2009): LSAMP, a novel candidate tumor suppressor gene in human osteosarcomas, identified by array comparative genomic hybridization. In: *Genes, chromosomes & cancer*, Jg. 48, H. 8, S. 679–693.
- Kuipers A.; Zhang, Y.; Cauley, J. A.; Nestlerode, C. S.; Chu, Y.; Bunker, C. H.; Patrick, A. L.; Wheeler, V. W.; Hoffman, A. R.; Orwoll, E. S.; Zmuda, J. M. (2009): Association of a high mobility group gene (HMGA2) variant with bone mineral density. In: *Bone*, Jg. 45, H. 2, S. 295–300.
- Kurzrock R.; Kantarjian, H. M.; Druker, B. J.; Talpaz, M. (2003): Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. In: *Annals of internal medicine*, Jg. 138, H. 10, S. 819–830.
- Kuwano A.; Kajii, T. (1987): Synergistic effect of aphidicolin and ethanol on the induction of common fragile sites. In: *Human genetics*, Jg. 75, H. 1, S. 75–78.
- Ladanyi M.; Cha, C.; Lewis, R.; Jhanwar, S. C.; Huvos, A. G.; Healey, J. H. (1993): MDM2 gene amplification in metastatic osteosarcoma. In: *Cancer research*, Jg. 53, H. 1, S. 16–18.
- Ladanyi M.; Lewis, R.; Jhanwar, S. C.; Gerald, W.; Huvos, A. G.; Healey, J. H. (1995): MDM2 and CDK4 gene amplification in Ewing's sarcoma. In: *The Journal of pathology*, Jg. 175, H. 2, S. 211–217.
- Landers J. E.; Cassel, S. L.; George, D. L. (1997): Translational enhancement of mdm2 oncogene expression in human tumor cells containing a stabilized wild-type p53 protein. In: *Cancer research*, Jg. 57, H. 16, S. 3562–3568.
- Larramendy M. L.; Tarkkanen, M.; Valle, J.; Kivioja, A. H.; Ervasti, H.; Karaharju, E.; Salmivalli, T.; Elomaa, I.; Knuutila, S. (1997): Gains, losses, and amplifications of DNA sequences evaluated by

- comparative genomic hybridization in chondrosarcomas. In: *The American journal of pathology*, Jg. 150, H. 2, S. 685–691.
- Lau C. C.; Harris, C. P.; Lu, X.-Y.; Perlaky, L.; Gogineni, S.; Chintagumpala, M.; Hicks, J.; Johnson, M. E.; Davino, N. A.; Huvos, A. G.; Meyers, P. A.; Healy, J. H.; Gorlick, R.; Rao, P. H. (2004): Frequent amplification and rearrangement of chromosomal bands 6p12-p21 and 17p11.2 in osteosarcoma. In: *Genes, chromosomes & cancer*, Jg. 39, H. 1, S. 11–21.
- Lee C.; Gisselsson, D.; Jin, C.; Nordgren, A.; Ferguson, D. O.; Blennow, E.; Fletcher, J. A.; Morton, C. C. (2001): Limitations of chromosome classification by multicolor karyotyping. In: *American journal of human genetics*, Jg. 68, H. 4, S. 1043–1047.
- Levan G.; Mandahl, N.; Bregula, U.; Klein, G.; Levan, A. (1976): Double minute chromosomes are not centromeric regions of the host chromosomes. In: *Hereditas*, Jg. 83, H. 1, S. 83–90.
- Levine A. J.; Momand, J.; Finlay, C. A. (1991): The p53 tumour suppressor gene. In: *Nature*, Jg. 351, H. 6326, S. 453–456.
- Levine A. J.; Perry, M. E.; Chang, A.; Silver, A.; Dittmer, D.; Wu, M.; Welsh, D. (1994): The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. In: *British journal of cancer*, Jg. 69, H. 3, S. 409–416.
- Lewis I. J.; Nooij, M. A.; Whelan, J.; Sydes, M. R.; Grimer, R.; Hogendoorn, P. C. W.; Memon, M. A.; Weeden, S.; Uscinska, B. M.; van Glabbeke, M.; Kirkpatrick, A.; Hauben, E. I.; Craft, A. W.; Taminiau, A. H. M. (2007): Improvement in histologic response but not survival in osteosarcoma patients treated with intensified chemotherapy: a randomized phase III trial of the European Osteosarcoma Intergroup. In: *Journal of the National Cancer Institute*, Jg. 99, H. 2, S. 112–128.
- Li F. P.; Fraumeni, J. F.; Mulvihill, J. J.; Blattner, W. A.; Dreyfus, M. G.; Tucker, M. A.; Miller, R. W. (1988): A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. In: *Cancer research*, Jg. 48, H. 18, S. 5358–5362.
- Lim G.; Karaskova, J.; Beheshti, B.; Vukovic, B.; Bayani, J.; Selvarajah, S.; Watson, S. K.; Lam, W. L.; Zielenska, M.; Squire, J. A. (2005): An integrated mBAND and submegabase resolution tiling set (SMRT) CGH array analysis of focal amplification, microdeletions, and ladder structures consistent with breakage-fusion-bridge cycle events in osteosarcoma. In: *Genes, chromosomes & cancer*, Jg. 42, H. 4, S. 392–403.
- Lingle W. L.; Lutz, W. H.; Ingle, J. N.; Maihle, N. J.; Salisbury, J. L. (1998): Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 95, H. 6, S. 2950–2955.
- Lonardo F.; Ueda, T.; Huvos, A. G.; Healey, J.; Ladanyi, M. (1997): p53 and MDM2 alterations in osteosarcomas: correlation with clinicopathologic features and proliferative rate. In: *Cancer*, Jg. 79, H. 8, S. 1541–1547.
- Londoño-Vallejo J. A. (2004): Telomere length heterogeneity and chromosome instability. In: *Cancer letters*, Jg. 212, H. 2, S. 135–144.
- Longhi A.; Benassi, M. S.; Molendini, L.; Macchiagodena, M.; Picci, P.; Bacci, G. (2001): Osteosarcoma in blood relatives. In: *Oncology reports*, Jg. 8, H. 1, S. 131–136.
- Lopes M. A.; Nikitakis, N. G.; Ord, R. A.; Sauk, J. (2001): Amplification and protein expression of chromosome 12q13-15 genes in osteosarcomas of the jaws. In: *Oral oncology*, Jg. 37, H. 7, S. 566–571.
- López-Ginés C.; Carda-Batalla, C.; López-Terrada, L.; Llombart-Bosch, A. (1996): Presence of double minutes and monosomy 17p in xenografted human osteosarcomas. In: *Cancer genetics and cytogenetics*, Jg. 90, H. 1, S. 57–62.
- Lu X.-Y.; Lu, Y.; Zhao, Y.-J.; Jaeweon, K.; Kang, J.; Xiao-Nan, L.; Ge, G.; Meyer, R.; Perlaky, L.; Hicks, J.; Chintagumpala, M.; Cai, W.-W.; Ladanyi, M.; Gorlick, R.; Lau, C. C.; Pati, D.; Sheldon, M.; Rao, P. H. (2008): Cell cycle regulator gene CDC5L, a potential target for 6p12-p21 amplicon in osteosarcoma. In: *Molecular cancer research : MCR*, Jg. 6, H. 6, S. 937–946.
- Lu Y. J.; Morris, J. S.; Edwards, P. A.; Shipley, J. (2000): Evaluation of 24-color multicolor-fluorescence in-situ hybridization (M-FISH) karyotyping by comparison with reverse chromosome painting of the human breast cancer cell line T-47D. In: *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*, Jg. 8, H. 2, S. 127–132.

- Ma C.; Martin, S.; Trask, B.; Hamlin, J. L. (1993): Sister chromatid fusion initiates amplification of the dihydrofolate reductase gene in Chinese hamster cells. In: *Genes & development*, Jg. 7, H. 4, S. 605–620.
- Macville M.; Veldman, T.; Padilla-Nash, H.; Wangsa, D.; O'Brien, P.; Schröck, E.; Ried, T. (1998): Spectral karyotyping, a 24-colour FISH technique for the identification of chromosomal rearrangements. In: *Histochemistry and cell biology*, Jg. 108, H. 4-5, S. 299–305.
- Maelandsmo G. M.; Berner, J. M.; Flørenes, V. A.; Forus, A.; Hovig, E.; Fodstad, O.; Myklebost, O. (1995): Homozygous deletion frequency and expression levels of the CDKN2 gene in human sarcomas--relationship to amplification and mRNA levels of CDK4 and CCND1. In: *British journal of cancer*, Jg. 72, H. 2, S. 393–398.
- Maitra A.; Roberts, H.; Weinberg, A. G.; Geradts, J. (2001): Loss of p16(INK4a) expression correlates with decreased survival in pediatric osteosarcomas. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer*, Jg. 95, H. 1, S. 34–38.
- Malik Z.; Dishi, M.; Garini, Y. (1996): Fourier transform multipixel spectroscopy and spectral imaging of protoporphyrin in single melanoma cells. In: *Photochemistry and photobiology*, Jg. 63, H. 5, S. 608–614.
- Man T.-K.; Lu, X.-Y.; Jaeweon, K.; Perlaky, L.; Harris, C. P.; Shah, S.; Ladanyi, M.; Gorlick, R.; Lau, C. C.; Rao, P. H. (2004): Genome-wide array comparative genomic hybridization analysis reveals distinct amplifications in osteosarcoma. In: *BMC cancer*, Jg. 4, S. 45.
- Manning J. A.; Shalini, S.; Risk, J. M.; Day, C. L.; Kumar, S. (2010): A Direct interaction with NEDD1 regulates gamma-tubulin recruitment to the centrosome. In: *PloS one*, Jg. 5, H. 3, S. e9618.
- Marina N.; Gebhardt, M.; Teot, L.; Gorlick, R. (2004): Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. In: *The oncologist*, Jg. 9, H. 4, S. 422–441.
- Mark J. (1967): Double-minutes--a chromosomal aberration in Rous sarcomas in mice. In: *Hereditas*, Jg. 57, H. 1, S. 1–22.
- Martins A. S.; Ordoñez, J. L.; García-Sánchez, A.; Herrero, D.; Sevillano, V.; Osuna, D.; Mackintosh, C.; Caballero, G.; Otero, A. P.; Poremba, C.; Madoz-Gúrpide, J.; Alava, E. de (2008): A pivotal role for heat shock protein 90 in Ewing sarcoma resistance to anti-insulin-like growth factor 1 receptor treatment: in vitro and in vivo study. In: *Cancer research*, Jg. 68, H. 15, S. 6260–6270.
- Masuda H.; Miller, C.; Koeffler, H. P.; Battifora, H.; Cline, M. J. (1987): Rearrangement of the p53 gene in human osteogenic sarcomas. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 84, H. 21, S. 7716–7719.
- Matsushime H.; Quelle, D. E.; Shurtleff, S. A.; Shibuya, M.; Sherr, C. J.; Kato, J. Y. (1994): D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. In: *Molecular and cellular biology*, Jg. 14, H. 3, S. 2066–2076.
- Maurer B. J.; Lai, E.; Hamkalo, B. A.; Hood, L.; Attardi, G. (1987): Novel submicroscopic extrachromosomal elements containing amplified genes in human cells. In: *Nature*, Jg. 327, H. 6121, S. 434–437.
- McAllister R. M.; Gardner, M. B.; Greene, A. E.; Bradt, C.; Nichols, W. W.; Landing, B. H. (1971): Cultivation in vitro of cells derived from a human osteosarcoma. In: *Cancer*, Jg. 27, H. 2, S. 397–402.
- McBride O. W.; Merry, D.; Givol, D. (1986): The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 83, H. 1, S. 130–134.
- McClintock B. (1941): The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays. In: *Genetics*, Jg. 26, H. 2, S. 234–282.
- McClintock B. (1951): Chromosome organization and genic expression. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, Jg. 16, S. 13–47.
- McEachern M. J.; Krauskopf, A.; Blackburn, E. H. (2000): Telomeres and their control. In: *Annual review of genetics*, Jg. 34, S. 331–358.
- McIntyre J. F.; Smith-Sorensen, B.; Friend, S. H.; Kassell, J.; Borresen, A. L.; Yan, Y. X.; Russo, C.; Sato, J.; Barbier, N.; Miser, J. (1994): Germline mutations of the p53 tumor suppressor gene in

- children with osteosarcoma. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, Jg. 12, H. 5, S. 925–930.
- Mejia-Guerrero S.; Quejada, M.; Gokgoz, N.; Gill, M.; Parkes, R. K.; Wunder, J. S.; Andrulis, I. L. (2010): Characterization of the 12q15 MDM2 and 12q13-14 CDK4 amplicons and clinical correlations in osteosarcoma. In: *Genes, chromosomes & cancer*.
- Meltzer P. S.; Jankowski, S. A.; Dal Cin, P.; Sandberg, A. A.; Paz, I. B.; Coccia, M. A. (1991): Identification and cloning of a novel amplified DNA sequence in human malignant fibrous histiocytoma derived from a region of chromosome 12 frequently rearranged in soft tissue tumors. In: *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, Jg. 2, H. 10, S. 495–501.
- Memon A. A.; Sorensen, B. S.; Melgard, P.; Fokdal, L.; Thykjaer, T.; Nexø, E. (2004): Expression of HER3, HER4 and their ligand heregulin-4 is associated with better survival in bladder cancer patients. In: *British journal of cancer*, Jg. 91, H. 12, S. 2034–2041.
- Menghi-Sartorio S.; Mandahl, N.; Mertens, F.; Picci, P.; Knuutila, S. (2001): DNA copy number amplifications in sarcomas with homogeneously staining regions and double minutes. In: *Cytometry*, Jg. 46, H. 2, S. 79–84.
- Mertens F.; Mandahl, N.; Orndal, C.; Baldetorp, B.; Bauer, H. C.; Rydholm, A.; Wiebe, T.; Willén, H.; Akerman, M.; Heim, S. (1993): Cytogenetic findings in 33 osteosarcomas. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer*, Jg. 55, H. 1, S. 44–50.
- Mileo A. M.; Fanuele, M.; Battaglia, F.; Scambia, G.; Benedetti-Panici, P.; Mancuso, S.; Ferrini, U. (1990): Selective over-expression of mRNA coding for 90 KDa stress-protein in human ovarian cancer. In: *Anticancer research*, Jg. 10, H. 4, S. 903–906.
- Miller C. W.; Aslo, A.; Campbell, M. J.; Kawamata, N.; Lampkin, B. C.; Koeffler, H. P. (1996a): Alterations of the p15, p16, and p18 genes in osteosarcoma. In: *Cancer genetics and cytogenetics*, Jg. 86, H. 2, S. 136–142.
- Miller C. W.; Aslo, A.; Won, A.; Tan, M.; Lampkin, B.; Koeffler, H. P. (1996b): Alterations of the p53, Rb and MDM2 genes in osteosarcoma. In: *Journal of cancer research and clinical oncology*, Jg. 122, H. 9, S. 559–565.
- Møller M. B.; Kania, P. W.; Ino, Y.; Gerdes, A. M.; Nielsen, O.; Louis, D. N.; Skjødt, K.; Pedersen, N. T. (2000): Frequent disruption of the RB1 pathway in diffuse large B cell lymphoma: prognostic significance of E2F-1 and p16INK4A. In: *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, Jg. 14, H. 5, S. 898–904.
- Momand J.; Zambetti, G. P.; Olson, D. C.; George, D.; Levine, A. J. (1992): The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. In: *Cell*, Jg. 69, H. 7, S. 1237–1245.
- Müller M. (2007): *Chirurgie für Studium und Praxis - 2008/09. Unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges und der mündlichen Examina in den Ärztlichen Prüfungen ; 2008/09. 9. Aufl. Breisach am Rhein: Medizinische Vlg- u. Inform.-Dienste; Medizinische Verl.- und Informationsdienste.*
- Mundy G. R. (2002): Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. In: *Nature reviews. Cancer*, Jg. 2, H. 8, S. 584–593.
- Murnane J. P.; Sabatier, L.; Marder, B. A.; Morgan, W. F. (1994): Telomere dynamics in an immortal human cell line. In: *The EMBO journal*, Jg. 13, H. 20, S. 4953–4962.
- Murnane J. P. (2006): Telomeres and chromosome instability. In: *DNA repair*, Jg. 5, H. 9-10, S. 1082–1092.
- Muthusamy V.; Hobbs, C.; Nogueira, C.; Cordon-Cardo, C.; McKee, P. H.; Chin, L.; Bosenberg, M. W. (2006): Amplification of CDK4 and MDM2 in malignant melanoma. In: *Genes, chromosomes & cancer*, Jg. 45, H. 5, S. 447–454.
- Myers C. L.; Chen, X.; Troyanskaya, O. G. (2005): Visualization-based discovery and analysis of genomic aberrations in microarray data. In: *BMC bioinformatics*, Jg. 6, S. 146.
- Myllykangas S.; Knuutila, S. (2006): Manifestation, mechanisms and mysteries of gene amplifications. In: *Cancer letters*, Jg. 232, H. 1, S. 79–89.

