

Universitätsklinikum Kiel
Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
-onkologisches Labor-
(Direktor: Prof. Dr. med. W. Jonat)

**Vergleichende genomische Hybridisierung zur Charakterisierung
genetischer Alterationen in Ovarialkarzinomen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Anja Jacobsen
Lutzhöft

Kiel
2000

Referent/in: PD. Dr. Arnold

Korreferent/in: Prof. Dr. Binding

Tag der mündlichen Prüfung: 06.06.2000

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABKÜRZUNGEN	4
1. EINLEITUNG	7
1.1. Tumorgenese	7
1.1.1. Proto-Onkogene	8
1.1.2. Tumorsuppressorgene	10
1.1.3. Zellzyklus-Kontroll-Gene und Mismatch-Repair-Gene	13
1.1.4. Weitere Voraussetzungen für die Tumorgenese.....	13
1.2. Tumorerkrankungen.....	14
1.3. Ätiologie des Ovarialkarzinoms	20
1.4. Comparative-Genom-Hybridisierung	23
1.5. Ziel der Arbeit.....	26
2. MATERIAL.....	27
2.1 Arbeitsgeräte	27
2.2. Verbrauchsmaterialien.....	28
2.3. Chemikalien	28
2.4. Puffer und Lösungen.....	30
3. METHODEN	35
3.1. DNA-Präparation.....	35
3.1.1. DNA-Isolierung aus Blut	35
3.1.2. DNA-Gewinnung aus Gewebematerial	36
3.1.3. DNA-Konzentrations- und Reinheitsbestimmung.....	36
3.1.4. Agarose-Gelelektrophorese	36
3.2. Chromosomenpräparation aus Vollblut.....	37
3.2.1. Kultivierung von Lymphozyten.....	37
3.2.2. Herstellung der Metaphasen-Präparate	37
3.3. Nick-Markierungsreaktion.....	38
3.3.1. Labeling der DNA	38

3.3.2.	Filtertest zur Detektion der Einbaueffizienz	39
3.4.	Durchführung der Comparativen-Genom-Hybridisierung	40
3.4.1.	Vorbereitung der Metaphasen-Präparate	40
3.4.2.	Vorbereitung der markierten DNA	41
3.4.3.	Hybridisierung	41
3.4.4.	Detektion der Hybridisierung	42
3.4.5.	Beurteilung und Dokumentation der CGH-Hybridisierung	42
3.4.6.	Karyotypisierung der Metaphasen	43
3.4.7.	Auswertung der CGH-Ergebnisse	43
3.5.	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	44
3.5.1.	Herstellung der Gewebe-Präparate für die FISH	44
3.5.2.	Herstellung der mikrosezierten FISH-Sonden	44
3.5.3.	Vorbereitung der Präparate	45
3.5.4.	Vorbereitung der FISH-Proben	46
3.5.5.	Durchführung der FISH	47
3.5.6.	Detektion der FISH-Signale	47
3.5.7.	Auswertung der FISH	47
4.	ERGEBNISSE	48
4.1.	Optimierung der Comparativen-Genom-Hybridisierung	48
4.2.	CGH-Untersuchungen	48
4.2.1.	Kontroll-CGH	49
4.2.2.	CGH mit Tumor-DNA	55
4.3.	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	68
5.	DISKUSSION	81
5.1.	Unzulänglichkeiten der CGH und der FISH	81
5.2.	Genomische Veränderungen beim Ovarialkarzinom	83
5.3.	Auswertung der CGH	89
5.4.	Ergebnisse der CGH	89
5.4.1.	Vergleich der CGH-Ergebnisse mit anderen CGH-Studien	89
5.4.2.	Interpretation der Amplifikationen	94
5.4.3.	Interpretation der Deletionen	100

5.4.4.	Chromosom 17	103
5.4.5.	Tumorgenese des Ovarialkarzinoms.....	106
5.5.	Ergebnisse unter Einbeziehung einer weiteren Studie	109
5.6.	Bewertung der CGH-Ergebnisse.....	110
5.7.	Ausblick	111
6.	ZUSAMMENFASSUNG	113
7.	LITERATURVERZEICHNIS	115

Abkürzungen

AACR	American Association for Cancer Research
abs.	absolut
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
Ampl.	Amplifikation
ANCA	average number of copy alterations
AP	Alkalische Phosphatase
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat, 4-Toluidin-Salz
bp	Basenpaare
BRCA	breast cancer gene
BSA	Bovine- (Rinder) Serum-Albumin
CCD	charge-coupled device
CDK	cyclin-dependent kinase
CDKI	cyclin-dependent kinase inhibitor
CGH	Comparative-Genomische-Hybridisierung
Chr.	Chromosom
cM	centiMorgan
CML	chronisch-myeloische Leukämie
C ₀ t-1 DNA	repetitive menschliche DNA
DAPI	4', 6-Diamino-2-Phenylindol
Del.	Deletion
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
dmins	double minutes
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
DNase	Desoxyribonuklease

DOP	Degenerierte Oligonukleotid-Primer
DTT	Dithiotreitol
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	grün
HBO	Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe
HCl	Salzsäure
HNPCC	hereditary non-polyposis colon cancer
HPLC	high pressure liquid chromatographie
hsr	homogeneous staining regions
I.E.	Internationale Einheiten
ISIS	In-situ imaging system
k.A.	keine Angabe
kb	Kilobasen
LMP	low malignant potential
LOH	loss of heterozygosity
M	molar
Mb	Megabasen
min.	Minuten
mgl.	möglich
n	Anzahl der FISH-Signale
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
OD	Optische Dichte
Oligo	Oligonukleotid
OT	Objektträger
OvCa.	Ovarialkarzinom
P	Primär (-Tumor)
Pat.	Patientin
PBS	Phosphatpuffer
PBD	Phosphatpuffer

PCR	polymerase chain reaction
R	Rezidiv
r	rot
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunden
SSC	standard salt concentration (Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer)
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
ter	terminal
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
TSG	Tumor-Suppressor-Gen
Tu.	Tumor
Tween	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
ün	über Nacht
UICC	Union internationale contre le cancer
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
WHO	World Health Organization
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
YAC	yeast artificial chromosome
Zentr.	Zentromer

1. Einleitung

1.1. Tumorgenese

In einem Zellverband unterliegen die einzelnen Zellen einer ständigen Proliferations- und Differenzierungskontrolle. Durch balancierte Steuerung von Zellteilung und programmierten Zelltod (Apoptose) wird für eine intakte Aufrechterhaltung des Gewebeverbandes gesorgt. Initiale Mutationen, spontan entstanden durch z. B. Desaminierung von 5'-Methylcytosin oder ausgelöst durch exogene Mutagene in nur einer Zelle, können dieses Gleichgewicht kippen und zur Tumorentstehung führen, wenn die Ausprägung dieser Mutationen der Zelle einen Wachstumsvorteil bietet und sie sich der Proliferationskontrolle entziehen kann.

Im weiteren Verlauf dieser zunächst klonalen Expansion können noch weitere genetische Aberrationen hinzukommen und so zu einem klonal heterogenen Tumor führen. Die neu erworbenen Mutationen begünstigen u. U. die Tumor-Progression und sind auch Voraussetzung für eine eventuelle Metastasierung.

Man unterscheidet benigne von malignen Tumoren. Benigne Tumoren sind charakterisiert durch Wachstum in einer definierten Kapsel und sind in der Regel selten lebensbedrohend. Diese Tumorzellen zeigen noch die Eigenschaften der Ursprungszellen, d. h., sie sind meist normal differenziert. Demgegenüber zeigen maligne Tumoren ein invasives Wachstum in umliegendes Gewebe sowie die Fähigkeit, in andere Organe zu metastasieren.

Für die Entstehung von Tumoren gilt heute das Modell der Mehrschritt-Karzinogenese (Weinberg, 1989; Vogelstein und Kinzler, 1993). Erst eine sequentielle Anhäufung von Defekten in verschiedenen Gen-Familien ist verantwortlich für die Tumorgenese, die sich in Initiation, Promotion, maligne Transformation und Metastasierung aufgliedert, wobei allerdings nicht jeder Tumor Metastasen bildet. Bei diesen vor allem somatischen Mutationen sind vielfach Gene für Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, Gene für signaltransduzierende und transkriptionsassoziierte Proteine, DNA-Reparatur-Gene und Steuerungsgene der Zellzyklus-Maschinerie betroffen. Die Genprodukte dieser Gen-Familien kontrollieren durch wechselseitige Interaktionen die Proliferation, einen nötigen

Wachstumsarrest, die Differenzierung der Zelle, die Integrität des Genoms, und die Apoptose und sind für die Zelle daher von essentieller Bedeutung.

1.1.1. Proto-Onkogene

Zunächst wurden sogenannte Onkogene in einigen Viren mit malignem Transformationspotential beobachtet. Anschließend identifizierte man die Proto-Onkogene als zelluläre Ursprünge der viralen Formen. Die Proto-Onkogene stellen eine Gruppe von hochkonservierten Genen dar, die bei Hefen bis hin zum Menschen zu finden sind.

Die Proto-Onkogene sind Gene, welche die Zellproliferation und die damit verbundenen Zellabläufe regulieren. So sind sie mitverantwortlich für die Progression des Zellzyklus, sind an Signal-Kaskaden beteiligt, sowie an Zell-Zell Kommunikation und an der DNA Transkriptionskontrolle, um nur einige Beispiele zu nennen.

Bis jetzt kennt man fast 200 Proto-Onkogene und deren Proteine, die man in 14 verschiedene Klassen eingeteilt hat. So unterscheidet man Wachstumsfaktoren, z. B. *platelet-derived growth factor* (PDGF), *epidermal growth factor* (EGF) und *Insulin-like growth factor* (IGF), Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, z. B. HER2/ERBB2/NEU und IGF-1R, Protein-Kinasen zur Signaltransduktion (membranassoziierte G-Proteine: z. B. RAS; membranassoziierte/zytoplasmatische Tyrosin-Kinasen: z. B. SRC und ABL, zytoplasmatische Serin-Kinasen, z. B. BCR) und Transkriptionsfaktoren wie z. B. JUN, FOS und MYC, um einige bekanntere Vertreter zu nennen (Hesketh, 1997). Sechs von den insgesamt 14 Klassen sind in Auszügen in Tabelle 1 vorgestellt.

Proto-Onkogene werden zu Onkogenen, wenn sie durch bestimmte Mutationen aktiviert werden und dadurch eine regulierte Stimulation der Zellproliferation verloren geht. Hierbei handelt es sich um verschiedene Arten von Mutationen, wie z. B. Punktmutationen oder Deletionen in der kodierenden Sequenz, wodurch ein hyperaktives Protein entsteht. Eine Überexpression des Proteins kommt entweder durch eine Amplifikation des betreffenden Gens oder durch eine Translokation des Proto-Onkogens in die Nähe von 'Enhancern' oder hinter stärkere Promotoren (Genfusion z. B. im Fall von ABL/BCR) zustande.

Tabelle 1: Proto-Onkoproteine und deren Genlokalisierung

Klasse	Proto-Onkoproteine	Lokalisation der Gene	häufige Mutationen	Tumor erkrankungen
1: Wachstumsfaktoren	PDGFB/SIS	22q12.3-q13.1	Translokation	CML, Gehirntumor
	INT-2	11q13	Amplifikation	Speiseröhrenkrebs
2: Tyrosin-Kinasen	EGFR/ErbB1	7p12-p13	Amplifikation, Deletion	Brust-, Blasenkrebs Glioblastom
	HER2/ErbB2/NEU	17q21-q22	Überexpression	Brust-, Blasen- und Ovarialkrebs
	ABL1	9q34.1	Translokation	CML : t(9;22)(q34;q11)
	SRC	20q13.3	Überexpression	Kolonkarzinom, Brustkrebs
4a:membran-assoziierte G-Proteine	RAS	1p13	Aktivierung	Pankreaskarzinom Blasenkrebs
5: Zytoplasmatische Protein Serin Kinasen	BCR	22q11.2	Translokation mit ABL1	CML, s. o.
8: Zell-Zyklus Regulatoren	Cyclin D1 (CCND1)	11q13	Überexpression	Brustkrebs
	INK4A	9p21	Deletion, Rearrangements	Pankreaskarzinom
9: Transkriptionsfaktoren	FOS	14q24.1	Überexpression	Osteosarkom
	JUN	1p31-32	Überexpression	<i>small cell lung cancer</i>
	MYC	8q24	Translokation, provirale Insertion, Amplifikation	Burkitt-Lymphom, Brust-, Prostata-Pankreaskrebs

(Tabelle in Auszügen entnommen aus Hesketh, 1997)

Bei den Proto-Onkogenen genügt deshalb die Mutation nur eines Allels, welche zu einem veränderten Genprodukt oder zu einer erhöhten Expressionsrate führt, um eine transformierende Eigenschaft auszuüben. Mutationen von Proto-Onkogenen in den Zellen der Keimbahn sind in der Regel letal.

Zu den am häufigsten mutierten Proto-Onkogenen in menschlichen Tumoren gehören die ras-Gene (H-ras, K-ras und N-ras), welche für kleine G-Proteine kodieren.

Diese membrangebundenen GTPasen sind nach erfolgter Ligand-Rezeptor-Bindung für die Signalübertragung ins Innere der Zelle transient aktiv. Ein Austausch der Aminosäure, überwiegend in Position 12, führt zum Verlust der intrinsischen GTPase-Aktivität einerseits und verringert andererseits auch die Affinität zum GAP-Protein (GTPase-*activating*-Protein). Daraus resultiert ein ständig aktives RAS-Protein, wodurch die Zelle einer dauernden Stimulation unterliegt (Vachtenheim et al., 1994).

In der Regel reicht die Aktivierung eines einzelnen Proto-Onkogens für die Entstehung eines Tumors nicht aus. Es müssen mehrere Veränderungen im Genom akkumulieren, bevor es zu einer Entartung kommt. In verschiedenen Tumoren gefundene mutierte Onkogene und assoziierte Tumorsuppressorgene sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Eine Auswahl häufiger Tumoren mit relevanten Onkogenen und Tumorsuppressorgenen

Tumor	assoziierte Onkogene und TSG
Brust	MYB, MYC, Cyclin D1, Cyclin D3, EGFR, HER2/ErbB2/NEU, HRAS, P53, RB1, BRCA1, BRCA2
CML Lunge	ABL, BCR, MYC, N-RAS, RB1, P53 MYC, MYCN, MYCL, H-RAS, RB1, P53, RAF1, JUN
Ovar	P53, HER2/ErbB2/NEU, BRCA1, MYC, K-RAS, RB, CDH1/E-Cadherin OVCA1 und OVCA2

(Tabelle in Auszügen entnommen aus Hesketh, 1997)

1.1.2. Tumorsuppressorgene

Im Gegensatz zu den Proto-Onkogenen zeigen die Produkte der Tumor-Suppressorgene (TSG) mit ihren primär inhibierenden Funktionen ein rezessives Verhalten und Mutationen können daher auch über die Keimbahn vererbt werden. Erst eine Mutation in beiden Genorten führt durch den Verlust der inhibitorischen Wirkung zu einer transformierenden Eigenschaft.

Die TSG unterteilt man entsprechend ihrer Funktion in zwei Klassen: '*gatekeeper*'- und '*caretaker*'-Gene (Kinzler und Vogelstein, 1997; Koreth et al., 1999).

Normalerweise sind 'gatekeeper' für die Aufrechterhaltung einer konstanten Zellzahl in einer regenerationsfähigen Zellpopulation zuständig. Eine Mutation eines solchen Gens führt zu einem Ungleichgewicht von Zellproliferation und Apoptose und ist somit von zentraler Bedeutung für die Tumorentstehung. Zu den 'gatekeeper'-Genen zählt man z. B. das NF-1 (Neurofibromatose Typ-1-Gen) und das RB1 (Retinoblastom-Gen).

Zu den 'caretaker'-Genen gehören z. B. das ATM-Gen bei Ataxia telangiectasia und die Gene BRCA1 (*breast cancer gene*) und wahrscheinlich auch BRCA2 (Yu, 2000). Diese Gene sind hauptsächlich für die Aufrechterhaltung der Integrität des Genoms einer Zelle verantwortlich. Bei einem Funktionsverlust (*loss of function*) kommt es zu einer erhöhten Mutationsrate, so daß die Entstehung von Tumoren begünstigt wird. Eine Auswahl von Tumorerkrankungen mit beteiligten mutierten TSG ist in Tabelle 2 wiedergegeben. Wichtige TSG sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Übersicht über wichtige Tumorsuppressorgene

Gen	Lokalisation	Funktion	assoziierte Tumorerkrankungen
APC	5q21	bindet α - und β -Catenine, vermittelt Adhäsion und Zell-Zyklus Progression	Kolonkarzinom
BRCA1	17q21	Transkriptionsfaktor, DNA-Reparatur	familiärer Brust- und Ovarialkrebs
BRCA2	13q12-13	Transkriptionsfaktor, DNA-Reparatur	familiärer Brust- und Ovarialkrebs
INK4A/MTS1	9p21	Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor	viele Krebsarten; z. B. Melanom, ALL, Pankreaskarzinom
MSH2	2p21-22	DNA mismatch repair	<i>hereditary nonpolyposis colon cancer</i>
NF1	17q11.2	RAS-GTPase activating Protein	Neurofibromatose 1, CML
OVCA1/DPH2L (OVCA2)	17p13.3	?	Ovarialkarzinom
P53	17p13.1	Zell-Zyklus-Regulator, fördert Wachstumsarrest und Apoptose	Sarkom, Gliom, Brustkrebs, Leukämien
RB1	13q14	Zell-Zyklus-Regulator	Retinoblastom, Sarkom, Karzinom
WT1	11p12-13	Transkriptionsfaktor	Nierentumor (Wilms-Tumor)

(Tabelle in Auszügen entnommen aus Hesketh, 1997)

Das Retinoblastom-Gen (RB1) gehört zu einem der ersten entdeckten Tumorsuppressorgene und zu einem der wichtigsten Regulatoren des Zellzyklus. Schon 1971 postulierte A. G. Knudson nach statistischen Analysen von Retinoblastom-Erkrankungsfällen einen Zwei-Schritt-Mechanismus, also zwei Mutationen, eine in jedem Allel desselben Gen-Locus, die zur Tumorgenese des Retinoblastoms führen. Eine genetische Prädisposition, gekennzeichnet durch eine vererbte rezessive Mutation des RB1-Gens in der Keimbahn, benötigt zur Ausprägung des malignen Phänotyps nur noch eine weitere somatische Mutation (*second hit*) in dem noch intakten Wildtyp-Allel. Bei einer Anzahl von über 10^7 Retinoblasten ist das Risiko zu erkranken wesentlich erhöht, wenn bereits eine Mutation in allen Zellen vorliegt. Daher tritt diese Krankheit bei familiärer Vererbung schon im Kindesalter und meist auch bilateral auf, während bei der selteneren sporadischen Form die somatischen Mutationen erst im Laufe der Zeit in weiter fortgeschrittenem Alter auftreten und die Tumoren dann überwiegend unilateral vorzufinden sind. Auch beim Retinoblastom führt erst eine Anhäufung von Defekten zu der Erkrankung, wobei jedoch durch eine genetische Veranlagung die Grundlage für eine schnellere Tumormorinitiation gegeben ist.

Bekanntester Vertreter der TSG ist das multifunktionale p53, lokalisiert auf Chromosom 17p13.1. Es ist in über der Hälfte aller menschlichen soliden Tumoren mutiert. Seine wichtigste Funktion liegt in der Wahrung der Genom-Integrität (*the guardian of the genome*). Als *checkpoint*-Protein im Zellzyklus sorgt es in der G1-Phase bei DNA-Schäden durch Transaktivierung relevanter Zellzyklus-supprimierender Gene (z. B. p21^{WAF1/CIP1}) für einen Arrest des Zellzyklus, bis die Schäden behoben sind. Ist eine Reparatur nicht möglich, leitet das p53-Protein ebenfalls über die Aktivierung entsprechender Gene die Apoptose ein. Darüber hinaus spielt p53 eine direkte Rolle bei der Zelldifferenzierung, der DNA-Reparatur, der Angiogenese und der zellulären Seneszenz. Wie kürzlich gezeigt werden konnte, werden TSG neben beobachteten Mutationen auch durch epigenetische Modifikationen reguliert. Eine Hypermethylierung der Promotorregion des BRCA1-Gens wurde in sporadischen Brusttumoren beobachtet. Dieses führte zu einer Inhibition der Expression und somit zu einem Funktionsverlust des Gens (Dobrovic und Simpfendorfer, 1997).

1.1.3. Zellzyklus-Kontroll-Gene und Mismatch-Repair-Gene

Der Verlauf des Zellzyklus unterliegt einer ständigen Kontrolle und ist abhängig von einer sequentiellen Aktivierung und Inhibierung von Cyclinen, sowie einer Aktivierung von deren Partnern, den *Cyclin-dependent* Kinasen (CDKs). Die in Säugetierzellen bisher bekannten 13 Cycline sind in Kombination mit ihren CDKs, von denen bisher 6 identifiziert wurden, in verschiedenen Phasen des Zellzyklus aktiv. Sie werden neben ihrer Aktivierung durch Degradation und Proteolyse auch noch von sogenannten Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitoren (CKIs) negativ reguliert. Aberrationen in Genen dieser wichtigen Proteine führen zu einer Deregulation des Zellzyklus und damit zur Disposition von Krebs.

Ebenso dramatische Auswirkungen können Mutationen in DNA-*mismatch*-Reparatur-Enzymen (MMR) bewirken. Durch fehlende oder gestörte Aktivität der MMR-Proteine (z. B. MSH2, MSH3, MSH6/GTBP, MLH1) werden DNA-Schäden bei der Synthese nicht mehr erkannt und behoben, wodurch die Mutationsrate steigt (Mutator-Phänotyp). Auch hierdurch wird eine entscheidende Basis für die Tumorentstehung gelegt.

1.1.4. Weitere Voraussetzungen für die Tumorentstehung

Mitverantwortlich für die Immortalität der Krebszelle ist auch eine Konstanzhaltung der Telomerlänge durch eine ständig aktive Telomerase. Dadurch ist die Zelle befähigt, 'unendlich' viele Replikationszyklen zu durchlaufen, ohne daß das Ende der physiologischen Lebenszeit, die den Zeitpunkt der Apoptose bestimmt, erreicht wird.

Im weiteren Verlauf der Tumorentstehung spielen noch weitere Mechanismen eine wichtige Rolle, so z. B. die Angiogenese und die Metastasierung. Bestimmte Promotoren z. B. vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (VEGF), IL-8 und INT2, das Thrombospondin (TSP), Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und deren Inhibitoren, die *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs), regulieren die Angiogenese, die z. B. bei der Wundheilung im physiologischen Rahmen aktiviert wird. Im Tumorgewebe ist eine Neubildung von versorgenden Blutgefäßen eine Voraussetzung für das Größenwachstum.

Eine Metastasierung wird durch eine Aktivierung von Adhäsionsmolekülen (z. B. Cadherinen, Integrinen, CD44) und proteolytischen Proteinen (MMPs) gefördert. Die Gene

TIMPs, NME1 und NME2 wurden vermehrt bei erhöhten Metastasierungsraten gefunden.

1.2. Tumorerkrankungen

Krebs - diese Diagnose wurde 1997 ca. 338.000 mal in Deutschland gestellt (vom Robert Koch-Institut herausgegebene geschätzte Zahlen). Damit hat sich die Zahl der Neuerkrankungen gegenüber 1995 leicht erhöht (um 5000). Dieser Anstieg ist nicht nur auf eine veränderte Altersstruktur in der Bundesrepublik zurückzuführen, sondern vor allem auf eine Zunahme von Darmkrebs und Prostatakrebs bei Männern, sowie Brustkrebs und Lungenkrebs bei Frauen, hier gerade auch in Altersstufen von unter 60 Jahren. Die meisten Krebsfälle treten im Alter von über 60 Jahren auf, während die Zahl der Neuerkrankungen bei Personen unter diesem Alter auf etwa 90.400 geschätzt wird.

Bösartige Neubildungen sind nach den Krankheiten des Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache beider Geschlechter in Deutschland. Es läßt sich allerdings eine Trendwende erkennen, da die altersbedingte Sterblichkeit bei Krankheiten des Kreislaufsystems stärker abgenommen hat und auch weiterhin abnimmt als die Sterblichkeit bei Krebserkrankungen. Setzt sich dieser Trend weiter fort, wird in etwa 15-20 Jahren Krebs zur häufigsten Todesursache in Deutschland werden.

Eine Auflistung der häufigsten Krebsarten getrennt nach Geschlechtern sowie eine Statistik der Sterbefälle für das Jahr 1995 ist in Abbildung 1 dargestellt.

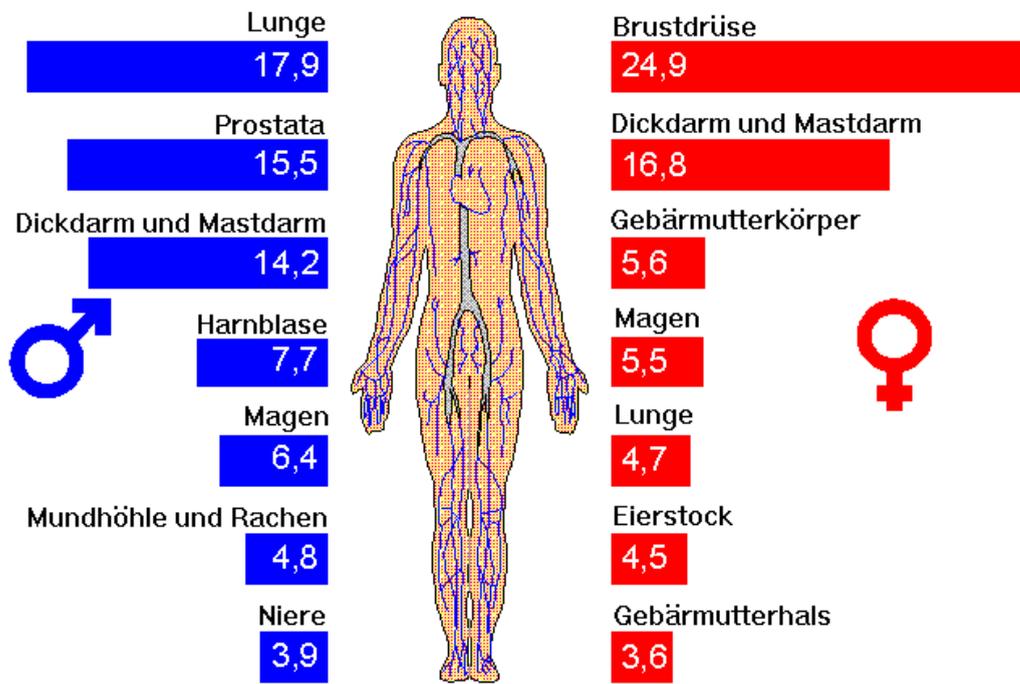
Wie aus der Abbildung zu ersehen ist, stand Eierstockkrebs, dessen genomische Veränderungen im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht wurden, im Jahr 1995 mit einem Anteil von 4,5% an 6.ter Stelle der geschätzten Tumor-Neuerkrankungen im weiblichen Teil der Bevölkerung, mit einem Altersgipfel zwischen 60 und 70 Jahren (1997: ca. 8200 neue Krebsfälle, davon 2200 Betroffene unter 60 Jahren). Bei annähernd gleicher Erkrankungshäufigkeit wie Gebärmutterkörper- (Corpus uteri) und Gebärmutterhalskrebs (Cervix uteri), ist die Sterblichkeitsrate dagegen etwa doppelt so hoch. Ovarialkarzinome erreichen damit die höchste Mortalitätsrate bei den malignen gynäkologischen Erkrankungen.

Die schlechte Prognose beim Eierstockkrebs liegt vor allem darin begründet, daß die Diagnose meist recht spät gestellt wird, da Ovarialkarzinome sich lange asymptomatisch verhalten. Bei der Erstdiagnose sind ca. 65% - 75% der Tumoren schon den

FIGO-Stadien III und IV zuzuordnen (Stadieneinteilung bei Tumoren, siehe Tabelle 4). Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beim Ovarialkarzinom beträgt nur etwa 20-35% (Stadium I: ca. 80-90%, Stadium II: 40- 60% und Stadium III:10-15% und Stadium IV < 5%), d. h., 2 von 3 Frauen überleben die ersten 5 Jahre nach Diagnosestellung nicht.

Nach ihrem klinischen Verhalten differenziert man die Tumoren in benigne, maligne und sogenannte Borderline-Tumoren (LMP-Tumor: *tumors of low malignant potential*). Die Borderline-Tumoren weisen im Vergleich zu benignen Tumoren Atypien und eine gesteigerte Proliferation auf, während ein infiltratives und destruktives Wachstum, charakteristisch für die malignen Formen, fehlt. Sie sind weder makroskopisch noch sonographisch sicher von den benignen oder den malignen Tumoren zu unterscheiden. Die invasiven Ovarialtumoren zeigen im Gegensatz zu den LMP-Tumoren einen Aneuploidiegrad von mehr als 50%, während LMP-Tumoren meist diploid sind und auch keine Metastasen bilden, die charakteristisch für die invasiven Formen sind. Borderline-Tumoren sind neoplastische Läsionen vom selben Zelltyp wie die malignen Ovarialtumoren. Ob jedoch die Borderline-Tumoren eine Vorläuferläsion der Ovarialkarzinome darstellen, ist noch nicht völlig geklärt. Bisher konnte der Übergang eines Borderline-Tumors in ein invasives Ovarialkarzinom noch nicht nachgewiesen werden (McCluskey und Dubeau, 1997). Bei den benignen und malignen Tumoren legen gemeinsame LOH-Muster (*loss of heterozygosity*) die Vermutung nahe, daß der Übergang von der benignen in die maligne Form ein Kontinuum der Tumorprogression darstellt (Roy et al., 1997).

Neuerkrankungsfälle (geschätzt)



Sterbefälle

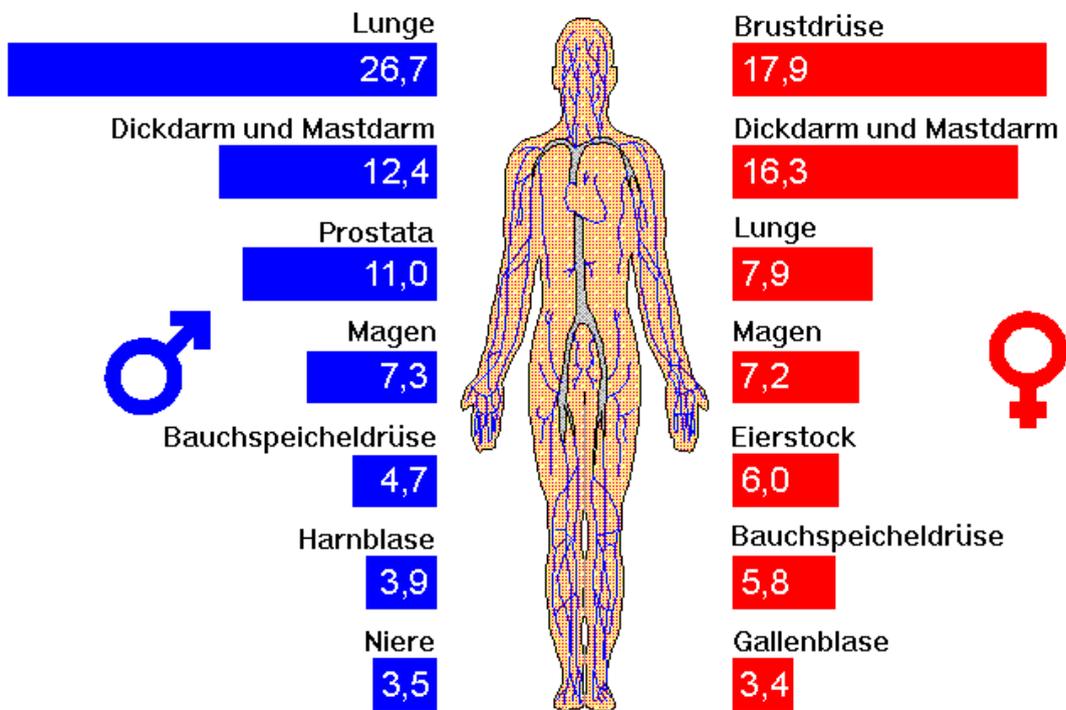


Abb. 1: Prozentuale Anteile der häufigsten Krebslokalisationen an der Gesamtzahl für das Jahr 1995 in Deutschland (Quelle: Internet-Veröffentlichung des Robert-Koch-Instituts)

Etwa 2-3% der Ovarial-Tumoren sind maligne Tumoren. Von diesen sind wiederum ca. 80% als epitheliale Karzinome einzuordnen, da sie aus den mesothelialen Zellen (paramesonephrisches Zölomepithel, Müller-Epithel) stammen, welche die Oberfläche des Eierstockes als einschichtiges Epithel auskleiden. Nach dem histologischen Typ unterscheidet man seröse, muzinöse, endometrioid, klarzellige, Brennertumoren und Mischformen (Tabelle 5). Während endometrioid Karzinome die beste Prognose besitzen, liegt diese bei den serösen im mittleren Bereich und ist bei den muzinösen, eventuell bedingt durch eine Resistenz gegenüber der Chemotherapie, am schlechtesten. Aufgrund ihres Wachstums unterteilt man die epithelialen Karzinome noch in papilläre, zystische und solide Tumoren.

Weniger als 20% der Ovarialneoplasien entstammen den Keimzellen oder dem eigentlichen ovariellen Stroma. In ungefähr 10-30% aller Fälle liegen Metastasen eines anderen Primärtumors vor, meistens ausgehend von Endometrium-, Brust-, Magen- oder Kolonkrebs (Tabelle 5).

Die Stadieneinteilung nach FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) und die TNM-Klassifikation (Tumor-Nodus-Metastasen) beschreibt Ausdehnung des Primärtumors, Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen (Tabelle 4). Diese Einteilungen erfolgen ausschließlich nach pathologisch-anatomischen Gesichtspunkten während der Operation und berücksichtigen alle histologischen Befunde.

Die Therapie des Eierstockkrebs erfolgt multimodal mittels Operation und Chemotherapie. Die maximale Tumorentfernung ist Voraussetzung für den Erfolg einer nachfolgenden systemischen Therapie.

Tabelle 4: Stadieneinteilung der Tumoren nach dem TNM-System (UICC) und FIGO

TNM	FIGO	Charakterisierung	Häufigkeit
T		Primärtumor	
TX		Primärtumor kann nicht beurteilt werden	
T0		kein Anhalt für Primärtumor	
T1	I	Tumor begrenzt auf Ovarien a ein Ovar betroffen, Kapsel intakt b beide Ovarien betroffen, Kapsel intakt c Tumorzellen in Aszites / Peritoneallavage	15%
T2	II	Tumorausbreitung im Becken a Befall von Uterus und / oder Tuben b Befall anderer Beckenorgane c Tumorzellen in Aszites / Peritoneallavage	15%
T3	III	peritoneale Metastasen über das Becken hinaus a mikroskopischer Nachweis b Tumorgroße = 2cm c Tumorgroße > 2cm	65%
N		Lymphknotenbefall	
NX		regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar	
N0		keine regionären Lymphknotenmetastasen	
N1		regionäre Lymphknotenmetastasen	
M		Fernmetastasen	
MX		Fernmetastasierung nicht beurteilbar	
M0		keine Fernmetastasen	
M1	IV	Fernmetastasen (außer Peritonealmetastasen)	5%
G		Differenzierungsgrad (<i>Grading</i>)	
GX		Differenzierung nicht beurteilbar	
GB		Borderline-Tumor (Proliferation hoch, Zell- / Kernatypien, keine Invasion)	
G1		Gut differenziert	
G2		Mäßig differenziert	
G3		Gering differenziert	
G4		Undifferenziert	

(Tabelle aus Berger et al., 1998)

Tabelle 5: Histologie und Häufigkeit der Ovarialkarzinome nach WHO

Histologie	Häufigkeit
Epitheliale Tumoren	65%
• serös	40%
• muzinös	20%
• endometrioid	4%
• mesonephroid (klarzellig)	2%
• Brenner-Tumor	selten
• Mischtypen	selten
• undifferenziert, unklassifiziert	4%
Stromatumoren	7%
• Granulosazelltumor	5%
• Thekazelltumor	k.A.
• Sertoli-, Leydig-Zell-Tumor	k.A.
• Androblastom	k.A.
• unklassifiziert	k.A.
Keimzelltumoren	12%
• Dysgerminom	1%
• Teratom	3%
• endodermaler Sinus-Tumor (" <i>yolk sac tumor</i> ")	1%
• embryonales Karzinom	selten
• Chorionkarzinom	selten
• Polyembryom	selten
• gemischter Keimzelltumor	selten
Borderline-Tumoren	6%
• " <i>tumors of low malignant potential</i> ", keine Invasion	
Andere	10%
• Lipidzelltumor, Gonadoblastom, mesenchymale Tumoren (Sarkome, Fibrome usw.), Lymphome, Metastasen	

(Tabelle aus Berger et al., 1998)

1.3. Ätiologie des Ovarialkarzinoms

Über die Ursachen des Eierstockkrebs ist wenig bekannt. Vergleichbare geographische Verteilungsmuster von Gebärmutterkörper-, Brust- und Eierstockkrebs in Europa lassen eine ähnliche Ätiologie vermuten. Kinderlose oder spätgebärende Frauen scheinen ein erhöhtes Erkrankungsrisiko zu haben. Demgegenüber scheinen orale Kontrazeptiva das Krebsrisiko zu senken. Diese Beobachtungen unterstützen die Annahme, daß jede Ovulation mit nachfolgend notwendiger Proliferation des ovariellen Oberflächenepithels zur Regeneration von kleinen entstandenen Läsionen das Krebsrisiko steigert. Daher senken späte Menarche, frühe Menopause, Schwangerschaften, lange Stillzeiten und orale Kontrazeptiva (protektiver Effekt ist direkt proportional zur Dauer der Einnahme) durch Reduzierung der Ovulationsrate das Erkrankungsrisiko (Wan et al., 1996; Schildkraut et al., 1997; Berger et al., 1998; Pfeleiderer et al., 2000).

Eine neuere Hypothese geht davon aus, daß auch Entzündungsprozesse, wie sie z. B. nach Asbest-Exposition, bei Endometriose, aber auch bei den zyklischen Ovulationen vorkommen, an der Entstehung von Ovarialkarzinom beteiligt sind (Ness und Cottreau, 1999).

Die überwiegende Mehrzahl aller Ovarialtumoren tritt sporadisch auf, etwa 5% scheinen jedoch genetisch prädisponiert zu sein. In den westlichen Industrieländern liegt das Risiko für eine Frau an Ovarialkarzinom zu erkranken bei 1% - 1,5%. Das Risiko steigt auf 5% - 7%, wenn nahe Verwandte (Mutter, Schwester, Tochter) betroffen sind. Man unterscheidet 3 familiäre Formen bei Ovarialtumoren (Pfeleiderer et al., 2000):

- 1) spezifisches Ovarialkarzinom-Syndrom
- 2) Mamma- / Ovarialkarzinom-Syndrom
- 3) Lynch II-Syndrom

Beim spezifischen Ovarialkarzinom-Syndrom liegt der Altersgipfel etwa 10 Jahre früher als beim nicht-familiären Ovarialkarzinom. Bei Erkrankungen einer Verwandten ersten Grades liegt die Inzidenz noch bei 3%, während sie auf 30% - 40% steigt, wenn zwei nahe Angehörige erkrankt sind.

Im Falle des familiären Mamma- / Ovarialkarzinom-Syndroms führt eine Mutation des BRCA1- oder BRCA2-Gens auf Chromosom 17q21 bzw. 13q12-q13, zu einem deutlich erhöhten Risiko für die Entstehung von Brustkrebs (bis zu 85% bei Mutationen von

BRCA1, Casey 1997) und von Eierstockkrebs. Im Fall von BRCA1 liegt das Risiko, bis zu einem Alter von 70 Jahren an Ovarialkarzinom zu erkranken, bei 40-44%, während es durch Mutation des BRCA2-Gens bei 10-20% liegt (Easton et al., 1995, *Breast Cancer Information Core*, BIC: Internet <http://www.nchhgr.nih.gov/dir/labtransfer/bic>). Es handelt sich hierbei um eine autosomal dominant vererbte Prädispositionen zu Brust- und epithelalem Ovarialkrebs, wobei das prädisponierende Allel ein rezessives Allel in der somatischen Zelle ist. Ein Verlust (*loss of heterozygosity*, LOH) bzw. eine Inaktivierung des einzig noch intakten Wildtyp-Allels führt zur Ausprägung des malignen Phänotyps.

Das Lynch II-Syndrom stellt eine Kombination des Lynch I-Syndroms (familiäres Kolonkarzinom, HNPCC: *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*) mit Ovarial-, Endometrium-, und Mammakarzinom sowie anderen Malignomen des Urogenital- und Gastrointestinaltraktes dar. Frauen mit familiärem HNPCC-Hintergrund haben ein dreifach erhöhtes Risiko, an Ovarialkrebs zu erkranken.

Aber auch andere Gene sind an der Entstehung von Ovarialkarzinomen beteiligt. So finden sich in fast allen Chromosomen Aberrationen.

LOH-Untersuchungen zeigten vor allem Verluste von Chromosom 3p, 4p, 5q, 6p, 6q, 7p, 8q, 9q, 11p, 12, 13q, 16, 17, 18q, 19 und Xp (Russell et al., 1990; Foulkes et al., 1991, 1993a-c; Sato et al., 1991; Chenevix-Trench et al., 1992; Eccles et al., 1992a-c; Futreal et al., 1992; Kiechle-Schwarz et al., 1993; Tavassoli et al., 1993, 1996; Schultz et al., 1995; Pieretti et al., 1995a, b; Sonoda et al., 1997). FISH-Analysen ergaben bisher folgende Auffälligkeiten: Verlust von Chromosom 4, 6, 8, 13, 14, 15, 17, 18, 22 und X, Gewinn von Chromosom 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 11, 12 und 14, sowie Rearrangements unter Beteiligung von Chromosom 1p, 1q, 3p, 3q, 6q, 7p, 9q, 11p, 12, 14, 17q, 19p und 19q (Wake et al., 1980; Atkin und Baker, 1987; Pejovic et al., 1990, 1992a, b; Roberts und Tattersall, 1990; Jenkins et al., 1993; Persons et al., 1993; Kiechle-Schwarz et al., 1994 und 1995; Thompson et al., 1994a, b; Heim und Mitelman, 1995; Brock et al., 1996; Sonoda et al., 1997). Besonders häufig findet man beim OvCa. Veränderungen der Gene p53, c-myc und HER2/NEU/ERBB2.

Folgende Abbildung mit einer Übersicht über chromosomale Imbalancen beim Ovarialkarzinom und anderen Tumorarten zusammengefaßt aus einigen CGH-Studien, ist aus dem Internet (<http://www.nhgri.nih.gov/DIR/LCG/CGH/Images/toplist.jpg>) entnommen. Die am häufigsten zu verzeichnenden Gewinne (*gains*) und Verluste (*losses*) sind hervorgehoben.



Abb. 2: Die häufigsten Gewinne (*gains*) und Verluste (*losses*) bei verschiedenen Krebsarten

Trotz der Vielzahl an Angaben über Veränderungen beim Ovarialkarzinom, sind spezielle wiederkehrende Alterationen in Korrelation mit Tumor-Stadien oder Differenzierungsgrad sowie zur Verwendung als prognostische Marker noch nicht eindeutig beschrieben worden.

1.4. Comparative-Genom-Hybridisierung

Um zunächst eine Übersicht über vorliegende chromosomale Aberrationen beim Ovarialkarzinom zu erhalten, wurde als Methode die Comparative- (vergleichende) Genom-Hybridisierung (CGH) ausgewählt. Mit dieser Technik ist es möglich, genomische Imbalancen in Tumoren mit zytogenetischer Auflösung darzustellen. Seit ihrer erstmaligen Beschreibung 1992 durch Kallioniemi et al., hat die CGH eine vielfältige Anwendung erfahren und gerade auf dem Gebiet der Krebsforschung zu vielen neuen Erkenntnissen über tumorspezifische Genomalterationen geführt.

Bei der CGH werden Tumor- und Kontroll-DNA mit unterschiedlichen Haptenen markiert und auf normale denaturierte Metaphase-Chromosomen unter Zugabe von C_{0t} -1 DNA zur Absättigung hochrepetitiver Bereiche co-hybridisiert (siehe Abbildung 3). Hierbei konkurriert das genetische Material um Bindungsstellen auf den homologen Bereichen der Metaphase-Chromosomen und wird entsprechend der relativen Häufigkeit anteilig gebunden.

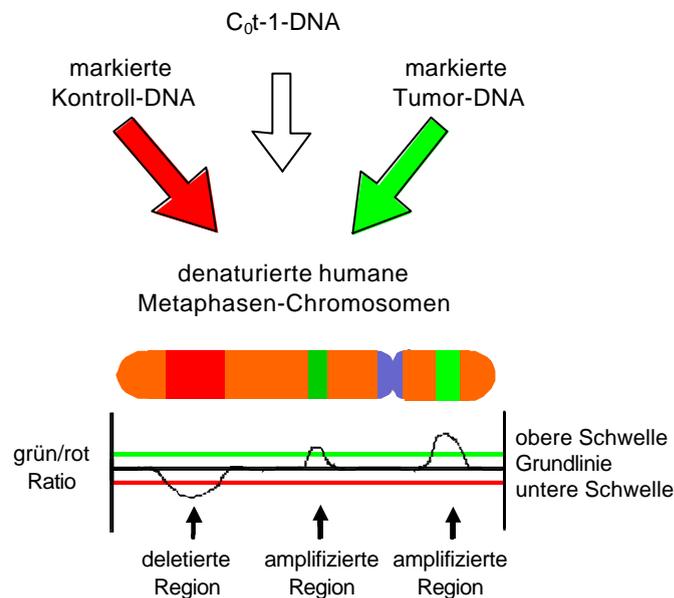


Abb. 3: Prinzip der CGH

Die hybridisierten DNA-Fragmente werden mittels verschiedener Fluorochrome im Fluoreszenz-Mikroskop detektiert und mit Hilfe einer lichtempfindlichen Kamera dokumentiert.

Im Normalfall liegt ein ausgewogenes Verhältnis der beiden Konkurrenten vor. Die Metaphasen erscheinen daher nach der Detektion der DNA mit Fluorescein (einem Fluorescein-Isothiocyanat-(FITC)-Derivat, Tumor-DNA: grün) und Rhodamin (Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat-(TRITC)-Derivat, Kontroll-DNA: rot) in einer homogenen Mischfarbe (orange). Bei chromosomalen Aberrationen in der Tumor-DNA sind die entsprechenden Bereiche auf den Metaphasechromosomen bei Verlust dieser Region in der Tumor-DNA rot angefärbt, oder die betroffenen Bereichen der Metaphase-Chromosomen erscheinen durch eine Vervielfältigung (Amplifikation) von Genmaterial des Tumors in grüner Farbe (Abbildung 3). Für eine Auswertung der Hybridisierungssignale werden mehrere Metaphasen in Einzelaufnahmen der drei Farben Blau, Grün und Rot fotografiert (siehe Abb. 4, S. 50) und mit Hilfe eines *Software*-Programmes analysiert.

Die Vorteile der CGH gerade bei der Analyse solider Tumoren sind folgende: in nur einem Experiment erhält man eine Übersicht über mögliche Genom-Veränderungen, ohne Vorkenntnisse über mögliche chromosomale Alterationen zu besitzen, wie sie z. B. bei LOH- oder FISH-Experimenten nötig sind. Da DNA als Ausgangsmaterial dient, kann man neben Frischgewebe auch archiviertes, in Paraffin eingebettetes Tumormaterial untersuchen (Isola et al., 1995; Speicher et al., 1995; Ried et al., 1995). Auf eine Kultivierung des zu untersuchenden Tumor-Gewebes für die Herstellung einer Tumor-Metaphase-Präparation zur zytogenetischen Charakterisierung kann verzichtet werden, zumal die erhaltenen Präparationen meist von schlechter Qualität sind und eine Chromosomen-Zuordnung durch den meist hochkomplexen Karyotyp erschwert wird.

Für die CGH reichen geringe Mengen an DNA, da diese mittels DOP-PCR (Telenius et al., 1992) für den Gebrauch amplifiziert werden können, so daß auch Einzelzell-Präparationen, gewonnen mit Mikro- oder Laserdissektion, Verwendung finden (Liang et al., 1995; Becker et al., 1996; Böhm et al., 1997; Bonner et al., 1997; Kuukasjärvi et al., 1997). Mit dieser Technik umgeht man zudem das Risiko, durch mögliche Kontamination des Probenmaterials mit Normalgewebe oder z. B. infiltrierenden Immunzellen, das CGH-Ergebnis zu verfälschen. Der Anteil an tumorrelevanter DNA sollte mehr als 35% betragen, damit mögliche Veränderungen erkannt und nicht durch anteilige Nor-

mal-DNA aus dem Nachbargewebe überlagert werden (Schröck et al., 1994; Joos et al., 1995). Man kann durch Analyse einzelner Zellen aber auch eine mögliche Heterogenität des Tumors genauer charakterisieren (Klein et al., 1999; Wells et al., 1999).

Die unterste Auflösungsgränze der CGH liegt bei 5-10 Mb. Kleinere Regionen können nur detektiert werden, wenn sie fünf- bis 10-fach amplifiziert vorliegen (Kallioniemi et al., 1994; Piper et al., 1995; Bentz et al., 1995 und 1998; Kirchhoff et al., 1999). Für genauere Feinkartierungen, aber auch zur Bestimmung des Ploidie-Grades müssen andere molekular-zytogenetische Methoden herangezogen werden, da die CGH nur relative Veränderungen der Genkopienzahl, nicht aber absolute Änderungen des gesamten Genoms wie Tri- oder Tetraploidien aufzeigt.

Für eine Überprüfung der CGH Daten, besonders zur Ermittlung des Ploidie-Grades, bietet sich die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) an. Durch Verwendung locus-spezifischer FISH-Sonden ist man in der Lage, bis hinunter auf die Gen-Ebene, Über- und Unterrepräsentationen, potentielle Bruchpunkte und Translokationen, sowie chromosomale Rearrangements (z. B. Insertionen und Inversionen) zu identifizieren und genauer zu lokalisieren. Vorkenntnisse über bestimmte Aberrationen sind aber Voraussetzung, um geeignete Sonden auswählen zu können.

Auf 'touch-Präparaten' läßt sich durch FISH innerhalb kürzester Zeit das CGH-Ergebnis kontrollieren und mit den entsprechenden chromosomalen Sonden interessante Loci näher eingrenzen.

1.5. Ziel der Arbeit

Im Rahmen des von der Deutschen Krebshilfe geförderten Projektes 'Vergleichende genomische Hybridisierung zur Charakterisierung genetischer Alterationen in Ovarialkarzinomen' (AZ M 72/93/Ki) sollte im onkologischen Labor der Klinik für Gynäkologie und Frauenheilkunde der Universitätsklinik Kiel die Methode der Comparativen-Genom-Hybridisierung etabliert werden. Diese Methode sollte zur Detektion und Lokalisation genetischer Aberrationen in Tumorgewebe von Patientinnen mit Ovarialkarzinom dienen und die Daten sollten mit den bereits vorhandenen Erkenntnissen verglichen und auf neue Auffälligkeiten hin überprüft werden, um Aufschluß über eine mögliche Korrelation mit dem Tumor-Stadium oder der Tumor-Progression und damit auch über mögliche prognostische Faktoren zu erhalten.

Ein Vergleich von CGH und FISH sollte zudem die Zuverlässigkeit der CGH überprüfen und gleichzeitig eine genauere Kartierung der gefundenen Aberrationen ermöglichen.

2. Material

2.1 Arbeitsgeräte

Folgende Geräte kamen zum Einsatz:

- Brutschrank, Forma Scientific
- Diamantschreiber, Roth
- Durchlichtmikroskop, Zeiss
- Edelstahlbehälter mit Deckel (ca. 30x15x7,5 cm), Roth
- Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, von Zeiss) ausgestattet mit:
einem Dualbandpass-Strahlungsteiler und -Sperrfilter, zwei getrennten
Anregungsfiltern für DAPI und FITC und einem Cy-3.5-Filterset V1, AHF,
und einer HBO 100/2 Quecksilberbogenlampe (Osram) mit ange-
schlossener CCD-Kamera (fluoreszenzfähig)
- FastPrep, BIO 101
- Gelelektrophorese-Apparatur, Bio-Rad
- Heizplatte, Medax
- PC ausgestattet mit der ISIS-3 Software, MetaSystems GmbH
- pH-Meter, Knick
- Pipetten, Eppendorf
- Power-Supply, Bio-Rad
- Schüttler, Heidolph
- Standküvetten, Roth
- Thermocycler PTC-200, MJ Research
- UV-Tisch mit Fotodokumentation, Pharmacia
- UV-Spektrophotometer, Pharmacia
- Vortex, Scientific Industries
- Wärmeschrank, Memmert
- Wasserbad, Haake
- Zentrifuge, Hettich

2.2. Verbrauchsmaterialien

Verwendete Materialien und deren Bezugsquellen:

- Deckgläschen eckig: 7x7, 22x22 und 60x24 mm, Menzel Gläser
- Deckgläschen rund: Ø 10 mm, Menzel Gläser
- Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml und 2,0 ml), Eppendorf
- EDTA-Blutröhrchen, Sarstedt
- Glaspipetten, Länge: 150 mm, Assistent
- JET-Quick PCR Reinigungs-Kit, Genomed
- Lysing Matrix-Röhrchen, BIO 101
- Metaphasen-OT, Vysis
- Nitrozellulosefilter BA 85, Schleicher und Schuell
- Objektträger mit Mattrand, Menzel Gläser
- Eindeck-Plastikfolie 60x30 mm, Appligene Oncor
- sterile Pipettenspitzen, Sarstedt
- sterile Falcon-Röhrchen (15 ml und 50 ml), Becton Dickinson

2.3. Chemikalien

Eingesetzte Chemikalien und deren Hersteller:

- Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragmente, Roche Diagnostics GmbH
- Anti-Digoxigenin-Rhodamin, Roche Diagnostics GmbH
- Agarose, Amresco
- AmpliTaq[®] DNA Polymerase, Perkin Elmer
- Anti-Digoxigenin-AP-Antikörper, Roche Diagnostics GmbH
- BCIP, Roche Diagnostics GmbH
- Biotin-16-dUTP, Roche Diagnostics GmbH
- Borsäure, Merck
- BSA, Amresco
- Bromphenolblau, Merck
- Chromosom 6 α -Satelliten-Probe, Appligene Oncor
- Chromosom 8-spezifische DNA-Probe, Roche Diagnostics GmbH
- Chromosom 12-spezifische DNA-Probe, Roche Diagnostics GmbH

- Chromosom 18 α -Satelliten-Probe, Appligene Oncor
- Chromosom 18-spezifische DNA-Probe, Appligene Oncor
- c-myc DNA-Probe, Appligene Oncor
- Colcemid, Gibco BRL
- C₀t-1-DNA, Gibco BRL
- Dextranblau, Merck
- Dextransulfat, Biomol
- 10x DIG-DNA-Labeling Mix, Roche Diagnostics GmbH
- Digoxigenin-11-dUTP, Roche Diagnostics GmbH
- DAPI/Antifade (Vectashield), Vector
- DNA-Längenstandard, 1 kb-Ladder improved, MBI Fermentas
- DNA-Polymerase I, Roche Diagnostics GmbH
- DNase I, Roche Diagnostics GmbH
- DTT, Promega
- dNTP's, Roche Diagnostics GmbH
- DOP-Primer, Metabion
- EDTA, Amresco
- Eisessig, Merck
- EtBr, Bio-Rad
- Ethanol, absolut, Merck
- Ficoll (Typ 400), Sigma
- Fixogum, Marabu
- Fötale Kälberserum, Gibco BRL
- Formaldehyd 37%, säurefrei, Merck
- Formamid, Merck
- Glycerin, Merck
- HCl, Merck
- KCl, Merck
- L-Glutamin, Gibco BRL
- Liquemin N 25000, Gibco BRL
- Methanol, Merck
- MgCl₂, Merck
- Natrium₃-Citrat, Merck

- NaCl, Merck
- NBT, Roche Diagnostics GmbH
- PBD, Appligene Oncor
- Penicillin, Gibco BRL
- Pepsin, Sigma
- Phytohaemagglutinin (HA 15), Murex
- Proteinase K, Roche Diagnostics GmbH
- Reaktionspuffer D, 5x, Invitrogen
- Reaktionspuffer, 10x, für DOP-PCR, Amersham
- Reaktionspuffer, 10x, für Markierungsreaktion, Roche Diagnostics GmbH
- Replitherm Reaktionspuffer 20x, Biozym
- RNase A, Roche Diagnostics GmbH
- RPMI 1640, Gibco BRL
- Saccharose, Merck
- SDS, Roth
- Streptavidin-AP-Konjugat, Roche Diagnostics GmbH
- Streptavidin-Fluorescein, Roche Diagnostics GmbH
- Streptomycin, Gibco BRL
- Triton X-100, Sigma
- Tris/HCl, Sigma
- Tween 20, Sigma
- Xylencyanol FF, Fluka

2.4. Puffer und Lösungen

DNA-Isolierung aus Blut und Gewebe:

- Lysispuffer: 320 mM Saccharose, 1 mM Tris/HCl , pH7,5
5 mM MgCl₂ x 6H₂O, 1% Triton X-100
- SE-Puffer: 75 mM NaCl, 25 mM EDTA, pH 8,0
- Proteinase K: 10 mg/ml
- RNase A: 20 mg/ml

- SDS: 20%
- NaCl: 5 M
- EtOH: 70%
- TE-Puffer (10:0,1): 10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 8,0

DOP-PCR:

- DOP-Primer Mix: 40 µM Aliquots HPLC gereinigter DOP-Primer, bei -20°C gelagert (5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3')
- dNTP-Mix für DOP-PCR: je 2 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP; Aliquots bei -20°C
- dNTP-Mix für Label-PCR: je 2 mM dATP, dCTP, dGTP mit 1 mM dTTP und 1 mM DIG-11-dUTP oder Biotin-16-dUTP; Aliquots bei -20°C
- 5x Reaktionspuffer D: 300 mM Tris-HCl, 75 mM Ammonium-Sulfat, 17,5 mM MgCl₂, pH 8,5
- 10x Reaktionspuffer: 100 mM Tris/HCl, 500 mM KCl, pH 8,3, 0,01% Gelatine (w/v); Aliquots bei -20°C (gebrauchsfertig vom Hersteller)
- 20x Replitherm-Reaktionspuffer: 200 mM Tris/HCl, 1 M KCl, 0,1% Tween 20 und 0,1% NP-40; Aliquots bei -20°C (gebrauchsfertig vom Hersteller)
- Ampli-Taq[®]-Polymerase: 5 U/µl
- NaCl: 25 mM
- MgCl₂: 50 mM

Chromosomenpräparation:

- Liquemin N 25000: 5000 I.E. Natrium-Heparin pro ml
- Blutkulturmedium: RPMI 1640 mit 10% fötalem Kälberserum, 200 mM L-Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin

- Phythaemagglutinin: 9 mg/ml in dH₂O
- Colcemid: 10 µg/µl
- Hypotone Lösung: 75 mM KCl
- Fixativ: 3 Teile Methanol und 1 Teil Eisessig (v/v); frisch angesetzt und bei -20°C gelagert

Nick-Markierungsreaktion:

- dNTP-Mix: dATP, dCTP, dGTP je 0,5 mM in 500 mM Tris/HCl, 50 mM MgCl₂, pH 7,5
- dTTP: 0,5 mM
- Biotin-16-dUTP: 1 mM
- 10x Reaktionspuffer: 500 mM Tris/HCl, 100 mM MgSO₄, 1 mM DTT, pH 7,2 (fertige Lösung)
- 10x DIG-DNA-Labeling Mix: 1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 0,65 mM dTTP, 0,35 mM DIG-dUTP, pH 7,5
- DNA-Polymerase I: 9 U/ml
- DNase I: Stocklösung: 3 mg/ml; vor Gebrauch 1:2000 in dH₂O verdünnen
- DTT: 1 mM
- Lösung D: 270 mM EDTA, 1% SDS, pH 7,5; Aliquots bei -20°C lagern

Gel-Elektrophorese:

- 10x TBE: 1 M Tris/HCl, 0,83 M Borsäure, 10 mM EDTA, pH 8,0
- Agarose-Gel: 1% Agarose in 0.5x TBE
- 10x Gelladepuffer: 50% Glycerin, 1 mM EDTA, pH 7,5, 0,25% Bromphenol-Blau, 0,25% Xylencyanol FF
- DNA-Längen-Standard: 1 kb Ladder *improved*, 200 ng/5µl

- Laufpuffer: 0,5x TBE
- EtBr-Färbegrad: 100 µg/ml EtBr in dH₂O

Filtertest:

- Puffer AP-1: 100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂
pH 7,5; nach dem Autoklavieren: Zugabe von Triton X-100 (0,05%)
- Puffer AP-2: 3% BSA in Puffer AP-1
- Puffer AP-3: 100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl,
50 mM MgCl₂, pH 9,5
- AP-Antikörperlösung: 1:5000 Verdünnung von Anti-DIG-AP und eine
1:1000 Verdünnung von Streptavidin-AP in AP-2
- Substratlösung: 4,4 µl NBT und 3,3 µl BCIP in 1 ml Puffer AP-3;
frisch angesetzt und im Dunkeln gelagert

CGH:

- 10x PBS- Stammlösung: 1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 15 mM KH₂PO₄,
80 mM Na₂HPO₄ x 7H₂O, pH 7,3;
für den Gebrauch auf 1x PBS verdünnen
- 1x PBS/MgCl₂: 50 mM MgCl₂ in 1x PBS
- 20x SSC-Stammlösung: 3 M NaCl, 0,3 M Na₃-Citrat, pH 7,0;
für den Gebrauch auf 2x SSC verdünnen
- RNase A-Stocklösung: 20 mg/ml RNase A in 10 mM Tris/HCl,
15 mM NaCl, pH 7,5; 15min. kochen, langsam
abkühlen lassen und Aliquots bei -20°C lagern
- HCl: 0,01 N, pH 2,3
- Pepsinlösung: 10% Pepsin-Stocklösung (w/v) in dH₂O;
in 40 µl Aliquots bei -20°C lagern
- Postfixierungslösung: 2,7 ml säurefreies 37% Formaldehyd auf
100 ml PBS/MgCl₂
- aufsteigende
Alkoholreihe: 70%, 85%, EtOH_{abs.}

- Stop-Mix: 0,1% Bromphenolblau (w/v),
0,5% Dextranblau (w/v), 0,1 M NaCl,
20 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7,8
- Denaturierungslösung: 50% Formamid, 2x SSC (v/v), pH 7,0
- Hybrid-Mix: 50% Formamid, 2x SSC,
10% Dextransulfat (v/v), pH 7,0
- 10x PBD-Stammlösung: 4x SSC, 0,05% Tween 20, pH 7,5;
fertige Lösung von Appligene Oncor,
für den Gebrauch auf 1x PBD verdünnen
- Antikörperlösung: 1:200 Verdünnung von Anti-DIG-Rhodamin
(1 mg/ml) und
Streptavidin-Fluorescein (1 mg/ml) in 1x PBD
- DAPI/Antifade: 1,5 µg/ml; fertig vom Hersteller, bei -20°C gelagert

FISH:

- Fixativ: 3 Teile Methanol und 1 Teil Eisessig (v/v)
- Hybridisierungslösung: 50% Formamid, 2x SSC,
10% Dextransulfat (v/v), pH 7,0
- DAPI/Antifade: 1,5 µg/ml, fertig vom Hersteller, bei -20°C gelagert

3. Methoden

3.1. DNA-Präparation

3.1.1. DNA-Isolierung aus Blut

Das in einem EDTA-Röhrchen aufgenommene frische Blut (10 ml) wurde mindestens 24 h bei -20°C eingefroren und anschließend für die Aufarbeitung wieder aufgetaut. Nach der Überführung des Blutes in ein 50 ml Falcon-Röhrchen erfolgte die Zugabe von 30 ml Lysispuffer und eine halbstündige Inkubation auf Eis. Während dieser Zeit wurde der Ansatz alle 10 min. vorsichtig geschwenkt und anschließend für 15 min. bei 4000 UpM und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt und zum Sediment erneut Lysispuffer gegeben (10 ml). Nach erfolgter Suspension wieder eine Inkubation auf Eis für 15 min. und im Anschluß daran eine Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wie oben beschrieben. Das erhaltene Präzipitat wurde in 5 ml SE-Puffer mit 25 µl Proteinase K (10 mg/ml) und 250 µl SDS (20%) aufgenommen und 24 h bei 37°C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Am nächsten Tag wurden 1,4 ml einer gesättigten NaCl-Lösung (5 M) zupipettiert, der Ansatz kurz gevortext und dann bei RT für 15 min. bei 4000 UpM zentrifugiert. Zu dem in ein neues Falcon-Röhrchen überführten Überstand (ca. 8-10 ml) kamen 10 ml Isopropanol. Der Inhalt wurde dann vorsichtig geschwenkt, bis die DNA als sichtbares 'Knäuel' ausfiel. Zum Fischen der DNA kam ein selbstgefertigtes Glashäkchen (über einer Bunsenbrenner-Flamme gebogenes dünnes Ende einer Glas-Pasteurpipette) zum Einsatz. Nach einmaligem Waschen in 70% EtOH wurde die gefischte DNA am Häkchen getrocknet. Je nach Menge erfolgte die Lösung der DNA über einige Tage in bis zu 500 µl TE-Puffer (10:0,1).

Falls keine DNA ausfiel, wurde der Ansatz in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und 24 h bei -20°C belassen. Danach erfolgte die Zentrifugation in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge bei 14.000 UpM für eine halbe Stunde. Das erhaltene DNA-Pellet wurde mit 70% EtOH gewaschen und nach dem Trocknen ebenfalls in TE aufgenommen. Nach Konzentrationsbestimmung (siehe 3.1.3.) und einer qualitativen Beurteilung (siehe 3.1.4.) wurde die DNA bei -20°C gelagert.

3.1.2. DNA-Gewinnung aus Gewebematerial

Zur Isolierung der DNA aus Frischgewebe wurden 200 mg Tumormaterial mit 1 ml SE-Puffer in ein Lysing Matrix-Röhrchen gegeben. Die Gewebezetrümmerung erfolgte für 30 sec. bei *speed* 4,5 in dem FastPrep-Gerät mit Hilfe der in den Röhrchen enthaltenen kleinen Partikel. Anschließend wurde der Inhalt in ein 15 ml Falcon-Röhrchen dekantiert und mit 4 ml SE-Puffer, 250 μ l 20% SDS und 25 μ l Proteinase K versetzt und üN bei 37°C inkubiert. Für den RNase-Verdau wurden am nächsten Tag 20 μ l RNase A zugegeben und der Ansatz für 30 min. in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 1,4 ml einer 5 M NaCl-Lösung und Durchmischung auf dem Vortex erfolgte die Zentrifugation des Ansatzes bei 4000 UpM für 15 min. bei 4°C. Der DNA-haltige Überstand wurde in ein neues Falconröhrchen überführt und zur Fällung der DNA mit dem zweifachen Volumen an EtOH_{abs.} versetzt. Die DNA fiel als sichtbares Knäuel nach vorsichtigem Schwenken des Röhrchens aus und wurde mit einem Glashäkchen gefischt. Zum weiteren Vorgehen siehe 3.1.1.

3.1.3. DNA-Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bei 260 nm gegen dH₂O als Referenz bestimmt. Als Maß für die Reinheit der DNA diente der Quotient aus OD₂₆₀/OD₂₈₀ (Normbereich zwischen 1,70 und 1,95).

3.1.4. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Größenbeurteilung der DNA wurde eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Als Trenngel diente 1%-ige Agarose, als Laufpuffer 0,5x TBE. Die mit Gelladepuffer versetzte (Endkonzentration des Ladepuffers: 1x) und anschließend aufgetragene DNA lag mengenmäßig bei 500-1000 ng. Bei einer Spannung von 100 V variierte, je nach Gelgröße, die Laufzeit zwischen einer halben Stunde und 45 min. Nach dem Lauf wurde die DNA in dem Gel in einer EtBr-Lösung gefärbt (5-10 min.), anschließend das Gel kurz (5 min.) in dH₂O entfärbt und mit Hilfe eines UV-Gerätes analysiert.

Zur Bestimmung der Fragmentgröße diente ein mitaufgetragener DNA-Längen-Standard. Für die Dokumentation wurde ein Sofort-Bild angefertigt.

3.2. Chromosomenpräparation aus Vollblut

3.2.1. Kultivierung von Lymphozyten

Ein ml heparinisertes Vollblut eines gesunden männlichen Spenders wurde in 10 ml Kulturmedium (RPMI 1640 mit Zusätzen) und 200 µl Phytohaemagglutinin für 71 Stunden bei 37°C und einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre im Brutschrank inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 65 µl Colcemid. Nach einer weiteren Inkubation von 40 min. im Brutschrank wurde der gesamte Ansatz in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 300 x g für 10 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig bis auf einen kleinen Rest abgenommen und das Zellpellet anschließend vorsichtig darin resuspendiert. Nun erfolgte die schrittweise Zugabe (1 ml, 2 ml, 4 ml) von vorgewärmter (37°C) hypotoner Lösung (75 mM KCl), bis ein Endvolumen von ca. 8-9 ml, in Abhängigkeit von der Größe des Pellets, erreicht wurde. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 20 min., wobei alle 10 min. der Inhalt des Röhrchen durch fünfmaliges Invertieren gemischt wurde. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation der Zellsuspension für 10 min. bei 300 x g und RT. Der erhaltene Überstand wurde bis auf ein Restvolumen von ca. 0,5 ml verworfen und das Zellpräzipitat vorsichtig darin resuspendiert. Dann erfolgte die vorsichtige Zugabe von 1 ml eiskaltem Fixativ mit anschließender Durchmischung. Danach wurde in 2 ml-Schritten, mit zwischenzeitlichem vorsichtigen Suspendieren, insgesamt noch 8 ml Fixativ zugegeben und der gesamte Ansatz am Ende nochmals vorsichtig gemischt. Nach einer halbstündigen Inkubation auf Eis und erneuter Zentrifugation (4°C, s.o.) wurde das erhaltene Pellet wieder vorsichtig in 8-9 ml Fixativ aufgenommen und anschließend wiederum bei 4°C, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde solange wiederholt, bis das Zellpellet eine helle, weißliche Farbe annahm. Die erhaltenen Lymphozyten wurden entweder direkt zur Herstellung der Metaphasen-Präparate eingesetzt oder in 1-2 ml Fixativ in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.2. Herstellung der Metaphasen-Präparate

Die Lymphozyten-Präparation wurde nach Lagerung bei -20°C zunächst noch zwei- bis dreimal mit eiskaltem Fixativ gewaschen (siehe 3.2.1.), in wenig Fixativ aufgenommen und während des weiteren Vorgangs kühl gehalten. Die Reinigung der Objektträger (mit

Mattrand) erfolgte durch Lagerung für einige Stunden in absolutem EtOH mit 1% HCl. Das Auftropfen der Lymphozyten-Suspension erfolgte auf diese vorgereinigten Objektträger, die vor dem Gebrauch mit einem Tuch trockengerieben wurden. Zur besseren Ausbreitung des Suspensions-Tropfens und dadurch zur besseren Spreitung der Metaphasen wurden zunächst zwei Tropfen Fixativ nebeneinander auf den Objektträger pipettiert. Dann wurde aus einer Höhe von 20-30 cm mittels einer Pipette je ein Tropfen der Lymphozyten-Präparation auf jeden der vorgelegten Fixativ-Tropfen gegeben. Nach 1-2 Minuten wurde die überschüssige Flüssigkeit abgekippt und der Objektträger kurz mit Fixativ gespült. Nach Lufttrocknung wurde jedes Präparat hinsichtlich der Qualität und Quantität der Metaphasen im Lichtmikroskop beurteilt. Ausgewählte Präparate, mit einer ausreichenden Menge an gut gespreiteten und von der Größe her passenden Metaphasen, mit einer Auflösung von ungefähr 400 Banden, wurden nach einem Alterungsprozeß von 4-5 Tagen bei RT bis zur Verwendung in 70% EtOH bei 4°C gelagert.

3.3. Nick-Markierungsreaktion

3.3.1. Labeling der DNA

In der Labeling-Reaktion (modifiziert nach dem Protokoll von Arnold et al., 1996) wurde jeweils 1 µg DNA in einem Volumen von 25 µl markiert.

Für die Markierung der Tumor DNA:	2,5 µl	ACG-Mix
	2,5 µl	10x Reaktionspuffer
	0,25 µl	DTT
	0,5 µl	dTTP
	1,0 µl	Biotin-16-dUTP
	1,0 µl	DNA-Polymerase
	0,5 µl	DNase I (1:2000)
	x µl	DNA (1 µg)
	x µl	dH ₂ O
	$\frac{3}{4}$	
	25 µl	Endvolumen

Für die Kontroll-DNA:	2,5 µl	10x Dig-Mix
	2,5 µl	10x Reaktionspuffer

0,25 µl	DTT
1,0 µl	DNA-Polymerase
0,5 µl	DNase I (1:2500)
x µl	DNA (1µg)
x µl	dH ₂ O
$\frac{3}{4}$	
25 µl	Endvolumen

Nach dem Zusammenpipettieren (auf Eis) wurden die Ansätze für 60-120 min. in einem Wasserbad bei einer Wassertemperatur von 15°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden 5 µl (200 ng) abgenommen und zum Stoppen der Reaktion 5 min. bei 65°C inkubiert. Die restlichen Ansätze wurden bis zur weiteren Behandlung bei 4°C verwahrt. Eine Fragmentgrößen-Analyse durch Gelelektrophorese (siehe 3.1.4.) erfolgte mit dem entnommenen 5 µl-Aliquot. Lag die Probenlänge in der benötigten Größenordnung zwischen 400 bp und 2000 bp, wurde, um einen weiteren Verdau der Proben-DNA zu verhindern, zu dem verbliebenen Reaktionsgemisch 2,5 µl Lösung D gegeben und anschließend der gesamte Ansatz bei 65°C inkubiert. Waren die DNA-Fragmente größer als 2000 bp, wurde der entsprechende Ansatz weiter bei 15°C inkubiert, bis der gewünschte Größenbereich erreicht wurde. Unter Umständen wurden nochmals DNA-Polymerase I und verdünnte DNase I zugegeben. Zur Bestimmung der Einbaurrate wurde im Anschluß ein Filtertest durchgeführt.