- Nakayama T.; Toguchida, J.; Wadayama, B.; Kanoe, H.; Kotoura, Y.; Sasaki, M. S. (1995): MDM2 gene amplification in bone and soft-tissue tumors: association with tumor progression in differentiated adipose-tissue tumors. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer*, Jg. 64, H. 5, S. 342–346.
- Nathan S. S.; Pereira, B. P.; Zhou, Y.-F.; Gupta, A.; Dombrowski, C.; Soong, R.; Pho, R. W. H.; Stein, G. S.; Salto-Tellez, M.; Cool, S. M.; van Wijnen, A. J. (2009): Elevated expression of Runx2 as a key parameter in the etiology of osteosarcoma. In: *Molecular biology reports*, Jg. 36, H. 1, S. 153–158.
- Nevins J. R.; Leone, G.; DeGregori, J.; Jakoi, L. (1997): Role of the Rb/E2F pathway in cell growth control. In: *Journal of cellular physiology*, Jg. 173, H. 2, S. 233–236.
- Nielsen G. P.; Burns, K. L.; Rosenberg, A. E.; Louis, D. N. (1998): CDKN2A gene deletions and loss of p16 expression occur in osteosarcomas that lack RB alterations. In: *The American journal of pathology*, Jg. 153, H. 1, S. 159–163.
- Noble-Topham S. E.; Burrow, S. R.; Eppert, K.; Kandel, R. A.; Meltzer, P. S.; Bell, R. S.; Andrulis, I. L. (1996): SAS is amplified predominantly in surface osteosarcoma. In: *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, Jg. 14, H. 5, S. 700–705.
- Nobori T.; Takabayashi, K.; Tran, P.; Orvis, L.; Batova, A.; Yu, A. L.; Carson, D. A. (1996): Genomic cloning of methylthioadenosine phosphorylase: a purine metabolic enzyme deficient in multiple different cancers. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 93, H. 12, S. 6203–6208.
- Ntougkos E.; Rush, R.; Scott, D.; Frankenberg, T.; Gabra, H.; Smyth, J. F.; Sellar, G. C. (2005): The IgLON family in epithelial ovarian cancer: expression profiles and clinicopathologic correlates. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, Jg. 11, H. 16, S. 5764–5768.
- Olfa G.; Christophe, C.; Philippe, L.; Romain, S.; Khaled, H.; Pierre, H.; Odile, B.; Jean-Christophe, D. (2010): RUNX2 regulates the effects of TNFalpha on proliferation and apoptosis in SaOs-2 cells. In: *Bone*, Jg. 46, H. 4, S. 901–910.
- Oliner J. D.; Kinzler, K. W.; Meltzer, P. S.; George, D. L.; Vogelstein, B. (1992): Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. In: *Nature*, Jg. 358, H. 6381, S. 80–83.
- Olivier M.; Hollstein, M.; Hainaut, P. (2010): TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, Jg. 2, H. 1, S. a001008.
- Onel K.; Cordon-Cardo, C. (2004): MDM2 and prognosis. In: *Molecular cancer research : MCR*, Jg. 2, H. 1, S. 1–8.
- O'Sullivan J. N.; Bronner, M. P.; Brentnall, T. A.; Finley, J. C.; Shen, W.-T.; Emerson, S.; Emond, M. J.; Gollahon, K. A.; Moskovitz, A. H.; Crispin, D. A.; Potter, J. D.; Rabinovitch, P. S. (2002): Chromosomal instability in ulcerative colitis is related to telomere shortening. In: *Nature genetics*, Jg. 32, H. 2, S. 280–284.
- Ottaviano L.; Schaefer, K.-L.; Gajewski, M.; Huckenbeck, W.; Baldus, S.; Rogel, U.; Mackintosh, C.; Alava, E. de; Myklebost, O.; Kresse, S. H.; Meza-Zepeda, L. A.; Serra, M.; Cleton-Jansen, A.-M.; Hogendoorn, P. C. W.; Buerger, H.; Aigner, T.; Gabbert, H. E.; Poremba, C. (2010): Molecular characterization of commonly used cell lines for bone tumor research: a trans-European EuroBoNet effort. In: *Genes, chromosomes & cancer*, Jg. 49, H. 1, S. 40–51.
- Overholtzer M.; Rao, P. H.; Favis, R.; Lu, X.-Y.; Elowitz, M. B.; Barany, F.; Ladanyi, M.; Gorlick, R.; Levine, A. J. (2003): The presence of p53 mutations in human osteosarcomas correlates with high levels of genomic instability. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 100, H. 20, S. 11547–11552.
- Ozaki T.; Neumann, T.; Wai, D.; Schäfer, K.-L.; van Valen, F.; Lindner, N.; Scheel, C.; Böcker, W.; Winkelmann, W.; Dockhorn-Dworniczak, B.; Horst, J.; Poremba, C. (2003): Chromosomal alterations in osteosarcoma cell lines revealed by comparative genomic hybridization and multicolor karyotyping. In: *Cancer genetics and cytogenetics*, Jg. 140, H. 2, S. 145–152.
- Ozaki T.; Schaefer, K.-L.; Wai, D.; Buerger, H.; Flege, S.; Lindner, N.; Kevric, M.; Diallo, R.; Bankfalvi, A.; Brinkschmidt, C.; Juergens, H.; Winkelmann, W.; Dockhorn-Dworniczak, B.; Bielack, S. S.; Poremba, C. (2002): Genetic imbalances revealed by comparative genomic hybridization in

- osteosarcomas. In: International journal of cancer. Journal international du cancer, Jg. 102, H. 4, S. 355–365.
- Ozisk Y. Y.; Meloni, A. M.; Peier, A.; Altungoz, O.; Spanier, S. S.; Zalupski, M. M.; Leong, S. P.; Sandberg, A. A. (1994): Cytogenetic findings in 19 malignant bone tumors. In: Cancer, Jg. 74, H. 8, S. 2268–2275.
- Pakos E. E.; Kyzas, P. A.; Ioannidis, J. P. A. (2004): Prognostic significance of TP53 tumor suppressor gene expression and mutations in human osteosarcoma: a meta-analysis. In: Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, Jg. 10, H. 18 Pt 1, S. 6208–6214.
- Papachristou D. J.; Papavassiliou, A. G. (2007): Osteosarcoma and chondrosarcoma: new signaling pathways as targets for novel therapeutic interventions. In: The international journal of biochemistry & cell biology, Jg. 39, H. 5, S. 857–862.
- Park H.-R.; Jung, W. W.; Bertoni, F.; Bacchini, P.; Park, J. H.; Kim, Y.-W.; Park, Y.-K. (2004): Molecular analysis of p53, MDM2 and H-ras genes in low-grade central osteosarcoma. In: Pathology, research and practice, Jg. 200, H. 6, S. 439–445.
- Pasic I.; Shlien, A.; Durbin, A. D.; Stavropoulos, D. J.; Baskin, B.; Ray, P. N.; Novokmet, A.; Malkin, D. (2010): Recurrent focal copy-number changes and loss of heterozygosity implicate two noncoding RNAs and one tumor suppressor gene at chromosome 3q13.31 in osteosarcoma. In: Cancer research, Jg. 70, H. 1, S. 160–171.
- Pereira A. L.; Pereira, A. J.; Maia, A. R. R.; Drabek, K.; Sayas, C. L.; Hergert, P. J.; Lince-Faria, M.; Matos, I.; Duque, C.; Stepanova, T.; Rieder, C. L.; Earnshaw, W. C.; Galjart, N.; Maiato, H. (2006): Mammalian CLASP1 and CLASP2 cooperate to ensure mitotic fidelity by regulating spindle and kinetochore function. In: Molecular biology of the cell, Jg. 17, H. 10, S. 4526–4542.
- Picci P. (2007): Osteosarcoma (osteogenic sarcoma). In: Orphanet journal of rare diseases, Jg. 2, S. 6.
- Picksley S. M.; Lane, D. P. (1993): The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53? In: BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology, Jg. 15, H. 10, S. 689–690.
- Pontén J.; Saksela, E. (1968): Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours. In: International journal of cancer. Journal international du cancer, Jg. 2, H. 5, S. 434–447.
- Poupon M. F.; Smith, K. A.; Chernova, O. B.; Gilbert, C.; Stark, G. R. (1996): Inefficient growth arrest in response to dNTP starvation stimulates gene amplification through bridge-breakage-fusion cycles. In: Molecular biology of the cell, Jg. 7, H. 3, S. 345–354.
- Pratap J.; Galindo, M.; Zaidi, S. K.; Vradii, D.; Bhat, B. M.; Robinson, J. A.; Choi, J.-Y.; Komori, T.; Stein, J. L.; Lian, J. B.; Stein, G. S.; van Wijnen, A. J. (2003): Cell growth regulatory role of Runx2 during proliferative expansion of preosteoblasts. In: Cancer research, Jg. 63, H. 17, S. 5357–5362.
- Quelle D. E.; Zindy, F.; Ashmun, R. A.; Sherr, C. J. (1995): Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. In: Cell, Jg. 83, H. 6, S. 993–1000.
- Radig K.; Schneider-Stock, R.; Haeckel, C.; Neumann, W.; Roessner, A. (1998): p53 gene mutations in osteosarcomas of low-grade malignancy. In: Human pathology, Jg. 29, H. 11, S. 1310–1316.
- Ragland B. D.; Bell, W. C.; Lopez, R. R.; Siegal, G. P. (2002): Cytogenetics and molecular biology of osteosarcoma. In: Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, Jg. 82, H. 4, S. 365–373.
- Ramos D.; Aldaz, C. M. (2006): WWOX, a chromosomal fragile site gene and its role in cancer. In: Advances in experimental medicine and biology, Jg. 587, S. 149–159.
- Rao P. N.; Heerema, N. A.; Palmer, C. G. (1988): Fragile sites induced by FUdR, caffeine, and aphidicolin. Their frequency, distribution, and analysis. In: Human genetics, Jg. 78, H. 1, S. 21–26.
- Raymond E.; Faivre, S.; Weiss, G.; McGill, J.; Davidson, K.; Izbicka, E.; Kuhn, J. G.; Allred, C.; Clark, G. M.; Hoff, D. D. von (2001): Effects of hydroxyurea on extrachromosomal DNA in patients with advanced ovarian carcinomas. In: Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, Jg. 7, H. 5, S. 1171–1180.

- Rebacz B.; Larsen, T. O.; Clausen, M. H.; Rønneest, M. H.; Löffler, H.; Ho, A. D.; Krämer, A. (2007): Identification of griseofulvin as an inhibitor of centrosomal clustering in a phenotype-based screen. In: *Cancer research*, Jg. 67, H. 13, S. 6342–6350.
- Reddy K. S. (2007): Double minutes (dmin) and homogeneously staining regions (hsr) in myeloid disorders: a new case suggesting that dmin form hsr in vivo. In: *Cytogenetic and genome research*, Jg. 119, H. 1-2, S. 53–59.
- Reeves R.; Nissen, M. S. (1990): The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. In: *The Journal of biological chemistry*, Jg. 265, H. 15, S. 8573–8582.
- Reifenberger G.; Ichimura, K.; Reifenberger, J.; Elkahloun, A. G.; Meltzer, P. S.; Collins, V. P. (1996): Refined mapping of 12q13-q15 amplicons in human malignant gliomas suggests CDK4/SAS and MDM2 as independent amplification targets. In: *Cancer research*, Jg. 56, H. 22, S. 5141–5145.
- Reifenberger G.; Liu, L.; Ichimura, K.; Schmidt, E. E.; Collins, V. P. (1993): Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. In: *Cancer research*, Jg. 53, H. 12, S. 2736–2739.
- Rhim J. S.; Park, D. K.; Arnstein, P.; Huebner, R. J.; Weisburger, E. K.; Nelson-Rees, W. A. (1975): Transformation of human cells in culture by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. In: *Nature*, Jg. 256, H. 5520, S. 751–753.
- Ring D.; Hubble, R.; Kirschner, M. (1982): Mitosis in a cell with multiple centrioles. In: *The Journal of cell biology*, Jg. 94, H. 3, S. 549–556.
- Riou G.; Barrois, M.; Prost, S.; Terrier, M. J.; Theodore, C.; Levine, A. J. (1995): The p53 and mdm-2 genes in human testicular germ-cell tumors. In: *Molecular carcinogenesis*, Jg. 12, H. 3, S. 124–131.
- Roberts W. M.; Douglass, E. C.; Peiper, S. C.; Houghton, P. J.; Look, A. T. (1989): Amplification of the gli gene in childhood sarcomas. In: *Cancer research*, Jg. 49, H. 19, S. 5407–5413.
- Rønneest M. H.; Rebacz, B.; Markworth, L.; Terp, A. H.; Larsen, T. O.; Krämer, A.; Clausen, M. H. (2009): Synthesis and structure-activity relationship of griseofulvin analogues as inhibitors of centrosomal clustering in cancer cells. In: *Journal of medicinal chemistry*, Jg. 52, H. 10, S. 3342–3347.
- Rowley J. D. (1990): The Philadelphia chromosome translocation. A paradigm for understanding leukemia. In: *Cancer*, Jg. 65, H. 10, S. 2178–2184.
- Sandberg A. A.; Bridge, J. A. (2001): Updates on cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: Ewing sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. In: *Cancer genetics and cytogenetics*, Jg. 123, H. 1, S. 1–26.
- Sandberg A. A.; Bridge, J. A. (2003): Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: osteosarcoma and related tumors. Review. In: *Cancer genetics and cytogenetics*, Jg. 145, H. 1, S. 1–30.
- Sanders R. P.; Drissi, R.; Billups, C. A.; Daw, N. C.; Valentine, M. B.; Dome, J. S. (2004): Telomerase expression predicts unfavorable outcome in osteosarcoma. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, Jg. 22, H. 18, S. 3790–3797.
- Saunders W. S.; Shuster, M.; Huang, X.; Gharaibeh, B.; Enyenihi, A. H.; Petersen, I.; Gollin, S. M. (2000): Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 97, H. 1, S. 303–308.
- Scheel C.; Schaefer, K. L.; Jauch, A.; Keller, M.; Wai, D.; Brinkschmidt, C.; van Valen, F.; Boecker, W.; Dockhorn-Dworniczak, B.; Poremba, C. (2001): Alternative lengthening of telomeres is associated with chromosomal instability in osteosarcomas. In: *Oncogene*, Jg. 20, H. 29, S. 3835–3844.
- Scheel C.; Poremba, C. (2002): Telomere lengthening in telomerase-negative cells: the ends are coming together. In: *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, Jg. 440, H. 6, S. 573–582.
- Schoenlein P. V.; Shen, D. W.; Barrett, J. T.; Pastan, I.; Gottesman, M. M. (1992): Double minute chromosomes carrying the human multidrug resistance 1 and 2 genes are generated from the dimerization of submicroscopic circular DNAs in colchicine-selected KB carcinoma cells. In: *Molecular biology of the cell*, Jg. 3, H. 5, S. 507–520.
- Schoenlein P. V.; Barrett, J. T.; Kulharya, A.; Dohn, M. R.; Sanchez, A.; Hou, D.-Y.; McCoy, J. (2003): Radiation therapy depletes extrachromosomally amplified drug resistance genes and oncogenes from