3.3.2. Filtertest zur Detektion der Einbaueffizienz

Von den markierten Proben wurde zunächst eine Verdünnungsreihe in dH₂O mit Endkonzentrationen von 1 ng, 100 pg und 10 pg pro µl hergestellt. Jeweils 1 µl der verschiedenen Konzentrationen wurde nebeneinander auf einen Nitrozellulosefilter gesetzt. Nach dem Trocknen wurde der Filter zur Fixierung der DNA für 1 min. invertiert auf einen UV-Leuchttisch gelegt und anschließend kurz in Puffer AP-1 equilibriert. Zum Blocken des Filters wurde zunächst in Puffer AP-2 auf einem Schüttler für 10 min. inkubiert. Dann erfolgte die halbstündige Inkubation in der verdünnten Antikörper-AP-Lösung, ebenfalls unter leichtem Schütteln. Es folgten zwei Waschschrte mit Puffer AP-1 und drei weitere mit Puffer AP-3 (je 3 min.). Dann wurde der Filter in 1 ml frisch angesetzte Substratlösung gelegt (invertiert) und für mindestens 15 min. im Dunkeln inkubiert. Waren alle

Verdünnungspunkte erkennbar, wurde die Reaktion durch Waschen des Filters unter fließendem Leitungswasser gestoppt. Der getrocknete Filter wurde zur Dokumentation aufbewahrt.

Wurden auch nach längerer Wartezeit keine Signale oder nur ein erster Verdünnungsschritt schwach sichtbar, mußte die Markierungsreaktion wiederholt werden.

3.4. Durchführung der Comparativen-Genom-Hybridisierung

Die CGH wurde nach einem Protokoll von Arnold et al. (1996) durchgeführt.

3.4.1. Vorbereitung der Metaphasen-Präparate

Bei Verwendung der selbstgetropften Präparate mußte zunächst eine Vorbehandlung durchgeführt werden. Dazu wurden die in 70% EtOH gelagerten OT kurz in 2x SSC bei RT equilibriert und dann nach Auftropfen von 200 µl verdünnter RNase-Lösung mit einer Plastikfolie in passender Größe abgedeckt, um invertiert in einer feuchten Kammer bei 37°C für 1 Stunde inkubiert zu werden. Danach wurden die Folien entfernt und die OT 2x 5 min. bei RT in 2x SSC gewaschen. Um einen Temperaturabfall bei dem folgenden Pepsin-Verdau möglichst zu vermeiden, wurde der dritte Waschschritt mit warmem 2x SSC durchgeführt. Für den Verdau wurde ein 40 µl Aliquot 10%-iges Pepsin aufgetaut, in eine Küvette mit 80 ml 37°C warmer 0,01N HCl gegeben und gut vermischt. Die temperierten OT wurden in diese Pepsin-Lösung gestellt und für 5min. in einem Wärmeschrank bei 37°C inkubiert. Im Anschluß folgten Waschschritte von 2x 5 min. bei RT in 1x PBS und 1x 5 min. in 1x PBS/MgCl₂, bevor die OT für 15 min. in einer Lösung aus säurefreiem Formaldehyd in PBS/MgCl₂ bei RT postfixiert wurden. Nach erneutem Waschen in 1x PBS (1x 5 min.) wurden die OT in der aufsteigenden Alkoholreihe für je 3 min. dehydriert und anschließend luftgetrocknet.

Die gekauften Präparate sowie die nach der Vorbehandlung getrockneten Metaphasen-Präparate wurden für 90 sec. in eine Küvette mit 70°C warmer Denaturierungslösung überführt. Damit die Temperatur der Denaturierungslösung nicht zu stark abfiel, wurden maximal nur 2 OT gleichzeitig behandelt. Nach dem Ende der Inkubationszeit wurden die Präparate unverzüglich in eine Küvette mit eiskaltem 70% EtOH gestellt. Zum weite-

ren Dehydrieren folgten noch 85% EtOH und EtOH_{abs.}, ebenfalls gekühlt, für je 3 min. Die Metaphasen-Präparate wurden anschließend luftgetrocknet.

3.4.2. Vorbereitung der markierten DNA

Für eine CGH mit selbst hergestellten Metaphasen-OT wurden je 285 ng markierte Kontroll- und Tumor-DNA zusammen mit 35 µg C₀t-1-DNA und dem 2,5x Volumen von EtOH_{abs.} zur Fällung üN bei -20°C gekühlt. Zur besseren Erkennung des Zellpellets nach der Zentrifugation wurden in den Ansatz zuvor noch 0,5 µl blauer Stop-Mix zupipettiert. Zentrifugiert wurde im Anschluß an die Fällung mit 14.000 UpM für 30 min. bei 4°C.

Durch eine größere Metaphasendichte auf den gekauften Vysis-OT konnten kleinere Deckgläschen (7x7 mm) verwendet werden. Dementsprechend reduzierte sich die Menge der eingesetzten DNA auf je 100 ng und bei der C₀t-1-DNA auf 10-15 µg.

Die Fällung und die anschließende Zentrifugation der DNA, waren mit der vorangegangenen Durchführung identisch.

Das nach dem Zentrifugieren erhaltene DNA-Pellet wurde für 30 min. bei 37°C getrocknet und anschließend in 10 µl, bzw. 3 µl Hybrid-Mix (eigene-/Vysis-OT) aufgenommen und zum Lösen erneut bei 37°C inkubiert (ca. 30 min.). Dann wurden die Proben für 7 min. bei 75°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt (3 min.), bevor sie für 45 min. zum Prähybridisieren in einen 37°C Wärmeschrank kamen.

3.4.3. Hybridisierung

Die vorbehandelten OT, die verwendeten Deckgläschen, sowie die prähybridisierten Proben kamen auf eine 42°C warme Heizplatte, auf der auch die Pipettierung der Proben auf die markierten Metaphasen-Bereiche erfolgte. Nach dem Auftragen von 10 µl Proben-Mix je Areal auf die selbstgetropften OT (je OT 2 Proben), bzw. 2-3 µl bei den Vysis-OT (bis maximal 12 Proben je OT), wurden diese Luftblasenfrei mit einem 22x22 mm, bzw. 7x7 mm Deckgläschen versehen und mit Fixogum versiegelt. Die Hybridisierung erfolgte über 2 - 3 Tage in einer feuchten Kammer bei 37°C.

3.4.4. Detektion der Hybridisierung

Die Positionen der einzelnen Deckgläschen wurden für eine spätere Zuordnung der Areale, zunächst mit einem Diamantschreiber auf der Rückseite der OT markiert, bevor diese zusammen mit dem Fixogum vorsichtig entfernt und die OT sofort in 1x PBD überführt wurden (bei RT, 5 min.). Nun wurde für 5 min. in 2x SSC bei 70-71°C gewaschen, bevor wieder bei RT in 1x PBD inkubiert wurde (5 min.). Nachdem die Antikörper-Verdünnung angesetzt, gevortext und anschließend für 5 min. bei 14.000 UpM (RT) zentrifugiert wurde, konnten je 80 µl des Antikörper-Überstandes auf einen Präparate-OT pipettiert werden. Eine aufgelegte Plastikfolie in Größe eines Deckgläschen verhinderte das Heruntertropfen der Lösung und das Austrocknen des Präparates, so daß dieses im invertierten Zustand in einer feuchten Kammer für 45-60 min. bei 37°C inkubiert werden konnte. Im Anschluß daran wurde 3x bei RT mit 1x PBD für je 5 min. unter leichtem Schütteln gewaschen. Nach dem Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 3 min. bei RT) konnten die OT im Dunkeln getrocknet und anschließend mit einer Mischung aus DAPI/Antifade eingedeckt werden. Bevor die Präparate mit Hilfe eines UV-Mikroskopes mit angeschlossener Kamera beurteilt und fotografiert wurden, lagerten sie für mindestens eine Stunde im Dunkeln bei 4°C.

3.4.5. Beurteilung und Dokumentation der CGH-Hybridisierung

Zunächst wurde die Hybridisierung hinsichtlich ihrer Qualität begutachtet. Die Metaphase-Chromosomen sollten eine homogene Anfärbung mit den beiden Fluorochromen (grün und rot) und mit dem Gegenfarbstoff DAPI (blau) aufweisen. Eine sehr grobkörnige Anfärbung einzelner Chromosomen, wie auch eine ungleichmäßige Verteilung der Fluoreszenz-Farbstoffe auf den Chromosomen einer Metaphase, führte zum Ausschluß der Metaphase. Um ein statistisch abgesichertes CGH-Ergebnis zu gewährleisten, wurden für eine Auswertung mindestens zehn bis 15 Metaphasen von jeder CGH einer Patientin aufgenommen. Hierbei war die Vollständigkeit der Metaphase, eine gute Spreitung und wenig überlappende Chromosomen die Auswahlkriterien.

Die Fluoreszenzmuster wurden mit den entsprechenden Reflektor- und Filterkombinationen in der Reihenfolge blau, grün und rot (DAPI, Fluorescein, Rhodamin) nacheinander mit einer angeschlossenen lichtempfindlichen CCD-Kamera unter Verwendung der *ISIS-3-Software* aufgenommen und im PC gespeichert.

3.4.6. Karyotypisierung der Metaphasen

Die gewonnenen Bilddaten wurden durch computergestützte digitale Bildverarbeitung mit der ISIS-3 *Software* für die Auswertung aufbereitet.

Zunächst wurde für jede Metaphase eine Hintergrundkorrektur vorgenommen, bevor die einzelnen Chromosomen voneinander getrennt wurden. Im Karyotypisierungs-Modus erfolgte die Zuordnung der Chromosomen in einem invertierten schwarz/weiß Bild der DAPI-Anfärbung (blau), da diese Darstellung einem der G-Bänderung (Giemsa-Färbung) ähnlichen Muster entspricht und damit die Zuordnung der Chromosomen erleichtert. Für eine getrennte p- und q-Arm-Skalierung der Chromosomen bei der Karyotypisierung wurde zusätzlich die Zentromerposition über einen Befehlsmodus des ISIS-3 Programms markiert.

3.4.7. Auswertung der CGH-Ergebnisse

Nach Bearbeitung aller fotografierten Metaphasen einer Patientin, wurden die jeweiligen Einzelprofile begutachtet, um von dem Summenprofil eventuell abweichende Chromosomen zu eliminieren. Zur Erstellung der Einzelprofile ermittelte das ISIS-3-*Software*-Programm über die Breite eines jeden einzelnen Chromosoms der Metaphase die Intensität der beiden Fluoreszenzfarbstoffe Fluorescein und Rhodamin (grün, rot), und verfuhr so entlang der gesamten medianen Chromosomenachse. Eine gleichmäßige Anfärbung mit Rot (r) und Grün (g) bedeutete ein Verhältnis von $g:r = 1$ und entsprach der im CGH-Profil dargestellten Grundlinie (Abb. 3, S. 23). Veränderte sich das Verhältnis der beiden Farben zueinander, so verlief das ermittelte CGH-Profil dieses Chromosoms entsprechend links ($g:r < 1$), bzw. rechts ($g:r > 1$) von der Grundlinie. Hierbei konnten Grenzwerte (obere und untere Schwelle), jeweils individuell für jeden bearbeiteten Fall einer Patientin berechnet, über- oder unterschritten werden, die einen Zugewinn bzw. einen Verlust der jeweilig betroffenen chromosomalen Region bedeuteten (Abb. 3, S. 23). Die Schwellen-Einstellungen basierten auf statistischen Berechnungen der Standardabweichungen der Ratio-Werte und waren ortsabhängig.

Aus den Einzelprofilen eines jeden Chromosoms aus mehreren Metaphasen eines Falles berechnete das ISIS-3-Programm für jedes der 24 Chromosomen (22 Autosomen, 2

Geschlechtschromosomen) ein zugehöriges Mittelprofil. In dieser Darstellung wurden Über- bzw. Unterschreitungen der Grenzwerte durch vertikale Balken auf der rechten, bzw. linken Seite des CGH-Profiles verdeutlicht. Eine Zuordnung möglicher Über- bzw. Unterrepräsentationen zu entsprechenden chromosomalen Regionen erfolgte mit Hilfe des zusätzlich dargestellten Ideogramms des jeweiligen Chromosoms (Abb. 7, S. 53). Zunächst wurden die so erhaltenen Daten entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit (Malignitätsgrad) eingeteilt. Da diese Untergruppen zum Teil recht klein ausfielen, konnte keine statistische Auswertung vorgenommen werden. Daher wurden nur die Gesamtzahlen der Aberrationen und ihre prozentualen Verteilungen bei den Hauptgruppen (benigne, Borderline- und maligne Tumore) berechnet und für eine vergleichende Analyse untereinander und zu bestehenden Daten herangezogen.

3.5. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

3.5.1. Herstellung der Gewebe-Präparate für die FISH

Tiefgefrorenes OP-Material (Tumor- und Normalgewebe) wurde nach Auftauen direkt auf mit Methanol abgeriebene Mattrand-OT 'ge-touched' und sofort für 20 min. in kühle, frisch hergestellte Fixativ-Lösung gestellt. Nach dem Trocknen und einer Begutachtung unter dem Durchlichtmikroskop wurden die Präparate in 70% EtOH bei 4°C gelagert.

3.5.2. Herstellung der mikrosezierten FISH-Sonden

Das von Herrn Weimer freundlicherweise zur Verfügung gestellte DNA-Material für die FISH war durch chromosomale Mikrosezierung der gewünschten Bereiche gewonnen und direkt mittels einer DOP-PCR amplifiziert worden (DOP-PCR 1; Weimer et al., 1999). Die Probe wurde zunächst einer weiteren DOP-PCR Amplifikation (DOP-PCR 2) unterzogen.

Pipettierschema DOP-PCR 2:

1-2 µl	von DOP-PCR 1
5 µl	10x PCR-Puffer
2,5 µl	MgCl ₂
5 µl	dNTP-Mix
2,5 µl	DOP-Primer
0,3 µl	Ampli-Taq [®] DNA-Polymerase

mit dH₂O auf ein Volumen von 50 µl bringen.

Temperaturzyklen:	1.) 92°C	3 min.
	2.) 92°C	1 min.
	3.) 62°C	2 min.
	4.) 72°C	1,5 min.
	5.) 2.)-4.)	25x wiederholen
	6.) 72°C	10 min.
	7.) 4°C	halten

Im Anschluß daran wurde eine PCR-Markierung durchgeführt, um die Sonden mit Biotin bzw. Digoxigenin zu markieren.

Pipettierschema:	2-4 µl	von DOP-PCR 2
	1 µl	20x Replitherm-Puffer
	2 µl	Label-dNTP-Mix
	2 µl	Biotin-16-dUTP oder DIG-11-dUTP
	1 µl	DOP-Primer
	1 µl	MgCl ₂
	0,12 µl	Ampli-Taq [®] DNA-Polymerase

mit dH₂O auf ein Volumen von 20 µl bringen.

Temperaturzyklen:	1.) 94°C	3 min.
	2.) 94°C	1 min.
	3.) 56°C	2 min.
	4.) 0,3°C/sec.	auf 72°C
	5.) 72°C	2 min.
	6.) 2.)-5.)	25x wiederholen
	7.) 72°C	10 min.
	8.) 4°C	halten

Zur Kontrolle der PCR wurde eine Gel-Elektrophorese durchgeführt (siehe 3.1.4.) und im Anschluß daran das erhaltene PCR-Produkt über eine Säule (JET-quick PCR-Reinigungssäule) nach Vorschrift des Herstellers aufgereinigt und in 50 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,0 aufgenommen.

3.5.3. Vorbereitung der Präparate

Die FISH-Präparate wurden entsprechend dem Protokoll für die selbstgetropften CGH-Präparate (siehe 3.4.1.) vorbehandelt.

3.5.4. Vorbereitung der FISH-Proben

Je 10 µl der markierten und gereinigten Sonden (siehe Tab. 6) wurden allein oder in Kombination mit einer weiteren Probe mit 20 µl bzw. 30 µl C₀t-1-DNA in Gegenwart von EtOH üN bei -20°C gefällt. Nach erfolgter Zentrifugation für 30 min., 14.000 UpM bei 4°C, wurde das getrocknete Präzipitat in 10 µl Hybrid-Mix gelöst. Eine Denaturierung erfolgte für 7 min. bei 75°C, die Prähybridisierung nach dem Abkühlen auf Eis für 30 min. bei 37°C.

Die käuflich erworbenen Proben wurden laut Anleitung des Herstellers vor Gebrauch in Hybrid-Mix verdünnt und denaturiert.

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten FISH-Proben

FISH-Probe	Lokalisation	Herkunft	FISH-Probe	Lokalisation	Herkunft
6-Alpha-Satellit	6-Zentromer (D6Z1)	Appligene-Oncor	Yac 1	3q26	Max-Planck Institut, Berlin
8-Alpha-Satellit	8-Zentromer	Roche Diagnostics	Yac 2	3q23	Max-Planck Institut, Berlin
12-Alpha-Satellit	12-Zentromer	Roche Diagnostics	Yac 3	3q13	Max-Planck Institut, Berlin
18-Alpha-Satellit	18-Zentromer (D18Z1)	Appligene-Oncor	HG 1	6q22.3	Humangenetik Kiel
8q21.3	D8S603	Appligene-Oncor	HG 2	6q23.2	Humangenetik Kiel
8q24	c-myc	Appligene-Oncor	HG 3	6q23.3	Humangenetik Kiel
18q21.2	D18S41	Appligene-Oncor	HG 4	6q25.2	Humangenetik Kiel

Die Proben gesamt 3p, 3p21, gesamt 6p, 6p21 und gesamt 8p wurden im Hause durch Mikrodisektion gewonnen und mittels DOP-PCR vervielfältigt.

3.5.5. Durchführung der FISH

Nachdem die FISH-OT ebenso wie die CGH-Präparate denaturiert wurden (siehe 3.4.1.), erfolgte auf der Heizplatte (42°C) das Pipettieren der Proben auf die entsprechenden Präparate, die anschließend mit einem Deckgläschen (rund, Ø 10 mm) versehen und diese mit Fixogum abgedichtet wurden. Die Hybridisierung erfolgte in einer feuchten Kammer bei 37°C (1 - 3 Tage).

3.5.6. Detektion der FISH-Signale

Vor dem Entfernen der Deckgläschen wurden deren Positionen mit einem Diamantschreiber auf der Rückseite der OT markiert. Die Waschschriffe, sowie die Detektion der Fluoreszenz-Signale und das anschließende Eindecken erfolgte, wie unter 3.4.4. beschrieben.

3.5.7. Auswertung der FISH

Die Auszählung der Signale von mindestens 100 verschiedenen Interphase-Kernen erfolgte am Fluoreszenz-Mikroskop. Bei mehrfachem Auszählen oder bei Wiederholung eines Experimentes wurde aus den gezählten Signalen der Mittelwert gebildet. Zur Dokumentation wurde in einigen Fällen ein Bild mittels CCD-Kamera und ISIS-3 Programm festgehalten.

4. Ergebnisse

4.1. Optimierung der Comparativen-Genom-Hybridisierung

Für die CGH wurden die Präparate-Objektträger mit den Normal-Metaphasen zunächst noch selbst getropft. Da bei den durchgeführten Präparationen die Qualität der Metaphasen sehr schwankte und damit auch die Qualität der CGH teilweise beeinträchtigt wurde, kamen im späteren Verlauf gekaufte Objektträger der Firma Vysis zum Einsatz. Aufgrund der hohen Metaphasendichte auf diesen OT konnten deutlich kleinere Deckgläschen von der Größe 7x7 mm (Sonderanfertigung) statt 22x22 mm eingesetzt werden. Die hybridisierte Fläche reichte aus, um die minimal erforderlichen zehn bis 15 Metaphasen pro Fall zu liefern. Somit konnte eine deutliche Reduzierung der eingesetzten DNA-Menge erzielt werden. Waren bei den größeren Deckgläschen noch 10 µl Hybrid-Mix mit je 285 ng Kontroll- und Tumor-DNA und 35 µg an C₀t-1 DNA nötig, konnten diese Mengen auf 1/3 reduziert werden. Dadurch konnte schon bei der Nick-Markierungsreaktion die Ansatzmenge halbiert werden (das Originalprotokoll verlangte einen 50 µl Reaktionsansatz, siehe Arnold et al., 1996). Weiterhin konnten in nur einem CGH Experiment wesentlich mehr Proben parallel, bei gleichem Zeitaufwand und gleichen Mengen an Waschpuffer und Antikörperlösung bearbeitet werden. Bei einer optimalen Verteilung der Metaphase-Tropfen über den gesamten Vysis-OT konnten je OT 12 Fälle parallel untersucht werden. Diese Zahl wäre bei den in Eigenproduktion entstandenen OT nur bei einer gleichzeitigen Bearbeitung von 6 OT (je OT 2 Fälle a 22x22 mm) möglich gewesen. Die Kosten für die gekauften OT (je OT 28 DM) kann man durch Zeiteinsparungen, durch umgehen der Metaphasen-Präparation, des RNase- und Pepsin-Verdaus der Metaphasen-OT vor der CGH und durch Reduzierung der eingesetzten Mengen wieder ausgleichen.

4.2. CGH-Untersuchungen

Im Rahmen dieser Dissertation wurde in dem Zeitraum von 1997 bis 1999 DNA-Material von insgesamt 61 Ovarialkarzinom-Patientinnen aufgearbeitet und zunächst mittels CGH auf numerische Genomaberrationen hin analysiert.

Die DNA wurde aus gefrorenem OP-Material isoliert und für den Einsatz in der CGH entsprechend aufbereitet. Die Detektion und Auswertung der Fluorescein- und Rho-

damin-Hybridisierungssignale erfolgte mit Hilfe der *ISIS-3-Software* (MetaSystems) am Fluoreszenzmikroskop.

4.2.1. Kontroll-CGH

Es wurden routinemäßig Kontroll-CGH's durchgeführt. Hierzu wurde Biotin und Digoxigenin markierte DNA (männliche und weibliche DNA) von Test-Personen in der Hybridisierung eingesetzt. Dieses diente der Ermittlung der optimalen C_0t-1 Menge und der Identifizierung möglicher Artefakte, die in der CGH zu beobachten sind. Ein Beispiel für eine Metaphase und die Darstellung 'Mittelprofile mit Balken' einer Kontroll-CGH ist in Abbildung 4 (S. 50) wiedergegeben. Die Darstellung 'Mittelprofile plus Balken' zeigt bei den Autosomen keine Aberrationen (siehe auch Abb. 5a, S. 51). Nur das X-Chromosom zeigt, methodisch bedingt, eine Überrepräsentation, das Y-Chromosom dagegen eine Unterrepräsentation (Erklärung dazu siehe S. 55).

Ebenso wurde zu Kontrollzwecken bei 14 Patientinnen DNA aus normalem Gewebe und/oder aus Blut gewonnen und der CGH zugeführt. Es zeigten sich in einigen Fällen die für die CGH charakteristischen artifiziellen Überrepräsentationen im Zentromer (Abb. 5b, S. 51). Hierbei handelte es sich überwiegend um die Chromosomen 1, 3, 9, 16, 19 und 20, sowie um die akrozentrischen Chromosomen 13 bis 15, alle gekennzeichnet durch einen hohen Anteil repetitiver DNA in Zentromerbereich. Diese auch schon in der Literatur beschriebenen Artefakte treten bei ungenügender Absättigung der hochrepetitiven Sequenzen mit C_0t-1 -DNA auf. Diese betroffenen Regionen wurden entsprechend dem Vorschlag von Joos et al. (1995) und du Manoir et al. (1995) nur unter Vorbehalt analysiert oder ganz von der Bewertung ausgeschlossen.

Zeigten sich artifizielle Überrepräsentationen in allen heterochromatischen Bereichen, wie beispielhaft in einem CGH-Profil von Normalgewebe-DNA in Abbildung 5b zu sehen, wurden diese Regionen ebenso nicht mit in die Bewertung einbezogen. Im Vergleich ist eine Kontroll-CGH ohne methodische Artefakte in Abbildung 4 (S. 50) zu sehen, das zugehörige Mittelprofil ist nochmals in Abb. 5a (S. 51) wiedergegeben.

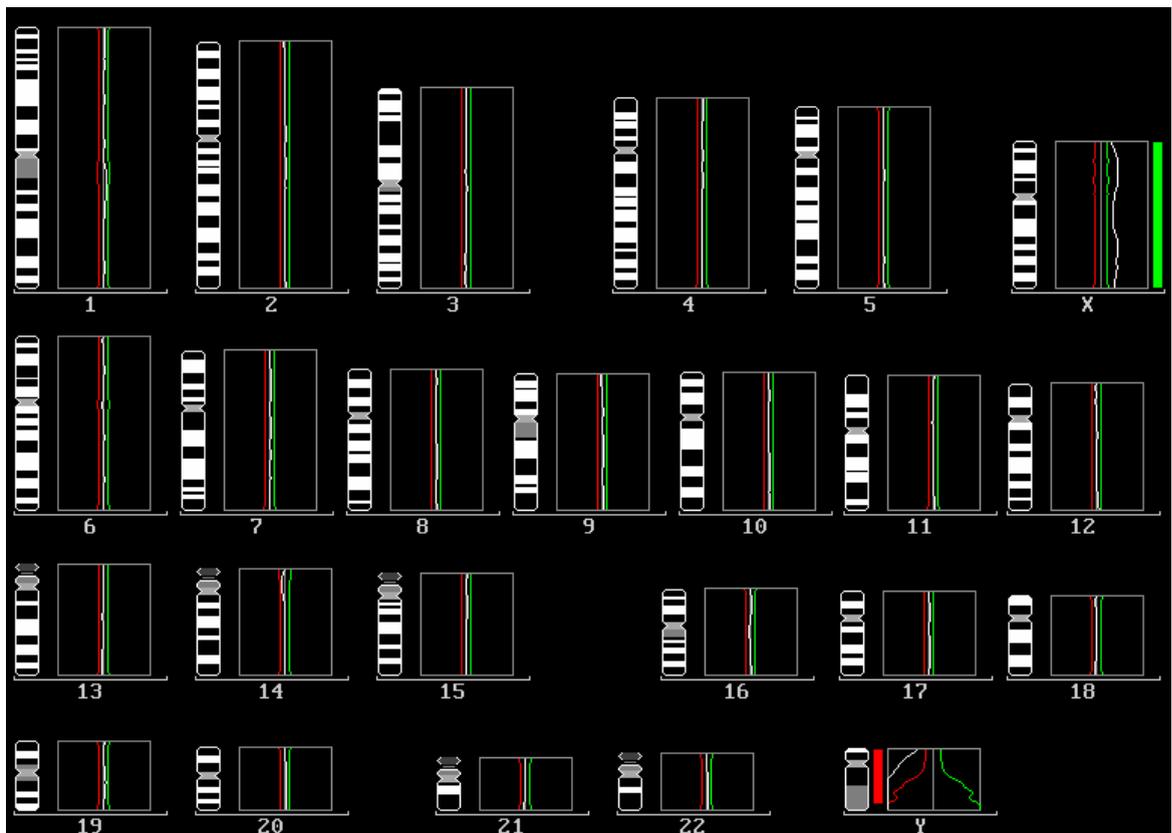
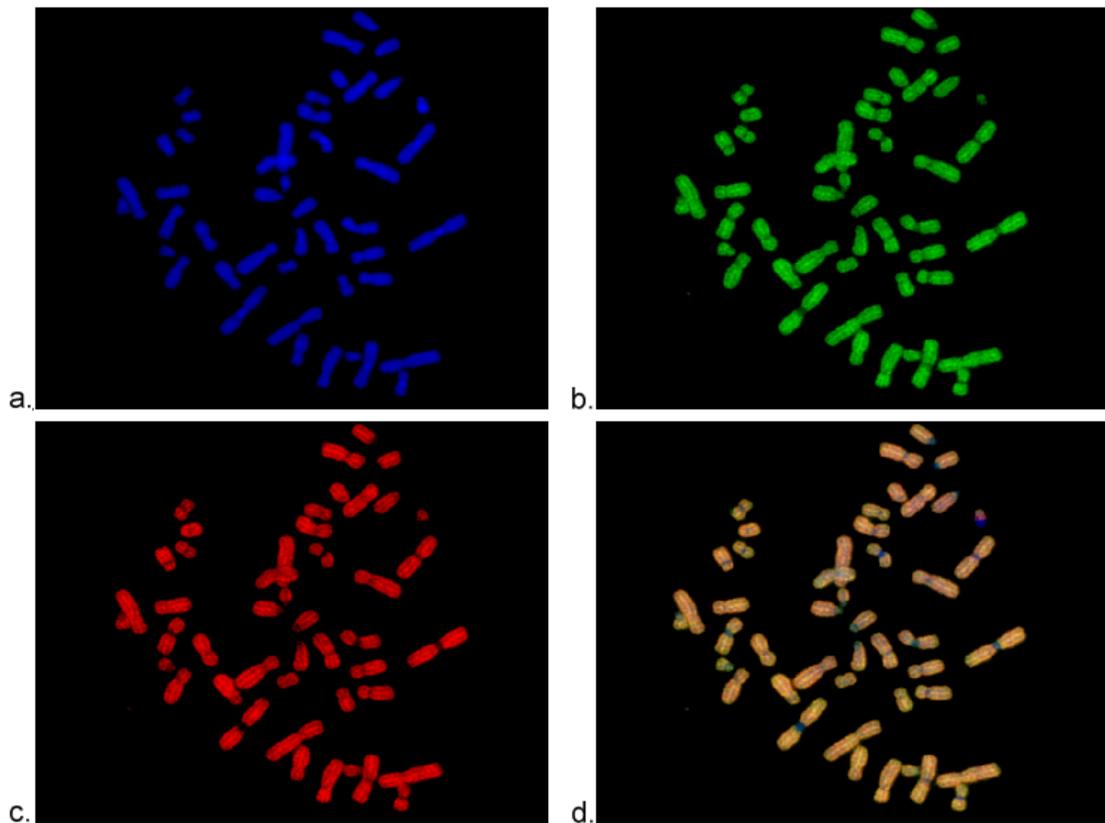
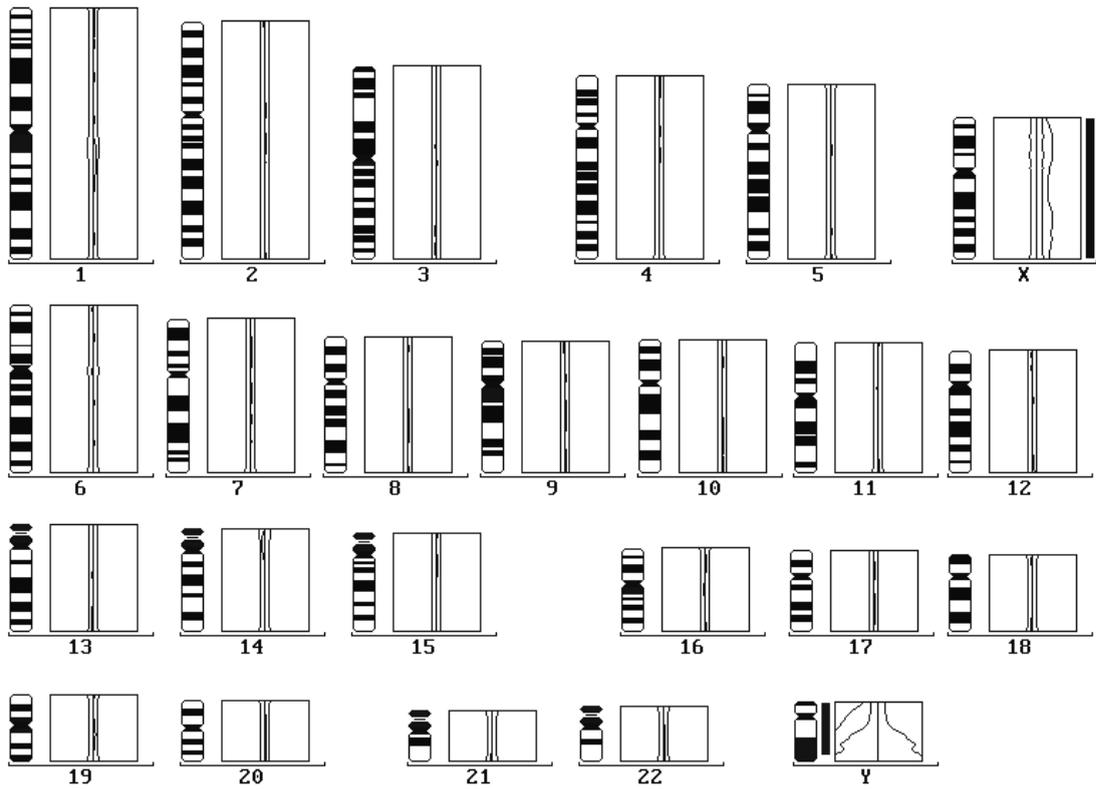
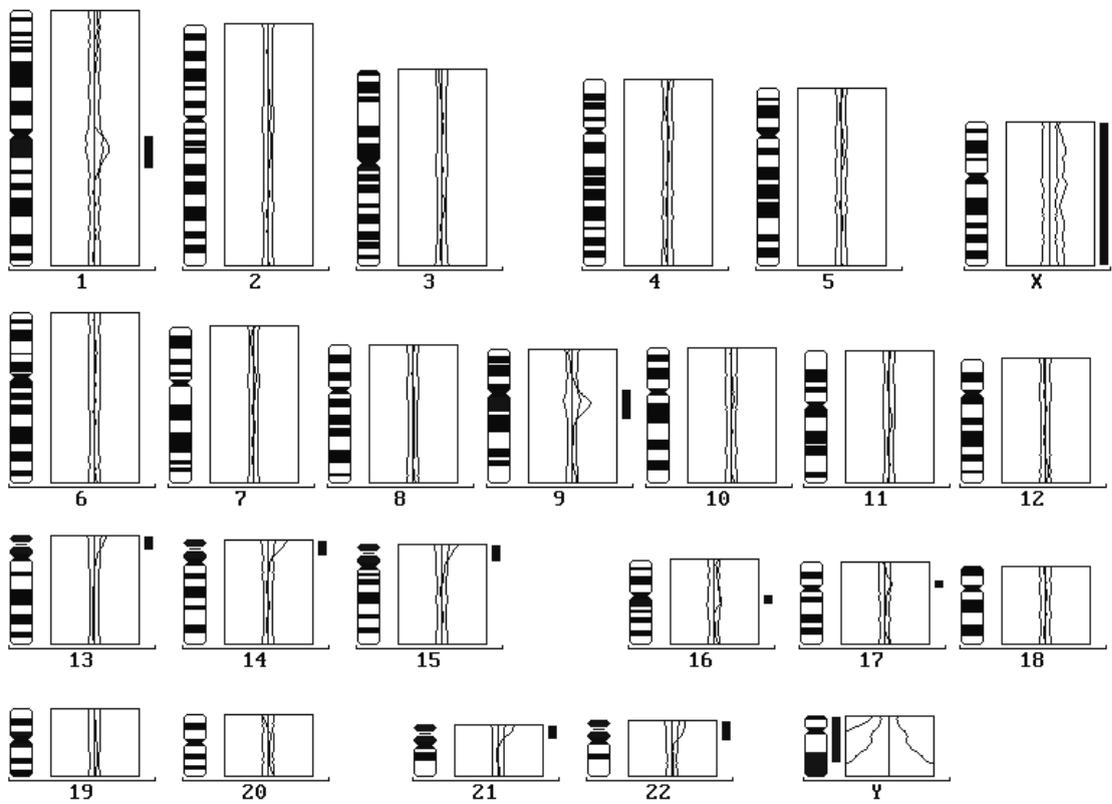


Abb. 4: a.-d. Sequentielle Aufnahmen einer Kontroll-CGH in den drei Farben Blau, Grün und Rot und das Gesamtbild dieser Einzelaufnahmen. Darunter die Auswertungsdarstellung 'Mittelprofile plus Balken'



a.



b.