- tumor cells via micronuclear capture of episomes and double minute chromosomes. In: *International journal of radiation oncology, biology, physics*, Jg. 55, H. 4, S. 1051–1065.
- Scholz R. B.; Kabisch, H.; Weber, B.; Röser, K.; Dellling, G.; Winkler, K. (1992): Studies of the RB1 gene and the p53 gene in human osteosarcomas. In: *Pediatric hematology and oncology*, Jg. 9, H. 2, S. 125–137.
- Schröck E.; du Manoir, S.; Veldman, T.; Schoell, B.; Wienberg, J.; Ferguson-Smith, M. A.; Ning, Y.; Ledbetter, D. H.; Bar-Am, I.; Soenksen, D.; Garini, Y.; Ried, T. (1996): Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. In: *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 273, H. 5274, S. 494–497.
- Scotlandi K.; Serra, M.; Landuzzi, L.; Baldini, N. (1992): SARG: a new human osteosarcoma cell line. Expression of bone markers and of major histocompatibility antigens. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, Jg. 3 Suppl 2, S. S29-31.
- Scotlandi K.; Serra, M.; Manara, M. C.; Lollini, P. L.; Maurici, D.; Del Bufalo, D.; Baldini, N. (1994): Pre-treatment of human osteosarcoma cells with N-methylformamide enhances P-glycoprotein expression and resistance to doxorubicin. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer*, Jg. 58, H. 1, S. 95–101.
- Selvarajah S.; Yoshimoto, M.; Ludkovski, O.; Park, P. C.; Bayani, J.; Thorner, P.; Maire, G.; Squire, J. A.; Zielenska, M. (2008): Genomic signatures of chromosomal instability and osteosarcoma progression detected by high resolution array CGH and interphase FISH. In: *Cytogenetic and genome research*, Jg. 122, H. 1, S. 5–15.
- Selvarajah S.; Yoshimoto, M.; Maire, G.; Paderova, J.; Bayani, J.; Squire, J. A.; Zielenska, M. (2007): Identification of cryptic microaberrations in osteosarcoma by high-definition oligonucleotide array comparative genomic hybridization. In: *Cancer genetics and cytogenetics*, Jg. 179, H. 1, S. 52–61.
- Selvarajah S.; Yoshimoto, M.; Park, P. C.; Maire, G.; Paderova, J.; Bayani, J.; Lim, G.; Al-Romaih, K.; Squire, J. A.; Zielenska, M. (2006): The breakage-fusion-bridge (BFB) cycle as a mechanism for generating genetic heterogeneity in osteosarcoma. In: *Chromosoma*, Jg. 115, H. 6, S. 459–467.
- Seyffert W.; Balling, R. (1998): *Lehrbuch der Genetik*. Stuttgart: Fischer.
- Shaffer L. G.; Slovak, M. L.; Campbell, L. J. (2009): ISCN 2009. An international system for human cytogenetic nomenclature (2009) ; recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: Karger [u.a.].
- Sharpless N. E. (2004): Ink4a/Arf links senescence and aging. In: *Experimental gerontology*, Jg. 39, H. 11-12, S. 1751–1759.
- Shay J. W.; Wright, W. E. (1996): Telomerase activity in human cancer. In: *Current opinion in oncology*, Jg. 8, H. 1, S. 66–71.
- Sherr C. J. (1993): Mammalian G1 cyclins. In: *Cell*, Jg. 73, H. 6, S. 1059–1065.
- Shimizu N.; Miura, Y.; Sakamoto, Y.; Tsutsui, K. (2001): Plasmids with a mammalian replication origin and a matrix attachment region initiate the event similar to gene amplification. In: *Cancer research*, Jg. 61, H. 19, S. 6987–6990.
- Shimizu N.; Shingaki, K.; Kaneko-Sasaguri, Y.; Hashizume, T.; Kanda, T. (2005): When, where and how the bridge breaks: anaphase bridge breakage plays a crucial role in gene amplification and HSR generation. In: *Experimental cell research*, Jg. 302, H. 2, S. 233–243.
- Shinawi M.; Cheung, S. W. (2008): The array CGH and its clinical applications. In: *Drug discovery today*, Jg. 13, H. 17-18, S. 760–770.
- Shuster M. I.; Han, L.; Le Beau, M. M.; Davis, E.; Sawicki, M.; Lese, C. M.; Park, N. H.; Colicelli, J.; Gollin, S. M. (2000): A consistent pattern of RIN1 rearrangements in oral squamous cell carcinoma cell lines supports a breakage-fusion-bridge cycle model for 11q13 amplification. In: *Genes, chromosomes & cancer*, Jg. 28, H. 2, S. 153–163.
- Simon R.; Struckmann, K.; Schraml, P.; Wagner, U.; Forster, T.; Moch, H.; Fijan, A.; Bruderer, J.; Wilber, K.; Mihatsch, M. J.; Gasser, T.; Sauter, G. (2002): Amplification pattern of 12q13-q15 genes (MDM2, CDK4, GLI) in urinary bladder cancer. In: *Oncogene*, Jg. 21, H. 16, S. 2476–2483.
- Smith K. A.; Stark, M. B.; Gorman, P. A.; Stark, G. R. (1992): Fusions near telomeres occur very early in the amplification of CAD genes in Syrian hamster cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 89, H. 12, S. 5427–5431.

- Spriggs A. I.; Boddington, M. M.; Clarke, C. M. (1962): Chromosomes of human cancer cells. In: *British medical journal*, Jg. 2, H. 5317, S. 1431–1435.
- Squire J. A.; Pei, J.; Marrano, P.; Beheshti, B.; Bayani, J.; Lim, G.; Moldovan, L.; Zielenska, M. (2003): High-resolution mapping of amplifications and deletions in pediatric osteosarcoma by use of CGH analysis of cDNA microarrays. In: *Genes, chromosomes & cancer*, Jg. 38, H. 3, S. 215–225.
- Srivastava S.; Zou, Z. Q.; Pirolo, K.; Blattner, W.; Chang, E. H. (1990): Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. In: *Nature*, Jg. 348, H. 6303, S. 747–749.
- Stark G. R.; Wahl, G. M. (1984): Gene amplification. In: *Annual review of biochemistry*, Jg. 53, S. 447–491.
- Stein U.; Eder, C.; Karsten, U.; Haensch, W.; Walther, W.; Schlag, P. M. (1999): GLI gene expression in bone and soft tissue sarcomas of adult patients correlates with tumor grade. In: *Cancer research*, Jg. 59, H. 8, S. 1890–1895.
- Stock C.; Kager, L.; Fink, F. M.; Gadner, H.; Ambros, P. F. (2000): Chromosomal regions involved in the pathogenesis of osteosarcomas. In: *Genes, chromosomes & cancer*, Jg. 28, H. 3, S. 329–336.
- Swanton C. (2004): Cell-cycle targeted therapies. In: *The lancet oncology*, Jg. 5, H. 1, S. 27–36.
- Szymanska J.; Mandahl, N.; Mertens, F.; Tarkkanen, M.; Karaharju, E.; Knuutila, S. (1997): Ring chromosomes in parosteal osteosarcoma contain sequences from 12q13–15: a combined cytogenetic and comparative genomic hybridization study. In: *Genes, chromosomes & cancer*, Jg. 16, H. 1, S. 31–34.
- Takahashi M.; Yamagiwa, A.; Nishimura, T.; Mukai, H.; Ono, Y. (2002): Centrosomal proteins CG-NAP and kendrin provide microtubule nucleation sites by anchoring gamma-tubulin ring complex. In: *Molecular biology of the cell*, Jg. 13, H. 9, S. 3235–3245.
- Tarkkanen M.; Böhling, T.; Gamberi, G.; Ragazzini, P.; Benassi, M. S.; Kivioja, A.; Kallio, P.; Elomaa, I.; Picci, P.; Knuutila, S. (1998): Comparative genomic hybridization of low-grade central osteosarcoma. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, Jg. 11, H. 5, S. 421–426.
- Tarkkanen M.; Elomaa, I.; Blomqvist, C.; Kivioja, A. H.; Kellokumpu-Lehtinen, P.; Böhling, T.; Valle, J.; Knuutila, S. (1999): DNA sequence copy number increase at 8q: a potential new prognostic marker in high-grade osteosarcoma. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer*, Jg. 84, H. 2, S. 114–121.
- Tarkkanen M.; Kaipainen, A.; Karaharju, E.; Böhling, T.; Szymanska, J.; Heliö, H.; Kivioja, A.; Elomaa, I.; Knuutila, S. (1993): Cytogenetic study of 249 consecutive patients examined for a bone tumor. In: *Cancer genetics and cytogenetics*, Jg. 68, H. 1, S. 1–21.
- Tarkkanen M.; Karhu, R.; Kallioniemi, A.; Elomaa, I.; Kivioja, A. H.; Nevalainen, J.; Böhling, T.; Karaharju, E.; Hyytinen, E.; Knuutila, S. (1995): Gains and losses of DNA sequences in osteosarcomas by comparative genomic hybridization. In: *Cancer research*, Jg. 55, H. 6, S. 1334–1338.
- Telenius H.; Carter, N. P.; Bebb, C. E.; Nordenskjöld, M.; Ponder, B. A.; Tunnacliffe, A. (1992): Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. In: *Genomics*, Jg. 13, H. 3, S. 718–725.
- Teodoro J. G.; Evans, S. K.; Green, M. R. (2007): Inhibition of tumor angiogenesis by p53: a new role for the guardian of the genome. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, Jg. 85, H. 11, S. 1175–1186.
- Toguchida J.; Yamaguchi, T.; Ritchie, B.; Beauchamp, R. L.; Dayton, S. H.; Herrera, G. E.; Yamamuro, T.; Kotoura, Y.; Sasaki, M. S.; Little, J. B. (1992): Mutation spectrum of the p53 gene in bone and soft tissue sarcomas. In: *Cancer research*, Jg. 52, H. 22, S. 6194–6199.
- Toledo F.; Buttin, G.; Debatisse, M. (1993): The origin of chromosome rearrangements at early stages of AMPD2 gene amplification in Chinese hamster cells. In: *Current biology : CB*, Jg. 3, H. 5, S. 255–264.
- Toledo F.; Le Roscouet, D.; Buttin, G.; Debatisse, M. (1992): Co-amplified markers alternate in megabase long chromosomal inverted repeats and cluster independently in interphase nuclei at early steps of mammalian gene amplification. In: *The EMBO journal*, Jg. 11, H. 7, S. 2665–2673.

- Tritarelli A.; Oricchio, E.; Ciciarello, M.; Mangiacasale, R.; Palena, A.; Lavia, P.; Soddu, S.; Cundari, E. (2004): p53 localization at centrosomes during mitosis and postmitotic checkpoint are ATM-dependent and require serine 15 phosphorylation. In: *Molecular biology of the cell*, Jg. 15, H. 8, S. 3751–3757.
- Ulaner G. A.; Huang, H.-Y.; Otero, J.; Zhao, Z.; Ben-Porat, L.; Satagopan, J. M.; Gorlick, R.; Meyers, P.; Healey, J. H.; Huvos, A. G.; Hoffman, A. R.; Ladanyi, M. (2003): Absence of a telomere maintenance mechanism as a favorable prognostic factor in patients with osteosarcoma. In: *Cancer research*, Jg. 63, H. 8, S. 1759–1763.
- Uozaki H.; Horiuchi, H.; Ishida, T.; Iijima, T.; Imamura, T.; Machinami, R. (1997): Overexpression of resistance-related proteins (metallothioneins, glutathione-S-transferase pi, heat shock protein 27, and lung resistance-related protein) in osteosarcoma. Relationship with poor prognosis. In: *Cancer*, Jg. 79, H. 12, S. 2336–2344.
- Urano F.; Umezawa, A.; Yabe, H.; Hong, W.; Yoshida, K.; Fujinaga, K.; Hata, J. (1998): Molecular analysis of Ewing's sarcoma: another fusion gene, EWS-E1AF, available for diagnosis. In: *Japanese journal of cancer research : Gann*, Jg. 89, H. 7, S. 703–711.
- Vacha S. J. (2006): Ten Pitfalls of Microarray Analysis. Online verfügbar unter http://www.chem.agilent.com/Library/applications/10_pitfalls_technote72.pdf.
- Valent A.; Bénard, J.; Clause, B.; Barrois, M.; Valteau-Couanet, D.; Terrier-Lacombe, M. J.; Spengler, B.; Bernheim, A. (2001): In vivo elimination of acentric double minutes containing amplified MYCN from neuroblastoma tumor cells through the formation of micronuclei. In: *The American journal of pathology*, Jg. 158, H. 5, S. 1579–1584.
- van Dartel M.; Cornelissen, P. W. A.; Redeker, S.; Tarkkanen, M.; Knuutila, S.; Hogendoorn, P. C. W.; Westerveld, A.; Gomes, I.; Bras, J.; Hulsebos, T. J. M. (2002): Amplification of 17p11.2 approximately p12, including PMP22, TOP3A, and MAPK7, in high-grade osteosarcoma. In: *Cancer genetics and cytogenetics*, Jg. 139, H. 2, S. 91–96.
- van Dartel M.; Hulsebos, T. J. M. (2004): Amplification and overexpression of genes in 17p11.2 ~ p12 in osteosarcoma. In: *Cancer genetics and cytogenetics*, Jg. 153, H. 1, S. 77–80.
- van Dartel M.; Leenstra, S.; Troost, D.; Hulsebos, T. J. M. (2003): Infrequent but high-level amplification of 17p11.2 approximately p12 in human glioma. In: *Cancer genetics and cytogenetics*, Jg. 140, H. 2, S. 162–166.
- van Dartel M.; Redeker, S.; Bras, J.; Kool, M.; Hulsebos, T. J. M. (2004): Overexpression through amplification of genes in chromosome region 17p11.2 approximately p12 in high-grade osteosarcoma. In: *Cancer genetics and cytogenetics*, Jg. 152, H. 1, S. 8–14.
- Vardiman J. W. (2009): The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: An overview with emphasis on the myeloid neoplasms. In: *Chemico-biological interactions*.
- Veltman I. M.; Veltman, J. A.; Arkesteijn, G.; Janssen, I. M.; Vissers, L. E.; de Jong, P. J.; van Kessel, A. G.; Schoenmakers, E. F. (2003): Chromosomal breakpoint mapping by arrayCGH using flow-sorted chromosomes. In: *BioTechniques*, Jg. 35, H. 5, S. 1066–1070.
- Vinatzer U.; Gollinger, M.; Müllauer, L.; Raderer, M.; Chott, A.; Streubel, B. (2008): Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: novel translocations including rearrangements of ODZ2, JMJD2C, and CNN3. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, Jg. 14, H. 20, S. 6426–6431.
- Wadayama B.; Toguchida, J.; Shimizu, T.; Ishizaki, K.; Sasaki, M. S.; Kotoura, Y.; Yamamuro, T. (1994): Mutation spectrum of the retinoblastoma gene in osteosarcomas. In: *Cancer research*, Jg. 54, H. 11, S. 3042–3048.
- Wahl G. M. (1989): The importance of circular DNA in mammalian gene amplification. In: *Cancer research*, Jg. 49, H. 6, S. 1333–1340.
- Wang S.; Ren, W.; Liu, J.; Lahat, G.; Torres, K.; Lopez, G.; Lazar, A. J.; Hayes-Jordan, A.; Liu, K.; Bankson, J.; Hazle, J. D.; Lev, D. (2010): TRAIL and doxorubicin combination induces proapoptotic and antiangiogenic effects in soft tissue sarcoma in vivo. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, Jg. 16, H. 9, S. 2591–2604.
- Wei G.; Lonardo, F.; Ueda, T.; Kim, T.; Huvos, A. G.; Healey, J. H.; Ladanyi, M. (1999): CDK4 gene amplification in osteosarcoma: reciprocal relationship with INK4A gene alterations and mapping of