Abb. 5: a. Karyogramm einer Kontroll CGH ohne methodisch bedingte Artefakte
 b. Überrepräsentation der heterochromatischen Bereiche in einer Kontroll-CGH, verdeutlicht durch die nebenstehenden Balken

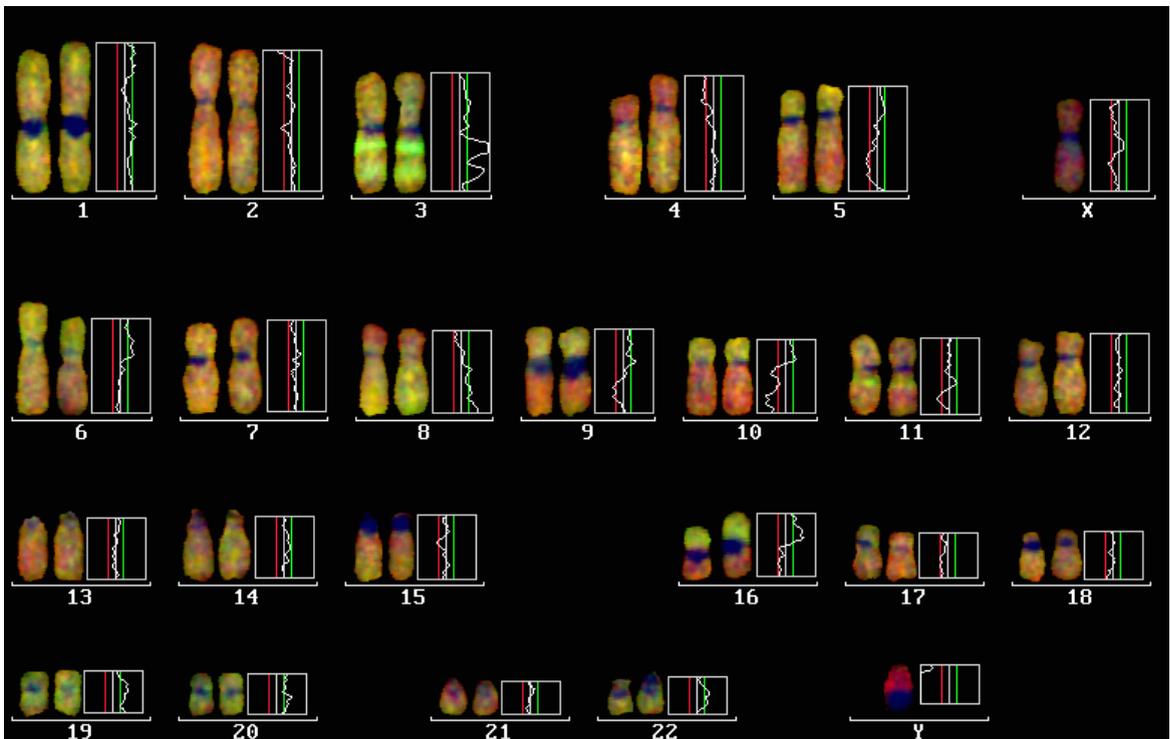
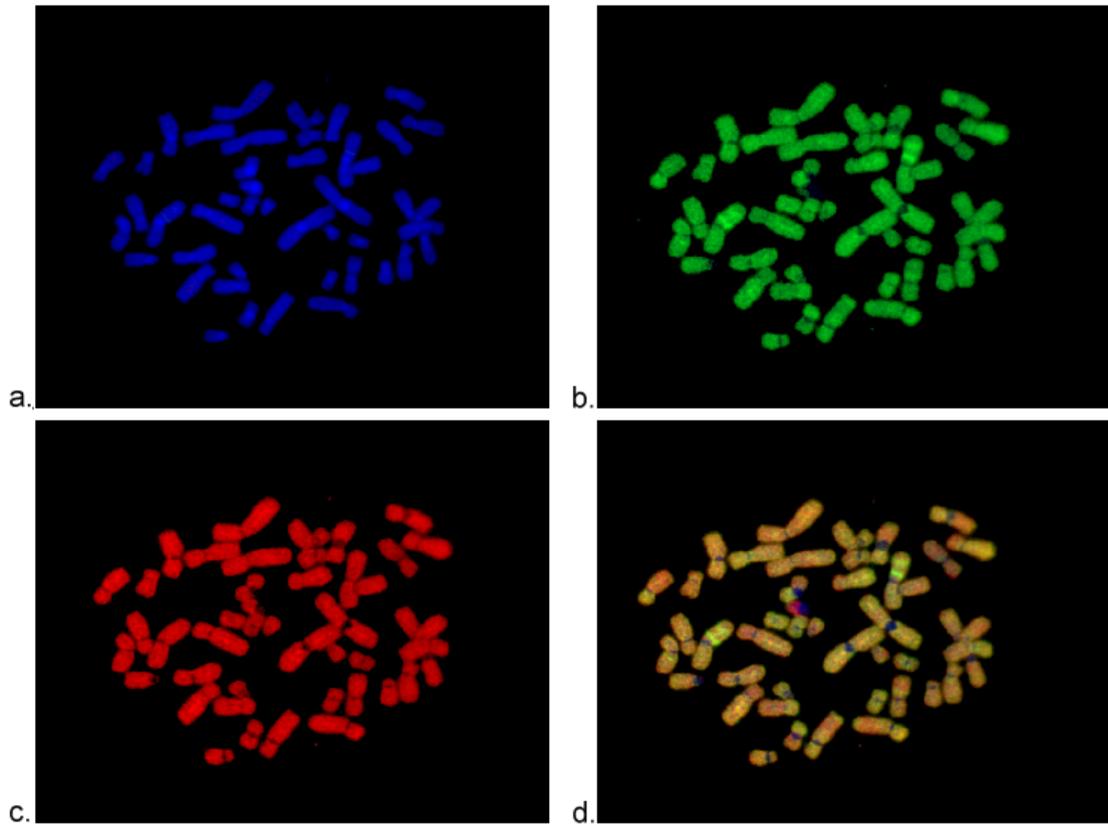
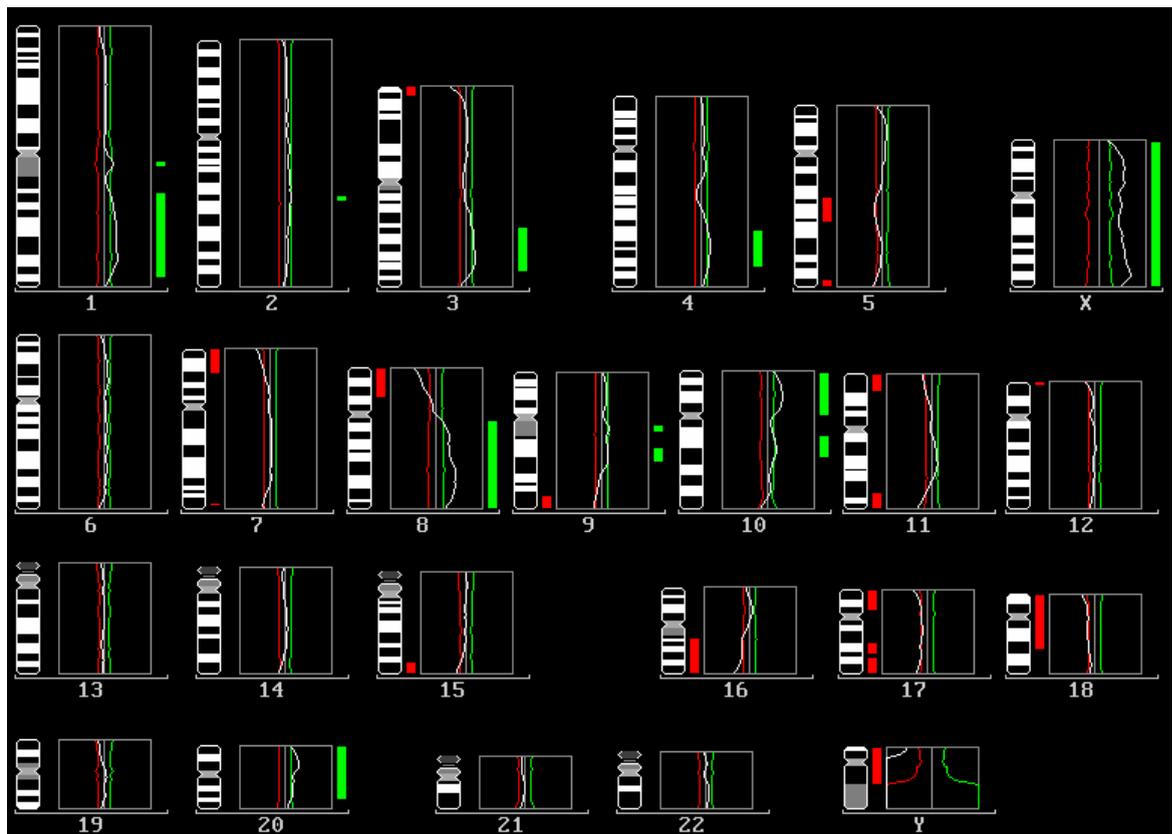
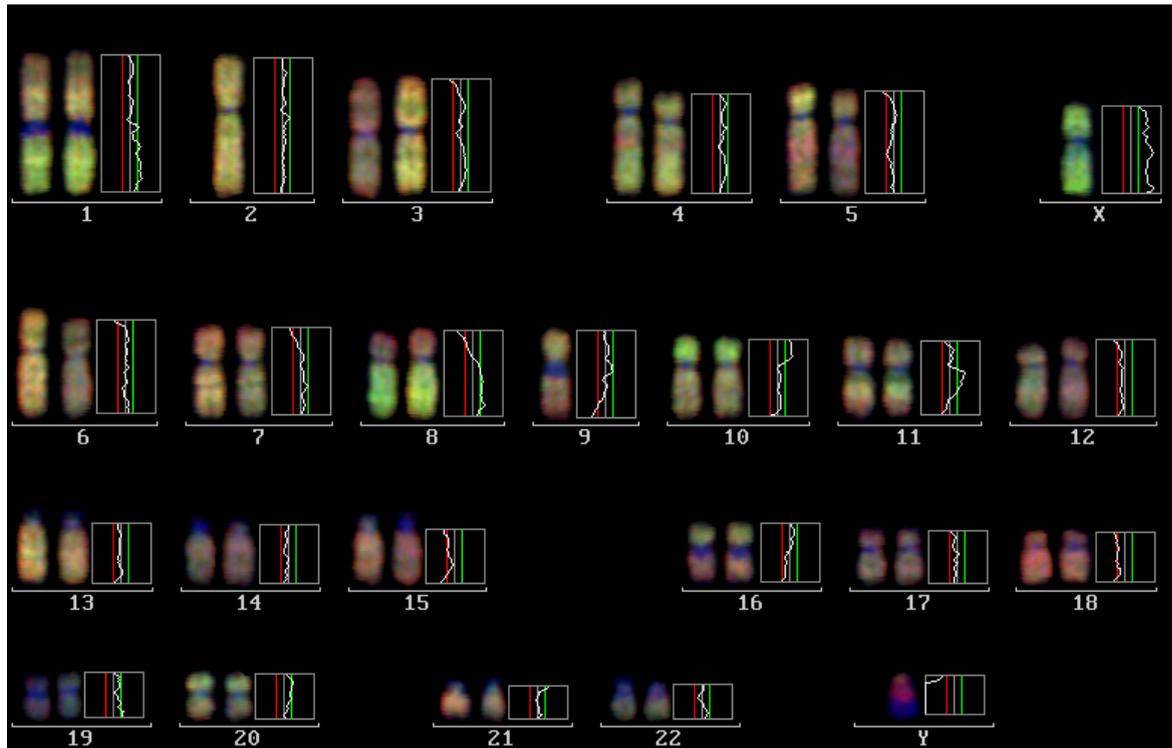


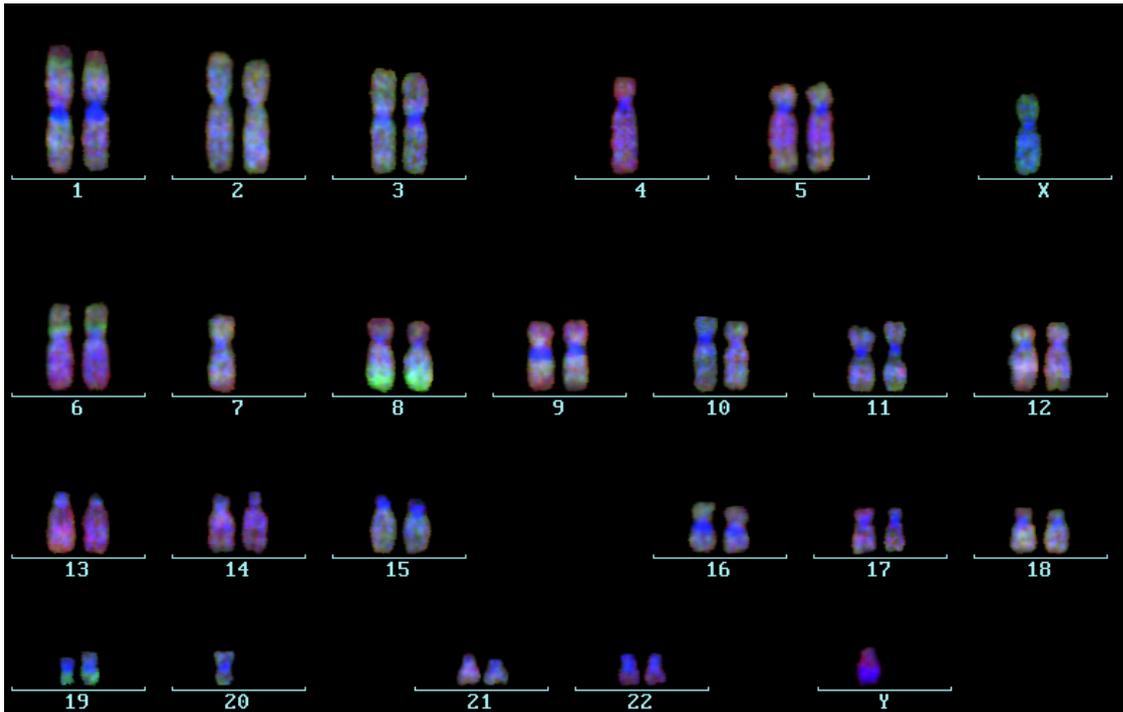
Abb. 6: a.-d. Sequentielle Aufnahmen einer CGH-Metaphase in den Farben Blau, Grün und Rot sowie das Gesamtbild der drei Farben. Darunter das zugehörige Karyogramm mit den Prüfprofilen des jeweils rechten Chromosoms (Patientin Nr.29)



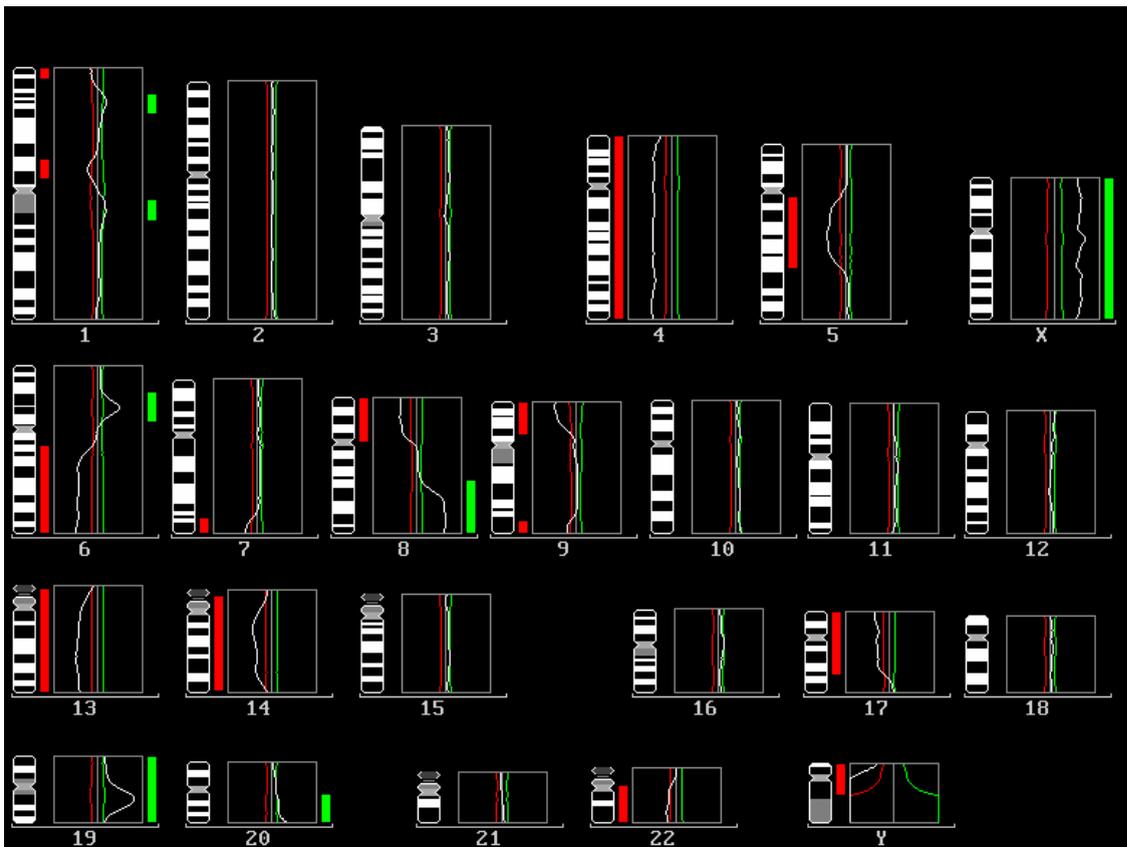
a.

b.

Abb. 7: a. Karyogramm mit Prüfprofil des jeweils rechten Chromosoms (Pat. Nr. 53)
 b. Mittelprofile mit Balken zu dem obigen Fall



a.



b.

Abb. 8: Beispiel für eine CGH mit vielen Aberrationen und starken Amplitudenwechseln, z. B. in Chromosom 1, 6 und 8 (Pat. Nr. 51)

Auch die Telomerbereiche stellten bei der Auswertung der CGH-Profile einen Unsicherheitsfaktor dar. Die Farbintensitäten nehmen aufgrund schlechterer Anfärbung zum Ende der Chromosomen hin ab. Daher lassen sie oftmals keine gesicherte Aussage über die Ratio der Fluoreszenzen zu (Bentz et al., 1998). Außerdem finden sich auch hier repetitive Sequenzen. Veränderungen in den Telomerbereichen wurden nur berücksichtigt, wenn nicht alle Chromosomen diese Veränderung in gleicher Art und Weise zeigten, wie es typisch für einen methodischen bedingten Artefakt ist.

Da bei den durchgeführten CGH-Analysen die Kontroll-DNA von einem männlichen Probanden stammte, konnte im Falle der X-Chromosomen nur eine Aussage zu einem möglichen Verlust gemacht werden, aber nicht über einen Zugewinn dieses Chromosoms. Aufgrund des Verhältnisses von nur einem 'roten' X-Chromosom (Kontroll-DNA) zu im Normalfall zwei 'grünen' (Patientinnen-DNA) verläuft das Ratio-Profil rechts von der oberen Schwelle (Abb. 4 und 5, S. 50/51). Da eine Korrelation von der Amplitude des Fluoreszenzprofils und der tatsächlichen Genkopienzahl nicht immer gegeben war, wie sich in dem FISH-CGH Vergleich herausstellte, wurde auch bei einer 'extremen' rechtsseitigen Verschiebung des Profils für das X-Chromosom keine Aussage zu einer möglichen Amplifikation gemacht. Wenn sich das Profil innerhalb der Grenzschwellen oder links von der unteren Schwelle befand, wurden diese Bereiche als mögliche Verluste der X-Chromosomen bewertet.

Bei der Verwendung von männlicher Kontroll-DNA zusammen mit weiblicher TumordNA in der CGH lässt sich die Qualität der Hybridisierung anhand des Y-Chromosoms überprüfen. Dieses sollte, abgesehen von der im oberen Teil gelegenen pseudoautosomalen Region, keine Hybridisierung mit weiblicher DNA zeigen (grün), sondern hauptsächlich in blau (DAPI-Gegenfärbung) und rot (Rhodamin, Kontroll-DNA) dargestellt sein.

4.2.2. CGH mit Tumor-DNA

Das Tumormaterial der untersuchten Patientinnen im Alter von 26 bis 89 Jahren (Altersdurchschnitt 60 Jahre) setzten sich aus drei Gruppen zusammen: die überwiegende Mehrheit zeigte einen malignen Tumortyp (52 von 64), in vier Fällen lag benignes Material vor und in acht Fällen handelte es sich um einen Borderline-Tumor. Die weitere Dif-

ferenzierung in Primärtumor und Rezidiv, in Grading und FIGO, sowie der histologische Subtyp sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Übersicht über die Zusammensetzung des Patientinnenkollektivs

Malignität (Ø-Alter; P / R)	gesamt	Primär- tumor	Rezidiv	Grading P / R	FIGO P / R	Histologischer Subtyp P / R
benigne (60,5)	4	4	-	-	-	serös: 1 nicht typisiert: 3
Borderline-Tu. (64,5)	8	8	-	-	-	serös: 5 mucinös: 1 nicht typisiert: 2
maligne (60,0 / 55,1)	52	43	9	G1: 4 / 1 G3: 39 / 8	F1: 4 / 2 F2: 2 / 1 F3: 30 / 5 F4: 7 / 1	serös: 27 / 6 endom.: 9 / 1 AdCa.: 3 / - solide: 4 / 2
gesamt	64	55	9			

Abkürzungen: Ø-Alter: Durchschnittsalter der Patientinnen bei der Operation, P: Primärtumor, R: Rezidiv, G: Grading, F: FIGO, AdCa.: Adenokarzinom, endom.: endometrioid

Ob bei den Patientinnen ein familiärer Hintergrund von erblichem Brust- oder Ovarialkrebs oder anderen Tumorerkrankungen bestand, war nicht bekannt.

In drei Fällen wurde ein Rezidiv eines bereits analysierten Primärtumors untersucht, so daß bei 61 Patientinnen insgesamt 64 Tumoren untersucht wurden.

Beispiele für CGH-Auswertungen (Metaphasen, Karyogramme und 'Mittelprofile plus Balken') mit Tumormaterial sind in Abbildung 6, Seite 52, Abbildung 7, Seite 53 und in Abbildung 8 auf Seite 54 dargestellt.

Wie sich nach einigen wiederholten CGH-Experimenten herausstellte, waren die Ergebnisse in vielen Fällen reproduzierbar, doch es gab auch Abweichungen bei einigen Ratio-Profilen der CGH. Wurden im ersten Versuch die Grenzwerten regional von den Ratioprofilen eindeutig über- oder unterschritten, so zeigten die Kurven der zweiten CGH nicht mehr diese Deutlichkeit, oder umgekehrt. Es gab Tendenzen in Richtung der Grenzwerten, die nur berührt, nicht aber passiert wurden. Hieraus und aus den korrespondierenden FISH-Ergebnissen wurde geschlossen, daß auch schon die Tendenzen eine gewisse Aussage erlauben.

Um alle möglichen Aberrationen zu erfassen, auch jene, welche durch eventuelle methodische Unzulänglichkeiten nicht eindeutig zu erkennen waren, erfolgte zunächst eine zweigeteilte Auswertung der CGH-Daten: zum einen die 'tendenzielle' Sicht, in der die Tendenzen ebenfalls berücksichtigt wurden, zum anderen die

‘sichere’ Sicht, bei der nur die durch Balken links und rechts der Ratio-Kurve kenntlich gemachten Bereiche in die Auswertung einfließen.

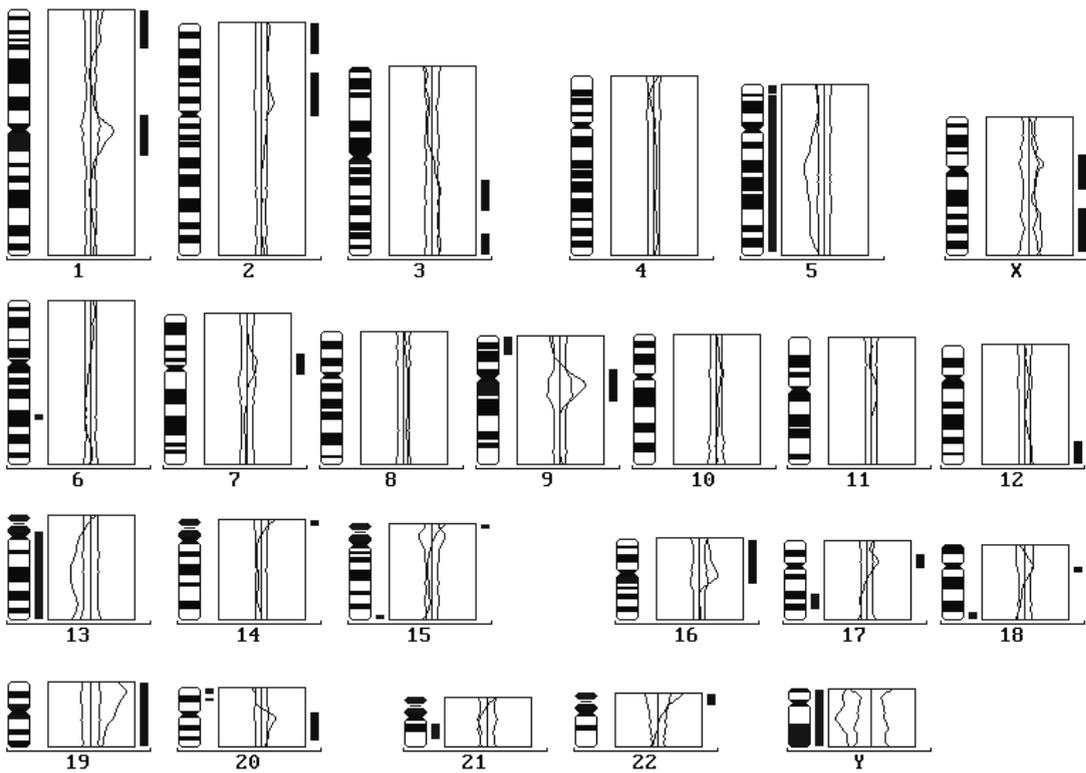
Ein Beispiel für ein wiederholtes Experiment mit zwei ähnlichen Ergebnissen (Tendenzen und eindeutigen Aberrationen) ist in Abbildung 9 (S. 59) zu sehen. Ähnlich abweichende CGH-Profile ergaben sich teilweise auch bei der Verwendung von verschiedenen Proben aus einem Tumor, wie in Abb. 10 (S. 60) dargestellt. Bei gesicherter Herkunft aus dem gleichen Tumor, ebenso bei mehreren CGH-Experimenten zu einem Fall, wurden die erhaltenen Ergebnisse der Einzeluntersuchungen in einer Auswertungsdarstellung zusammengefaßt. Hierbei wurden in einigen Fällen die Tendenzen eindeutig als Aberrationen bestätigt (vergleiche Abb. 11, S. 61, mit den zusammengefaßten Ergebnissen der CGH aus Abb. 9 und 10, S. 59/60).

Die Ergebnisse aus ‘tendenzieller’ und ‘sicherer’ Sicht unterschieden sich, abgesehen von höheren Werten bei den Amplifikationen und Deletionen in der ‘tendenziellen’ Auswertung, nur geringfügig bezüglich der Reihenfolge der Chromosomen bei einer Auflistung der Häufigkeiten dieser Aberrationen (Tab. 9, S. 62). Die Chromosomenarme 19p und q, sowie 20p lagen bei der ‘tendenziellen’ Sichtweise zusammen mit Chromosomen 8q und 3q bei den Amplifikationen an der Spitze. In der ‘sicheren’ Sichtung lag Chromosomarm 8q vor 3q und den Chromosomen 20q, 19q und 19p. Ein Vergleich der Ergebnisse beider Sichtweisen ist in Abb. 12, S. 63 als Säulendiagramm dargestellt. Da sich keine großen Unterschiede zwischen den beiden Sichtungsweisen zeigten, werden im Weiteren nur die Ergebnisse der sicheren Sichtung vorgestellt und diskutiert. Eine Berechnung der gefundenen Aberrationen erfolgte in der Gesamtheit und aufgeteilt in Amplifikationen und Deletionen für die jeweiligen Untergruppen des Patientinnenkollektivs (Tab. 8, S. 58). Der sogenannte ANCA-Index (*average number of copy alterations*) gibt Auskunft über die durchschnittliche Anzahl der chromosomalen Alterationen. Für die Berechnung wird die Anzahl der gefundenen Aberrationen durch die Anzahl der untersuchten Fälle geteilt. Dieser Wert steigt im allgemeinen im Rahmen der Tumorprogression (Ried et al., 1995).

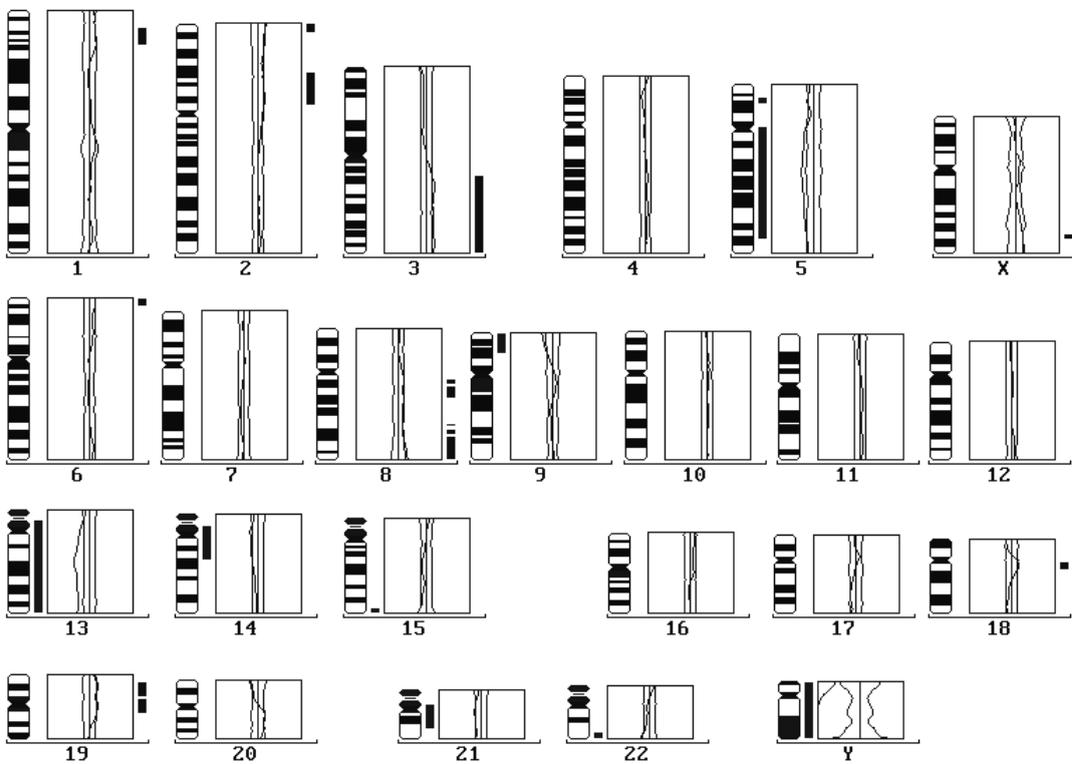
Tabelle 8: Übersicht der ANCA-Werte und der durchschnittlich gefundenen Aberrationen

Tumor-Art/ Anzahl Pat.	Sicht weise	Summe der Ab- erratio- nen	gesamt ANCA	Min. Max. ge- samt	Amp. ANCA	Min. Max. Amp.	Del. ANCA	Min. Max. Del.	Amp.	Del.
P 43	tend.	1016	23,6 (±11,9)	0 46	13,0 (±7)	0 24	10,7 (±5,6)	0 22	54,9%	45,1%
	sicher	679	15,8 (±10,6)	0 37	8,7 (±6,3)	0 22	7,0 (±4,9)	0 16	55,4%	44,6%
R 9	tend.	238	26,4 (±10,0)	11 39	15,6 (±4,3)	8 19	10,9 (±6,4)	1 20	58,8%	41,2%
	sicher	167	18,6 (±9,0)	7 29	11,8 (±3,8)	5 16	6,8 (±5,7)	0 14	63,5%	36,5%
P + R 52	tend.	1254	24,1 (±11,6)	0 46	13,4 (±6,6)	0 24	10,7 (±5,7)	0 22	55,7%	44,3%
	sicher	846	16,3 (±10,3)	0 37	9,3 (±6,0)	0 22	7,0 (±5,0)	0 16	57,0%	43,0%
Border. 8	tend.	43	5,4 (±3,5)	0 10	3,9 (±2,6)	0 6	1,5 (±1,7)	0 4	31 (72,1%)	12 (27,9%)
	sicher	9	1,1 (±1,4)	0 3	1,1 (±1,4)	0 3	0	0	9	0
benigne 4	tend.	44	11,0 (±8,3)	5 23	8,8 (±5,7)	0 17	2,3 (±2,6)	0 6	35 (79,5%)	9 (20,5%)
	sicher	26	6,5* (±7,3)	0 17	6,3 (±6,8)	0 16	0,3 (±0,5)	0 1	25 (96,2%)	1 (3,8%)

Abkürzungen: ANCA: *average number of copy alterations*, mit Angaben der Standardabweichungen (in Klammern); P: Primär-Tu.; R: Rezidiv; Border.: Borderline-Tumor; tend.: tendenzielle Sicht; sicher: sichere Sicht; Min. und Max.: Minimal- und Maximalwert der gefundenen Aberrationen in der Gesamtheit, sowie aufgeteilt in Amplifikationen und Deletionen. *: ohne Pat. Nr. 5: Gesamt-ANCA 3,0 ±2,5. Die Fallzahlen der Gruppen von Border.- und benignen-Tu. waren für eine Prozentberechnung zu klein, so daß diese Werte in Klammern gesetzt wurden. Die Größe der Gruppen ist in der ersten Spalte mit angegeben.

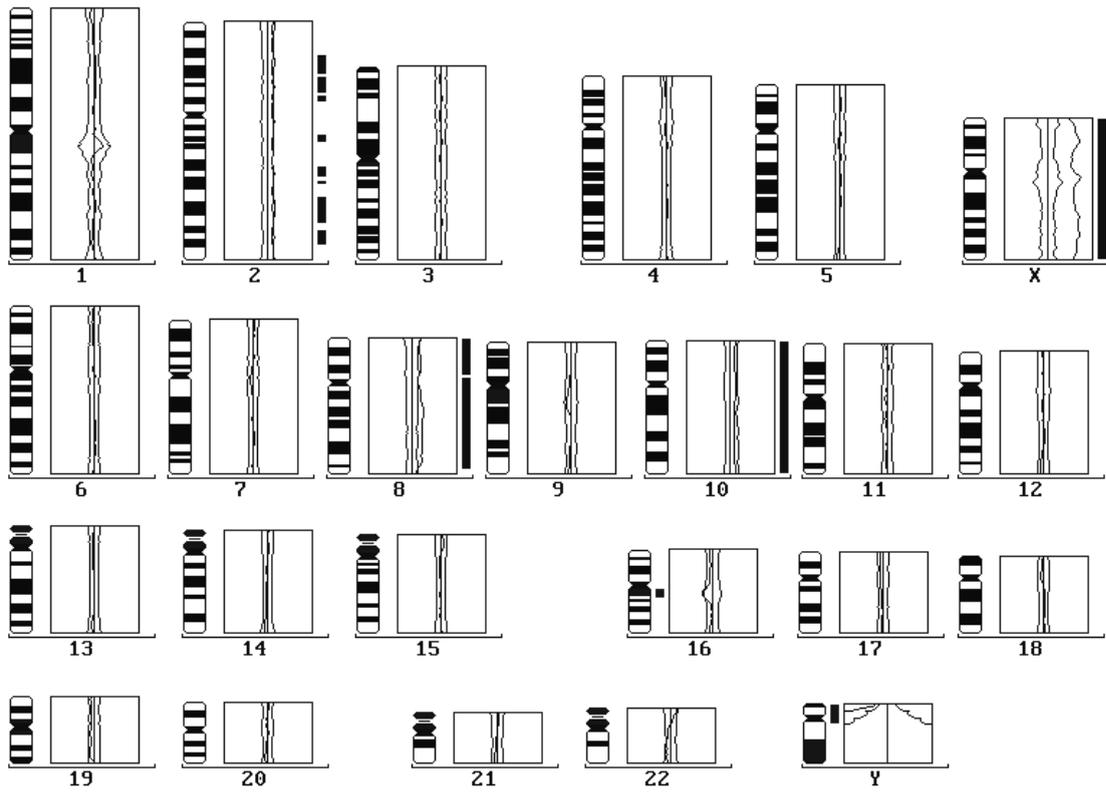


a.

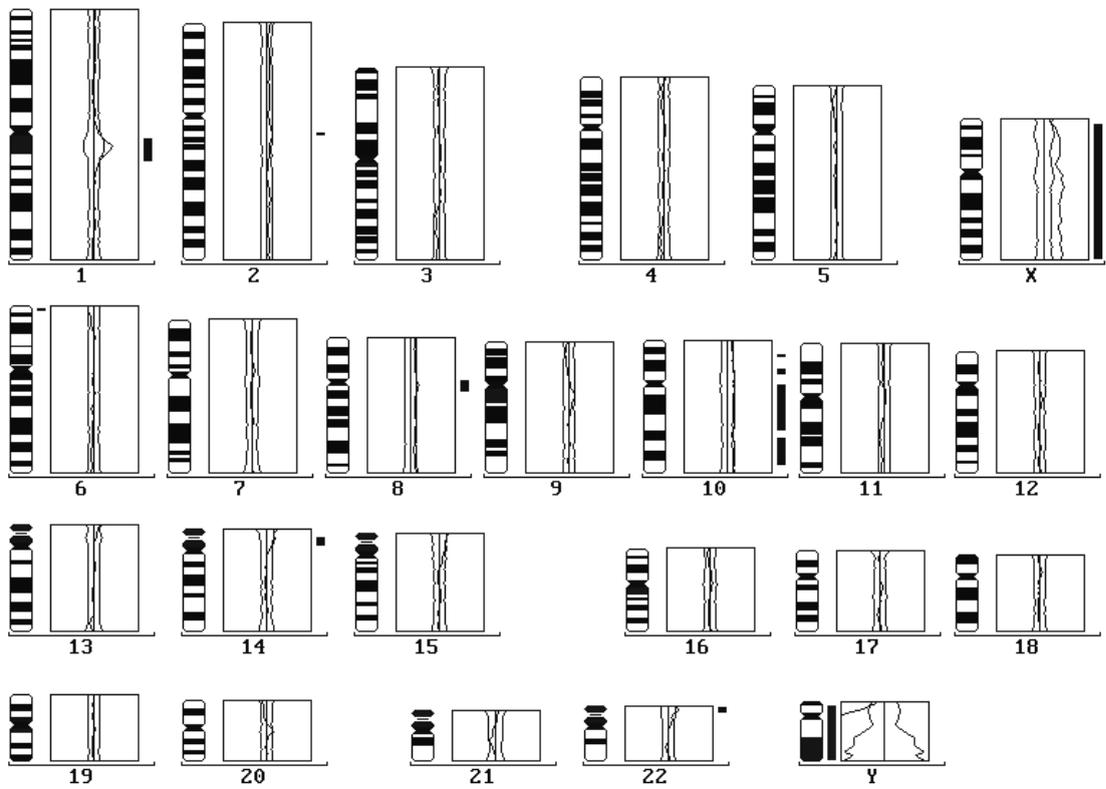


b.