- 12q13 amplicons. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer*, Jg. 80, H. 2, S. 199–204.
- Wheeler D. A.; Srinivasan, M.; Egholm, M.; Shen, Y.; Chen, L.; McGuire, A.; He, W.; Chen, Y.-J.; Makhijani, V.; Roth, G. T.; Gomes, X.; Tartaro, K.; Niazi, F.; Turcotte, C. L.; Irzyk, G. P.; Lupski, J. R.; Chinault, C.; Song, X.-z.; Liu, Y.; Yuan, Y.; Nazareth, L.; Qin, X.; Muzny, D. M.; Margulies, M.; Weinstock, G. M.; Gibbs, R. A.; Rothberg, J. M. (2008): The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. In: *Nature*, Jg. 452, H. 7189, S. 872–876.
- Windle B.; Draper, B. W.; Yin, Y. X.; O'Gorman, S.; Wahl, G. M. (1991): A central role for chromosome breakage in gene amplification, deletion formation, and amplicon integration. In: *Genes & development*, Jg. 5, H. 2, S. 160–174.
- Witte A. de (2006): 60-mer Oligo-Based Comparative Genomic Hybridization. Online verfügbar unter http://www.chem.agilent.com/Library/applications/CGH_ApplicationNote_5989-4530EN_72dpi%28RGB%29.pdf.
- Wolf M.; El-Rifai, W.; Tarkkanen, M.; Kononen, J.; Serra, M.; Eriksen, E. F.; Elomaa, I.; Kallioniemi, A.; Kallioniemi, O. P.; Knuutila, S. (2000): Novel findings in gene expression detected in human osteosarcoma by cDNA microarray. In: *Cancer genetics and cytogenetics*, Jg. 123, H. 2, S. 128–132.
- Wolf M.; Tarkkanen, M.; Hulsebos, T.; Larramendy, M. L.; Forus, A.; Myklebost, O.; Aaltonen, L. A.; Elomaa, I.; Knuutila, S. (1999): Characterization of the 17p amplicon in human sarcomas: microsatellite marker analysis. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer*, Jg. 82, H. 3, S. 329–333.
- Won K. Y.; Park, H.-R.; Park, Y.-K. (2009): Prognostic implication of immunohistochemical Runx2 expression in osteosarcoma. In: *Tumori*, Jg. 95, H. 3, S. 311–316.
- Wu B.-T.; Su, Y.-H.; Tsai, M.-T.; Wasserman, S. M.; Topper, J. N.; Yang, R.-B. (2004): A novel secreted, cell-surface glycoprotein containing multiple epidermal growth factor-like repeats and one CUB domain is highly expressed in primary osteoblasts and bones. In: *The Journal of biological chemistry*, Jg. 279, H. 36, S. 37485–37490.
- Wunder J. S.; Czitrom, A. A.; Kandel, R.; Andrulis, I. L. (1991): Analysis of alterations in the retinoblastoma gene and tumor grade in bone and soft-tissue sarcomas. In: *Journal of the National Cancer Institute*, Jg. 83, H. 3, S. 194–200.
- Wunder J. S.; Eppert, K.; Burrow, S. R.; Gokgoz, N.; Bell, R. S.; Andrulis, I. L.; Gogkoz, N. (1999): Co-amplification and overexpression of CDK4, SAS and MDM2 occurs frequently in human parosteal osteosarcomas. In: *Oncogene*, Jg. 18, H. 3, S. 783–788.
- Wunder J. S.; Gokgoz, N.; Parkes, R.; Bull, S. B.; Eskandarian, S.; Davis, A. M.; Beauchamp, C. P.; Conrad, E. U.; Grimer, R. J.; Healey, J. H.; Malkin, D.; Mangham, D. C.; Rock, M. J.; Bell, R. S.; Andrulis, I. L. (2005): TP53 mutations and outcome in osteosarcoma: a prospective, multicenter study. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, Jg. 23, H. 7, S. 1483–1490.
- Xiao Z. X.; Chen, J.; Levine, A. J.; Modjtahedi, N.; Xing, J.; Sellers, W. R.; Livingston, D. M. (1995): Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. In: *Nature*, Jg. 375, H. 6533, S. 694–698.
- Yamaguchi T.; Toguchida, J.; Yamamuro, T.; Kotoura, Y.; Takada, N.; Kawaguchi, N.; Kaneko, Y.; Nakamura, Y.; Sasaki, M. S.; Ishizaki, K. (1992): Allelotype analysis in osteosarcomas: frequent allele loss on 3q, 13q, 17p, and 18q. In: *Cancer research*, Jg. 52, H. 9, S. 2419–2423.
- Yamakuchi M.; Lotterman, C. D.; Bao, C.; Hruban, R. H.; Karim, B.; Mendell, J. T.; Huso, D.; Lowenstein, C. J. (2010): P53-induced microRNA-107 inhibits HIF-1 and tumor angiogenesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 107, H. 14, S. 6334–6339.
- Yan T.; Wunder, J. S.; Gokgoz, N.; Gill, M.; Eskandarian, S.; Parkes, R. K.; Bull, S. B.; Bell, R. S.; Andrulis, I. L. (2007): COPS3 amplification and clinical outcome in osteosarcoma. In: *Cancer*, Jg. 109, H. 9, S. 1870–1876.
- Yang J.; Cogdell, D.; Yang, D.; Hu, L.; Li, H.; Zheng, H.; Du, X.; Pang, Y.; Trent, J.; Chen, K.; Zhang, W. (2009): Deletion of the WWOX gene and frequent loss of its protein expression in human osteosarcoma. In: *Cancer letters*.

- Yang J.; Zhang, W. (2008): WWOX tumor suppressor gene. In: *Histology and histopathology*, Jg. 23, H. 7, S. 877–882.
- Yen C.-C.; Chen, W.-M.; Chen, T.-H.; Chen, W. Y.-K.; Chen, P. C.-H.; Chiou, H.-J.; Hung, G.-Y.; Wu, H.-T. H.; Wei, C.-J.; Shiau, C.-Y.; Wu, Y.-C.; Chao, T.-C.; Tzeng, C.-H.; Chen, P.-M.; Lin, C.-H.; Chen, Y.-J.; Fletcher, J. A. (2009): Identification of chromosomal aberrations associated with disease progression and a novel 3q13.31 deletion involving LSAMP gene in osteosarcoma. In: *International journal of oncology*, Jg. 35, H. 4, S. 775–788.
- Yotov W. V.; Hamel, H.; Rivard, G. E.; Champagne, M. A.; Russo, P. A.; Leclerc, J. M.; Bernstein, M. L.; Levy, E. (1999): Amplifications of DNA primase 1 (PRIM1) in human osteosarcoma. In: *Genes, chromosomes & cancer*, Jg. 26, H. 1, S. 62–69.
- Yu G. L.; Blackburn, E. H. (1991): Developmentally programmed healing of chromosomes by telomerase in *Tetrahymena*. In: *Cell*, Jg. 67, H. 4, S. 823–832.
- Yu S.; Bittel, D. C.; Kibiryeva, N.; Zwick, D. L.; Cooley, L. D. (2009): Validation of the Agilent 244K oligonucleotide array-based comparative genomic hybridization platform for clinical cytogenetic diagnosis. In: *American journal of clinical pathology*, Jg. 132, H. 3, S. 349–360.
- Zheng L.; Lee, W. H. (2001): The retinoblastoma gene: a prototypic and multifunctional tumor suppressor. In: *Experimental cell research*, Jg. 264, H. 1, S. 2–18.
- Zielenska M.; Bayani, J.; Pandita, A.; Toledo, S.; Marrano, P.; Andrade, J.; Petrilli, A.; Thorner, P.; Sorensen, P.; Squire, J. A. (2001): Comparative genomic hybridization analysis identifies gains of 1p35 approximately p36 and chromosome 19 in osteosarcoma. In: *Cancer genetics and cytogenetics*, Jg. 130, H. 1, S. 14–21.
- Zimmerman W. C.; Sillibourne, J.; Rosa, J.; Doxsey, S. J. (2004): Mitosis-specific anchoring of gamma tubulin complexes by pericentriol controls spindle organization and mitotic entry. In: *Molecular biology of the cell*, Jg. 15, H. 8, S. 3642–3657.

9 Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Harald Rieder bin ich für die Bereitstellung des interessanten Themas, die großartige Betreuung, die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und das immer offene Ohr sehr dankbar. Die unzähligen Gespräche, ständige Unterstützung und Anregungen haben sehr zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Für die Möglichkeit meine Ergebnisse auf interessanten Tagungen vorzustellen und somit Kontakte zu knüpfen und Wissen auszutauschen möchte ich mich auch herzlich bedanken.

Ebenso möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. William Martin für die bereitwillige Mitbetreuung meiner Promotion, die Erstellung des Gutachtens und die Abnahme der Prüfung bedanken.

Bei Frau Prof. Dr. Brigitte Royer-Pokora möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken diese Doktorarbeit an Ihrem Institut zu erstellen.

Prof. Dr. Christopher Poremba und PD Dr. Karl Ludwig Schäfer des Institutes für Pathologie möchte ich für die freundliche Bereitstellung der Osteosarkomzelllinien danken. Desweiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Nigel Carter und Dr. Bee Ling Ng des Wellcome Trust Sanger Centres in Cambridge für die großartige Möglichkeit bedanken das durchflusszytometrische Karyotypisieren und Sortieren von Chromosomen zu erlernen. Außerdem danke ich PD Dr. Barbara Fritz und Evelyn Kornmann des Institutes für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg für die Unterstützung bei der Mikrodisektion von Chromosomen. Ganz herzlich danke ich auch PD Dr. Alice Fabarius und Dr. Michelle Giehl, des wissenschaftlichen Labors des Universitätsklinikums Mannheim für die Möglichkeit der Centrosomenanalysen der Osteosarkomzelllinien.

Bei den Mitarbeitern des Institutes für Humangenetik möchte ich mich für die hilfsbereite Zusammenarbeit, Unterstützung und die gute Arbeitsatmosphäre bedanken.

Mein ganz besonderer Dank geht an Anne, Maike, Ina und Conny, die mich über die Jahre hinweg begleitet und unterstützt haben und mehr geworden sind als nur Kollegen. Vielen lieben Dank für die wunderbaren Gespräche, Hilfe im Labor, Spaß bei der Arbeit, Nervennahrung und gute Laune.

Der allergrößte Dank gilt natürlich meinen Eltern, die mich immer liebevoll unterstützt haben, mir Rückhalt gegeben und mich stets motiviert haben.

Eidesstattliche Erklärung

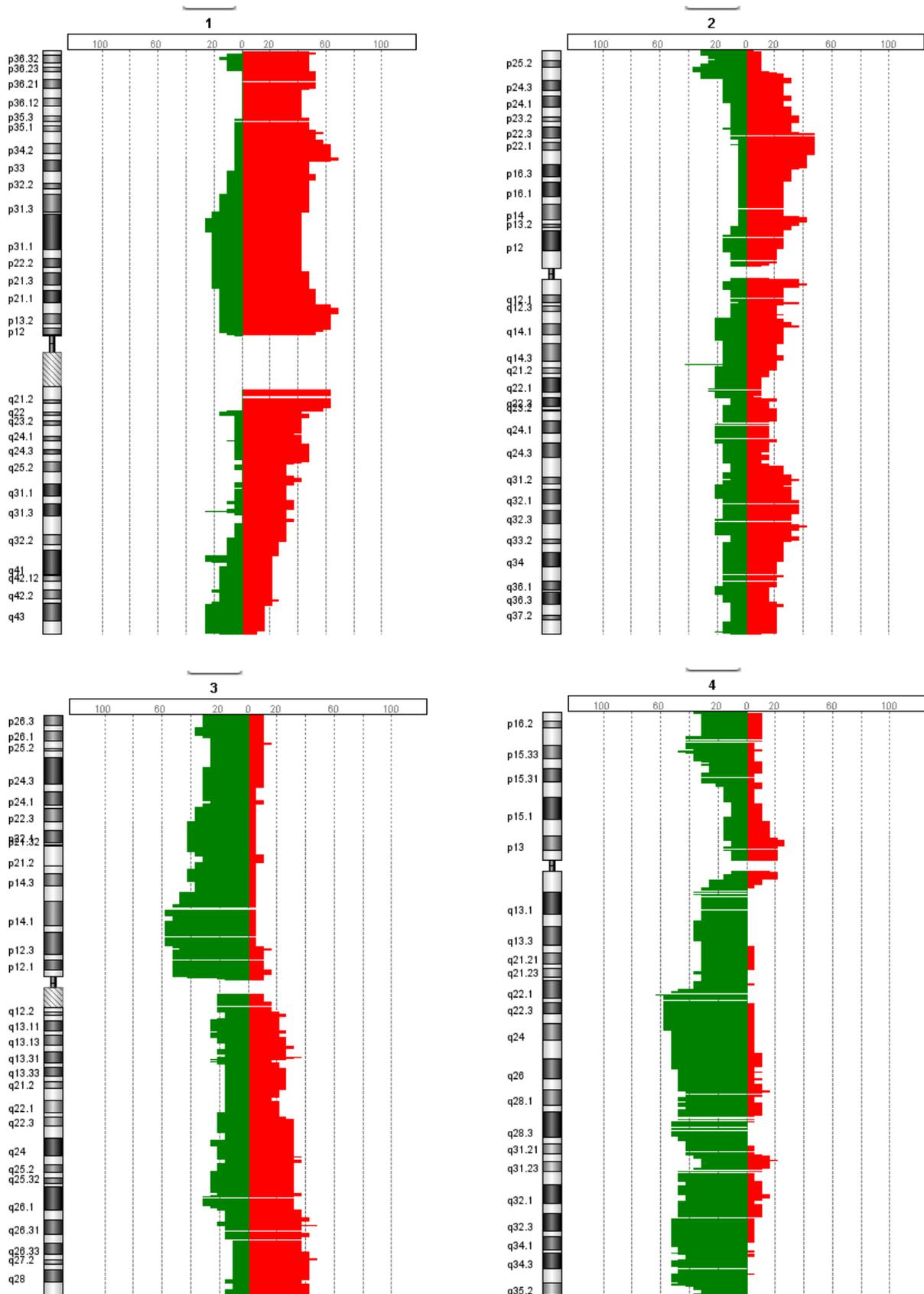
„Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst verfasst wurde und dass ich keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die aus anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn entsprechend übernommen wurden, habe ich mit Quellenangaben kenntlich gemacht.“