Abb. 9: Ergebnisse von zwei CGH-Untersuchungen gleichen Materials einer Patientin (Nr.18). Erkennbar sind Unterschiede in Form von Tendenzen bei Chromosom 2, 3, 8 und 16

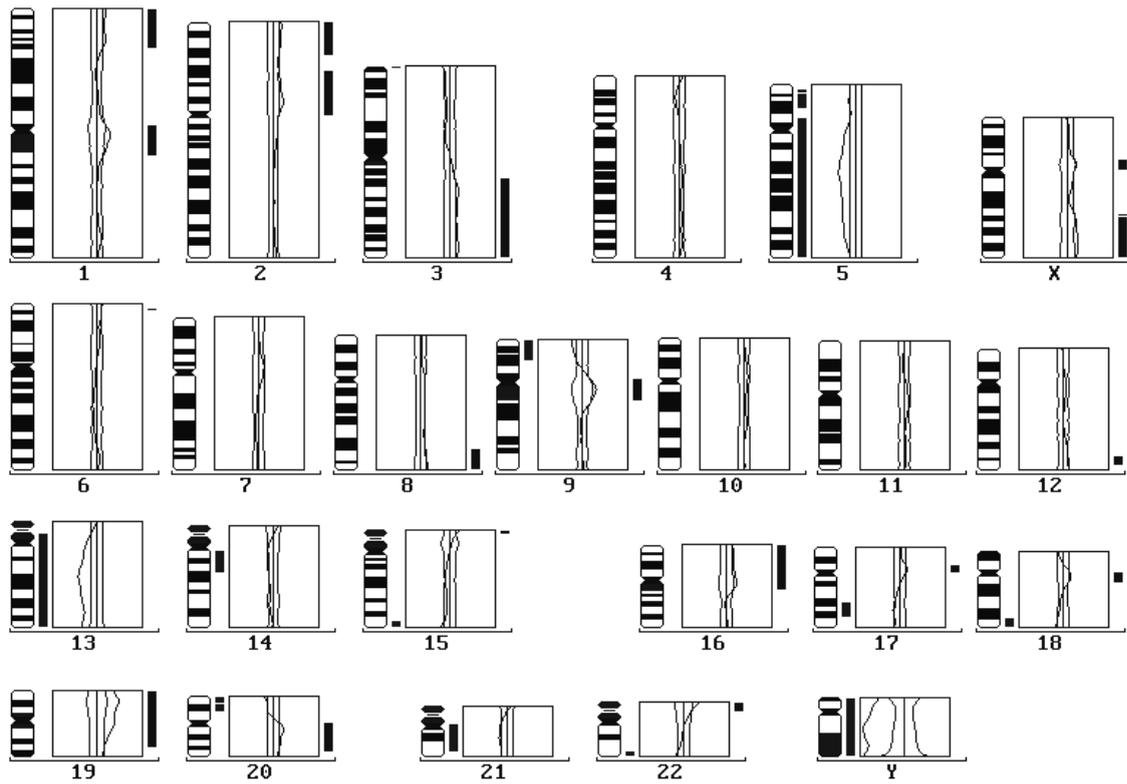


a.

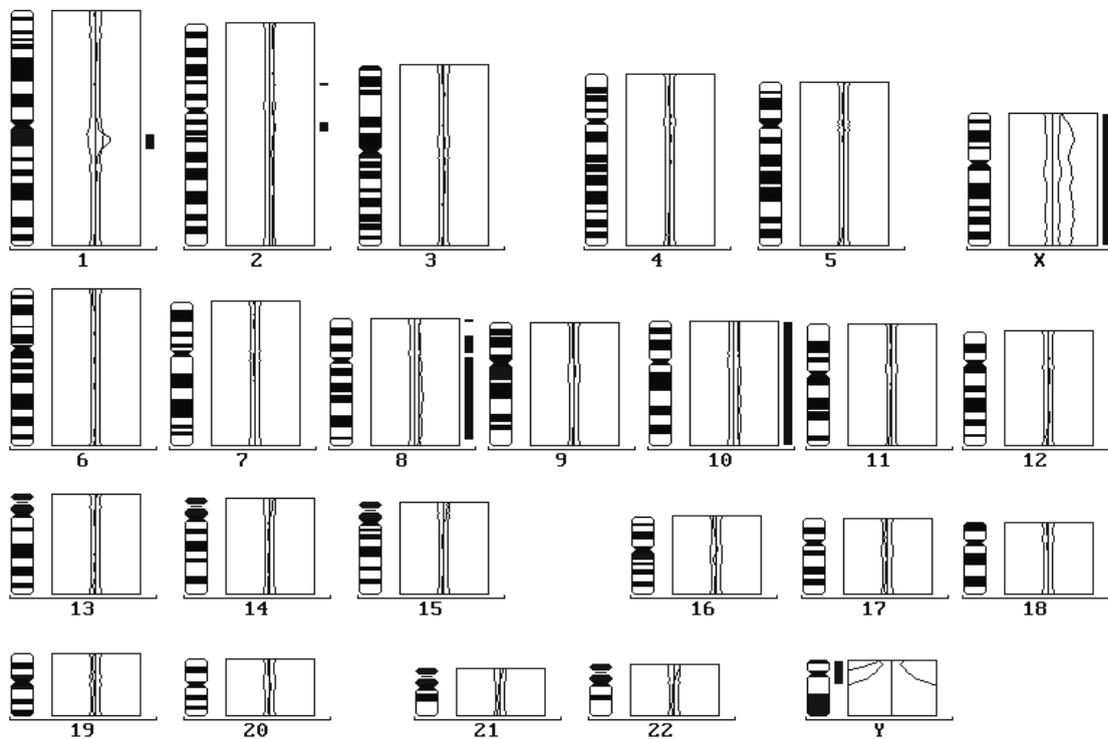


b.

Abb. 10: Zwei CGH-Experimente mit Material aus unterschiedlichen Tumorearealen; Tendenzen und Aberrationen bei Chromosom 2, 8 und 10 (Pat. Nr. 59)



a.



b.

Abb.11: Zusammenfassung der Fälle aus Abb. 9 in a., aus Abb. 10 in b. Die Tendenzen sind nun in der Mehrzahl als eindeutigen Veränderungen zu erkennen, z. B. Chromosom 2p, 8q, 17q und 18q in a., sowie 8 und 10 in b.

Eine statistische Analyse zur Klärung einer möglichen Korrelation zwischen *Grading*, FIGO und Subtyp mit der Art und Anzahl der Aberrationen sowie deren Lokalisation war aufgrund der kleinen Gruppen nicht möglich.

Die folgende Übersichtstabelle zeigt die Berechnungen der prozentualen Anteile von Amplifikationen und Deletionen für die Gruppe der malignen Tumoren (Primär-Tumor und Rezidive, 52 Fälle), ungeachtet des Subtyps und der Klassifikation. In der Tabelle 10 sind die Aberrationen mit einem Anteil von mehr als 30% und deren genauere Positionen zusammen mit einer Übersicht lokalisierter Gene aufgeführt.

Tabelle 9: Prozentualer Anteil von Amplifikationen (Ampl.) und Deletionen (Delet.) bei malignen Tumoren (Primär-Tu. und Rezidive). Betroffene Chromosomen (Chr.) sind nach Häufigkeit aufgelistet.

Vergleich a. tendenzielle und b. sichere Sicht

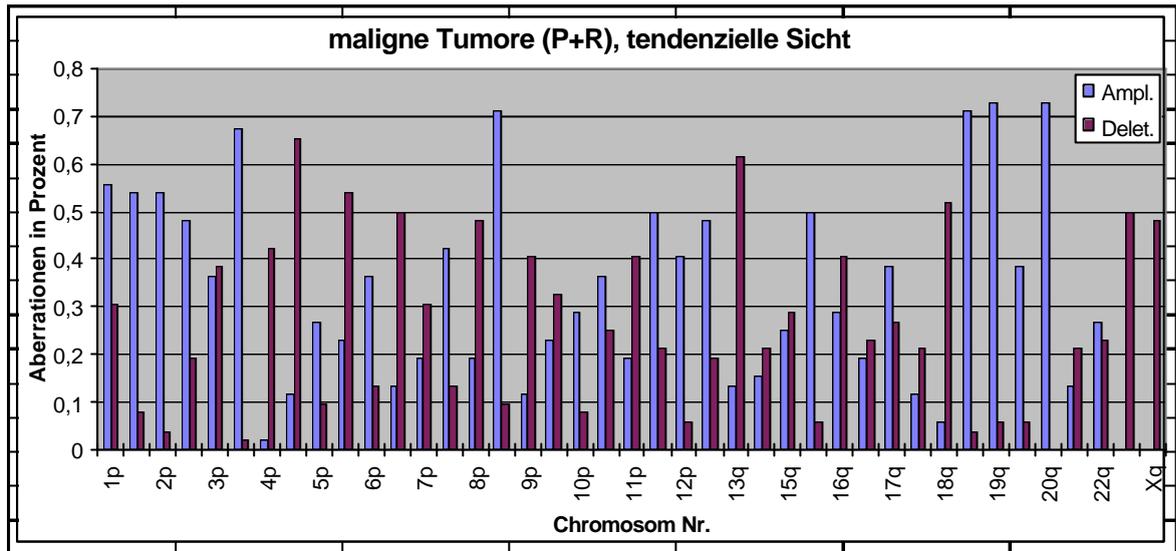
a.

Chr.	Ampl.	Chr.	Ampl.	Chr.	Delet.	Chr.	Delet.
19q	73,1%	16q	28,8%	4q	65,4%	22q	23,1%
20q	73,1%	22q	26,9%	13q	61,5%	11q	21,2%
19p	71,2%	5p	26,9%	5q	53,8%	14q	21,2%
8q	71,2%	15q	25,0%	18q	51,9%	18p	21,2%
3q	67,3%	5q	23,1%	6q	50,0%	21q	21,2%
1p	55,8%	9q	23,1%	Xp	50,0%	2q	19,2%
1q	53,8%	11p	19,2%	8p	48,1%	12q	19,2%
2p	53,8%	17p	19,2%	Xq	48,1%	6p	13,5%
11q	50,0%	7p	19,2%	4p	42,3%	7q	13,5%
16p	50,0%	8p	19,2%	9p	40,4%	5p	9,6%
12q	48,1%	14q	15,4%	11p	40,4%	8q	9,6%
2q	48,1%	13q	13,5%	16q	40,4%	1q	7,7%
7q	42,3%	21q	13,5%	3p	38,5%	10p	7,7%
12p	40,4%	6q	13,5%	9q	32,7%	12p	5,8%
17q	38,5%	18p	11,5%	1p	30,8%	16p	5,8%
20p	38,5%	4q	11,5%	7p	30,8%	19q	5,8%
10q	36,5%	9p	11,5%	15q	28,8%	20p	5,8%
3p	36,5%	18q	5,8%	17q	26,9%	2p	3,8%
6p	36,5%	4p	1,9%	10q	25,0%	19p	3,8%
10p	28,8%	Xp*	0,0%	17p	23,1%	3q	1,9%
		Xq*	0,0%			20q	0,0%

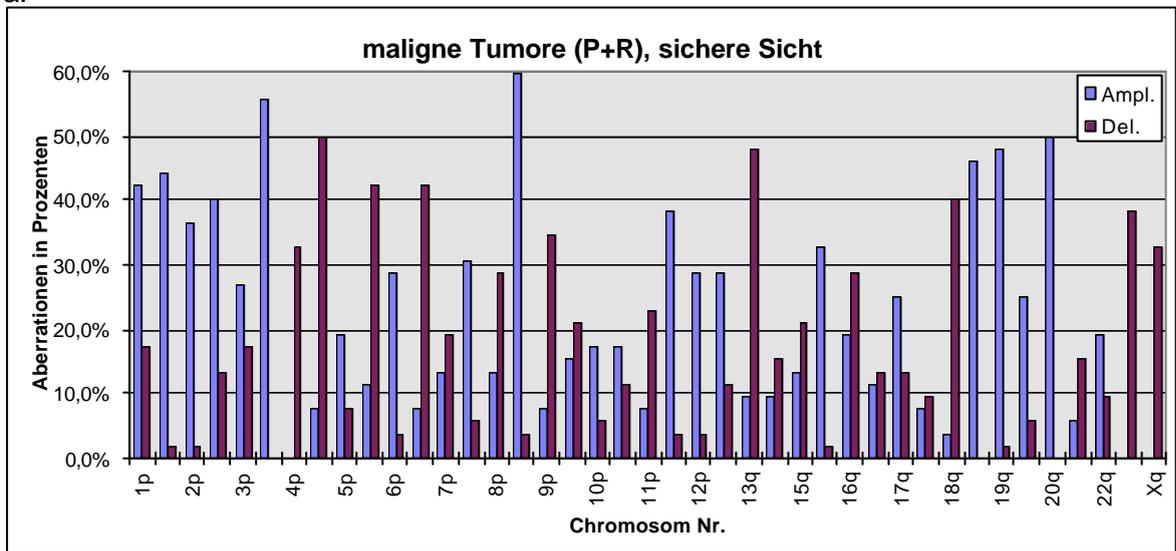
b.

Chr.	Ampl.	Chr.	Ampl.	Chr.	Delet.	Chr.	Delet.
8q	59,6%	5p	19,2%	4q	50,0%	17p	13,5%
3q	55,8%	10p	17,3%	13q	48,1%	17q	13,5%
20q	50,0%	10q	17,3%	5q	42,3%	10q	11,5%
19q	48,1%	9q	15,4%	6q	42,3%	12q	11,5%
19p	46,2%	15q	13,5%	18q	40,4%	18p	9,6%
1q	44,2%	7p	13,5%	Xp	38,5%	22q	9,6%
1p	42,2%	8p	13,5%	9p	34,6%	5p	7,7%
2q	40,4%	17p	11,5%	4p	32,7%	7q	5,8%
11q	38,5%	5q	11,5%	Xq	32,7%	10p	5,8%
2p	36,5%	13q	9,6%	8p	28,8%	20p	5,8%
16p	32,7%	14q	9,6%	16q	28,8%	6p	3,8%
7q	30,8%	11p	7,7%	11p	23,1%	8q	3,8%
12p	28,8%	18p	7,7%	9q	21,2%	11q	3,8%
12q	28,8%	4q	7,7%	15q	21,2%	12p	3,8%
6p	28,8%	6q	7,7%	7p	19,2%	1q	1,9%
3p	26,9%	9p	7,7%	1p	17,3%	2p	1,9%
17q	25,0%	21q	5,8%	3p	17,3%	16p	1,9%
20p	25,0%	18q	3,8%	14q	15,4%	19q	1,9%
16q	19,2%	4p	0,0%	21q	15,4%	3q	0,0%
22q	19,2%	Xp*	0,0%	2q	13,5%	19p	0,0%
		Xq*	0,0%			20q	0,0%

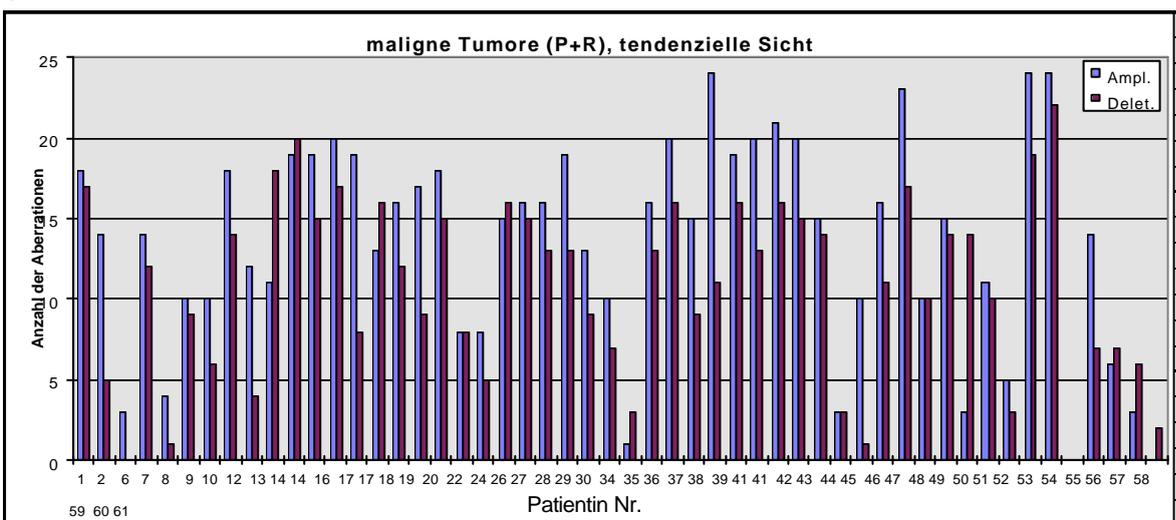
*: Amplifikationen bei X-Chromosomen wurden nicht erfasst, siehe dazu Seite 55



a.

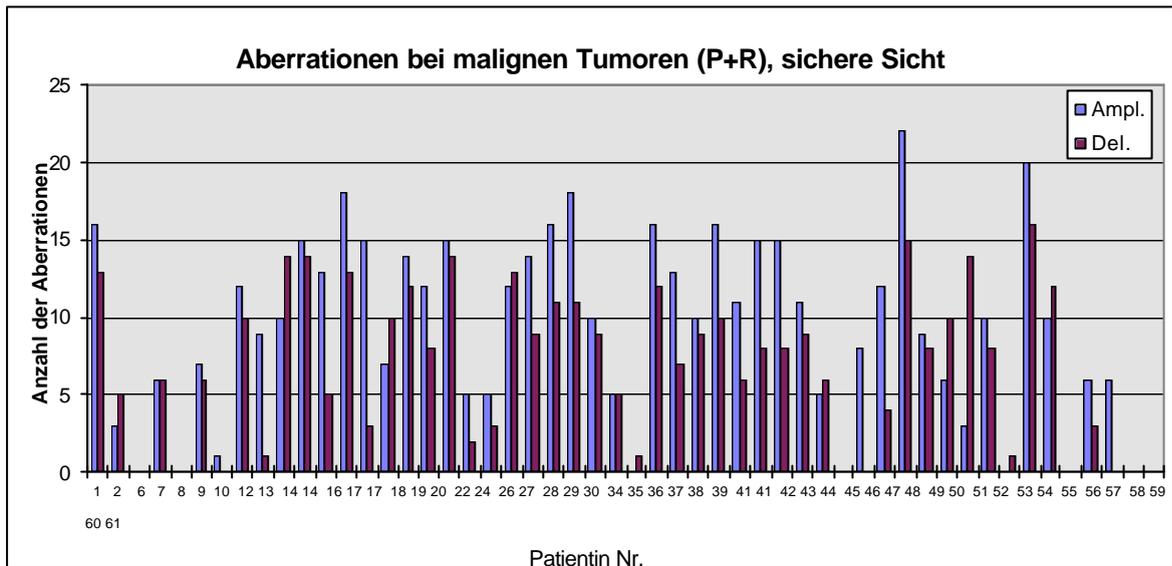


b.

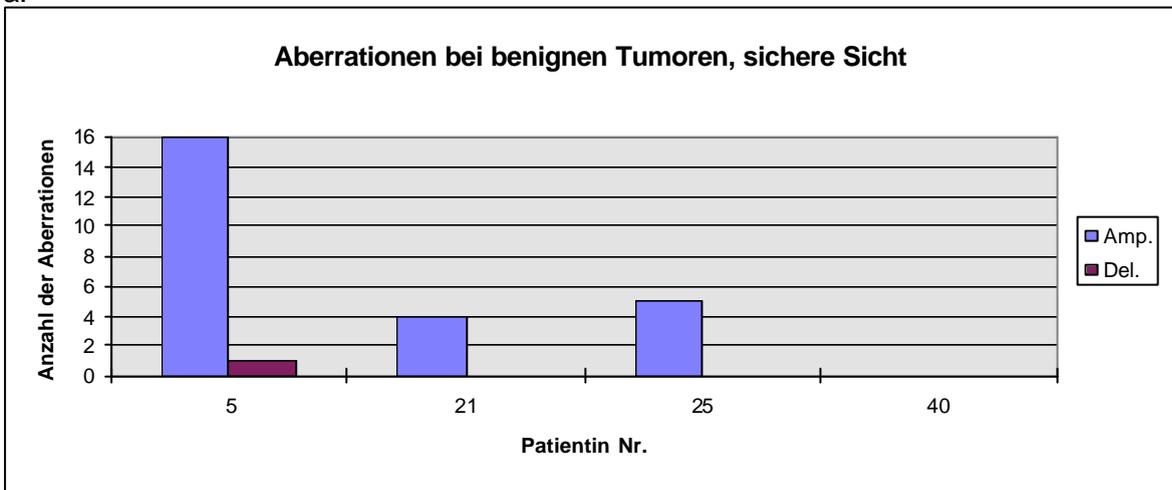


c.

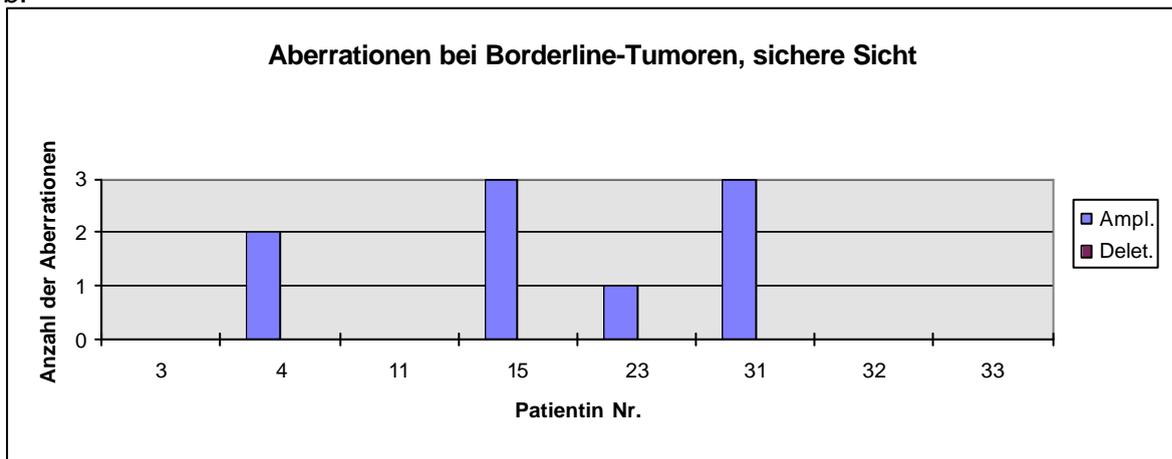
Abb. 12: Vergleich der prozentualen Aberrationen bei a. tendenzieller und b. sicherer Sichtweise für die jeweiligen Chromosomenarme (p- und q-Arm in Folge); in c. Aberrationen jeder Patientin bei tendenzieller Sicht (maligne Tu., R=Rezidiv)



a.



b.



c.

Abb. 13: Übersicht über die Aberrationen (Amplifikationen und Deletionen) der Patientinnen bei a. malignen, b. benignen und c. Borderline-Tumoren

Tabelle 10: Angabe der Bereiche, die am häufigsten von Veränderungen betroffen waren (≥30%) sowie darin lokalisierte Gene. Eine Auflistung der Sub-Regionen, ermittelt aus Abb. 14, erfolgte nach abnehmender Häufigkeit.

a. Amplifikationen und b. Deletionen

a.

Chr.-Arm	Sub-Regionen	lokalisierte Gene
8q (59,6%)	8q23-qter 8q21.2-qter gesamt 8q	c-myc: 8q24; MMP16, TPD52: 8q21; MYBL1: 8q22 CLYN: 8q11-q12; MOS: 8q11-q12; LYN: 8q13-qter;
3q (55,8%)	3q25-qter 3q13.2-qter	LAZ3; BCL-6; hTR
20q (50%)	gesamt	E2F1, MMP24: 20q11; SRC: 20q13.1; AIB1, CAS: 20q12-q13.13 AIB4, ZNF217, ZNF218, PIC1-like, Cyp24, NABC1-5
19q (48,1%)	gesamt	E2A: 19p13; JUNB und JUND: 19p13.2;
19p (46,2%)	gesamt	BCL3: 19q13.1
1q (44,2%)	1q21-q31 1q gesamt	ABL: 1q24-q25
1p (42,3%)	1p32-pter	1p1: GST, VAV, CSFI, RHOC, RAPIA, GNATZ, GSTM2, GSTM4, GSTM5, NGFM; NRAS: 1p13; MYCL1: 1p32; JUN: 1p31-p32; E2F2, MMP23A+B: 1p36; p73: 1p36.3
2q (40,4%)	gesamt	HER4, PMS1, INHA: 2q35; PAX3
11q (38,5%)	11q12-q22 11q gesamt	HSTF1, PRAD1, EMS, FOLR1, VEGF, INT2, BCL1, CCND1: 11q13; MMP-1,3,7,8,10,12,13 und 20: 11q22.3; ETS1: 11q23.3
2p (36,5%)	2p14-pter gesamt	MSH6: 2p16; MSH2: 2p21-p22; NMYC: 2p24.1
16p (32,7%)	gesamt	CBP: 16p13; IL-4R, PRM1
7q (30,8%)	gesamt	MDH2: 7cen-q22; PMS2: 7q22; MET, WNT2: 7q31; RAFB1: 7q33-q36

b.

Chr.-Arm	Sub-Regionen	lokalisierte Gene
4q (50%)	4q21-qter	IL-2; CASP6; CENPE;
13q (48,1%)	13q14-q22 gesamt	RB: 13q14; BRCA2: 13q12-q13;
5q (42,3%)	5q13-q23 gesamt	APC, MCC: 5q21 MSH3: 5q11-q13
6q (42,3%)	6q21-q23 6q14-qter	ESR, HCGA, SOD2, TCP10, E2F3: 6q22; MYB, TPD53: 6q22-q23
18q (40,4%)	18q12-qter gesamt	DCC: 18q21; DPC4/SMAD4: 18q21.1; BCL2
Xp (38,5%)	-	AMG, STS, DMD
9p (34,6%)	9p21-pter gesamt	INK4A/MTS1/CDK41/CDKN2 (Protein:p16 ^{INK4A}): 9p21; ABL1: 9p34.1
4p (32,7%)	4p13-pter gesamt	HOX7, PGM2
Xq (32,7%)	-	MYBL2

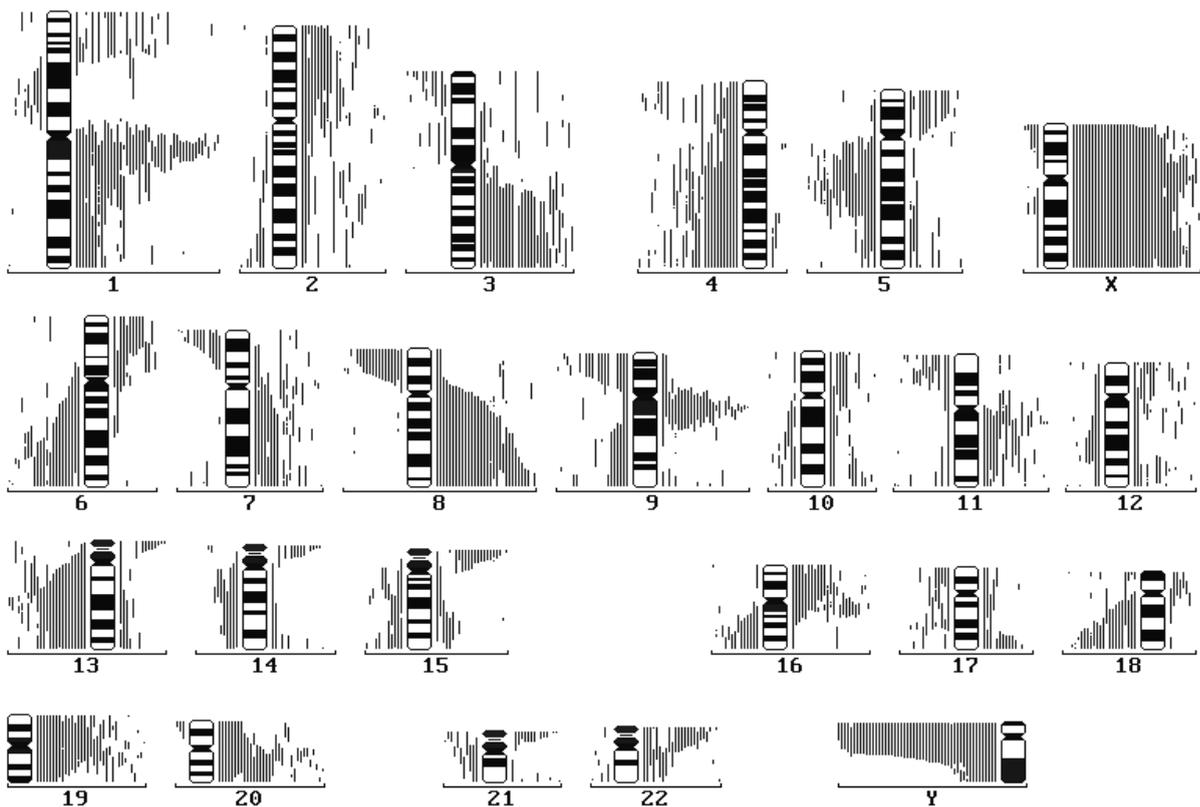


Abb. 14: Darstellung aller Aberrationen der 52 malignen Primär- und Rezidiv-Tumoren. Balken auf der rechten Seite geben Über-, die auf der linken Seite Unterrepräsentationen an

Es wurden generell mehr Amplifikationen als Deletionen beobachtet (\emptyset 57% zu 43% bei den malignen OvCa.). In zwölf der insgesamt 52 malignen Fälle waren mehr Deletionen zu finden, wobei auch diese Gruppe einen heterogenen Charakter in Bezug auf Subtyp, *Grading* und FIGO-Stadium zeigte und somit keine möglichen Korrelationen ermittelt werden konnten. In einem Fall lag das Verhältnis von Amplifikation zu Deletion mit 3:14 extrem weit auseinander. Diese Patientin (Nr. 52) zeigte ein höheres Alter (82 Jahre) als der Rest dieser Gruppe, mit einem Durchschnittsalter von 57,9 Jahren (48-71 Jahre). Ansonsten lagen die Differenz zwischen den Werten von Amplifikation und Deletion zwischen eins und vier.

Auch in der Gruppe der benignen Tumoren fanden sich mehr Amplifikationen als Deletionen (Gesamt-ANCA: $6,5 \pm 7,3$, Ampl.: $6,3 \pm 6,8$; Delet.: $0,3 \pm 0,5$).

Das Tumor-Material einer Patientin zeigte in der CGH mit einer Anzahl von 17 Veränderungen ungewöhnlich viele Aberrationen, davon 16 Amplifikationen und eine Deletion. Im Gegensatz dazu waren bei den übrigen drei Patientinnen weniger Aberrationen in der DNA zu finden: in einem Fall keine, in den anderen beiden jeweils vier, bzw. fünf

Amplifikationen, aber keine Deletionen (Abb. 13, S. 64). Unter Ausschluß der Patientin Nr. 5, ergab sich ein ANCA-Wert bei den benignen Patientinnen von $3,0 \pm 2,5$.

Die CGH-Untersuchung bei den Borderline-Tumoren ergab folgendes Bild: viermal keine Veränderungen, in keinem Fall Verlust von DNA-Material, aber einmal eine, einmal zwei, sowie zweimal drei Zugewinne (Gesamt-ANCA: $1,1 \pm 1,4$; Ampl.: $1,1 \pm 1,4$; Del.: 0). In den Diagrammen auf Seite 64 (Abb. 13) sind die Aberrationen der einzelnen Patientinnen dieser kleinen Gruppen graphisch dargestellt.

4.3. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die FISH-Analyse ermöglicht es, bestehende CGH-Daten zu überprüfen und sie durch genauere Kartierung auffälliger Bereiche zu vervollständigen. Zudem gibt sie Auskunft über den Ploidie-Grad und erlaubt auch Rückschlüsse über eine mögliche Heterogenität des Tumormaterials, welche in der CGH nicht erkannt wird.

Da bei den Tumorpräparaten eine Unterscheidung zwischen Kernen aus Tumor- und denen aus Normal-Gewebe nicht immer eindeutig getroffen werden konnte, können evtl. auch Signale von Normalkernen mit in die Auswertung eingegangen sein.

Aus dem Patientinnenkollektiv der CGH-Untersuchung wurden zehn Fälle (acht maligne Ovarialkarzinome, davon vier Primäre und vier Rezidive sowie zwei Borderline-Tumoren) ausgewählt, um an ihnen die CGH-Ergebnisse mittels FISH zu verifizieren (Patientinnen Nr.: 14, 15, 18, 20, 22, 23, 24, 27, 28, 29).

Es wurden fünf Chromosomen mit insgesamt 19 verschiedenen FISH-Proben genauer analysiert:

- Chromosom 3: 3p, 3p21, 3q13, 3q23, 3q26;
- Chromosom 6: 6p, 6p21, 6-Alpha-Satellit, 6q22.32, 6q23.2, 6q23.3, 6q25.2;
- Chromosom 8: 8p, 8-Alpha-Satellit, 8q21.3, 8q24;
- Chromosom 12: 12-Alpha-Satellit;
- Chromosom 18: 18-Alpha-Satellit, 18q21.2;

Das ergab bei den zehn Patientinnen insgesamt 139 untersuchte Loci (siehe Tabelle 11 und 12, S. 71 und S. 78).

Die Qualität der durch die 'touch-Methode' gewonnenen Zellkern-Präparate ließ in der Mehrzahl der Tumorfälle eine Auswertung der FISH-Hybridisierungssignale zu. Da sich nach dem *touchen* des Normalgewebes kaum Kerne auf den OT wiederfanden, wurde nur in wenigen Fällen Normalmaterial zur Kontrolle untersucht.

Kontrolluntersuchungen auf den Normalgewebe-Präparaten und auf Metaphasen-OT mit den verwendeten FISH-Proben ergab eine minimale und maximale Anzahl von $n=1,81$ und $n=2,20$ Signalen pro Zellkern, gemittelt aus mindestens 100 ausgezählten Kernen. Dieses waren die Grenzwerte für einen diploiden Karyotyp. Mehr Signale wurden als potentiell polyploider, weniger als potentiell monosomer Karyotyp gewertet. Bei der Untersuchung wurden nur vier Kategorien (1 bis ≥ 4 Signale) erfaßt und bewertet, da bei

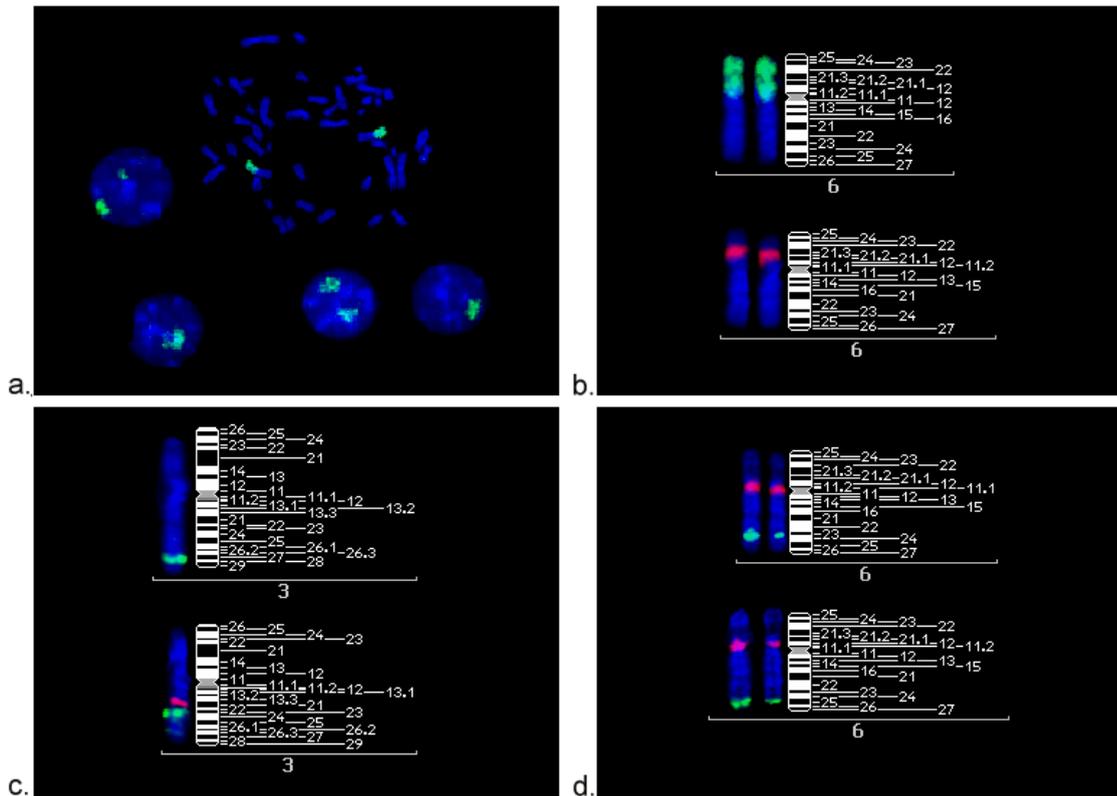
zu vielen Signalen keine genaue Zählung durchgeführt werden konnte. Vier oder mehr Signale gingen daher nur als vier Signale in die Berechnung ein, so daß der exakte Ploidiegrad nicht ermittelt wurde.

Die wenigen Kerne ohne Fluoreszenz-Signale (bei den Kontrollen wie auch bei den Tumor-Präparaten) wurden als Artefakte angesehen und daher nicht mit in die Auszählung einbezogen.

Auf den Normalpräparaten wurde zunächst noch die Qualität und auf den Metaphase-Chromosomen die Lokalisation der FISH-Proben untersucht (Abb. 15-1, S. 70). Dieses war besonders für die mikrodisssektierten Proben nötig, um vor allem die Auswertbarkeit der erhaltenen Signale abschätzen zu können. Bisher fehlen noch Angaben über mikrodisssektierte FISH-Sonden in der Literatur. Daher wurden in dieser Arbeit vergleichend größere (gesamter Chromosomenarm von 3p, 6p, 8p), als auch kleinere mikrodisssektierte FISH-Proben (3p21, 6p21) eingesetzt. Bei den größeren Sonden war bei der Auszählung besondere Aufmerksamkeit geboten, da im Zellkern große, teilweise überlappende Fluoreszenz-Signale zu erkennen waren. Es wurden nur Kerne berücksichtigt, deren Signale von der Intensität und Größe her gleich waren. Bei den kleineren Proben wurde in den Voruntersuchungen noch ein Mindestabstand eruiert, bei dem zwei reebeneinanderliegende Signale auch als zwei getrennte gezählt werden konnten. Wurde dieser Minimalabstand unterschritten, wurden die beiden fluoreszierenden Punkte als ein Signal gewertet.

In 91 von 139 untersuchten Loci (65,5%) waren die FISH-Untersuchungen im Einklang mit den CGH-Ergebnissen. Unterschiede fanden sich bei acht der zehn Patientinnen (Patientinnen Nr. 14, 15, 18, 22, 24, 27, 28 und 29), wobei die FISH-Analyse bei vier dieser acht Personen (siehe Tab. 11, S. 71) einen aneuploiden Karyotyp ermittelte. Von den insgesamt 48 diskrepanten Ergebnissen resultierten 40 aus diesem aneuploiden Patientinnenkreis. Ein Beispiel für eine FISH bei einer aneuploiden Patientin ist in Abb. 15-2 (Pat. 22, Proben: HG2 und 18-Zentromer; S. 70) wiedergegeben.

Eine mögliche Heterogenität des Tumormaterials, erkennbar an Kernarealen mit unterschiedlicher Signalanzahl gleicher FISH-Proben, wurde in den ausgezählten Präparaten nicht beobachtet. Das zur Verfügung stehende Tumormaterial war teilweise sehr klein, so daß die 'touch-Präparate' nur einen kleinen Ausschnitt aus dem Tumorgewebe re-



präsentierten. Eine Aussage über eine klonale Heterogenität des Tumors konnte daher nicht getroffen werden.

Abb. 15-1: Kontroll-FISH : a. Gesamt 3p-Probe auf Interphase-Kernen und einer Metaphase; b. Lokalisation der gesamt 6p-Probe (g) und der 6p21-Probe (r); c. im oberen Bild: Yac1 (g), darunter Yac 2 und Yac 3 (g/r) auf Chr. 3; d. FISH-Proben HG3 (6-Zentromer und 6q23.3: r/g) und darunter HG 4 (6-Zentromer und 6q25.2: r/g)

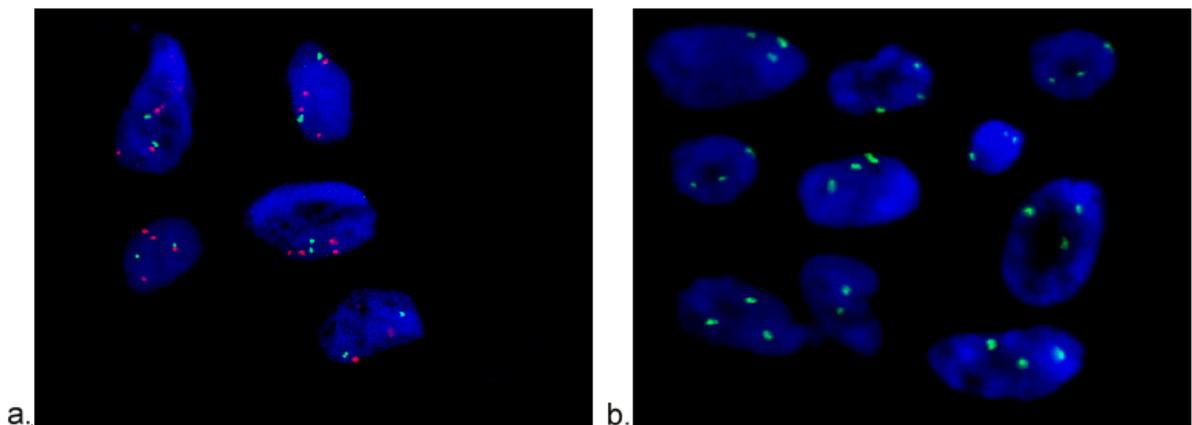


Abb. 15-2: a. Zwei-Farben-FISH mit der Probe HG 2 (6 Zentr. rot, 6q23.2, grün) und b. FISH mit der 18-Alpha-Satelliten-Sonde (Patientin Nr. 22: Aneuploid)

Tabelle 11: Vergleich der Übereinstimmung von CGH- und FISH-Ergebnissen

Patientin Nr.	Art des Tumors	Anzahl der untersuchten Loci	CGH = FISH	CGH ≠ FISH
14	Rezidiv	13	12	1
15	Borderline-Tu.	13	9	4
18 ^p	Primär	13	5	8*
20	Rezidiv	13	13	-
22 ^p	Rezidiv	15	4	11*
23	Borderline-Tu.	11	11	-
24	Rezidiv	14	13	1
27 ^p	Primär	16	3	13*
28	Primär	15	13	2
29 ^p	Primär	16	8	8*
total:	10	139	91	48 (40*)

Legende: Art des Tumors: maligne Primärtumoren und maligne Rezidive; Tu.: Tumor;
^p: aneuploide Patientinnen, *: diskrepante Ergebnisse aufgrund von Aneuploidien;

Die acht Fälle, in denen die FISH-Untersuchung ein anderes Ergebnis erbrachte als die CGH-Analyse, betrafen folgenden Patientinnen und Chromosomen:

- Patientin Nr. 14: Chromosom 8q: Die c-myc-Probe ließ auf einen diploiden Karyotyp schließen, während sich diese Region in der CGH als amplifiziert darstellte.
- Patientin Nr. 15, Chromosom 6q: Die Signalausählung von Probe HG3 (6q23.3) lag mit n=2,25 Signalen knapp über der Schwelle für einen diploiden Karyotyp, der von der CGH und auch mit den anderen Chromosom 6-Proben ermittelt wurde.
- Patientin Nr. 15, Chromosom 8: Die CGH zeigte eine leichte Amplifikation des gesamten 8er-Chromosoms, während die FISH-Untersuchung mit drei verschiedenen chromosomalen Proben (gesamt 8p, 8-Zentromer und 8q24) auf einen normalen diploiden Karyotyp hinwies.
- Patientin Nr. 24, Chromosom 8: Das CGH-Profil im Bereich 8p zeigte eine eindeutige Tendenz in Richtung unterer Schwelle, ohne allerdings diese Grenze zu unterschreiten (Abb.18-1 a. und b., S. 77). Demgegenüber ergab die FISH eine durchschnittliche Signalanzahl von n=1,65, Zeichen für einen partiellen Verlust der betroffenen Region. Die 8-Alpha-Satelliten-Sonde entsprach dagegen mit n=2,15 Signalen

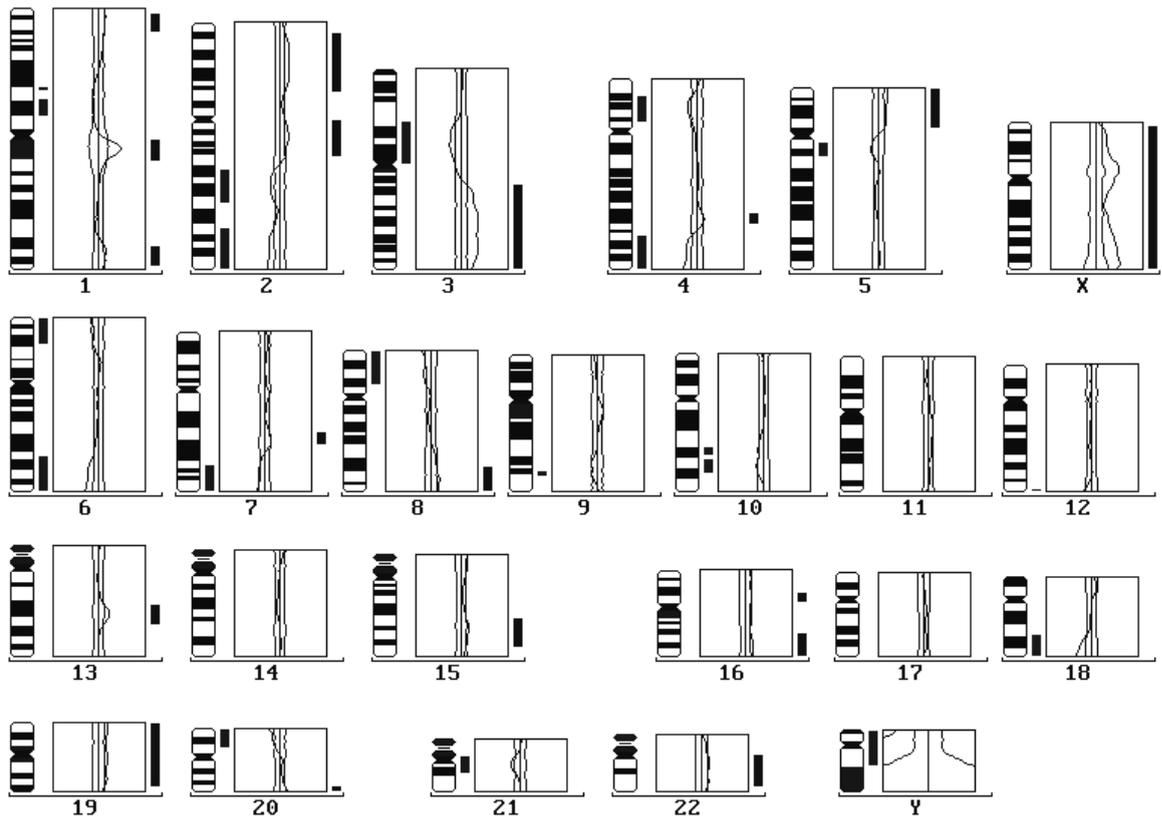
dem Ergebnis der CGH, deren Profil genau in diesem Bereich die untere Grenze in Richtung oberer Grenze passierte.

- Patientin Nr. 28, Chromosom 6: Das Ratio-Profil verlief im p-Arm nur zu Beginn vom Zentromer aus in Richtung p-Telomer bis 6p21.1 links der unteren Grenze und dann genau in Höhe dieser Schwelle bis in die Mitte der 6p21-Bande. Die zugehörige 6p21-FISH-Sonde zeigte einen Verlust ($n=1,75$) dieser Region an (Karyogramm siehe Abb. 17b, S. 74 und Abb. 18-2b, S. 77).
- Patientin Nr. 28, Chromosom 18: Auch hier orientierte sich das CGH-Mittelprofil ungefähr ab Position 18q11.2 über das Zentromer hinweg bis an das distale Ende des p-Arms auf die linke Seite von der Grundlinie. Erst im Telomerbereich wurde die Grenzschwelle passiert, verdeutlicht durch den nebenstehenden Balken. Die FISH-Analyse mit der 18-Alpha-Satelliten-Probe deutete allerdings auf eine partielle Monosomie ($n=1,49$) dieser Region.

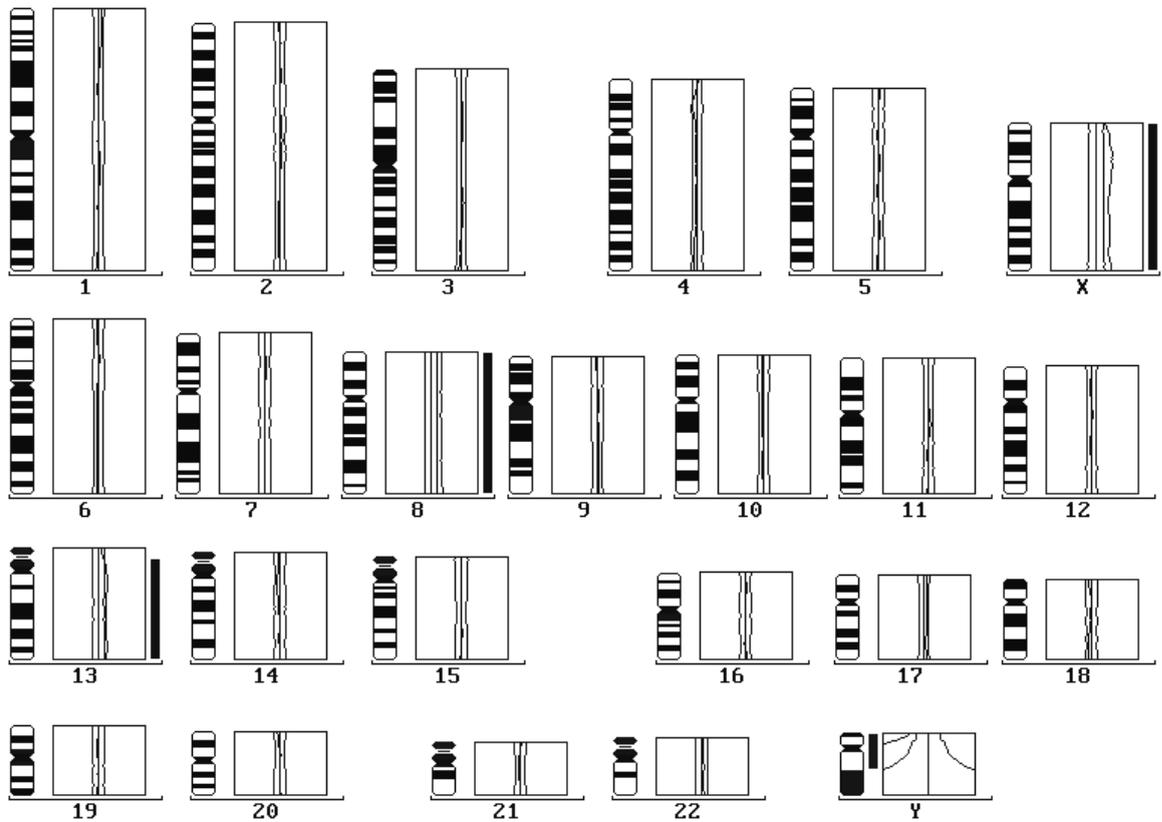
Die zugehörigen CGH-Ratio-Profile dieser Patientinnen sind in Abbildung 16 und 17 (S. 73/74) dargestellt.

Die verwendeten Alpha-Satelliten-(Zentromer-) Proben dienten in erster Linie der Polyploidie-Bestimmung. Aufgrund tandemartiger Anordnung dieser Sequenzen in unterschiedlicher Länge können FISH-Studien im Vergleich mit CGH-Studien zu widersprüchlichen Ergebnissen führen (Harrison und Ross, 1998), wie im Diskussionsteil noch näher erläutert wird. In den vorliegenden Experimenten stimmten die mit diesen Sonden ermittelten Daten (insgesamt 40 Fälle) bis auf zwei Ausnahmen (Fall Nr. 23 und 123) mit denen der CGH überein.

Für eine Abschätzung der Genauigkeit der CGH wurden aufeinanderfolgende FISH-Sonden für eine Kartierung der gefundenen chromosomalen Amplifikation und Deletion ausgewählt. Es wurden Chromosomen 3q und 6q mit drei, bzw. vier konsekutiven Proben (Yac 1-3, HG 1-4) analysiert. Bei einer Änderung des Ratio-Profils in diesen Bereichen wurde eine mögliche Korrelation der Amplituden-Höhe mit der Anzahl der gefundenen Hybridisierungssignale untersucht, sowie eine Überprüfung der mittels CGH gefundenen Aberrationen und deren Grenzen durchgeführt.

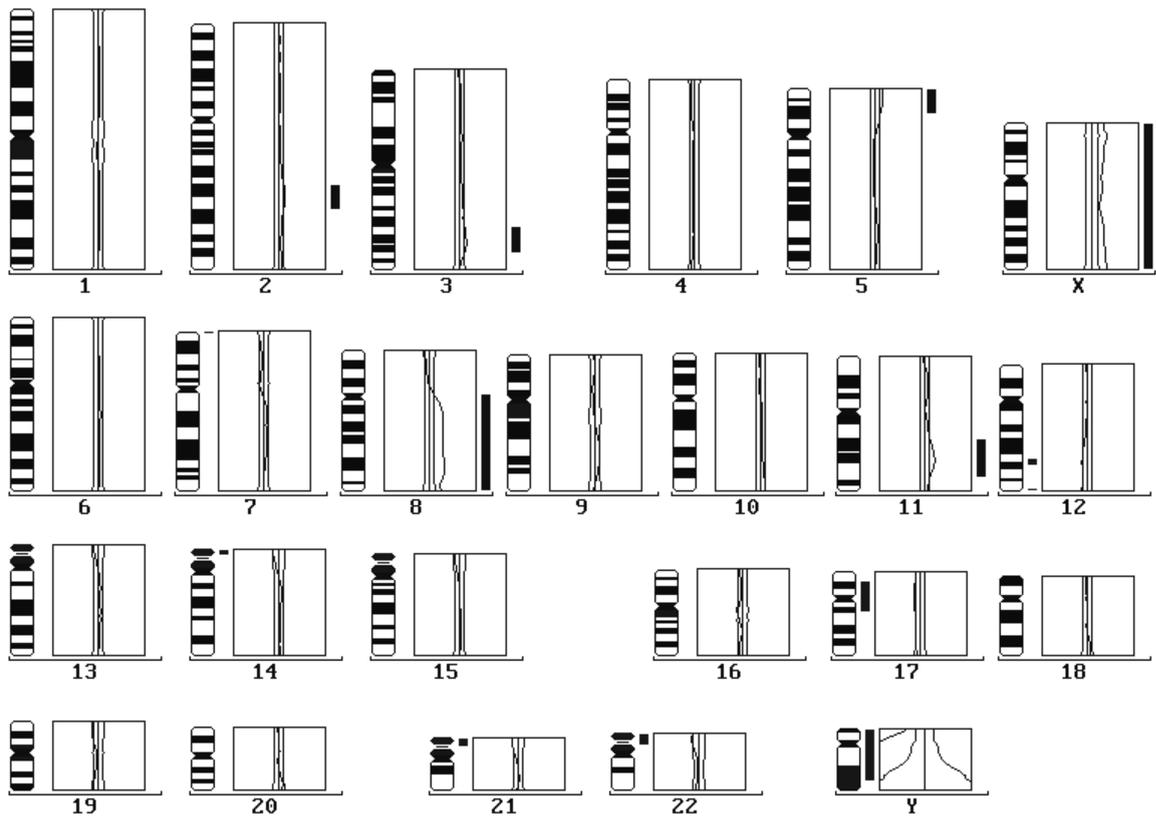


a.

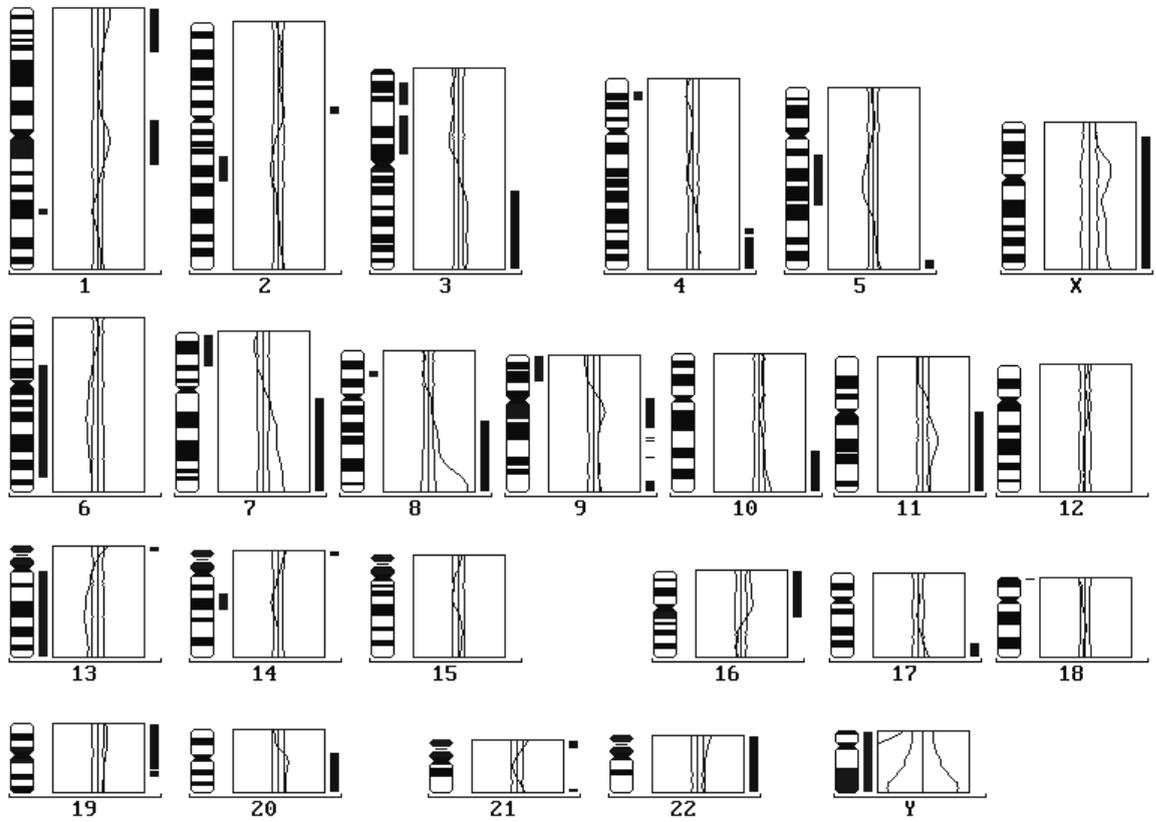


b.

Abb. 16: Karyogramme: a. Patientin Nr. 14 und b. Patientin Nr. 15



a.



b.

Abb. 17: Karogramme: a. Patientin Nr. 24 und b. Patientin Nr. 28

In allen Experimenten wurden die von der CGH gefundenen aberranten Bereiche in 3q durch die Yac-Sonden und in der Mehrzahl der Fälle auch die Aberrationen von 6q durch die HG-Sonden bestätigt. Ein Beispiel für eine Übereinstimmung ist in Abbildung 18-2 (S. 77) dargestellt: eine Zwei-Farben-FISH mit den Proben Yac 2 und Yac 3 (3q23, bzw. 3q13) ergab bei Patientin Nr. 28 $n=2,62$ und $n=1,94$ Signale. Damit liegt der Bruchpunkt in dem Bereich zwischen diesen Sonden, wie in der CGH (Profil in Abb. 18-2 d., S. 77) angezeigt.

Es konnte in diesen vergleichenden Untersuchungen in den meisten Fällen keine eindeutige Korrelation zwischen der Höhe der Ratio-Amplitude und der Anzahl der Signale gefunden werden. Ein Beispiel für eine gänzlich fehlende Übereinstimmung war bei Patientin Nr. 22 zu finden: das Summen-Profil (Abb. 6, S. 52) zeigte im 3q-Arm zwei auffällige Überrepräsentationen, mit den zwei maximalen Amplituden in den Bereichen 3q13.2-3q13.3 und 3q25-3q26.1 und dem dazwischen liegenden Minimum bei 3q23. Die korrespondierenden FISH-Sonden (Yac1: 3q26, Yac2: 3q23, und Yac3: 3q13) ergaben aber folgende Werte: Yac3: $n=3,66$, Yac2: $n=3,78$ und für Yac1: $n=2,53$ (Tab.12, S. 78). Die meisten Signale wurden bei 3q23 gezählt, also in dem eigentlichen 'Tal' zwischen den beiden Kurven-Maxima.

Ein Grund dafür ist sicherlich die Tatsache, daß auch mehr als vier Signale nur als 'vier' gezählt wurden und in die Berechnung des Mittelwertes eingingen. Bei zuvielen Signalen in einem Kern wurde das Auszählen erschwert, daher lag die obere gezählte Grenze bei vier Signalen. Der genaue Ploidie-Grad wurde nicht bestimmt. Wie andere Untersuchungen ergaben, sind die Fluoreszenz-Intensitäten nur bis zu einem Verhältnis der beiden Haptene von 4:1 noch linear (du Manoir et al., 1993). Somit können bei einer Vielzahl der Ratio-Kurven keine Aussagen über den Amplifikationsgrad gemacht werden.

Die schon angesprochenen Tendenzen der CGH-Profile, in Form von deutlicher Annäherung an oder ein Verlauf entlang der Grenzlinie brachte in den FISH-Experimenten verschiedene Ergebnisse: in einem Fall wurde ein Ratio-Mittelprofil entlang der oberen Grenze noch mit $n=2,05$ Signalen erfaßt (Pat. Nr. 28, Karyogramm in Abb. 17b., S. 74), in anderen Fällen, allerdings nur bei den aneuploiden Patientinnen, wurden die Tendenzen durch das FISH-Ergebnis bestätigt. Eine Bewegung der CGH-Profile in Richtung Unterrepräsentation wurden von der FISH in zwei Fällen noch als diploid erkannt (Fall

Nr. 27 und 119), in drei anderen untersuchten Loci (Fall Nr. 87, 113 und 123) wurde ein Verlust dieser Region durch die FISH deutlich.

In einer Untersuchung (Pat. Nr. 14, Probe 6p) verlief das Fluoreszenz-Profil nur im oberen Teil des 6p-Armes links von der unteren Schwelle und kehrte dann zu der Grundlinie zurück (Karyogramm in Abb. 16a, S. 73). Die korrespondierende FISH ermittelte einen normalen Karyotyp für den p-Arm von Chromosom 6.

In der Tabelle 12 auf Seite 78 sind alle Ergebnisse der FISH-Analysen mit einem Vergleich zu den CGH-Daten aufgelistet.

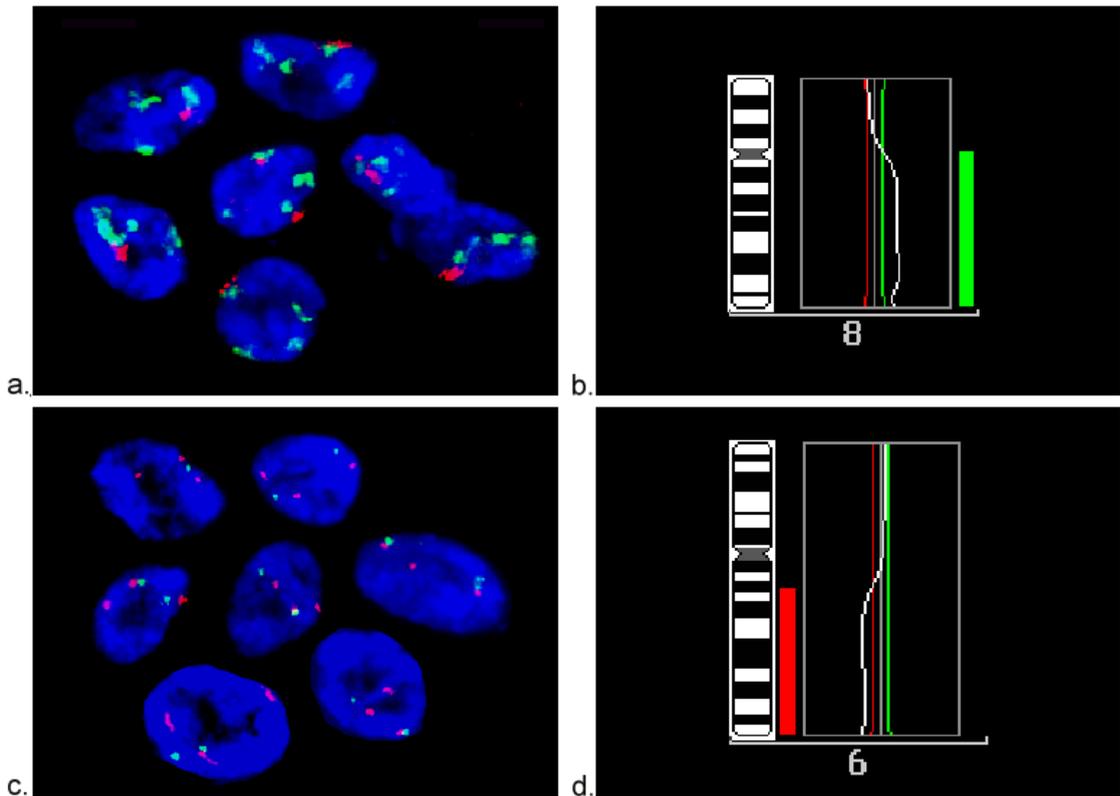


Abb. 18-1: a. Patientin Nr. 24: FISH mit Proben 8p/8q24 (g/r) und b. dem dazugehörigen CGH-Ratio-Profil; c. Patientin Nr. 27 (aneuploid): Dual-Farben FISH mit den Proben 6 Zentromer und 6q23.3 (HG3: r/g) und d. dem Ratio-Profil der CGH

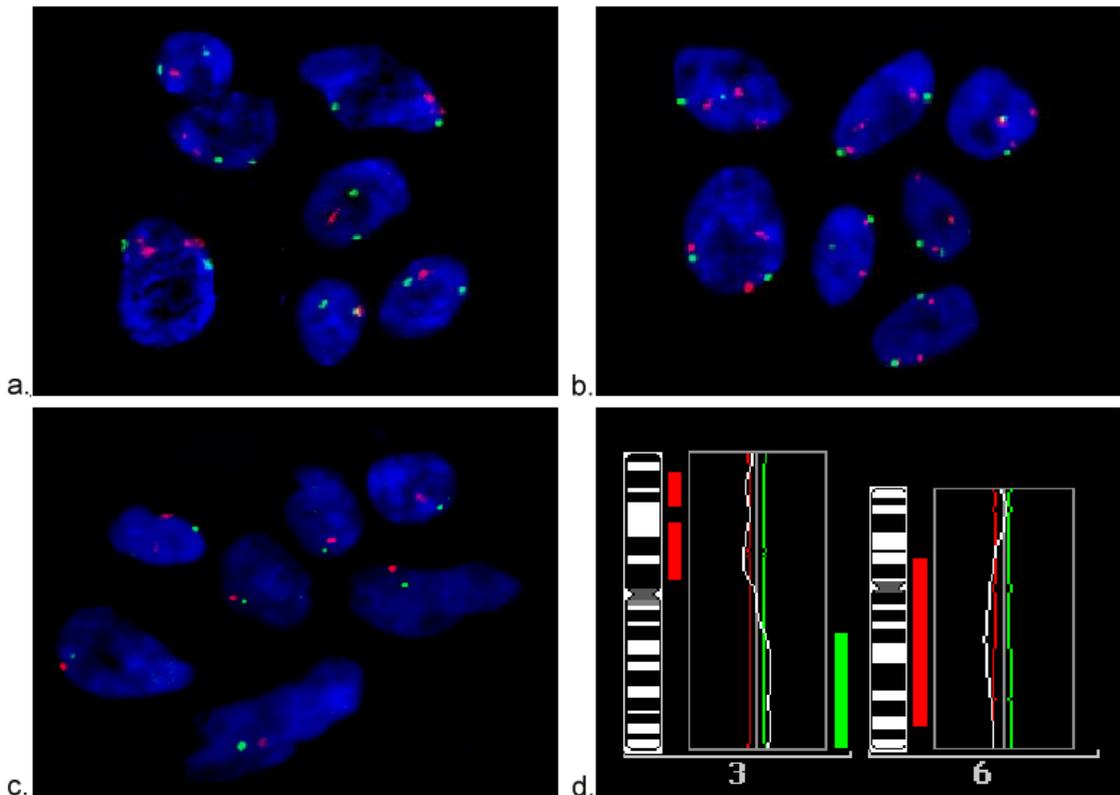


Abb. 18-2: Patientin Nr. 28: Zwei-Farben FISH mit folgenden Proben: a. 3p21/ Yac 3 (r/g: 1:2); b. Yac 2/ Yac3 (r/g: 3:2) und c. 6 Zentr. und 6q23.3 (HG3: r/g: 1:1); d. Ratio-Profil der CGH von Chromosom 3 und 6

Tabelle 12: Gesamtübersicht aller durchgeführten FISH-Analysen mit den zugehörigen CGH-Ergebnissen und ein Vergleich dieser Daten

Patientin Nr.	Fall Nr.	Chromosom	FISH-Probe	durchschnittlich gezählte Signale n=	CGH	Vergleich FISH - CGH
14	1	3p	p21	1.94	✓	=
	2	3q	Yac 1	3.32	+	=
	3		Yac 2	3.67	+	=
	4		Yac 3	3.13	+	=
	5	6p	p	1.96	✓ / -	(=)
	6	6c	Sat.	2.16	✓	=
	7	6q	HG 3	1.32	-	=
	8		HG 4	1.34	-	=
	9	8p	p	1.30	✓	=
	10	8c	Sat.	2.06	✓	=
	11	8q	q24	2.13	+	<
	12	12c	Sat.	2.14	✓	=
	13	18c	Sat.	1.95	✓	=
15	14	3p	p	2.07	✓	=
	15	3q	Yac 1	1.97	✓	=
	16		Yac 2	2.11	✓	=
	17		Yac 3	2.12	✓	=
	18	6p	p21	2.04	(✓)	=
	19	6c	Sat.	2.04	✓	=
	20	6q	HG 1	2.02	✓	=
	21		HG 3	2.25	✓	>
	22	8p	p	1.85	+	<
	23	8c	Sat.	1.98	+	<
	24	8q	q24	2.04	+	<
	25	12c	Sat.	2.03	✓	=
	26	18c	Sat.	1.97	✓	=
18*	27	3p	p	2.15	✓ (-)	=
	28	3q	Yac 1	3.44	+	=
	29		Yac 2	3.68	+	=
	30		Yac 3	3.54	+	=
	31	6p	p21	3.21	✓ (+)	>
	32	6c	Sat.	3.20	✓	>
	33	6q	HG 1	3.63	✓	>
	34		HG 2	2.86	✓	>
	35	8p	p	2.33	✓	>
	36	8c	Sat.	2.63	✓	>
	37	8q	q24	3.04	+	=
	38	12c	Sat.	3.15	✓	>
	39	18c	Sat.	3.04	✓	>
20	40	3p	p21	2.07	✓	=
	41	3q	Yac 1	2.88	+	=
	42		Yac 2	2.17	✓	=
	43		Yac 3	2.06	✓	=
	44	6p	p21	2.21	✓	(=)
	45	6c	Sat.	2.18	✓	=
	46	6q	HG 1	2.19	✓	=
	47		HG 3	2.12	✓	=
	48	8p	p	1.93	✓	=
	49	8c	Sat.	2.00	✓	=
	50	8q	q24	2.39	+	=
	51	12c	Sat.	2.10	✓	=
	52	18c	Sat.	2.12	✓	=

Patientin Nr.	Fall Nr.	Chromosom Nr.	FISH-Probe	durchschnittlich gezählte Signale n=	CGH	Vergleich FISH/CGH
22*	53	3p	p21	3.28	+	=
	54	3q	Yac 1	2.81	+	=
	55		Yac 2	3.54	+	=
	56		Yac 3	3.68	+	=
	57	6p	p	2.60	✓	>
	58	6c	Sat.	3.68	✓	>
	59	6q	HG 1	1.91	-	>
	60		HG 2	2.18	-	>
	61		HG 3	2.12	-	>
	62		HG 4	2.11	-	>
	63	8p	p	1.92	-	>
	64	8c	Sat.	3.69	✓	>
	65	8q	q24	3.32	✓ (+)	>
	66	12c	Sat.	2.91	✓	>
	67	18c	Sat.	2.76	✓	>
23	68	3p	p21	1.98	✓	=
	69	3q	Yac 1	2.08	✓	=
	70	6p	p21	1.96	✓	=
	71	6c	Sat.	2.00	✓	=
	72	6q	HG 1	1.99	✓	=
	73		HG 2	2.01	✓	=
	74	8p	p	1.88	✓	=
	75	8c	Sat.	1.92	✓	=
	76	8q	q21.3	2.11	✓	=
	77	12c	Sat.	2.07	✓	=
	78	18c	Sat.	2.05	✓	=
24	79	3p	p21	2.14	✓	=
	80	3q	Yac 1	2.97	+	=
	81		Yac 2	2.20	✓	=
	82		Yac 3	2.10	✓	=
	83	6p	p21	2.09	✓	=
	84	6c	Sat.	2.10	✓	=
	85	6q	HG 1	2.08	✓	=
	86		HG 4	2.01	✓	=
	87	8p	p	1.65	✓ (-)	<
	88	8c	Sat.	2.15	✓ (+)	=
	89	8q	q21.3	3.72	+	=
	90	8q	q24	2.60	+	=
	91	12c	Sat.	2.11	✓	=
	92	18c	Sat.	2.10	✓	=
27*	93	3p	p21	3.29	✓	>
	94	3q	Yac 1	2.75	✓	>
	95		Yac 2	3.63	✓	>
	96		Yac 3	2.53	✓	>
	97	6p	p21	3.09	✓ (+)	>
	98	6c	Sat.	3.06	✓	>
	99	6q	HG 1	2.05	-	>
	100		HG 2	2.06	-	>
	101		HG 3	2.04	-	>
	102		HG 4	2.03	-	>
	103	8p	p	1.96	-	>
	104	8c	Sat.	3.83	+	=
	105	8q	q24	3.69	+	=
	106	12c	Sat.	2.04	-	>
	107	18c	Sat.	2.88	✓	>
	108	18q	q21.3	1.18	-	=

Patientin Nr.	Fall Nr.	Chromosom Nr.	FISH-Probe	durchschnittlich gezählte Signale n=	CGH	Vergleich FISH/CGH	
28	109	3p	p21	1.72	-	=	
	110	3q	Yac 1	2.23	+	=	
	111		Yac 2	2.62	+	=	
	112		Yac 3	1.94	✓	=	
	113	6p	p21	1.75	✓ (-)	<	
	114	6c	Sat.	1.55	-	=	
	115	6q	HG 1	1.55	-	=	
	116		HG 2	1.59	-	=	
	117		HG 3	1.55	-	=	
	118		HG 4	1.84	✓	=	
	119	8p	p	1.92	✓ (-)	=	
	120	8c	Sat.	2.05	✓ (+)	=	
	121	8q	q24	3.01	+	=	
	122	12c	Sat.	2.17	✓	=	
	123	18c	Sat.	1.49	✓ (-)	<	
	29*	124	3p	p	3.74	+	=
		125	3q	Yac 1	2.53	+	=
		126		Yac 2	3.78	+	=
		127		Yac 3	3.66	+	=
128		6p	p21	2.72	+	=	
129		6c	Sat.	3.81	+	=	
130		6q	HG 1	2.91	✓	>	
131			HG 2	3.00	✓	>	
132			HG 3	2.47	✓	>	
133			HG 4	2.85	✓	>	
134		8p	p	2.06	-	>	
135		8c	Sat.	3.22	+	=	
136		8q	q24	3.48	+	=	
137		12c	Sat.	2.82	✓	>	
138		18c	Sat.	3.19	✓	>	
139		18q	q21.3	2.84	✓	>	

Symbole: ✓:CGH ermittelte einen diploiden (normalen) Karyotyp; (+): Ratio-Profil-Tendenzen in Richtung Amplifikation oder (-): Deletion; =: FISH in Übereinstimmung mit CGH-Ergebnis; >: FISH ergab einen höheren oder < geringeren Ploidiegrad als die CGH; (=): zweigeteiltes CGH-Ergebnis, FISH in einem Teil in Übereinstimmung; *: aneuploide Patientin;

5. Diskussion

Die CGH bietet im Vergleich zu den konventionellen molekulargenetischen Methoden die Möglichkeit, ohne vorherige Kenntnisse in einem einzigen Hybridisierungs-Experiment chromosomale Aberrationen im Gesamtgenom zu detektieren und auch zu lokalisieren. Trotz einiger Limitationen (geringe Sensitivität, keine Erfassung von balancierten Chromosomen-Rearrangements und des Ploidie-Grades) ist die CGH bei der Analyse solider Tumoren von Bedeutung, da diese Tumoren selten kultivierbar sind und kaum brauchbare oder einfach zu karyotypisierende Metaphase-Präparationen liefern. Zudem kann es während der Zellkultivierung zu weiteren Veränderungen kommen, so daß nicht mehr der Ursprungsklon repräsentiert wird. Daher kann gerade mit Hilfe der CGH, unter Umgehung der Zellkultur und zudem mit nur geringen Mengen an DNA, ein erster Einblick über Genomalterationen gewonnen werden.