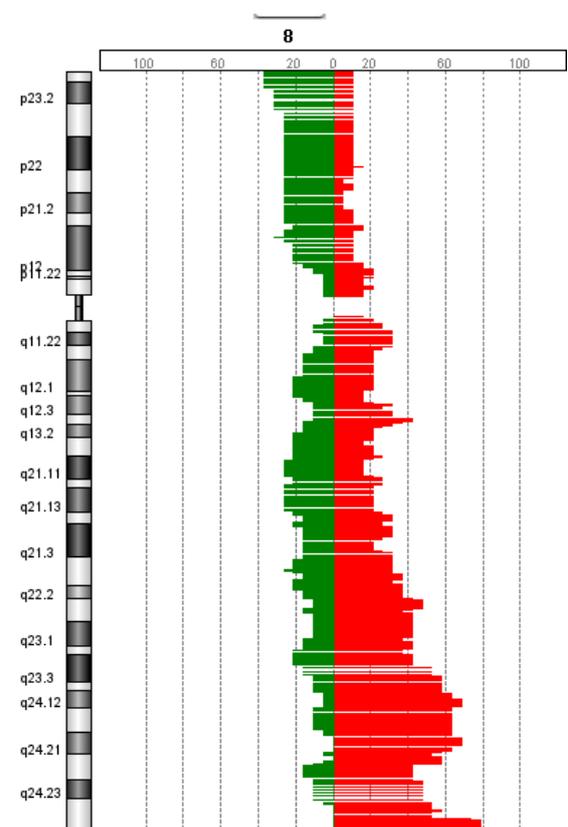
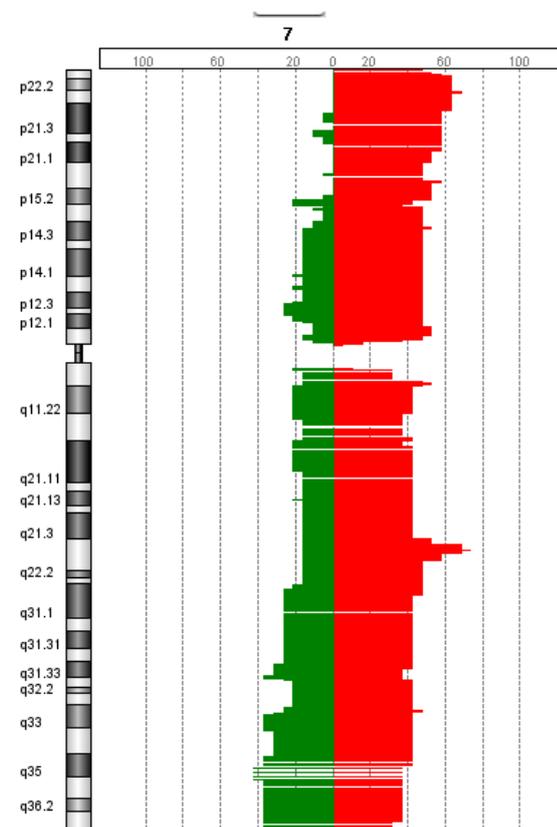
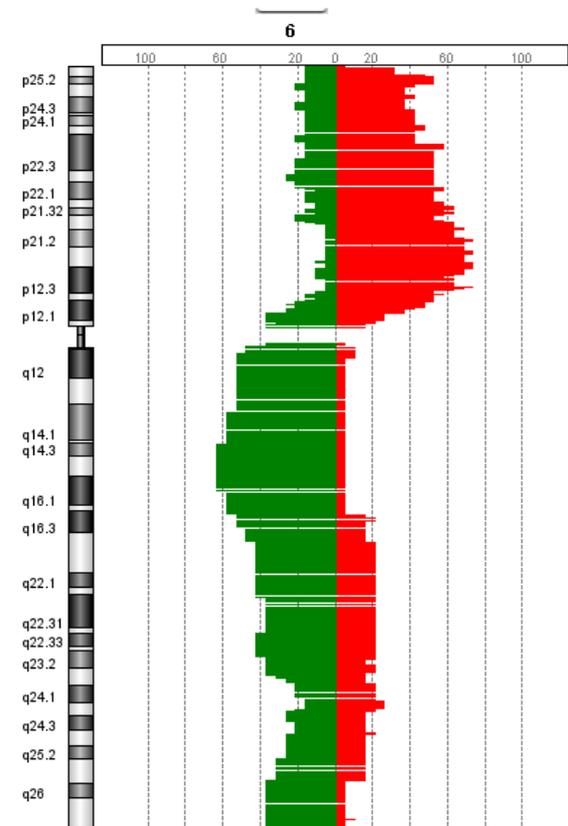
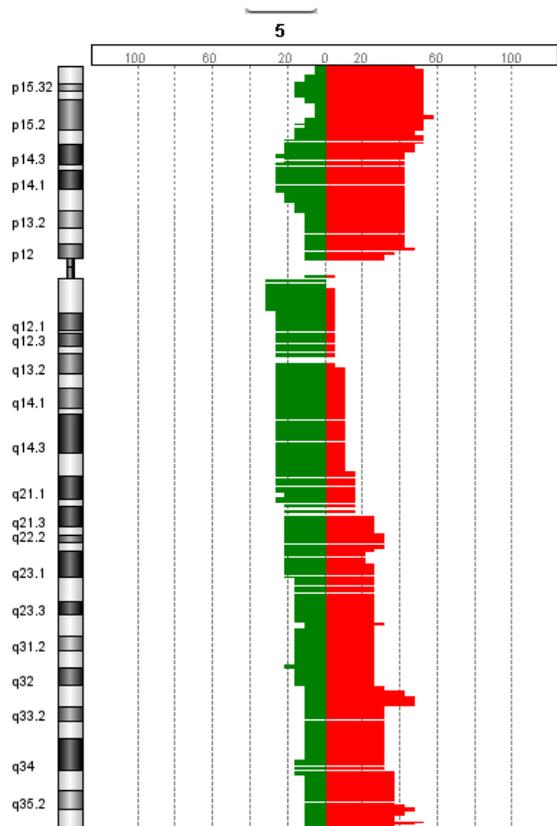
Düsseldorf, 28.05.2010

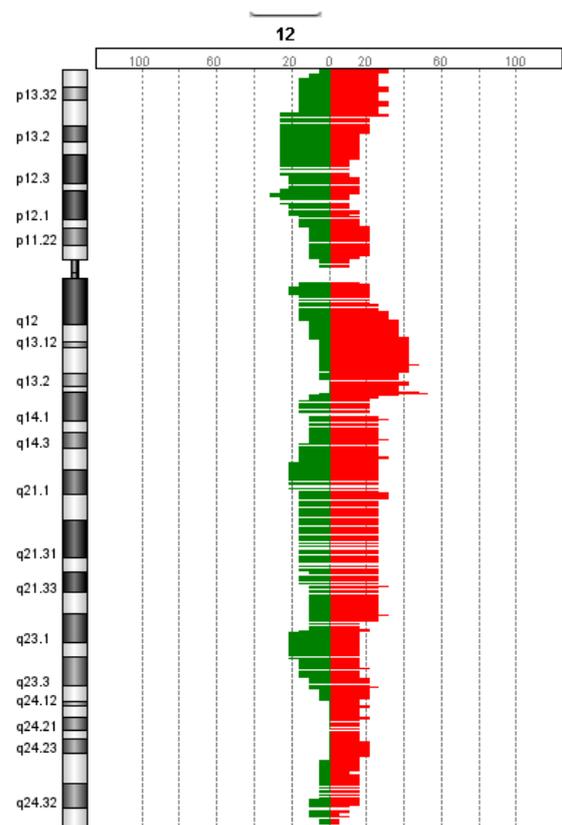
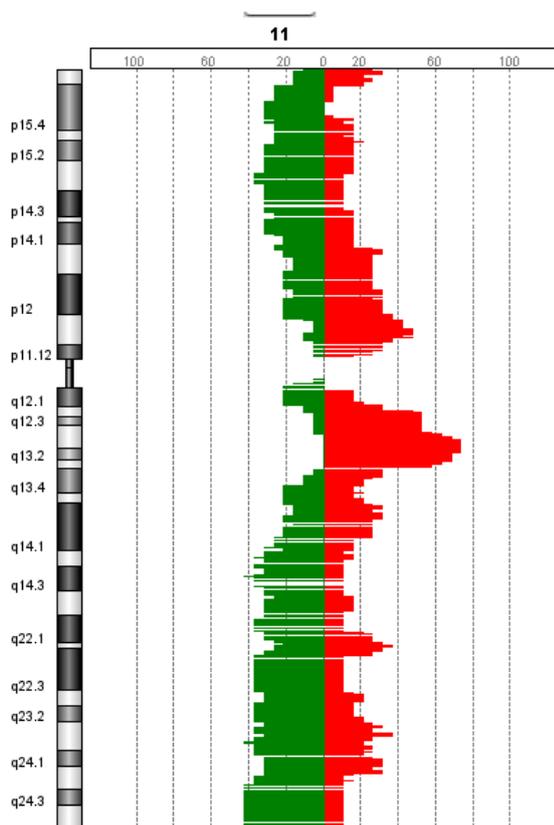
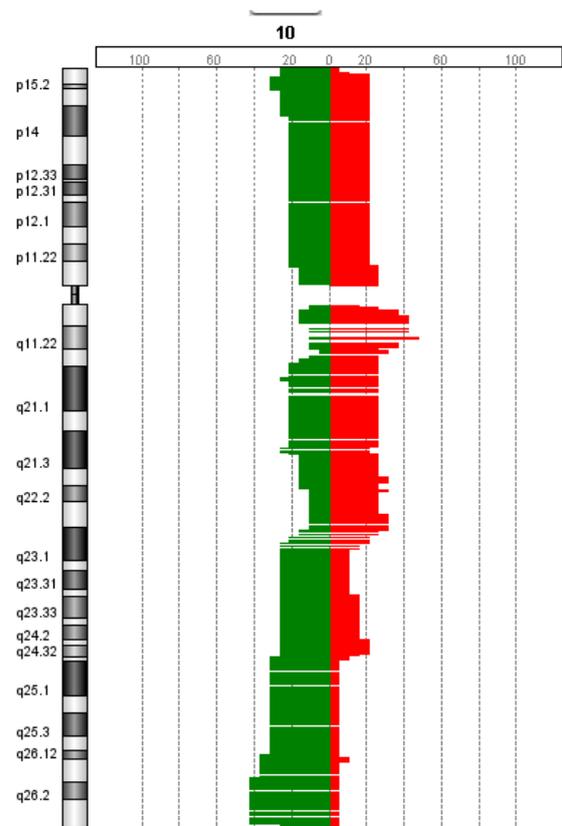
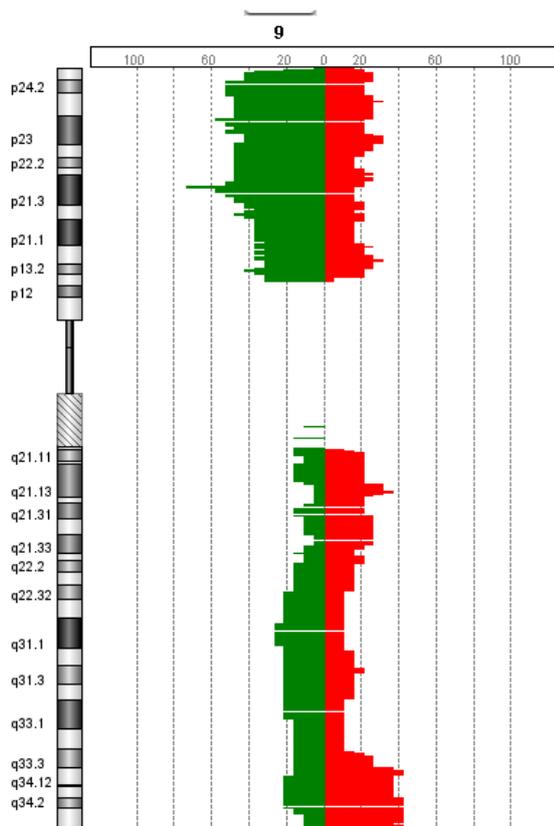
Birte Möhlendick

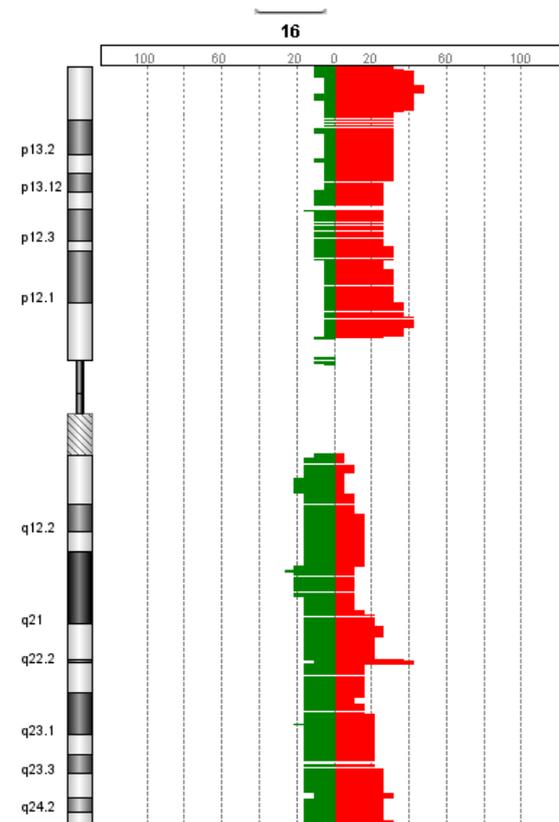
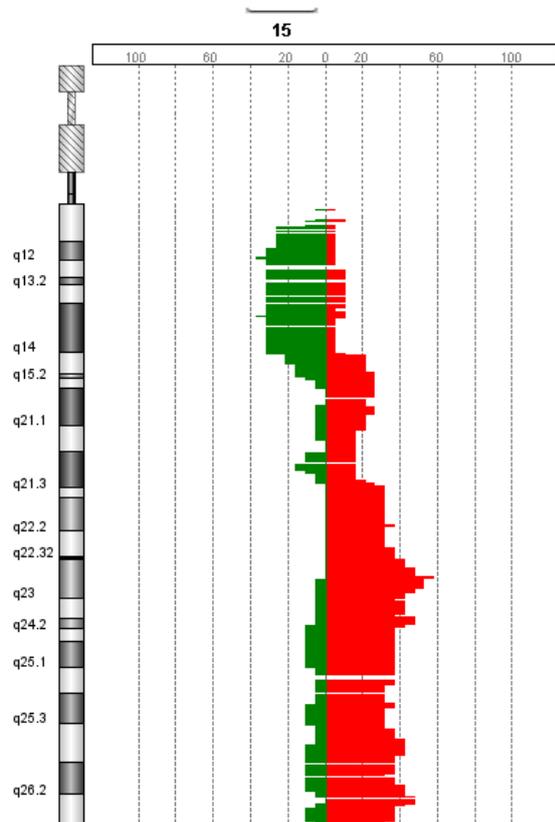
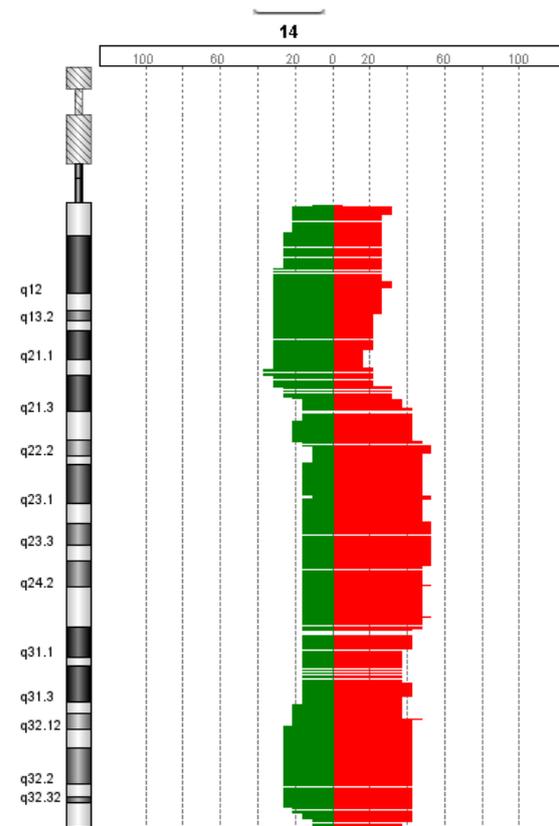
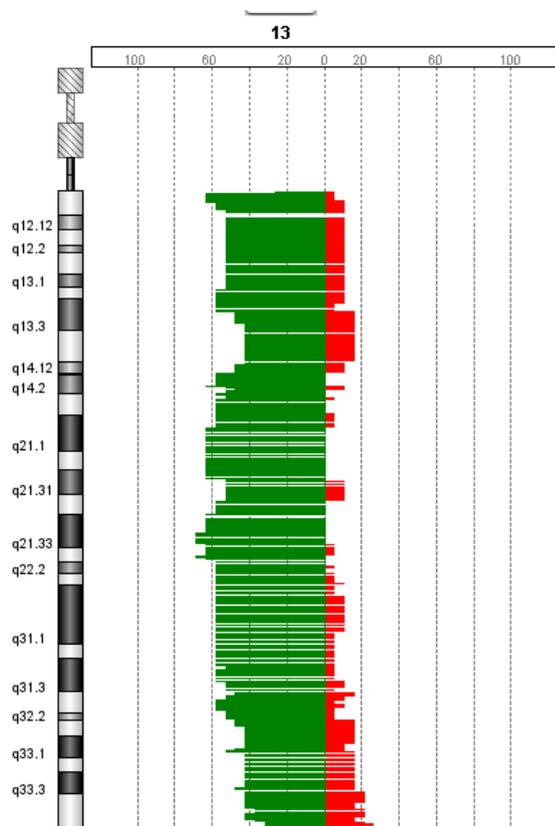
Anhang