Die CGH gibt meistens Hinweise auf mögliche Tumorsuppressorgene in häufig deletierten Bereichen oder auf mutmaßliche Proto-Onkogene in bestimmten, auffällig oft amplifizierten Regionen, wenn man die erhaltenen Daten unter Berücksichtigung des Ploidie-Grades richtig deutet.

Neues Wissen über tumor-spezifische Alterationen kann bei der Diagnose, Prognose, und der Therapie der Krebserkrankung hilfreich sein und zum Verständnis der Tumorentstehung und deren Progression beitragen.

5.1. Unzulänglichkeiten der CGH und der FISH

Zu den Limitationen der CGH zählt zum einen die geringe Sensitivität. Erfasst werden nur relative Veränderungen der Kopienzahl zueinander, aber keine Gewinne oder Verluste ganzer Chromosomensätze, z. B. Tri- oder Tetraploidien, oder Polysomien der Mehrzahl der Chromosomen. Genauso wenig werden strukturelle Veränderungen, wie z. B. balancierte Translokationen, Insertionen oder Inversionen detektiert (Kallioniemi et al., 1994).

Die untere Auflösungsgrenze liegt bei 5-10 Mb (Cher et al., 1994; Bentz et al., 1995 und 1998), da auch die Spreitung der Chromosomen einen limitierenden Faktor darstellt.

Eine Überrepräsentation bestimmter Gene oder chromosomaler Abschnitte kommt oftmals in Form von sogenannten Amplicons (Amplifikationseinheiten) vor. Diese zeigen

sich als '*homogeneous staining regions*' (hsr) in den Chromosomen oder in Form von kleinen extrachromosomalen Strukturen, den sogenannten *double minutes* (dmins; Lengauer et al., 1998). In einer Studie von McGill et al. (1993) wurden in Zellkulturen (mindestens 6-24 Stunden Kulturzeit) von OvCa.-Material in 88% der Fälle dmins gefunden.

Da die CGH nur Vervielfältigungen von DNA-Bereichen erfaßt, welche eine Größe von mehr als 5 Mb besitzen, und kleinere Bereiche, einschließlich einer Größe von 2 Mb nur erkennt, wenn sie mindestens 5-10fach amplifiziert vorliegen (Kallioniemi et al., 1992 und 1994; Bentz et al., 1998; Kirchhoff et al., 1999) und die Metaphase-Chromosomen optimal gestreckt sind, können einige kleinere überzählige Bereiche, wie z. B. dmins, von der CGH evtl. nicht erfaßt werden.

In den am häufigsten von Amplifikationen betroffenen Regionen vermutet man potentielle Proto-Onkogene. Daher sind genauere Untersuchungen über mögliche weitere Amplicons unabhängig von der CGH anzuraten.

Die gleichen Limitationen gelten für Deletionen. Verluste kleinerer Bereiche werden von der CGH ebenfalls nicht detektiert. Chromosomale Imbalancen werden zudem nur erfaßt, wenn sie in dem zu untersuchenden Material mehrfach vorkommen. In dem CGH-Profil wird nur der Klon eines Tumors oder die Veränderungen dargestellt, die mit einem Anteil von mehr als 35% im Tumormaterial vorliegen. Eine mögliche klonale Heterogenität des Tumors wird dagegen nicht erkannt (Schröck et al., 1994; Joos et al., 1995). Desweiteren können sich Aberrationen verschiedener Klone eines Tumors in der CGH evtl. gegenseitig aufheben. Genauso kann bei einer DNA-Präparation von Tumormaterial DNA aus benachbartem Normalgewebe oder infiltrierten Immunzellen mit isoliert werden und dadurch die Aussage der CGH verfälschen (Schröck et al., 1994).

Methodische Artefakte betreffen vor allem die heterochromatischen Regionen (Kallioniemi et al., 1994; Joos et al., 1995; Mohapatra et al., 1997; Nielsen et al., 1997; Sonoda et al., 1997; Nacheva et al., 1998). Eine ungenügende Absättigung mit C_{0t-1} DNA führt in der CGH zu Ratio-Profilen mit starken Ausschlägen, die meist Amplifikationen vortäuschen. Ebenso davon betroffen sind die Telomer-Bereiche, die zudem in einigen Fällen eine graduelle Abnahme der Fluoreszenz-Intensitäten in Richtung der Chromosomenenden zeigen können. Dann besteht die Gefahr, die Chromosomen-Enden bei der Festlegung der Grenzen für die Karyotypisierung nicht vollständig zu berücksichtigen (Bentz et al., 1998).

Die Genauigkeit der von der CGH gefundenen Grenzen der aberranten Regionen ist aufgrund variabler Chromosomenlängen in den verschiedenen Metaphasen nicht hundertprozentig (Bentz et al., 1998) und wird zudem noch durch die über die betroffene Region hinausstrahlenden Fluoreszenz-Signale beeinflusst.

Bei der FISH können Zentromer-Proben im Vergleich mit Ergebnissen der CGH zu widersprüchlichen Aussagen führen. Die in diesen Regionen zu findenden tandemartigen Repetitionen sich wiederholender Sequenzen können schon von den Eltern her eine unterschiedliche Länge aufweisen. Unterschreiten diese Abfolgen eine kritische Länge, fallen die Signale der gebundenen FISH-Proben unter die Grenze der Detektierbarkeit. Das Ergebnis würde auf eine Monosomie dieses Bereiches hindeuten (Harrison und Ross, 1998). Eine gleichzeitige Verwendung einer weiteren Probe mit unterschiedlicher Lokalisation umgeht das Problem. Bei der Durchführung der FISH-Experimente im Rahmen dieser Studie wurden in der Mehrzahl der Untersuchungen bei der Verwendung von Zentromer-Proben (Ausnahme Chromosom 12) weitere distal gelegene Sonden unterschiedlicher Markierung eingesetzt.

Eine weitere Fehlerquelle können zu große FISH-Sonden darstellen, wie z. B. die eingesetzten Proben 3p, 6p und 8p. Wenn diese Marker einen Bruchpunkt überspannen, in dem Material verloren ging, geben sie durch ihre Bindung an den noch vorhandenen Teil ein Hybridisierungssignal und täuschen einen normalen Karyotyp vor. Ist allerdings dieser noch zur Verfügung stehende chromosomale Abschnitt zu klein, werden die FISH-Proben bei stringenten Waschbedingungen entfernt und geben kein Signal. Diese Ungenauigkeiten ergeben sich auch im Fall von Amplifikationen. Es sollten daher die Ergebnisse der großen Proben mit kleineren Sonden wiederholt werden, um eine genauere Bruchpunktanalyse zu ermöglichen. Diese Arbeit steht noch aus.

5.2. Genomische Veränderungen beim Ovarialkarzinom

Das Ergebnis dieser Studie zeigt beim OvCa. in der Mehrzahl einen komplexen Karyotyp. Numerische Alterationen, chromosomale Instabilität und allelische Verluste sind häufig beim OvCa. zu finden (Orth et al., 1994). Am meisten betroffen ist Chromosom 17, sowohl in geringgradigen, wie auch in hochgradigen Tumoren, mit einer LOH-Rate von 50% - 90% in den untersuchten Fällen (Eccles et al., 1990; Lee et al., 1990; Russell et al., 1990; Narod et al., 1991; Jacobs et al., 1992; Pieretti et al., 1995 a, b; Papp et al.,

1996; Wertheim et al., 1996). Eine Deletion von 17q21 mit dem BRCA1-Gen ist am häufigsten bei familiären Formen von OvCa. zu beobachten (Narod et al., 1991), während in sporadischen, aber auch in familiären Formen 17p, einschließlich des p53-Gens (17p13.1) und distale Regionen am stärksten betroffen sind (Godwin et al., 1994).

Ein Verlust des gesamten Chromosom 17 ist oftmals ein frühes Ereignis bei der Entwicklung des OvCa. (Tavassoli et al., 1993). Dieses läßt die Vermutung zu, daß neben den eben beschriebenen noch weitere Gene auf diesem Chromosom von Bedeutung sind.

Andere, vielfach aberrante Chromosomen sind in verschiedenen Untersuchungen, bei Karyotypisierungen, LOH-Analysen und CGH aufgefallen und können relevante Gene beherbergen: 3p (Ehlen und Dubeau, 1990; Rimessi et al., 1994), Chromosom 6 (Lee et al., 1990; Foulkes et al., 1993a; Orphanos et al., 1995; Cooke et al., 1996; Saito et al., 1996), Chromosom 7 (Kerr et al., 1996), Chromosom 9 (Schultz et al., 1995; Devlin et al., 1996), Chromosom 11 (Lee et al., 1990; Eccles et al., 1992a; Viel et al., 1992; Foulkes et al., 1993c; Kiechle-Schwarz et al., 1993; Rimessi et al., 1994; Gabra et al., 1995; Davis et al., 1996; Lu et al., 1997), Chromosom 13 (einschließlich Mutationen von BRCA2, aber ohne Beteiligung vom RB-Gen; Yang-Feng et al., 1992; Kim et al., 1994), 18q (einschließlich eines Locus unabhängig von DCC; Chenevix-Trench et al., 1992; Arnold et al., 1996), Chromosom 19 (Kiechle-Schwarz et al., 1994), 22q (Bryan et al., 1996) und Xp (Yang-Feng et al., 1992).

Eine Liste von vielfach betroffenen chromosomalen Regionen mit involvierten bekannten Genen ist in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: Chromosomen, die beim Ovarialkarzinom häufig von Veränderungen betroffen sind und einige Gene dieser Regionen

Chromosom	beim OvCa. auffällige Chr. und Chr.-Bereichen, darin lokalisierte vermutlich relevante Gene und tw. deren Expressionsmuster und Modifikationen
1p	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Verlust von Chr. 1 in Kurzzeit-Kultur (Kiechle-Schwarz et al., 1995) ◆ Bruchpunkt in 1p1, mgl. assoziierte Gene: GST, VAV, RHOC, RAPIA, NRAS, GNATZ, GSTM2, GSTM4, GSTM5, NGFM, P73, PITSLRE (Taetle et al., 1999a) ◆ 1p12: NRAS: zu 44 % amplifiziert (Bian et al., 1995) ◆ 1p31: NOEY2 (ARHI): LOH bei 41%, TSG mit maternalem imprinting (Yu et al., 1999) ◆ Verlust von 1p36, sowie ein Translokationsbruchpunkt bei 1p36: t(1;17)(p36;?) (Thompson et al., 1997)
1q	◆ amplifiziert in Kurzzeitkulturen (Thompson et al., 1994b)
2q	◆ 2q24-q32: amplifiziert bei familiärem OvCa., dagegen bei sporadischer Form unauffällig (Tapper et al., 1998)
3p	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Bruchpunkt in 3p1, mgl. assoziierte Gene: FHIT, TRX, PTPRG, ETK1, GPRI5, POU1F1 (Taetle et al., 1999a) ◆ 3p21: CTNNB1 beim endom. OvCa. mutiert, führt zu einer erhöhten Expression (Palacios und Gamallo, 1998) ◆ 3p24-p24.2 und 3p21.1-p21.2: Transformationsexperimente in Zelllinien: mögliche TSG (Rimessi et al., 1994)
3q	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 3q26: EVI-1: amplifiziert und überexprimiert (Brooks et al., 1996) ◆ 3q26: PIK3CA: amplifiziert und überexprimiert (Shayesteh et al., 1999) ◆ 3q26: amplifiziert, evtl. hTR betroffen (Sugita et al., 2000)
4q	◆ 4q16 amplifiziert (Guan et al., 1995)
5p	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 5p13: DOC2: Unterexprimiert, vermutliches TSG, Teil des später identifizierten Dab2 (Mok et al., 1998) ◆ 5p13: Dab2: Inaktivierung ein früher Prozeß beim OvCa. (Fazili et al., 1999)
6p	◆ LOH: mgl. TSG auf 6p (Foulkes et al., 1993a)
6q	<ul style="list-style-type: none"> ◆ häufiger LOH beim OvCa. (Lee et al., 1990) ◆ LOH (6q24-qter); ESR (Foulkes et al., 1993a) ◆ 6q14-q21: SEN6A: Seneszenz-Gen ? (Sandhu et al., 1996) ◆ 6q23.3: LOH, mgl. TSG (Shridhar et al., 1999) ◆ 6q25: LOH bei 38%: LOT1 (Zink-Finger-Gen) mgl. TSG (Abdollahi et al., 1997 und 1999) ◆ 6q24-q25: LOH in Zelllinien, mgl. TSG (Wan et al., 1999) ◆ 6q25.1-q25.2: LOH bei 44% (Colitti et al., 1998) ◆ 6q26-q27: SEN6 Gen (Banga et al., 1997) ◆ 6q27: LOH (Saito et al., 1996) ◆ 6q27 häufig mutiert, frühe Veränderung beim OvCa. (Tibiletti et al., 1996 und 1998)

Chromosom	beim OvCa. Auffällige Chr. Und Chr.-Bereichen, darin lokalisierte vermutlich relevante Gene und tw. Deren Expressionsmuster und Modifikationen
7	<ul style="list-style-type: none"> ◆ amplifiziert in Kurzzeit-Zellkulturen (Thompson et al., 1994b) ◆ Trisom/Tetrasom (Engel et al., 1998) ◆ 7q: Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PLANH1; Kerr et al., 1996) ◆ 7q31.1: LOH bei 50%, mgl. TSG mit bedeutender Rolle beim OvCa.(Koike et al., 1997) ◆ 7q31: c-met: Überexpression (Huntsman et al., 1999)
8p	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 8p: LOH, drei kritische Regionen (Wright et al., 1998) ◆ 8p: häufig LOH (in vielen Tu.), mgl. TSG bei 8p22-p23, unabhängig von DLC1 (Wilson et al., 2000) ◆ 8p21: LOH bei 50%, mgl. TSG (Brown et al., 1999) ◆ gesamtes Chr. 8 amplifiziert (Persons et al., 1993)
8q	<ul style="list-style-type: none"> ◆ hsr: 8q24 involviert (Abeysinghe et al., 1999); ◆ c-MYC (8q24.12-q24.13) Amplifikation und Überexpression gefunden durch PCR, Southern blots und Northern blots; (Kohler et al., 1989; Baker et al., 1990; Sasano et al., 1990; Schreiber und Dubeau, 1990; Tashiro et al., 1992; Bauknecht et al., 1993) ◆ c-MYC zu 50% amplifiziert (Bian et al., 1995)
9p	<ul style="list-style-type: none"> ◆ LOH von 9p (Chenevix-Trench et al., 1994) ◆ LOH von 9p21-p22 (=p16) in Zelllinien (Kamb et al., 1994) ◆ 9p21: Homozygot deletiert in Aszites beim OvCa., folgende bekannte Gene betroffen: CDKN2A (INK4A, MTS1, CDK41= p16 Protein), CDKN2B (INK4B, MTS2, =p15-Protein) (Watson et al., 1999)
11p	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 11p: häufiger LOH beim OvCa. (Lee et al., 1990; Thompson et al., 1994a, b) ◆ 11p15.1-p15.2: TSG101: verkürztes Transkript in 64% der Fälle (Carney et al., 1998) ◆ LOH korreliert mit schlechter Überlebenszeitrate (Eccles et al., 1992a)
11q	<ul style="list-style-type: none"> ◆ FGF3/INT2 (11q13) amplifiziert (Hruza et al., 1993; Lamie und Peters, 1991) ◆ 11q13: FGF3/INT2: LOH oder amplifiziert (Foulkes et al., 1993c) ◆ 11q13: in hsr gefunden (Guan et al., 1995) ◆ [11q13: CCND1/PRAD1(BCL-1) amplifiziert und überexprimiert in verschiedenen soliden Tumoren, ohne OvCa. (Hosokawa und Arnold, 1998)] ◆ 11q13.3-q13.5: FOLR1: Folat-Rezeptor überexprimiert (Foulkes et al., 1993c) ◆ 11q22.3-q25: LOH assoziiert mit Aggressivität des Tumors (Launonen et al., 1998) ◆ 11q23.3-qter: LOH, bei 11q23.3 ein mgl. TSG (Foulkes et al., 1993c) ◆ 11q23: LOH bei 44%, ATM zeigt keine Veränderungen, distaler Locus ? (Koike et al., 1999) ◆ 11q: Amplifikation ohne eine beobachtbare Korrelation mit der Überlebenszeitrate der Patientinnen (Medl et al., 1995)

Chromosom	beim OvCa. auffällige Chr. und Chr.-Bereichen, darin lokalisierte vermutlich relevante Gene und tw. deren Expressionsmuster und Modifikationen
12	<ul style="list-style-type: none"> ◆ gesamt amplifiziert (Persons et al., 1993) ◆ Trisomie 12 (Pejovic et al., 1990; Yang-Feng et al., 1991; Kiechle-Schwarz et al., 1991) ◆ Amplifikation in Kurzzeit-Zellkulturen (Kiechle-Schwarz et al., 1995) ◆ 12p12.1 (KRAS) amplifiziert (Filmus et al., 1986) ◆ 12p12.1: in hsr gefunden (Guan et al., 1995) ◆ 12p12.3-p13.1: TEL und Kip1, neue TSG?: LOH (Hatta et al., 1997) ◆ 12q23-qter: LOH, mögliche TSG (Hatta et al., 1997) ◆ KRAS zu 23% mutiert in Codon 12, keine Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern (Varras et al., 1999) ◆ KRAS mutiert in Codon 12 bei 2 von 6 Pat. (33%), Korrelation zu malignem Potential der Neoplasie (Haas et al., 1999) ◆ KRAS zu 31% mutiert (Bian et al., 1995)
13q	<ul style="list-style-type: none"> ◆ LOH von verschiedenen Markern, tw. in Assoziation mit wenig differenziertem OvCa., tw. mit hochgradigem (Cliby et al., 1993; Dodson et al., 1994; Kim et al., 1994); ◆ 13q22-q31 kleinster deletierter Bereich mit mgl. TSG, da Region distal von RB und BRCA2 (Tapper et al., 1997)
14q	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 14q12-q13 und 14q32: LOH, mgl. TSG (Bandera et al., 1997) ◆ 14q32:LOH: p27KIP1: keine Expression des Proteins, Korrelation mit Krankheitsverlauf (Masciullo et al., 1999)
15q	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 15q15 und 15q22 amplifiziert (Guan et al., 1995)
16p	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 16p11-13.2 amplifiziert, in hsr (Guan et al., 1995)
16q	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 16q21 und 16q24 amplifiziert (Guan et al., 1995)
+17	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Trisom (Engel et al., 1998) ◆ 17q21-q22 (ERBB2) amplifiziert (Zheng et al., 1991; King et al., 1992; Persons et al., 1993; Young et al., 1996) ◆ 17q21-q22 HER2/ ERBB2/NEU in 25-30% beim OvCa. amplif. und überexprimiert; korreliert mit Aggressivität des Tu. und geringerer Überlebenszeitrate (Slamon et al., 1989; Berchuck et al., 1990 und 1994a) ◆ HER2/ ERBB2/NEU: keine Korrelation zwischen Überexpression und klinischem Verlauf (Meden und Kuhn, 1997; Ross et al., 1999) ◆ ERBB2: keine Amplifikation gefunden (Tavassoli et al., 1993)
-17	<ul style="list-style-type: none"> ◆ häufiger LOH (bis zu 77%, bzw. 50%) beim OvCa. (Lee et al., 1990; Berchuck et al., 1994a) ◆ LOH bei serösen und endom. OvCa. (Pieretti et al., 1995a, b) ◆ 17p13.1: p53 (Tsao et al., 1991; Mazars et al., 1991) p53 zu 50% bzw. 80% mutiert / deletiert (Okamoto et al., 1991; Sheridan et al., 1993) Gen-Verlust ohne klinische Korrelation (Wang et al., 1999)

Chromosom	beim OvCa. auffällige Chr. und Chr.-Bereichen, darin lokalisierte vermutlich relevante Gene und tw. deren Expressionsmuster und Modifikationen
-17	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 17p13.3: OVCA1 (DPH2L), LOH bei 80%, geringe Expression, mgl. TSG (Schultz et al., 1996; Bruening et al., 1999) ◆ Hypermethylierung von 17p13.3 (Pieretti et al., 1995c) ◆ 17q21: Plakoglobin-Gen (Aberle et al., 1995) ◆ 17q21.3: NM23 (NME1/NME2) LOH bei 21,7%, keine klinische Korrelation (Mandai et al., 1995) ◆ 17q21-q22: BRCA1 (Smith et al., 1992) Verminderte Expression von BRCA1 (Zheng et al., 2000) ◆ 17q25: allelischer Verlust bei mehr als 50% (Kalikin et al., 1997) ◆ Verlust des gesamten Chromosom 17 (Foulkes et al., 1991 und 1993b; Tavassoli et al., 1993; Persons et al., 1993; Pieretti et al., 1995a, b) ◆ Überexpression von p53 (17p13.1): <ul style="list-style-type: none"> - bei LOH von 17p (Eccles et al., 1992b,c) - korreliert mit schlechterer Prognose (Bosari et al., 1993) - bei invasivem OvCa., dagegen normal bei benignen und Borderline-Tumoren (Chan et al., 2000)
18	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 18q21-qter: DCC: LOH und verminderte Expression korrelieren mit Tumorstadium (Saegusa et al., 2000)
19q	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Amplif. von AKT2 (19q13.1-q13.2) (Cheng et al., 1992); ◆ Amplif. in Form von hsr von 19q13.1-q13.2 (Guan et al., 1995) ◆ hsr 19q13.1-q13.2: AKT2, ERCC2; Überexpression von AKT2 (Serin/Threonin-Kinase) gefunden, ERCC-2 (DNA-Reparatur Gen) dagegen unauffällig (Thompson et al., 1996) ◆ 19q13.2-q13.4: ERCC1, ERCC2, LIG1: LOH bei 53% (Bicher et al., 1997) ◆ 19q13: TADG14 (Kallikrein 8): Protein überexprimiert (Underwood et al., 1999)
20	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 20q11.2-q13.1: MMP9, Aktivierung des Proteins durch c-ras und FAK in Zellkultur (Shibata et al., 1998) ◆ 20q12-q13.13: AIB1: amplifiziert und überexprimiert (Anzick et al., 1997) ◆ 20q13: in wenigen Fällen amplifiziert (3,8%) (Courjal et al., 1996)
22q	<ul style="list-style-type: none"> ◆ LOH bei 53%, 2 mgl. TSG-Loci (Bryan et al., 1996)
X	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Verlust von X bei Kurzzeitkulturen (Kiechle-Schwarz et al., 1995) ◆ Xp: Ornithin-Transcarbamylase-Gen (Yang-Feng et al., 1992) ◆ Xq: LOH bei Kurzzeitkulturen (Thompson et al., 1994a)

5.3. Auswertung der CGH

Anhand von Kontrolluntersuchungen mit Normal-DNA wurden die kritischen Regionen aufgezeigt, deren Ergebnisse nur bedingt aussagekräftig sind. Hierzu zählen vor allem die heterochromatischen und deren unmittelbar angrenzende Bereiche, die in einigen Fällen methodisch bedingt zu einer Überrepräsentation neigen. Amplifikationen in den Zentromer-Regionen der Chromosomen 1, 9 und 16 wurden daher nicht bewertet (s. S. 49).

Die Beobachtung, daß auch schon eine Verschiebung des Ratio-Kurvenverlaufes in Richtung der Grenzwerten eine mögliche Aberration dieses Bereiches anzeigt, ist gerade bei Einzeluntersuchungen verschiedener Tumoren von Bedeutung. Hier sollte eine auffällige Tendenz in dem CGH-Profil mit weiteren zytogenetischen Methoden aufgeklärt werden, um möglichst alle Veränderungen in der Tumor-DNA zu erfassen.

In einem größeren Kollektiv, bei mehrfachen Wiederholungen erübrigt sich diese tendenzielle Sichtung, da aufgrund der relativen Häufigkeiten alle Aberrationen erfaßt werden sollten. Dieses zeigte sich in dieser Arbeit in dem Vergleich von tendenzieller und sicherer Sicht, die sich besonders in der Häufigkeit der aufgetretenen Alterationen, aber nur geringfügig in der Reihenfolge der am meisten involvierten Chromosomen unterschieden. In der folgenden Diskussion werden daher nur die Ergebnisse der sicheren Sichtung aufgeführt.

5.4. Ergebnisse der CGH

5.4.1. Vergleich der CGH-Ergebnisse mit anderen CGH-Studien

Es zeigte sich bei dem untersuchten Material ein sehr komplexer Karyotyp, gekennzeichnet durch vielfache Aberrationen verschiedener Chromosomen. In 88,5% der Fälle (bei 46 der 52 malignen Tumoren) waren eine, bis hin zu 37 chromosomalen Veränderungen zu verzeichnen. In sechs DNA-Proben wurden mit der CGH keine Aberrationen gefunden. Dieses könnte an der geringen Sensitivität der Methode liegen. Weitere Untersuchungen zu möglichen Mutationen auf der Genebene und Analysen zu dem Expressionsstatus tumorrelevanter Proteine könnten in diesen Fällen helfen, die Tumorentstehung und Progression zu klären. Im Durchschnitt fanden sich bei den malignen Tumoren (Primär- und Rezidiv-Tumoren) bei getrennter p- und q-Arm Auswertung ein

ANCA-Wert (durchschnittlich beobachtete Anzahl der Veränderungen) von 16,3 ($\pm 10,3$). Im Gegensatz dazu lagen die Werte der benignen und der Borderline-Tumoren bei sicherer Sicht mit 6,5 ($\pm 7,3$) bzw. 1,1 ($\pm 1,4$) deutlich darunter. Es zeigte sich bei einer Patientin (Nr. 5) aus der Gruppe der benignen Tumoren insgesamt 17 Aberrationen (16 Amplifikationen, eine Deletion), daher der relativ hohe ANCA-Wert. Unter Ausschluß dieser Patientin läge der berechnete ANCA-Wert bei $3,0 \pm 2,5$. Im Fall der Patientin Nr. 5 könnte man eine falsche histologische Einordnung des Tumors vermuten. Das Gewebepräparat sollte daher nochmals begutachtet werden. Es wäre allerdings auch möglich, daß dieser benigne Tumor einen Übergang zu einem LMP- oder einem malignen Tumor darstellt, aber nach histologischen Gesichtspunkten noch der benignen Form zuzuordnen ist.

Bei zehn der 52 malignen Tumoren überwogen die Deletionen. In einem Fall lag die Differenz zwischen Deletion und Amplifikation bei elf (14 Deletionen, drei Amplifikationen), wohingegen die Differenz sonst bei maximal vier lag. Die Patientin, bei der diese große Differenz auffiel, gehörte in die Gruppe der serösen G3-Tumoren, hatte allerdings mit 82 Jahren schon den Altersdurchschnitt der Gruppe von 60 Jahren weit überschritten. Ob dieser großen Verlust von genetischem Material auf einer Fehldeutung der CGH beruht, müßte durch zusätzliche Information über den Ploidie-Grad noch geklärt werden. Ansonsten lag die Anzahl der Amplifikationen höher als die der Deletionen, mit einem Verhältnis von 1,3:1. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Aussage von Tapper et al. (1997) und Arnold et al. (1996), die ebenso Amplifikationen häufiger beobachteten als Deletionen. Gegenteiliges fanden Mertens et al. (1997) bei einer Zusammenfassung der Ergebnisse verschiedener zytogenetischer Studien von Neoplasien heraus. In diesem Kollektiv, einschließlich OvCa., stellten sie bei allen Tumor-Arten mehr Deletionen als Amplifikationen fest, nicht aber bei Chromosom 1q, 7, 12q und 20, die häufiger amplifiziert waren. Da in den einbezogenen Arbeiten meist andere Methoden, z. B. LOH (*loss of heterozygosity*) oder konventionelle Karyotypisierungen, aber weniger die CGH angewendet wurden, kann diese diskrepante Aussage (mehr Deletionen als Amplifikationen) auf die unterschiedlichen Techniken zurückzuführen sein. Interessant ist der Befund von Mertens et al. (1997), daß im Gegensatz zu den anderen Tumoren beim OvCa. zumindest eine Kopie vom Chromosom 7 häufig fehlte. In der Kieler-Studie war 7q häufig überzählig (42,3%), 7p fehlte dagegen in 30,8% der Fälle.

Die von Iwabuchi et al. (1995) gemachte Beobachtung, daß bei den G3-Tumoren die ANCA-Werte höher lagen als bei den G1-Stadien, war in dieser Studie auch zu beobachten: ANCA-Werte: G3: 0-37 ($\bar{\emptyset}$ 17,3 \pm 9,7), G1: 0-27 ($\bar{\emptyset}$ 7,0 \pm 11,7). Aufgrund der geringen Zahl der G1-Fälle, nur fünf, im Gegensatz zu 47 G3-Tumoren, ist keine Bewertung möglich. Weitere Beobachtungen von Iwabuchi et al. wiesen auf eine Beteiligung des Chromosomabschnitts 17q21-pter an der Stabilität des Genoms hin, wie in der folgenden Diskussion noch weiter ausgeführt wird. Eine verringerte Kopienzahl dieses Bereichs führte zu einer größeren Anzahl von Aberrationen (ANCA-Wert: 19.2 \pm 6 gegenüber 3,4 \pm 5 in der Studie von Iwabuchi). In der Kieler-Studie zeigten nur acht Fälle einen Verlust dieser 17er-Region. Die Werte der Gesamt-Aberrationen lagen dabei zwischen 11 und 36, also auf einem mittleren bis hohen Niveau. Ebenso wenig zeigte sich in den Regionen von 3q25-q26 und 20q13 ein Zugewinn von genetischem Material bei den G1-Tumoren. Auch ein Verlust von 8q24 bei den G3-Tumoren (*late event*), wie von Iwabuchi beschrieben, war dieser Arbeit nicht zu entnehmen.

Eine statistische Korrelation zeigte sich nur bei einem Vergleich der gefundenen Häufigkeiten von Amplifikationen und Deletionen: je größer der Anteil an Amplifikationen, desto größer auch der Anteil an Deletionen im gleichen Fall (siehe Abb. 13, S. 64). Dieses ist möglicherweise unter der Annahme erklärbar, daß die Zelle über bestimmte Kontrollmechanismen in der Lage ist, die Anzahl der Chromosomen, bzw. den DNA-Gehalt möglichst konstant zu halten. Verluste in einigen Regionen würden durch Aufnahme zusätzlicher chromosomaler Bereiche 'ausgeglichen'. Da z. B. dmns kein Zentromer besitzen, können diese Strukturen bei der Mitose ungleichmäßig verteilt werden. Hierdurch wird die Grundlage für eine genetische Diversifikation gelegt (McGill et al., 1993). Eine wahrscheinliche Erklärung für die Korrelation von Amplifikationen und Deletionen ist jedoch die Annahme, daß bei einer erhöhten Instabilität des Genoms, gleichermaßen Verluste und Gewinne von genetischem Material zu verzeichnen sind.

Vergleichbare Häufigkeitsverteilungen bei Amplifikationen und Deletionen, wie sie diese Arbeit aufzeigt, sind auch schon in der Literatur beschrieben, und die in diesen Bereichen identifizierten Gene auf eine mögliche Tumorrelevanz hin analysiert worden. Eine vergleichende Auflistung verschiedener CGH-Untersuchungen mit Material von OvCa. ist in der Tabelle 14 auf der folgenden Seite wiedergegeben. Es wurde in der

Tabelle die Reihenfolge der ermittelten Amplifikationen und Deletionen aus der jeweiligen Studie in abnehmender Häufigkeit aufgelistet.

Differenzen in den beobachteten Häufigkeiten sind durch eine unterschiedliche Zusammensetzung (*Grading* und histologischer Subtyp) und Größe des Patientenkollektivs zu erklären. Bei Tapper et al. (1997) findet sich z. B. eine gleichmäßige Anzahl verschiedener Subtypen (je acht seröse, muzinöse und endometrioid). Ein weiterer Punkt ist ein Unterschied in der Setzung der Schwellenwerte. Festgelegte Signifikanz-Intervalle, wie z. B. in der Arbeit von Arnold et al. (1996), können methodisch bedingt weniger Aberrationen aufzeigen. In dieser Arbeit wurden die Grenzen auf Grundlage der individuellen Ratio-Werte der beteiligten Metaphasen für die CGH jeder Patientin neu berechnet.

Ein Vergleich der bisherigen CGH-Studien zeigte ähnliche Aberrationen, sowohl in den untersuchten Gruppen in Deutschland (Kiel und Freiburg, vorliegende Arbeit und Arnold et al., 1996), als auch in denen aus anderen Ländern. Das OvCa. scheint somit hauptsächlich durch genetische und weniger durch exogene Faktoren ausgelöst zu werden.