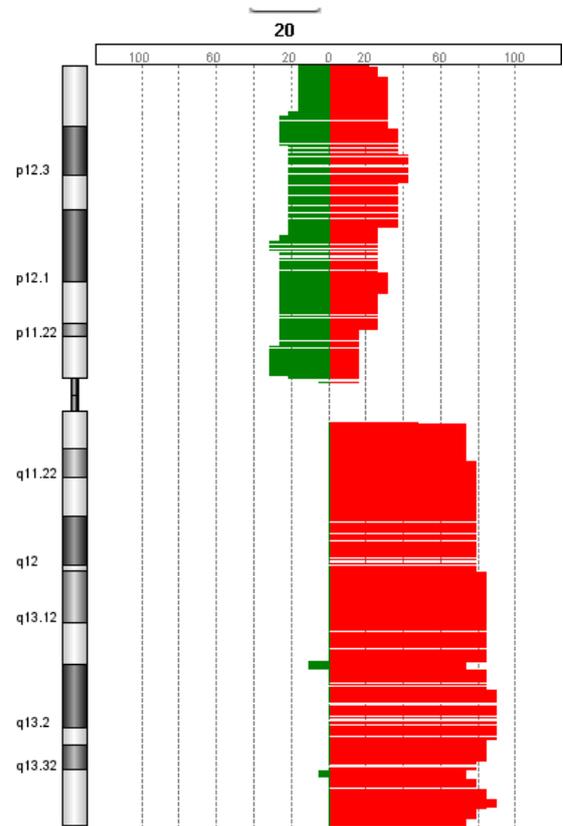
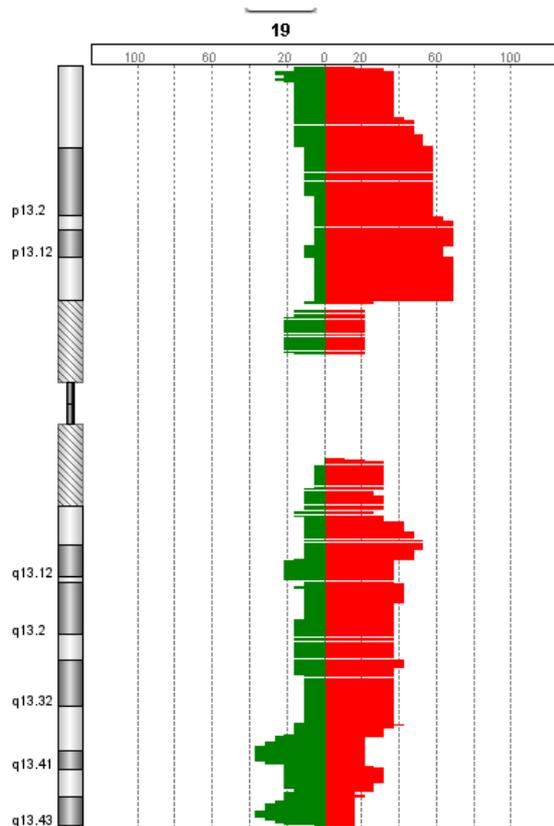
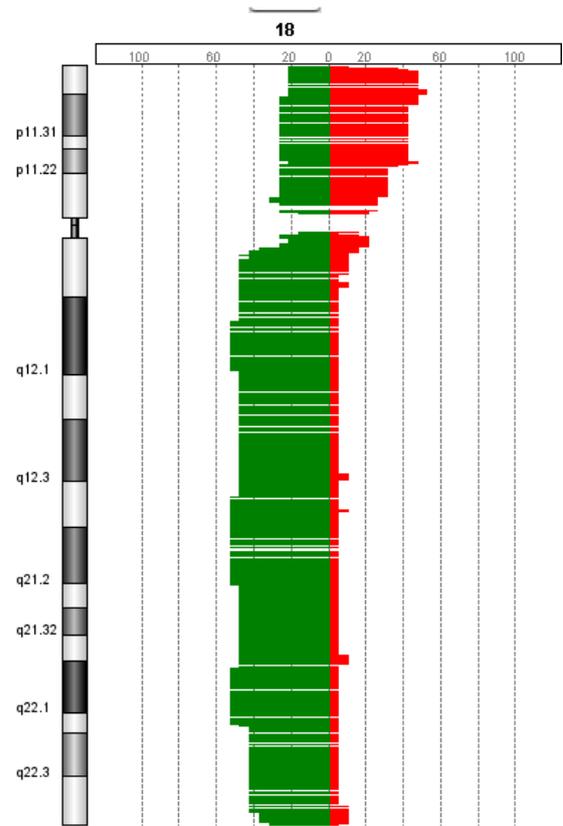
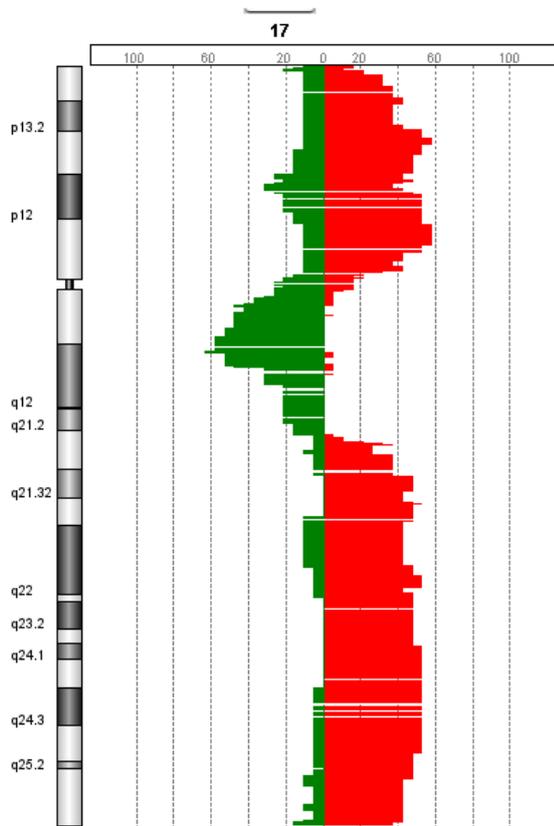
Abbildungen 1-24: aCGH-'Penetrance Plots' der Chromosomen 1-Y von 19 Osteosarkomzelllinien. Die Höhe der Balken gibt die Prozentzahl der Zelllinien mit Aberrationen an. Rote Balken=Zugewinn, Grüne Balken=Verlust.











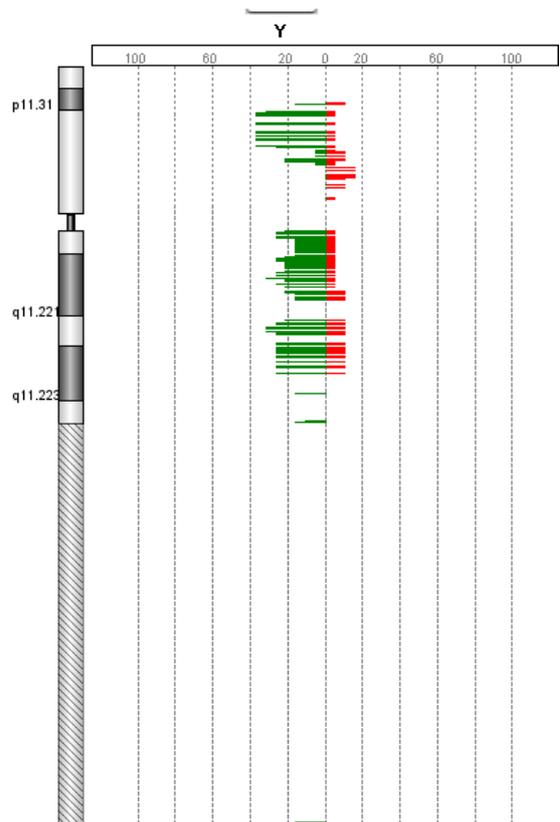
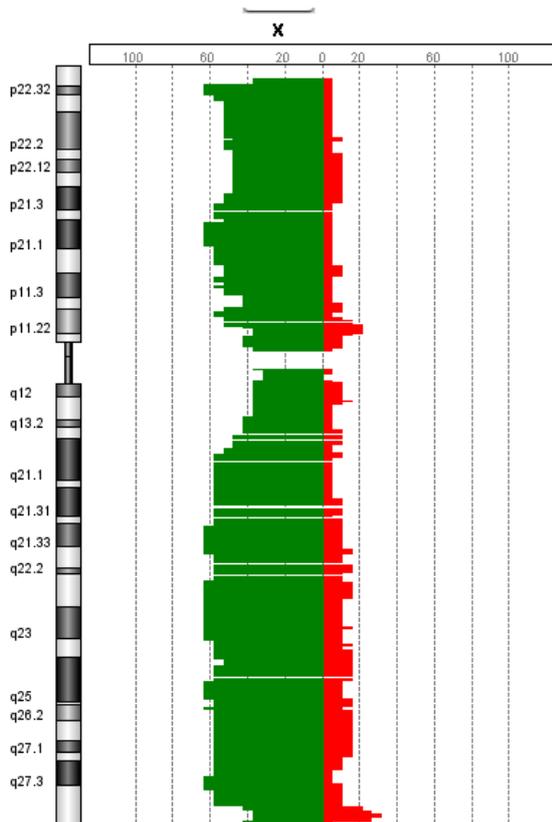
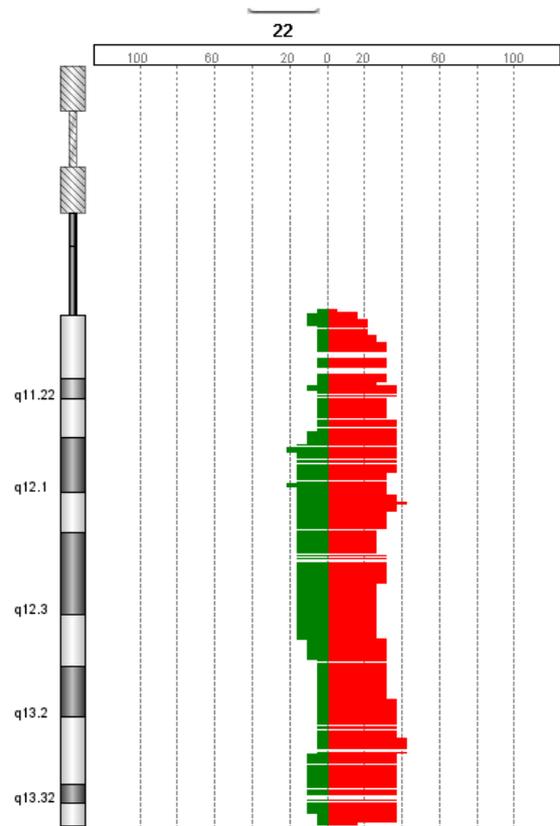
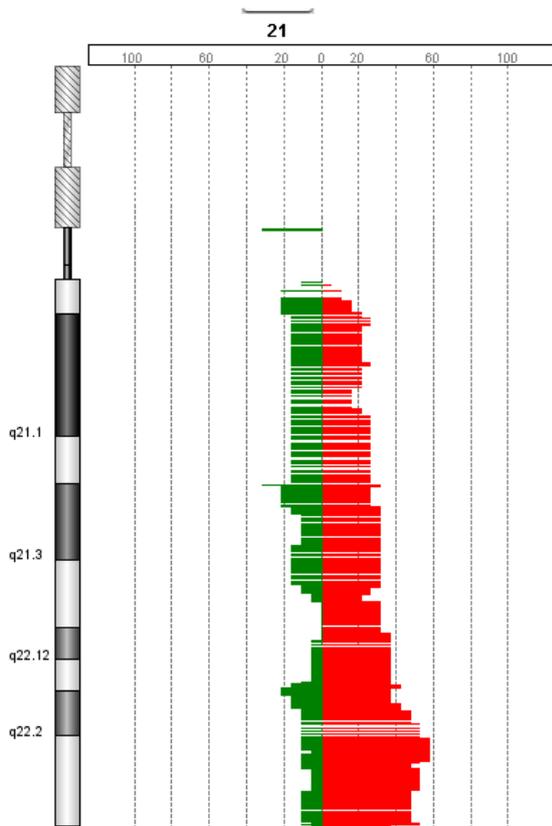


Tabelle 1: aCGH-Karyotypen der 21 Osteosarkomzelllinien. *=Tochterzelllinien der Zelllinie HOS.

aCGH-Karyotyp
*143b Rev ish enh(1p36.33p36.13; 1p34.3p31.3; 1q21.1q21.3; 2p22.3p16.3; 2q37.1q37.3; 3q11.2q29; 5q33.1q35.3; 6p25.3p25.2; 6p22.3; 6p12.2p12.1; 7q11.21; 8q11.21q21.11; 11p15.4p15.3; 11q13.1q13.3; 11q22.1q22.3; 11q23.3q24.2; 14q21.3q32.33; 15q21.3q24.2; 16q22.1q22.2; 17p13.3p11.2; 17q21.33; 18p11.32p11.22; 18q21.1; 20q11.21q13.33), dim(1p36.13p34.3; 1p31.3p12; 1q21.3q22; 1q24.1q25.1; 2p25.3p25.1; 2q11.1q36.3; 2q37.3; 3p26.3p26.1; 3q13.31; 4p15.1p13; 4q13.1q21.23; 5p15.2q11.1; 5q11.2q32; 6p25.2p22.3; 6p22.2; 6p12.1q27; 7p15.3; 7p15.2p15.1; 7q11.21q36.3; 9p23; 9p21.3; 9q21.33q34.2; 11q11q13.1; 11q13.4q22.1; 11q22.3q23.3; 11q24.2q25; 13q12.11; 13q33.3q34; 14q11.2q21.3; 15q12; 15q24.2q26.3; 17q11.1q12; 17q25.2q25.3; 18q11.1q23; 19p12q13.43; 20p13p11.1; 21q22.13q22.3; Xp22.33p11.1; Xq22.3q28)
HAL Rev ish enh(1p34.3p12; 1q21.1q43; 2q33.1; 2q35q36.1; 2q37.1; 3q12.2q12.3; 3q22.2q29; 4q22.1; 4q31.22q32.1; 5p15.33p12; 5q23.1q35.3; 6p21.1p12.1; 6q16.3; 6q25.1; 7q11.21q36.3; 8p23.3p22; 8q13.3q21.11; 8q22.1q22.3; 8q23.3q24.21; 9p24.3p24.2; 9p24.1p23; 9q34.11q34.3; 10p15.3p11.21; 10q11.21q24.33; 11q12.2q13.4; 12p13.33p13.32; 12p13.31; 12p12.3p12.1; 12q12q23.1; 12q23.3q24.11; 12q24.12q24.13; 12q24.23q24.31; 13q12.11q14.11; 14q21.3q22.2; 14q23.1; 15q21.2q26.3; 17p13.2p13.1; 17q22q25.3; 18q11.1q11.2; 19p13.3p13.11; 19q12q13.32; 19q13.42; 20p13p11.1; 20q11.21q13.33; 21q22.2q22.3; Xp22.2; Xp22.13p11.4; Xp11.22p11.1; Xq13.3q21.1; Xq21.31; Xq21.32q22.1; Xq22.3; Xq28; Yp11.2), dim(3p14.1p11.1; 3q11.2q12.1; 3q12.3q13.32; 4p16.3p15.2; 4q12q21.23; 4q22.3q31.22; 4q31.23q31.3; 4q32.1q35.2; 6p25.3p21.33; 7p14.1; 7p13; 7p12.3p12.1; 7p11.2; 9p24.2p24.1; 9p23p13.1; 10q21.3; 11p15.4p11.2; 12p12.1p11.1; 12q12; 12q14.1; 12q23.1q23.3; 12q24.12q24.22; 12q24.31q24.33; 13q14.12q34; 14q11.2q21.3; 14q23.1q32.33; 16p11.2p11.1; 17p13.1p12; 17p11.2q21.2; 18p11.32q11.1; 19p13.3; 19q13.33q13.42; 19q13.43; 21q11.2q21.3; 21q21.3q22.11; 21q22.13q22.2; 21q22.3; 22q12.1; Xp22.33p22.2; Xp11.3p11.22; Xq25; Yq11.21q11.223)
HOS Rev ish enh(1p13.3p12; 1q11q21.3; 2p22.3p16.3; 2q11.1q11.2; 2q36.3q37.3; 4p14p11; 5p15.33p11; 5q22.1q22.3; 5q32q35.3; 6p25.3p25.2; 6p22.3p12.2; 7p22.3p11.2; 7q11.21; 7q22.1; 8q24.3; 9q13q21.33; 9q33.3q34.3; 11p15.3p11.12; 11q12.2q13.3; 11q22.1q22.3; 11q23.3q24.2; 12q13.11q14.1; 12q23.1; 14q21.3q32.33; 15p11.2q26.3; 16p13.3; 16q22.1q22.2; 17p13.3q11.2; 17q21.31q22; 18p11.32p11.22; 19q13.11q13.33; 19q13.41q13.42; 20p13p12.1; 20q11.21q13.33; Xp11.4p11.3), dim(1q21.3q22; 1q31.1q31.3; 2p25.1; 3p14.2p11.1; 4p16.1p15.2; 7p15.2p15.1; 7q33q36.3; 9p21.3; 16q21; 17q11.2q12; 18q11.2q23; 21q22.13q22.2; Xp22.33p11.4; Xp11.22q28)
KPD Rev ish enh(2p14p13.3; 3q13.13q13.31; 4q28.1q28.3; 4q31.21q34.1; 5p15.2p14.3; 6p21.33p21.32; 6p21.31; 6p21.2p12.3; 6p12.1; 6q21q22.1; 7p22.3p15.1; 7p14.3; 7p12.1p11.2; 10q11.22; 10q22.3q23.1; 11p15.5; 12p12.1p11.21; 12q12q14.1; 15q23; 15q26.1q26.3; 16p12.1p11.2; 17q22; 17q24.1q25.3; 20q13.12q13.33), dim(1q42.3q44; 2p25.3p22.2; 3p26.3p11.1; 3q11.2q13.13; 3q13.31q29; 4p16.3p15.32; 4q22.1q28.1; 4q34.3; 5p15.33p15.31; 5q34q35.1; 6p21.32p21.2; 6p12.1q21; 6q22.1q23.3; 6q24.2q24.3; 7p15.1; 7p14.3p12.1; 7q31.1q34; 8p23.3p23.1; 9p24.3p21.2; 9p21.1p13.2; 9q21.33q34.3; 10q11.23q22.1; 10q23.1q26.3; 11p15.4p14.1; 12p13.31p12.1; 12q13.13q13.2; 12q14.1q21.32; 13q22.1q32.3; 13q33.1; 15q23q25.1; 16p13.3; 16p13.2; 16p13.13; 17p13.3p13.1; 17q12; 17q25.3; 19q12q13.43; 21q11.2; 22q11.22; 22q12.1q13.1; Yq11.222)
MG63 Rev Ish enh(1p13.3p13.2; 2p25.3p24.3; 4p13; 4q11q12; 4q32.1q32.3; 4q34.2; 4q34.3; 6p25.1p23; 6p22.1; 6p21.32; 6p21.31; 6p21.2; 6p21.1p12.3; 6p12.2p12.1; 8q13.1q13.2; 8q23.1q24.3; 9p23p22.3; 9p22.1; 9p21.3; 9p13.3p13.2; 10q11.23; 12p13.33; 12p11.23p11.21; 12q21.1q21.2; 16p13.3p11.2; 16q12.1q21; 16q24.1; 16q24.3; 17p13.1; 19p13.3p12; 20p12.3p12.2; 20q11.22q13.33; 21q22.13q22.3; Xp22.33p21.3; Yp11.31), dim(1p31.1; 1q41; 2p25.3p25.1; 2p12p11.2; 3p26.3p11.2; 4p16.3p14; 4p12p11; 4q12q32.1; 4q32.3q34.1; 4q34.3q35.1; 4q35.2; 5p15.33p15.2; 5p15.1p13.3; 6p25.3p25.1; 6p22.3p21.31; 6p21.2p21.1; 6p12.3p12.2; 6p12.1q27; 7q11.21q36.3; 8q24.3; 9p24.2p23; 9p21.3p13.3; 9p13.2p13.1; 9q12q21.33; 9q31.1; 10p15.3q26.3; 11p15.5p15.4; 11p15.2p13; 11p13p11.2; 11q11q12.2; 11q14.2q14.3; 12q12; 12q15q21.1; 12q23.1q23.3; 12q24.32q24.33; 13q12.11q34; 14q11.2q32.33; 15q11.2q15.2; 15q21.2q21.3; 15q25.3q26.2; 16p11.2p11.1; 16q12.1; 16q21q24.3; 17p12q11.1; 17q11.2q12; 17q21.33q23.1; 18p11.32q23; 19p13.3; 19p12; 20p13p12.3; 20p12.1p11.21; 22q11.23q12.1; Xp21.3q28; Yp11.2; Yq11.221q12)

aCGH-Karyotyp

MHM|Rev ish enh(1p36.33q44, 2q13q37.3, 3q26.1q29, 4p16.3p16.1, 4q22.3q28.1, 5p15.33p15.1, 5q33.1, 5q35.2q35.3, 6p25.3p11.2, 7p22.3p11.2, 7q22.1, 8p21.1q11.1, 8q23.2q24.3, 9q33.3q34.3, 10q11.21q11.22, 11p15.5p15.4, 11p11.2, 11q13.1q13.3, 11q14, 11q22.1q22.3, 12q13.3q23.1, 12q24.31q24.32, 14q22.2q31.1, 15q26.2q26.3, 16p13.3p11.2, 16q22.1, 16q23.1q24.3, 17p13.2p13.1, 17q21.31q25.3, 18p11.32q11.1, 19p13.3p12, 19q12q13.42, 20p13q13.33, 21q22.3, 22q11.1q13.33, Xq28), dim(3p26.3p26.1, 4q22.1, 4q35.1q35.2, 5q11.2q31.1, 8p23.3p21.1, 9p24.3p13.1, 10q11.23q21.3, 11q14.1q22.1, 11q22.3q25, 12q12q13.13, 12q24.33, 14q12q22.2, 19p13.12p13.13, Xp22.33p11.22, Xq21.1q28)

*MNNGHOS|Rev ish enh(1p36.33p36.13; 1p34.3p12; 1q21.1q21.3; 1q25.3q32.1; 1q44; 2p22.3p16.3; 2q11.1q11.2; 2q36.3q37.3; 4p15.1q12; 5q22.1q23.1; 5q35.2q35.3; 6p25.3p25.2; 6p22.3p12.2; 6p12.1; 6p11.2q27; 7p14.3p14.2; 7p14.1p13; 7p12.3; 7q11.21; 7q21.2q22.1; 7q22.2q33; 7q34; 8q11.1q24.3; 9q13q21.33; 9q22.33; 9q34.13q34.3; 10p15.3p11.22; 11q13.1q13.3; 11q22.1q22.3; 11q23.3q24.2; 12p13.33p11.21; 12q23.1; 12q24.11; 12q24.33; 14q11.2q32.33; 15q11.2q24.2; 16q11.2q24.3; 17p13.3q11.2; 17q21.31q23.1; 18p11.32p11.22; 20p11.21q13.33; 21q21.1q22.3; 22q13.2q13.33), dim(1p36.13p34.3; 1q21.3q22; 1q32.2q42.12; 2p25.3p25.1; 2q11.2q23.3; 3q24q25.1; 3q25.32q26.32; 6p25.2p22.3; 6p22.2; 6p12.2p12.1; 7p15.3; 7p15.2p15.1; 7q11.21; 7q21.2; 7q22.1q22.2; 7q32.2q32.3; 8p23.3p11.21; 9p24.3p21.2; 9q21.33q22.33; 9q31.2q33.3; 11p15.5q13.1; 11q13.4q22.1; 11q22.3q23.3; 11q24.2q25; 15q12; 15q24.2q26.3; 17q11.2q12; 18q11.2q23; 21q11.2; Xp22.33q28)

MOS|Rev ish enh(1p36.33p33, 1q21.1q21.3, 1q24.2q25.2, 1q25.3, 1q32.1, 2q11.1q11.2, 2q13q14.1, 2q31.3q33.1, 3q25.1, 3q26.1, 3q26.2q26.31, 3q26.33q29, 5p15.33p11, 5q21.3q35.3, 6p25.3p12.1, 6q23.3q24.2, 6q27, 8q22.3q24.3, 9q21.13, 9q31.3q32, 9q33.3q34.11, 10p15.3q24.32, 11p15.5p15.4, 15q15.1q21.2, 15q23q25.2, 15q25.3, 15q26.2q26.3, 16p13.3p11.2, 16q22.1q22.2, 17q21.32q21.33, 19p13.3p13.11, 19q13.11q13.42, 20p13q13.33, 21q22.11q22.13, 22q11.21q12.2, 22q13.31, Xq24q25), dim(1q21.3q24.1, 1q25.2, 1q25.3q31.1, 1q31.3, 1q32.1q44, 2p25.3q11.1, 2q24.1q24.2, 3p21.31p14.3, 3p14.1p11.1, 3q11.2q13.31, 3q24q26.1, 3q26.31, 3q28, 4p15.33, 4q22.1q35.2, 5q11.2q21.1, 6q11.1q16.3, 6q22.32q23.3, 6q24.2q27, 7p12.3p12.1, 7q11.21q11.23, 7q21.11q31.1, 8p12p11.21, 8q23.2q23.3, 9q34.11q34.3, 10q24.32q26.3, 11p14.2p14.1, 12q12q13.11, 12q14.1q24.11, 13q12.11q34, 14q11.2q21.3, 15q14q15.1, 15q26.3, 16q11.2q24.3, 17p13.3q21.32, 17q24.2q25.3, 18q11.1q22.2, 19q13.43, 21p11.1, 21q11.2q21.3, 22q13.31q13.33, Xp21.1q11.1, Xq21.33q24, Xq25q28)

OHS|Rev ish enh(1p36.33q44, 2p25.1q37.3, 3q22.1q29, 5p12, 5q35.3, 6p23p12.3, 6q16.3q25.3, 7p22.3q36.3, 8p22q11.23, 8q12.3, 8q13.1, 8q21.3q24.22, 8q24.3, 9p24.3p13.1, 10p15.3q23.1, 11p15.4p15.3, 11p13, 11p11.2, 11q12.1q25, 13q13.3q14.12, 13q14.2, 13q21.31q21.32, 14q11.2q32.33, 15q15.1q26.3, 16p13.3p11.2, 17p13.3p11.2, 17q21.31q25.3, 19p13.3q13.43, 20q11.21q13.32, 21q11.2q21.1, 22q11.22q12.1, 22q13.2q13.33), dim(3p22.3p11.1, 6p12.2q16.3, 6q25.3q27, 12p13.33p12.3, 13q12.11q13.3, 13q14.12q14.2, 13q14.3q21.31, 13q21.33q22.1, 15q11.2q14, 17p11.2, 17q11.1q21.31, 20q13.13q13.2, Xp22.33q28)

OS09|Rev ish enh(2p24.1p13.2, 2q12.1q12.2, 2q22.2q36.1, 6p21.33p12.1, 7q22.1, 7q32.1q35, 8q22.1, 8q22.2q24.12, 8q24.21, 8q24.22q24.3, 9p24.1, 9p23p22.3, 9p22.1p21.3, 9p21.2, 9p21.1p13.3, 9q21.13, 9q22.1q22.2, 11p15.4, 11p13p11.2, 11q12.2q13.4, 12p13.31p13.2, 13q14.3q21.1, 13q21.33q22.1, 14q12, 14q24.3q31.1, 14q31.3, 17p13.1p11.2, 21q22.2q22.3, Yp11.31q11.223), dim(1p31.3p11.2, 1q32.3q44, 2p25.3, 2p25.2q24.1, 2p13.2q22.2, 2q36.1q37.3, 3p24.3p11.1, 4q22.1q35.2, 5p15.33q35.3, 6p21.32p21.31, 6p21.1q23.2, 7p21.3p21.1, 7p15.1q21.11, 7q35q36.3, 8p23.3p11.23, 8q11.1q22.3, 8q24.12q24.13, 8q24.22, 9p24.3p23, 9p21.3p21.1, 9q12q21.13, 9q21.31q22.1, 9q22.2q34.3, 10q26.13q26.3, 11p15.5p14.3, 11p13, 11p11.2q11, 11q13.4q25, 13q12.11q14.3, 13q21.1q21.33, 13q31.1q34, 14q32.12q32.33, 15q12q15.3, 16p13.3p12.1, 17q11.2q12, 17q21.33q22, 18p11.32q23, 19p13.3, 20p13p11.21, 21q11.2q22.11)

aCGH-Karyotyp

OS10|Rev ish enh(1p36.23p36.13, 1q22q23.1, 1q25.3, 2q11.2q12.2, 2q13q14.3, 2q23.1q23.3, 2q24.2, 2q24.3q31.1, 2q31.2, 2q32.1q32.3, 2q33.1, 2q37.3, 3q22.3q29, 5q34.q35.3, 6p25.3q27, 7p22.3q11.22, 7q22.1, 7q31.32q31.33, 8q24.12q24.13, 8q24.21, 8q24.22, 8q24.3, 9p24.3p23, 9q34.13q34.3, 11q11q25, 13q32.1, 13q32.2q33.1, 13q33.3q34, 15q13.1q14, 15q15.1q21.1, 17p13.3p11.2, 17q12, 17q22q25.1, 19p13.3p12, 20q11.21q13.31, 20q13.33, 21q22.3, 22q12.2, 22q12.3, Xq25q27.2),dim(1p36.33p36.23, 2p22.3, 2q31.1q32.1, 2q32.3q33.1, 2q37.3, 4q12q35.2, 5q11.2q23.1, 5q34, 8q11.21, 8q13.1q24.11, 8q24.22, 9p22.3p13.1, 10p15.3p11.21, 13q12.11q31.3, 13q33.1q33.3, 13q34, 15q21.3, 17p13.1p12, 17q11.2q12, 17q25.3, 18p11.21q11.1, 18q11.2q23, 19q13.2q13.43, 20p11.21, 20q13.32q13.33, Xp22.33q25, Xq26.2, Xq27.3)

OS14|Rev ish enh(1p36.33p12; 1q21.1q41; 2p25.1p11.2; 2q11.1q11.2; 3p26.3p11.1; 3q11.2q13.31; 3q13.32q29; 4p16.3p11; 4q21.1q21.23; 4q27q28.3; 4q31.22; 5p15.33p12; 5q11.1q33.1; 6p25.3p12.3; 7q11.21q36.3; 8p11.22p11.21; 8q11.1q12.1; 8q12.3q24.3; 9p24.3p13.1; 9q21.11q34.3; 10q11.21q11.22; 10q23.32q26.3; 11p15.5; 11p12p11.12; 11q12.2q13.3; 12p13.33p11.1; 12q12q24.33; 13q34; 14q11.2q21.1; 15q22.33q26.3; 16p13.3; 16q21q23.1; 17p13.3p13.1; 17p12p11.2; 17q21.31q21.32; 17q21.33q25.3; 18p11.32p11.21; 19p13.3p13.11; 19q12q13.43; 20p13p11.23; 20q11.21q13.33; 21q21.1q22.3),dim(1q41q44; 3q13.31; 4q13.2q13.3; 4q21.23q24; 4q32.1q34.2; 6q14.3q24.1; 6q25.2q27; 8p23.3p12; 10p15.3p11.21; 11q14.1; 13q12.11; 13q14.2; 17q11.2q12; 18q12.1)

OS15|Rev ish enh(1p36.33p12, 1q21.1q32.2, 2p25.3p21, 2p14q13, 3p12.1p11.2, 3q13.2, 3q25.1, 4p13q12, 4q28.1, 5p15.33p11, 6p21.31p12.1, 6q23.3q23.3, 6q24.1q24.2, 7p22.3q36.3, 8q11.1q11.23, 8q12.3q24.3, 9p13.3p13.1, 11p12, 11q13.1q13.3, 12p13.33p13.31, 12q12q24.33, 14q11.2q32.33, 15q21.2q26.2, 16q11.2q12.1, 16q23.1q24.3, 17p13.1p11.2, 17q11.1q11.2, 18p11.32p11.31, 18p11.22, 19p13.13p13.11, 20q11.21q13.33, 21q21.1, 21q21.3, 21q22.12q22.3, Xp11.23q13.1),dim(1q42.3q44, 2q13q33.1, 3p26.3p14.1, 3q12.3q13.13, 3q13.2q23, 3q25.2q26.1, 4q22.1q35.2, 6p25.3p21.31, 6p12.1p11.2, 6q12q16.1, 6q25.1q27, 8p23.3p12, 8q11.23q12.3, 8q22.1, 9p24.3p21.3, 10q11.21q26.3, 11p15.4p11.2, 11q14.1q25, 12p13.31p12.1, 13q12.11q34, 16q12.1q21, 17q11.2, 18p11.31p11.21, 18q11.2q23, 19q13.12q13.13, 19q13.33q13.43, 20p13p11.21, 21q21.3q22.11, 21q22.3, 22q12.1q13.33, Xp21.3p11.3, Xq13.1q28)

OS18|Rev ish enh(1p36.33p12, 1q21.1q21.3, 2p22.3p16.3, 3p21.31p21.1, 5p15.33p12, 6p25.3p25.1, 6p22.3p12.2, 7p22.3p11.2, 7q22.1, 8q24.3, 9q21.11q21.33, 9q34.11q34.3, 11p15.5p15.4, 11p15.3p11.12, 11q12.2q13.3, 11q22.1q22.3, 11q23.3q24.2, 12q12q14.1, 14q21.3q32.33, 16p13.3p11.2, 16q12.1q23.1, 17p13.3q11.1, 17q11.1q11.2, 17q21.2q22, 17q23.3q25.3, 18p11.32p11.21, 19p13.3p13.11, 19q13.11q13.33, 20p13p12.1, 20q11.21q13.33, 21q22.2q22.3, 22q11.21q13.33, Xp11.4p11.22, Xq11.1q28),dim(2p25.2p25.1, 4p16.1p15.2, 4q11q13.1, 7p15.2p15.1, 7q33q36.3, 9p21.3, 10p15.1p11.21, 17q11.2q12, 17q25.1, 18q11.2q23, Yq11.221q12)
OSA|Rev ish enh(1p36.33; 1p35.3p34.3; 1p34.1p33; 1p32.3; 1p22.1p12; 3q27.1; 4p15.33; 4p15.32p15.31; 5p15.33p15.32; 5p15.1; 5q15q35.3; 7p22.1; 7p21.1; 7p15.3; 7q33; 8p23.3p21.3; 8q11.21q13.3; 8q24.3; 11p15.5p15.4; 11p15.2p15.1; 11p11.2; 11q12.1q13.3; 12p13.33p13.31; 12q13.11; 12q13.13; 12q13.3q14.1; 12q14.3; 12q15; 12q21.33, 12q23.1; 12q23.3; 12q24.11; 12q24.21; 12q24.33; 13q22.2; 13q22.3; 13q31.1; 13q31.3; 13q32.1, 13q32.2q34, 13q33.1, 13q33.2q33.3; 14q32.12; 17q21.31q25.3; 19q13.31q13.33),dim(1q31.3; 1q41; 3p26.2; 3q24; 4p16.3p11; 5p15.2; 5p14.3p13.2; 7p21.3p21.2; 7q35q36.1; 9p24.3p13.1; 10q21.1; 11p15.5; 11p15.4; 11p15.1; 11q13.4q25; 21q21.3; Xq13.1)

OST|Rev ish enh(1p21.2p12, 1q42.2q42.3, 3p25.3, 5p15.33p11, 6p25.2p21.1, 7p22.3p21.1, 8q24.3, 9q13q22.32, 9q33.3q34.3, 10q11.21q11.22, 11p15.4p15.2, 11p14.3p11.12, 11q12.1q14.1, 12q12q13.2, 15q11.2, 15q24.1q26.3, 16p13.3p13.12, 16p12.2p12.1, 16q23.3q24.3, 20q11.21q13.33, 22q13.1q13.33, Xq22.1q22.2),dim(1p35.3p21.2, 2q31.3q37.3, 3p14.2q29, 4p16.3p15.33, 4q11q35.2, 5q11.1q11.2, 5q31.3q35.3, 6p21.1q25.3, 7p15.2p11.2, 7q31.33q32.1, 7q33q36.3, 8q11.23q24.21, 9p24.3p13.1, 9q22.31q33.1, 10p15.3p11.21, 11p15.5, 11q14.2q14.3, 11q21q25, 13q12.11q32.1, 14q11.2q32.33, 16q23.1, 18p11.32q23, 19p13.3p13.2, 19p12, 19q12q13.43, 20p13p11.21, 22q11.1q13.1, Xp22.33p22.32, Xq21.1q22.1, Xq22.3q28)

aCGH-Karyotyp

SAOS2|Rev ish enh(1p36.33p13.3, 1q21.1q42.13, 2p24.1p11.2, 2q11.1q12.2, 2q32.1q37.3, 3q13.12q13.2, 3q21.3q23, 3q27.1q28, 4p16.1p11, 4q28.3q32.1, 4q32.3q34.1, 5p13.3p12, 6p24.3p21.32, 6p12.3q25.3, 7p21.3, 8p11.21, 8q23.1q24.3, 9q21.11, 12p13.33p11.21, 12q13.3q21.2, 12q21.33, 12q24.33, 13q12.3q14.13, 13q21.2q34, 14q11.2q22.3, 15q22.1q23, 15q26.3, 16q12.1q12.2, 16q22.3q23.1, 16q24.3, 17q22q25.3, 18p11.31p11.21, 19q12q13.43, 20p12.3q11.22, 21q11.2q22.3, 22q11.23, 22q12.3, Xp22.33q22.1, Xq27.1q28),dim(1q42.13q44, 3p14.3p11.1, 3q11.2q13.12, 5p15.33p15.2, 6p25.3, 7q11.22q21.11, 8p23.3p11.21, 8q11.23q13.2, 9q33.1, 10p15.3p14, 11q24.3q25, 12p13.31p13.2, 13q14.2, 14q24.3, 15q23q24.3, 17p13.1, 18q22.1q23, 19q12, 20q11.23, Xq27.1q28)

SARG|Rev ish enh(1p36.33p33, 1q21.1q25.2, 2p25.3p11.2, 2q12.1q12.2, 2q14.3q21.2, 3q12.2q29, 4q12, 4q26, 5q21.3q35.3, 6p25.3p11.1, 7p22.3q36.3, 8p12p11.23, 8q11.21q13.2, 8q21.13q23.1, 8q23.3q24.11, 8q24.12q24.22, 9q31.2q31.3, 10q22.1, 11p15.5p15.4, 11q12.1q13.4, 11q14.1, 11q14.2, 11q21, 11q23.1, 11q23.3, 11q24.1q24.2, 12q14.1, 14q23.2q24.2, 14q32.12q32.33, 16q11.2, 16q21q24.3, 17p13.3, 17p13.2p11.2, 18p11.32q11.1, 19p13.3q13.12, 19q13.2, 20p12.1p11.22, 20q11.21q13.33, 21q11.2q22.3, 22q11.21q13.33, Xq22.1q27.3, Xq27.3q28),dim(1p33p12, 1q31.3, 2p22.1, 2q11.2, 2q13q14.2, 3p26.3p11.2, 4q12q26, 6q11.1q23.3, 8p23.3p12, 8q21.11q21.13, 8q23.1q23.3, 8q24.22q24.3, 9p24.3p21.2, 9p13.2p13.1, 10q11.21, 10q26.12q26.3, 11q11q12.1, 11q13.4q14.1, 11q14.3q21, 11q22.1q22.3, 11q23.1q23.2, 11q23.3q24.1, 11q24.2q25, 12p13.33p11.23, 13q12.11q34, 15q11.2q15.3, 18q11.2, 19q13.2q13.32, 19q13.33q13.41, Xp22.33p11.22, Yq11.222q11.223)

TPXM|Rev ish enh(1p36.33q41; 2p23.3p23.1; 2q11.1q14.2; 2q22.3; 2q31.1q37.3; 3p24.1; 3p21.31; 3p12.3p11.1; 3q13.31q21.3; 5q35.3; 6p25.3p12.3; 6q16.3q25.3; 7p22.3q36.3; 8q11.1q24.3; 9p24.3p13.1; 9q33.3q34.3; 10p15.3q23.1; 11p15.5; 11p13q13.2; 13q13.3q14.12; 13q14.2; 13q21.31q21.32; 13q32.1q34; 14q11.2q24.3; 15q15.1q21.1; 15q22.31q24.2; 15q26.1; 15q26.3; 16p13.3p11.2; 16q12.2q24.3; 17p13.3; 17p12p11.2; 17q21.31q25.3; 18p11.32q23; 19p13.3p13.11; 19q12q13.12; 20p12.3p11.22; 20q11.21q13.33; 21q11.2q22.3; 22q11.1q13.33; Xp11.22; Yp11.2),dim(2q21.1q22.2; 2q22.3q31.1; 3p26.2p21.31; 3p21.1p12.3; 4q31.23q35.2; 5p15.2p13.3; 10q23.1q26.3; 11p14.3p14.2; 12p13.33p11.21; 12q21.33; 13q12.11q13.3; 13q14.12q21.31; 13q21.32q22.1; 15q11.2q15.1; 17p13.3; 17p12; 17p11.2q21.31; 19q13.12q13.13; 20q13.13q13.2; Xp22.33q28; Yp11.31p11.2; Yq11.21; Yq11.221)

U-2OS|Rev ish enh(1p34.2p34.1; 1p13.3p12; 2p25.1q21.3; 3q11.2q21.3; 4p15.1p11; 4q25q26; 5p15.33p11; 5q31.1; 6p12.3q12; 7p22.3p21.3; 7p15.3p11.2; 7q11.23q31.1; 8p21.2p12; 8p11.22; 8q21.11q21.3; 8q24.11q24.3; 9p21.2p21.1; 10q11.21q22.2; 11p11.2p11.12; 11q13.5q14.1; 11q23.1q23.3; 12p13.33p12.3; 12p12.1; 13q32.1; 13q34; 14q11.2; 14q21.2q24.3; 15q21.3q23; 16q24.3; 17q22q25.3; 18p11.32q11.2; 18q23; 19q12; 20q11.21q13.33; 21q21.3q22.11; 22q11.21q13.33),dim(1p36.32p36.23; 1q31.2; 1q31.3; 1q42.13; 2p25.3; 2q22.1; 3q22.2q26.32; 3q29; 4p16.3p15.1; 4q28.1q31.1; 5q21.1q21.2; 5q31.1q31.3; 6q14.1q22.31; 7q31.1q36.3; 8p23.3p23.1; 8p12; 8q22.1q22.2; 9p24.3p21.3; 10p15.3p15.1; 10q23.1q26.3; 11q23.3q25; 12q14.3q24.11; 13q12.11q34; 14q32.11q32.33; 15q21.2q21.3; 16p13.12p11.2; 17p13.1p11.2; 18q11.2q22.2; 19p13.3p12; 21q22.12q22.3; 22q11.1q11.21; Xp22.33q28)

ZK58|Rev ish enh(1p35.1p12, 1q21.1q25.1, 2p24.2p24.1, 2q31.1q33.2, 3p26.3p24.2, 3q13.31, 4p15.2, 4q11q12, 4q31.22q31.23, 5q13.2q22.3, 5q35.2q35.3, 6q22.1q23.2, 7p22.3p21.1, 7q11.21q36.3, 8p21.3, 8p11.21q11.1, 8q12.3q13.1, 8q21.11q21.12, 8q21.2, 8q21.3q24.3, 9q21.13, 9q21.31q34.3, 10p11.21, 10q22.3q23.1, 10q24.2q24.32, 10q26.12q26.13, 11q13.1, 11q13.4q13.5, 11q22.2, 11q23.2q23.3, 11q24.2, 12p13.33p11.1, 12q12q24.31, 12q24.33, 13q12.11q13.3, 13q14.3, 13q33.1q34, 14q11.2q13.2, 14q22.2q32.33, 15q23, 16p13.3, 16p12.1p11.2, 16q22.1q22.2, 17p11.2, 17q21.32q25.3, 18p11.32p11.31, 18q12.3, 18q21.33q22.1, 19p13.13p12, 19q13.11q13.12, 19q13.33, 19q13.41q13.42, 20q11.21q13.33, 21q11.2q22.3, 22q11.1q11.22, Xp11.22p11.21, Xq23, Xq28),dim(1p36.33p36.32, 1q31.1, 1q41, 2q33.2q36.3, 3p23p21.31, 3p14.1p11.1, 4q22.1q31.22, 4q31.3q35.2, 6p24.3, 6p22.3p22.1, 6p11.2q22.1, 8p23.3p23.2, 8q12.1q12.3, 8q13.2q21.2, 8q21.13q21.2, 8q21.3, 9p23, 9q12q21.11, 9q21.12q21.13, 10p15.3p14, 11p15.5p11.2, 11q11q12.1, 13q21.32q33.1, 14q22.1q22.2, 17p13.3, 18q21.1q21.2, 18q22.1q23, 19p13.3, 19q13.33q13.41, 19q13.43, 20p12.1, 22q13.33, Xp22.33p22.31, Yq11.222q11.223)