Tabelle 14: Rangfolge der Veränderungen verschiedener CGH-Studien beim OvCa.

	eigene Daten	Iwabuchi et al. (1995)	Arnold et al. (1996)	Tapper et al. (1997)	Sonoda et al. (1997)
A m p l i f i k a t i o n	+8q (59,6%)	+3q25-q26 (50%/28%)	+8q (53%) 8q23-qter	+1q (38%) 1q31-q41	+8q24.1 (56%)
	+3q (55,8%),	+8q24 (58%/11%)	+3q (51%) 3q26-qter	+8q (38%) 8q24	+20q13.2-qter (48%)
	+20q (50%)	+1p22-p31 (31%/11%)	+20q (43%)	+17q (38%) 17qcen-q21	+3q26.3-qter (36%)
	+19q (48,1%),	+11q14-q22 (31%/6%)	+1p (32%) 1p35-pter	+2p (29%) 2p13-p16	+1q32 (36%)
	+19p (46,2%),	+1q25-q31 (27%/6%)	+19q (30%)	+7q (25%) 7q21-q32	+20p (36%)
	+1q (44,2%),	+2q32-q33 (27%/0%)	+1q (28%)		+9p21-pter (32%)
	+1p (42,3%),	+18q12-q22 (27%/6%)	+12p (28%) 12p12		+12p (32%)
	+2q (40,4%),	+13q31-q34 (23%/11%)	+6p (21%) 6p21-p22		
	+11q (38,5%),	+12p21 (23%/17%)	+2q (19%)		
	+2p (36,5%),	+5p (23%/6%)			
	+16p (32,7%)	+6p22-p25 (23%/0%)			
	+7q (30,8%)	+7p22-p31 (23%/0%)			
		+20q13 (19%/11%)			
D e l e t i o n	-4q (50%)	-17p21-pter (46%/17%)	-18q (23%) 18q22-qter	-9p (25%) 9p21-p22	-5p21 (24%)
	-13q (48,1%)	-16q (38%/17%)	-4 (23%) 4q22-qter	-8p (21%) 8p21-pter	-9q (24%)
	-5q (42,3%),	-8p21-p23 (27%/0%)	-X (19%)	-13q (21%) 13q22-q31	-17p (24%)
	-6q (42,3%),	-19 (27%/17%)	-13q (17%) 13q21		-17q12-21 (24%)
	-18q (40,4%),	-Xp (27%/11%)	-16q (17%) 16q23-qter		-4q25-31 (20%)
	-Xp (38,5%),				-16q (20%)
	-9p (34,6%),				-22q (20%)
	-4p (32,7%)				
	-Xq (32,7%)				
	52 Pat.	56 Pat.	47 Pat.	24 Pat.	25 Pat.

Die Prozentangaben in der Studie von Iwabuchi geben die unterschiedlichen Daten für G1 und G3 klassifizierte OvCa. an. Die Auflistung der Daten erfolgte nach der in der jeweiligen Studie ermittelten Reihenfolge

5.4.2. Interpretation der Amplifikationen

Folgende Chromosomenbereiche zeigten in dieser Studie mit Werten von über 30% die größten Überrepräsentationen: 8q (59,6%), 3q (55,8%), 20q (50%), 19q (48,1%), 19p (46,2%), 1q (44,2%), 1p (42,3%), 2q (40,4%), 11q (38,5%), 2p (36,5%), 16p (32,7%) und 7q (30,8%).

Die Chromosomen-Arme 8q, 3q, 20q, 1q und 1p lagen in der Mehrzahl der publizierten Arbeiten an der Spitze der Amplifikationen (Tab. 14, S. 93).

In Übereinstimmung mit den publizierten Daten von Arnold et al. (1996) und Sonoda et al. (1997) findet sich in dieser Untersuchungsreihe eine Amplifikation von Chromosomarm 8q an der Spitze der beobachteten Überrepräsentationen. Es besteht wahrscheinlich ein direkter Zusammenhang mit einer Amplifikation von c-myc, lokalisiert auf 8q24, welches in vielen Tumoren in überzähliger Kopienzahl zu finden ist. Das Myc-Gen ist in 20% - 30% der Ovarialkarzinome amplifiziert, vor allem aber in fortgeschrittenen serösen Fällen (van Dam et al., 1994; Zhang et al., 1994; Berchuck, 1995) und korreliert mit einer geringeren Überlebenszeitrate (Wang et al., 1999). Diese Amplifikation kommt beim OvCa. oftmals in Form von hsr vor, überwiegend bestehend aus Material der 8q24-Region (Abeysinghe et al., 1999).

Kürzlich konnte gezeigt werden, daß c-myc direkt die Telomerase aktiviert, indem es die Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase, die Telomerase-Reverse-Transkriptase (TERT), aktiviert. Eine direkte Korrelation von der c-myc-Expressionsrate und der Telomeraseaktivität, wie sie in normalen und in proliferierenden Zellen zu finden ist, ist durch diesen Befund erklärbar. Bei der malignen Entartung sind aber wahrscheinlich auch andere Faktoren an der Aktivierung des TERT-Promotors beteiligt (Wu et al., 1999).

Der kleinste gemeinsame Bereich auf 8q, der in dieser Studie den größten Zugewinn an genetischem Material zeigte, ist identisch mit dem c-myc Locus. Auffällig ist aber auch eine Beteiligung weiterer chromosomaler Regionen an einem Zugewinn. Generell ist der gesamte 8q-Arm von einer Überrepräsentation betroffen. Dieses läßt die Vermutung zu, daß sich noch weitere relevante Gene in diesem Bereich befinden. Ein zu dem Rekombinations-Gen RAD54 homologes Gen, das RAD54B, ist in 8q21.3-q22 kodiert. Mutationen dieses Gens wurden beim Kolonkarzinom und bei Lymphomen gefunden (Hiramoto et al., 1999).

Weitere bereits bekannte Onkoproteine sind in 8q lokalisiert: MOS (8q11-12, Serin/Threonin-Kinase), CLYN (8q11-q12; aus der SRC-Familie), LYN (8q13-qter, Tyrosin-Kinase), und ein MYB-ähnliches Protein, das MYBL1 auf 8q22 (Transkriptionsfaktor). Eine Amplifikation der Proto-Onkogene, die für diese genannten zellregulierenden Proteine kodieren, hat aller Wahrscheinlichkeit nach einen Einfluß auf eine maligne Entartung der betroffenen Zellen.

Eine auffällig hohe Überrepräsentation von 3q wurde ebenso in drei der anderen Arbeiten beschrieben. Der Hauptanteil dieser Amplifikation fand sich in dieser, wie in den anderen Untersuchungen in dem Bereich 3q25-qter, wobei in dieser Studie auch der darüberliegende Bereich 3q13.2- 3q25 auffällig war und oftmals in Kombination mit dem distalen Teil überrepräsentiert vorlag. Hier kann man über mögliche Lokalisationen tumorrelevanter Gene nur spekulieren, da bisher noch keine Proto-Onkogene beschrieben, sondern nur mögliche Kandidaten vorgeschlagen wurden. So ein vermutetes Onkogen, das PIK3CA, kodiert für eine Untereinheit der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3-Kinase). Die beobachtete Amplifikation korreliert mit einer übermäßigen Transkription und einer verstärkten Expression des Proteins, wie auch mit einer gesteigerten Aktivität der PI3-Kinase und der daraus resultierenden stimulierenden Wirkung auf die Proliferation, den Katabolismus und auch auf eine onkogene Transformation (Shayesteh et al., 1999).

Kürzlich berichtete Sugita et al. (2000) von einer *low-level* Amplifikation (3-4fach) eines Bereiches in 3q26 von ungefähr 20 Mb bei Tumoren aus Cervix, Ovar und Lunge. In diesem Bereich ist das Gen für die RNA-Komponente der Telomerase (hTR; 3q26.3) lokalisiert. Da eine Deregulation der Telomerase-Aktivität bei vielen Tumoren assoziiert ist mit zellulärer Immortalität und der Onkogenese, ist eine Beteiligung des hTR an der Tumorentstehung wahrscheinlich. Ob das hTR-Gen tatsächlich betroffen ist, muß laut Sugita noch geklärt werden. Dieses schlossen Kuokkanen et al. (AACR 2000) mit ihrer Studie aus. Sie ordneten einen auffällig amplifizierten 3q-Bereich unterhalb des hTR-Gens ein.

Wie auch schon in der Arbeit von Arnold et al. (1996) angeführt wird, könnten evtl. die in dieser Region identifizierten Zink-Finger Gene, das LAZ3 (Kerckaert et al., 1993) und das BCL6 (Ye et al., 1993; Baron et al., 1995) ebenso von Bedeutung sein, wie das EVI1 und das RYK (Iwabuchi et al., 1995).

Ein neu identifiziertes DNA-Reparatur-Gen, das MBD4 (MED1), in 3q21-q22 ist in humanen Karzinomen häufig mutiert und führt dadurch zu einer erhöhten Mikrosatelliten-Instabilität. Allerdings zeigten sich überwiegend Mutationen in Form von LOH oder kleineren Deletionen, die zu einem Funktionsverlust führten (Riccio et al., 1999). Ob dieses Gen auch durch Amplifikationen, die gerade beim OvCa. in dieser Region auffallen, beeinflusst wird, bedarf einer Klärung.

Bei der Patientin Nr. 29 traten im 3q-Arm zwei Bereiche mit extremer Überrepräsentation auf, mit den Haupt-*peaks* bei 3q13.2/3q13.3, sowie 3q25/3q26.1 (Abb. 6, S. 52). Eine genauere molekular-zytogenetische Untersuchung dieser beiden Bereiche wäre von Interesse und könnte einen Einblick in die Rolle dieser Regionen bei der Tumorgenese geben.

Auf dem Chromosomarm 20q, welcher in der Hälfte der Fälle gesamtheitlich amplifiziert war, befinden sich folgende Gene, die häufig in veränderter Kopienzahl in Tumoren zu finden sind: das Kinase-Gen *src* auf 20q13.1, dessen Protein-Aktivität beim Kolonkarzinom (Garcia et al., 1991; Park und Cartwright, 1995), sowie Haut- (Barnekow et al., 1987) und Brustkrebs (Muthuswamy und Muller, 1995) erhöht ist. Weiterhin sind hier die Gene für E2F1 (20q11, Transkriptionsfaktor), AIB1, AIB3, AIB4 und CAS (Guan et al., 1996; Brinkmann et al., 1996) lokalisiert.

AIB1 (NCOA3, Nuklear-Rezeptor Co-Aktivatoren) auf 20q12, Mitglied der SRC-1 Familie, ist in amplifizierter Form schon beim Brustkrebs und OvCa. aufgefallen (Anzick et al., 1997). Eine Überexpression des Proteins könnte durch eine gesteigerte Interaktionen mit dem Östrogen-Rezeptor bei der Entstehung von steroid-abhängigen Tumoren eine Rolle spielen. CAS (20q13) mit seiner möglicherweise dualen Funktion in der Apoptose und der Zell-Proliferation und damit grundlegenden zellregulierenden Eigenschaften zeigte schon bei Brust- und Kolonkarzinom-Zelllinien überzählige Kopien (Brinkmann et al., 1996).

Die Matrix-Metalloproteinasen sind bei einer Vielzahl von Tumoren durch direkte Korrelation zwischen Expression und der Fähigkeit zu Metastasieren aufgefallen (Kataoka et al., 1996). Ein Mitglied dieser Familie, das MMP-9 (20q11.2-q13.1), könnte auch beim OvCa. für die frühe Disseminierung von Tumorzellen in das Peritoneum verantwortlich sein (Shibata et al., 1998). Ebenso ist ein weiteres MMP-Protein-Gen, das

MMP-24 in 20q11.2 lokalisiert und überexprimiertes Protein wurde bei Gehirn-Tumoren festgestellt (Llano et al., 1999).

Das Chromosom 19 zeigte bei der Amplifikation von p- und q-Arm in dieser Studie mit 48,1% bzw. 46,2% ähnliche Werte. Sind beim Chromosom 19 gerade in frühen Ovarialkarzinomen zwei Regionen (19p13 und 19q13) an Translokationen beteiligt (Thompson et al., 1994a), so liegt dieses Chromosom oder Teile desselben in fortgeschrittenen Stadien meist polysom als dmns oder als hsr vor. In einer Untersuchung wurden in 88% der Zellkulturen dmns gefunden (McGill et al., 1993). Guan et al. (1995) fanden in ihrer Studie mittels Mikrodisektion neben anderen Chromosomen auch eine Beteiligung von Teilen des Chromosoms 19 an der Bildung von hsr (19q13.1-q13.2). Dieser Befund wurde durch Thompson et al. (1996) bestätigt. Zudem berichtete diese Gruppe noch von einer Überexpression von AKT2, einem möglichen Onkogen auf 19q13.1-q13.2, wohingegen das ERCC2-Gen, ebenso in dem Bereich zu finden, unauffällige Expressionsmuster zeigte. Man geht aber davon aus, daß noch weitere Proto-Onkogene in dieser Region lokalisiert sind, so z. B. das neu entdeckte TADG14-Gen (oder KLK: Kallikrein 8) aus der Familie der Serin-Proteasen, dessen Protein beim OvCa. in erhöhter Rate vorliegt. Eine mögliche Funktion als prognostischer Marker oder als Ziel für eine Therapie wird derzeit in Betracht gezogen (Underwood et al., 1999).

Weitere interessante Gene auf Chromosom 19 sind das E2A (19p13), die Mitglieder der JUN-Familie JUNB und JUND in 19p13.2 und das BCL3 in 19q13.1.

Das gesamte Chromosom 1 ist in 44,2%, bzw. in 42,3% (q/p-Arm) der Fälle in amplifizierter Form vorzufinden, unterbrochen durch einen Bereich von 1p21 bis 1p31, der in keinem Fall einen Zugewinn verzeichnete, dagegen aber in 17,3% der Fälle fehlte.

Auf dem p-Arm sind folgende Bereiche aufgefallen. Die Region von 1p31, mit einem möglichen TSG, dem NOEY2 (ARHI), assoziiert mit Ovarial- und Brustkrebs (Yu et al., 1999) und einer weiteren Bruchpunktregion in 1p36.3. Die letztgenannte Region ist bei Translokationen in Kombination mit 3q21 und dem Produkt t(1;3)(p36;q21) bei hämatologischen Erkrankungen aufgefallen. Betroffene Gene dieser Mutation sind das RPN1 und das GR6 auf 3q21 (Shimizu et al., 2000). Schon einen Hinweis auf Bruchpunkte in Chromosom 1 lieferte Thompson et al. (1997), der Translokationsereignisse in 1p36 beobachtete, allerdings im Unterschied zu den bei den hämatologischen Erkrankungen

gefundenen Rearrangements mit Chromosom 3, beim OvCa. dagegen mit Chromosom 17 [t(;17)(p36;?)], sowohl bei geringgradigen, als auch bei hochgradigen Formen. Beide Chromosomen, sowohl Chromosom 17 und auch Chromosom 3 zeigen beim OvCa. Veränderungen, die durch diese Translokations-Ereignisse entstehen und weitere Aberrationen, die durch diese ausgelöst werden könnten.

Das neu identifizierte Gen NOEY2 (ARHI, 1p31) zeigt große Homologien zu RAS und RAP und wird in normalem Brust- und Ovar-Gewebe exprimiert, dagegen fehlt die Expression im Tumorgewebe. Nähere Untersuchungen ergaben einen LOH in 41% der Fälle, wobei in der Regel das funktionale paternale Allel verloren gegangen ist. Das Gen zeigt eine monoallelische Expression des paternalen Gens, während das maternale Gen durch *Imprinting* 'stillgelegt' wird. Eine Re-Expression des Proteins nach Gen-Transfektion in mutierte Zelllinien stoppte deren klonales Wachstum. Es konnten Zusammenhänge mit einer Reduzierung der Cyclin-D1-Promotor-Aktivität und einer p21-Induktion gezeigt werden. Alles deutet auf eine mögliche Funktion bei der Tumorgenese hin (Yu et al., 2000). Genau in die Region des NOEY2-Gens fällt auch der in dieser vorgestellten CGH-Studie beobachtete Verlust in dem sonst amplifiziert vorliegendem p-Arm und würde daher auf ein darin befindliches TSG, wie z. B. das NOEY2-Gen, hindeuten.

Eine Involvierung von Regionen um 1p36 bei Translokationen haben auch Taetle et al. (1999a, b) beobachtet und schreiben Chromosom 1 eine wichtige Rolle in der Pathogenese des OvCa. zu.

Folgende Gene, lokalisiert auf 1p36, werden desweiteren als mögliche TSG angesehen: Heir-1 (ID3), TNFR2, PITSLRE (p58, CDC21), DAN, E2F2 und PAX7 (Dracopoli et al., 1994; Lahti et al., 1994; Enomoto et al., 1994; White et al., 1995). Diese Gene erfüllen aber nicht die Kriterien, da in diesem Zusammenhang (Gewinn von chromosomalem Material) eher Onkogene zur Tumorentstehung vermutet werden.

Auch das p73, verwandt mit p53, kodiert in 1p36.3, könnte durch Deregulation zur Tumorentstehung beitragen. Es aktiviert die gleichen *target*-Gene wie p53 und interagiert auch mit demselben. Allerdings wird dem p73 eher eine Rolle als Tumorsuppressorgen zugeschrieben wie es schon für p53 der Fall ist (Kaghad et al., 1997).

Andere Studien verzeichneten einen LOH von der Region um 1p36 (Imyanitov et al., 1999). In diesem Kontext könnten die eben aufgeführten TSG natürlich eine Rolle bei der Karzinogenese spielen, ausgenommen p73, welches in der Studie von Imyanitov et

al. (1999) keine Korrelation von LOH und Protein-Expression zeigte. Allerdings berichtete diese Gruppe von einer verstärkten Expression des p73-Proteins in OvCa.-Zelllinien im Gegensatz zu normalen ovariellen Zellen. Dieses würde mit der beobachteten Amplifikation von 1p36 in dieser 'Kieler-Studie' vereinbar sein.

Das MMP23 in 1p36.3 ist ein Protein, welches in Ovar, Testis und Prostata exprimiert wird, also überwiegend in reproduktiven Geweben zu finden ist (Velasco et al., 1999). Über Auswirkungen auf die physiologischen Funktionen bei einer Überexpression dieses Proteins, z. B. ausgelöst durch Amplifikation der kodierenden Region, wie diese Studie zeigt, wurde noch nicht berichtet.

Desweiteren befinden sich auf dem 1p Arm in den amplifizierten Bereichen noch die Gene NRAS (1p13), MYCL1 (1p32), JUN (1p31-32), MMP21-22 und CDC2L1-2 (1p36.3), sowie auf 1q das ABL2 (1q24-25) mit möglichen Onkogen-Funktionen.

Zu dem in 40,4% der Fälle amplifizierten Chromosomarm 2q ein interessanter Befund von Tapper et al. (1998). Die Autoren fanden einen Zugewinn von 2q24-q32 nur bei sporadisch auftretenden Fällen von OvCa., nicht aber bei den erblichen Formen, bei denen BRCA1- und BRCA2-Mutationen für die Tumorgenese hauptverantwortlich sind. Daher vermutete diese Arbeitsgruppe ein weiteres Onkogen in dieser Region. Die eben genannte Studie stellte eine generelle Übereinstimmung der genomischen Veränderungen bei familiärem und sporadischem OvCa. fest, mit Ausnahme der 2q-Region.

Interessanterweise war der 4p-Arm als einziger in dieser vorgestellten Untersuchung nie von einem Zugewinn an chromosomalem Material betroffen. Dieses könnte darauf hinweisen, daß sich evtl. keine relevanten Proto-Onkogene in dieser Region befinden. Bisher wird auch nur ein einziges Gen in dieser Region bei einer Auflistung sämtlicher bisher bekannter TSG und Proto-Onkogene in dem 'Facts Book' von R. Hesketh (1997), das TTF, ohne nähere Charakterisierung aufgeführt. Es finden sich in der Literatur auch nur wenige Hinweise auf Veränderungen im 4p-Arm beim OvCa.

In der Liste der Deletionen findet sich 4p mit einem Anteil von 32,7% weiter oben in der Rangfolge, so daß u. U. bisher noch unbekannte TSG in dem gesamtheitlich betroffenen Arm vermutet werden können.

5.4.3. Interpretation der Deletionen

Die häufigsten Verluste in den Untersuchungen der 'Kieler-Fälle' waren bei 4q (50%), 13q (48,1%), 5q (42,3%), 6q (42,3%), 18q (40,4%), Xp (38,5%), 9p (34,6%), 4p (32,7%) und Xq mit einem Anteil von ebenfalls 32,7% zu verzeichnen. Diese Daten unterscheiden sich nur teilweise von den publizierten Häufigkeiten in den anderen Arbeiten. Bei Arnold et al. (1996) und Sonoda et al. (1997) wird ebenfalls ein relativ häufiger Verlust von 4q beschrieben, während dieses Chromosom in den anderen Arbeiten nicht erwähnt wird. Chromosom 13 gehört bei Arnold et al. (1996) und bei Tapper et al. (1997) auch zu der Gruppe der Chromosomen, die häufig durch Deletionen gekennzeichnet sind. Verluste von 5q und 6q sind in den vergleichenden Arbeiten nicht aufgeführt. Wie schon zu Beginn angeführt, können diese Unterschiede durch eine unterschiedliche Zusammensetzung und Größe der untersuchten Kollektive, sowie durch methodische Unterschiede bedingt sein.

In dem untersuchten Kieler Patientinnen-Kollektiv zeigte sich bei Chromosom 4 überwiegend der Bereich 4q21 bis 4qter von einer Deletion betroffen. Verluste von 4q hat man schon bei Kopf-, Nackenzellkarzinomen und bei Leberzellkarzinomen (Sreekantiah et al., 1994; Kuroki et al., 1995) in weiter fortgeschrittenen Stadien beobachtet. Die Autoren vermuten ein bis dato unbekanntes TSG in der Region distal von 4q21. Auch beim Brustkrebs ist häufig ein Verlust von 4q zu verzeichnen. Hierbei fanden sich zwei Bereiche, 4q33-q34 und 4q25-q26, mit LOH-Frequenzen von 76% und 63% (Shivapurkar et al., 1999). Wahrscheinlich sind in dieser Region lokalisierte Gene bei der Genese verschiedener Tumoren von Bedeutung.

Desweiteren befinden sich die Gene für Caspase 6 (CASP6) und Protein E (CENPE) im großen Arm von Chromosom 4, wie auch das Gen für IL-2.

Bei 13q lagen die zu verzeichnenden Verluste hauptsächlich in den Bereichen von 13q11 bis 13q14 und von 13q14 bis 13q31, einschließlich des bekannten Locus des Retinoblastom-Gens (RB) auf 13q14. Neben anderen Tumorerkrankungen, wie z. B. Retinoblastoma oder *small cell lung cancer* (Übersicht in Houldsworth und Chaganti, 1994), findet sich ein allelischer Verlust des RB-Locus in einer LOH-Studie auch zu 50% beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom (Berek und Martinez-Maza, 1994; Takano et al.,

1995), durchaus mit dem hier vorgestellten Wert von 48,1% vergleichbar. Eine andere Studie ermittelte für den Bereich von 13q14 nur einen LOH-Wert von 30% (Li et al., 1991). Untersuchungen zur Expression und Protein-Struktur des RB-Genes ergaben nur in wenigen Tumoren relevante Veränderungen (Liu et al., 1994; Taylor et al., 1995). Auch Dodson et al. (1994) fanden zwar eine LOH-Rate des RB-Locus von bis zu 52%, doch war die Expressionsrate vom RB-Protein auf normalem Niveau. Somit kann zu einer möglichen Rolle des RB-Proteins beim OvCa. keine eindeutige Aussage gemacht werden.

Das BRCA2 Gen liegt mit seiner Lokalisation bei 13q12-q13 im häufig deletierten Bereich des Chromosoms 13. Allerdings ist dieses Gen bei sporadischen OvCa. nicht in dem Maße von Mutationen betroffen wie beim Brustkrebs. Es ist aber durch seine Funktion bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen der DNA von Bedeutung für die genomische Stabilität und kann daher auch bei sporadischen Fällen von OvCa. beteiligt sein.

Chromosom 5q zeigte die stärksten Verluste in den Regionen von 5q14-5q23 und 5q11-5q13. Die Kartierung des MSH3-Gens erfolgte in die Region von 5q11-q13. Andere Mitglieder dieser Familie der *mismatch-repair*-Gene, MSH2 (2p21-p22) und MHL1 (3p21.3), sind für die Entstehung der HNPCC (familiäres Kolonkarzinom) mitverantwortlich sind. Das APC-Gen, welches ebenfalls bei der HNPCC eine Rolle spielt, befindet sich auf dem 5q-Arm, genauer bei 5q21, co-lokalisiert mit dem MCC-Gen. Verluste dieser TSG tragen daher vermutlich auch zur Initiation und Progression des Ovarialtumors bei.

Eine FISH-Analyse bei hämatologischen Erkrankungen zeigte eine Deletion von 5q, vermehrt in dem Bereich von 5q31, gekoppelt mit Translokationen des langen Arms von Chromosom 5. Das Zytokin-Gen für GM-CSF ist hier zu finden, genauso wie die Gene IL-3, IL-4, IL-5 und IL-9. Diesem Bereich sind bisher noch keine TSG zugeordnet worden (Brezinová et al., 2000).

In Chromosom 6q ist der Bereich 6q21-qter von einer Deletion betroffen, und mit ihm die darauf befindlichen tumorrelevanten Gene E2F3 (6q22) und MYB (6q22-q23).

Auf ein mögliches TSG in einem 2 cM-Fragment bei 6q24-q25 wiesen Wan et al. (1999) hin, da nach Transfer dieser Region in Tumor-Zellen zweier Zelllinien deren ma-

lignes Potential verloren ging. Ebenso durch Transfer-Experimente fanden Sandhu et al. (1996) einen Hinweis auf das Gen SEN 6 A in der Region bei 6q14-q21, die das immortale Wachstum von Hybridzellen aufhob.

Ein weiterer Kandidat für eine Beteiligung an der Karzinogenese ist ein Zink-Finger-Gen bei 6q25, das LOT-1. In 38% der untersuchten OvCa.-Fälle wurde in einer Studie ein LOH detektiert. Eine Beteiligung dieser Region bei der Entstehung von Brust- und Nierenkrebs wurde schon vermutet (Abdollahi et al., 1997).

Eine Deletion von einer 4 cM-Einheit im Chromosomabschnitt 6q25.1-q25.2 ist nach Colitti et al. (1998) assoziiert mit hochgradig invasivem OvCa. und läßt daher ein TSG in dieser Region vermuten. Dieser Bereich liegt weiter distal vom SOD2-Gen, welches beim OvCa. auch oftmals deletiert ist.

Saito et al. (1996) vermuten ein mögliches TSG in dem von ihnen gefundenen 300 kb-Segment bei 6q27, zusätzlich zu dem darauf befindlichem AF-6 Gen. Schon im Jahr 1993 stellten Foulkes et al. (1993a) bei 6q27 ein mögliches TSG zur Diskussion, da in mehreren verschiedenen Tumoren diese Region fehlte. Das ESR-Protein, kodiert in 6q, ist bei Brustkrebs oftmals verändert und kommt daher nach Meinung von Foulkes und Kollegen auch als ein mögliches TSG auf 6q in Frage.

In dieser Arbeit zeigte Chromosomabschnitt 18q21-qter wie auch der gesamte q-Arm chromosomale Verluste. In den deletierten Bereichen distal von 18q12 sind die TSG DCC (18q21) und DPC4/SMAD4 (18q21.1) lokalisiert, ebenso wie das Proto-Onkogen BCL2. Saegusa et al. (2000) stellten bei einer Untersuchung verminderte oder fehlende Expression des DCC Proteins beim OvCa. fest, mit einer Korrelation zu Grad und Stadium des Tumors, ohne aber mit der Überlebenszeit-Rate zu korrelieren. Die Expressionsmuster dieses Gens waren bei benignen und Borderline-Tumoren nicht in dem Maße verringert wie bei den malignen Formen.

Nach dem Chromosom 18 folgt in der Rangfolge bei den Deletionen das X-Chromosom mit einer Deletionsrate von 38,5%. Ein Verlust von X-Chromosomen ist auch schon vielfach beschrieben. Dieses wird zum Teil als ein altersabhängiges Phänomen betrachtet (Hando et al., 1994; Richard et al., 1994; Catalan et al., 1995). Die Altersverteilung lag bei den Trägerinnen der X-Deletion in dieser Untersuchung zwischen 46 und 82 Jahren, mit einem Altersschnitt von 61,7 Jahren. Sie lag damit nur geringfügig über dem Durchschnittsalter von 60 Jahren in der Gesamtgruppe und läßt daher keine Aussage

über einen Verlust von einem X-Chromosom als einen altersbedingten Vorgang zu. McCluskey und Dubeau (1997) sehen in dem Verlust dieses Chromosoms eine Rolle bei der Entstehung der LMP-Tumoren, dagegen weniger in der Entwicklung der malignen Formen.

Demgegenüber wird der beobachtete Verlust von X-Chromosomen in Zelllinien als Artefakt der Zellkultur angesehen und entspricht somit nicht einem Charakteristikum der OvCa., wie LOH-Funde in Zelllinien implizieren (Heim et al., 1989; Elfving et al., 1990).

In der CGH könnte der Verlust des X-Chromosoms auch auf einen methodischen Fehler zurückzuführen sein. Aufgrund verminderter Zugänglichkeit kann das inaktive X-Chromosom bei der Markierungsreaktion evtl. schlechter angefärbt werden und so einen Verlust einer Kopie vortäuschen (Nacheva et al., 1998). In dieser Studie zeigten die CGH-Profile in der Mehrzahl eine normalen diploiden Karyotyp. Ob die Verluste von X-Chromosomen methodisch bedingt waren, kann durch eine FISH-Untersuchung geklärt werden.

5.4.4. Chromosom 17

Die in der Literatur oft beschriebene Deletion von Chromosom 17, fiel in dieser Studie mit einem Anteil von nur 13,5% für 17p und 17q vergleichsweise gering aus. In der Studie von Iwabuchi et al. (1995) liegt der Durchschnittswert bei ca. 32%, und bei Sonoda et al. (1997) bei 24%. In den Arbeiten von Arnold et al. (1996) und Tapper et al. (1997) wird über einen Verlust von Chromosom 17 nicht berichtet. Dabei spielen Mutationen gerade in Chromosom 17 wahrscheinlich eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des Ovarialkarzinoms. Vor allem allelische Deletionen von 17p, Verluste der BRCA1-Region, von 17q22-23 und Mutationen von p53 gehören zu den häufigsten Auffälligkeiten und werden auch als frühes Ereignis beim OvCa. gewertet (Tavassoli et al., 1993).

Unterschiede in der Zusammensetzung der Untersuchungs-Gruppen, deren Größe und die Schwellenwertberechnung bei der Auswertung der CGH können zu verschiedenen Ergebnissen führen. Außerdem sind Ergebnisse aus LOH-Analysen nicht direkt mit den Ergebnissen einer CGH vergleichbar. Unterschiede in der Sensitivität (Auflösungsvermögen der CGH, Polyploidien) und dem verwendeten Ausgangsmaterial (Zellkulturartefakte bei LOH-Analysen) ergeben voneinander abweichende Resultate.

Bei dem Verlust des kurzen Armes von Chromosom 17, sowie bei Mutationen in diesem Bereich, wie in vielen Fällen zu beobachten ist, sind vor allem das p53-Gen und ein weiter distal gelegener Locus bei 17p13.3 betroffen (Eccles et al., 1992b, c; Gallion et al., 1995; Lee et al., 1995). Untersuchungen des TSG p53 belegen, daß dieses Gen in ca. 50% - 54% der weiter fortgeschrittenen Stadien des OvCa. und in frühen Formen zwischen 16% und 44% von einem Verlust betroffen ist (Mazars et al., 1991; Kohler et al., 1993; Chan et al., 2000).

Eine durch Mutationen bedingte Überexpression, im Gegensatz zum häufigen LOH von p53, findet sich in 50% - 54% der Stadien III/IV, zu 15% in I/II und zu 4% bei Borderline-Tumoren. Die Angaben über eine Expression bei den Borderline-Tumoren liegen zwischen 0% und 4%, während in den benignen OvCa. keine Expression gefunden wurde (Berchuck et al., 1994b; Berchuck 1995; Chan et al., 2000). Da die Mehrzahl der Mutationen Transitionen sind, geht man davon aus, daß es sich um spontan entstandene Mutationen handelt, die nicht auf exogene Karzinogene zurückzuführen sind (Berchuck et al., 1994b). Mutationen des p53-Gens korrelieren mit fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung (Eccles et al., 1992a, b; Sheridan et al., 1993) und mit einer schlechten Prognose (Bosari et al., 1993).

p53-Mutationen sind oft mit einem Verlust des Wildtyp-Allels gekoppelt, daher die oftmals beobachtete LOH-Rate. Im Gegensatz zu einem Ausfall des Proteins bei einem Verlust beider Gen-Kopien oder bei einem LOH und einer Mutation im verbliebenden Locus kann p53 auch als dominant transaktivierendes Onkogen funktionieren. Bei einer Überexpression des Proteins, wie schon angeführt, oder bei verlängerter Lebensdauer, kann das p53 komplexieren und dadurch seine Tumor-supprimierenden Eigenschaften verlieren. Weiterhin kann sich durch eine p53-*missense* Mutationen evtl. das Repertoire der kontrollierten Gene verändern und somit p53 als Onkogen funktionieren (Lane et al., 1990; Berchuck et al., 1993; Dittmer et al., 1993; Hsiao et al., 1994; Hussain und Harris, 1998).

Ein Verlust der Eigenschaften des p53-Proteins wird auch verantwortlich gemacht für eine Instabilität des Genoms beim OvCa., assoziiert mit einer vermehrten Deletion der Telomerbereiche (Iwabuchi et al., 1995; Lee et al., 1995). Interessant ist im Zusammenhang mit der häufigen Aberration von Chromosom 17 auch der Befund, daß die Region 17p13.3 in 33% der untersuchten Fälle in einer Arbeit von Pieretti et al. (1995c) hypermethyliert vorliegt. Zu der Auswirkung einer solchen Hypermethylierung gibt es einige

Hypothesen. Zum einen besteht die Möglichkeit, durch Hypermethylierung nahe TSG zu inaktivieren, wie z. B. beim RB-Gen (Ohtani-Fujita et al., 1993), zum anderen kann die genetische Stabilität reduziert werden. Eine Instabilität entsteht durch Änderungen in der chromosomalen Struktur durch die Methylierung und dadurch bedingt zu einem vermehrten Auftreten von Bruchpunkten oder Rekombinationen mit dem Resultat, daß Regionen verloren gehen (Baylin et al., 1991). Eine Beteiligung der DNA-Methylierung an der Karzinogenese kann auch über eine höhere Punkt-Mutationsrate erfolgen. Desaminierung von Methylcytosin kann zu einer Transition von C nach T führen.

Das Phänomen der Hypermethylierung korreliert invers mit einem LOH von Chromosom 17. Ein LOH wurde vermehrt bei hochgradigen Tumoren beobachtet, während eine Hypermethylierung überwiegend bei den geringgradigen Tumoren zu finden war. Der Übergang eines geringgradigen in ein hochgradigen Tumor ist also durch Verlust der hypermethylierten Region gekennzeichnet (Pieretti et al., 1995c).

Schultz et al. (1996) identifizierten zwei Gene in 17p13.3, das OVCA1 und OVCA2. Durch *Northern blot*-Analysen konnte die mRNA dieser Gene in normalem Epithelgewebe der Ovarien nachgewiesen werden, doch die Transkriptions-Raten waren deutlich reduziert oder in 90% des untersuchten Tumor-Materials und entsprechenden Zelllinien nicht detektierbar (Schultz et al., 1996). In Zellkulturen konnte die inhibierende Wirkung von OVCA1 auf das Wachstum von Tumor-Zellen nach Transfektion nachgewiesen werden (Bruening et al., 1999). Damit sind OVCA1 und OVCA2 weitere interessante Kandidaten für eine nähere Charakterisierung im Zusammenhang mit dem OvCa.

Wie beim Brustkrebs sind auch beim Eierstockkrebs, trotz LOH, in ca. 30% Amplifikationen von HER2/NEU/ERBB2 (17q21-q22) zu beobachten, wobei hier eine Überexpression des Proteins mit der Aggressivität des Tumors und mit einer schlechten Überlebenszeitrate korreliert und daher erhöhte Werte evtl. als prognostische Marker dienlich sein könnten (Berchuck et al., 1990; Meden et al., 1992, 1995 und 1997; Meden und Kuhn, 1997).

Eine verminderte Expression beobachteten Zheng et al. (2000) vom BRCA1-Gen (Genlocus: 17q21-q22) beim epithelialen OvCa. Die Reduktion der Expression korrelierte mit dem Tumor-Stadium. Daraus schloß der Autor eine signifikante Rolle des BRCA1-Proteins bei der Entstehung und Progression auch von sporadischem OvCa. Eine Hypermethylierung der Promotorregion des BRCA1-Gens wurde in sporadischen

Brusttumoren beobachtet. Dieses führte zu einer Inhibition der Expression und somit zu einem Funktionsverlust des Gens (Dobrovic und Simpfendorfer, 1997). Dieses Phänomen könnte auch beim sporadischen OvCa. auftreten.

Die häufig von Verlust betroffene Region 17q21-q25 ist auch auffällig bei Brusttumoren und läßt daher ein oder mehrere TSG, abgesehen vom BRCA1-Gen, in diesem Bereich vermuten (Orsetti et al., 1999).

Ein Mitglied aus der Familie der Septin-Gene, welche an der Zytokinese und der Zell-Zyklus-Kontrolle beteiligt sind, wurde kürzlich in 17q25 bei Untersuchungen von OvCa. identifiziert (*ovarian/breast* Septin, Russell, AACR 2000).

Desweiteren sind die Gene NF1, RARA und NM23 auf 17q eventuell an der Karzinogenese beteiligt (Iwabuchi et al., 1995). Das nm23-Protein zeigte allerdings in einigen Studien widersprüchliche Ergebnisse bei einer möglichen Korrelation zwischen Expression und Metastasierung beim OvCa. (Mandai et al., 1995). Srivatsa et al. (1996) stellten in ihrer Arbeit eine Korrelation von erhöhter nm23-Protein-Expression und einer verkürzten progressionsfreien Zeit fest.

5.4.5. Tumorgenese des Ovarialkarzinoms

Die Karzinogenese des OvCa. ist zwar noch nicht eindeutig geklärt, doch vermehrte Hinweise leiten die Entstehung der invasiven Formen aus den Vorläuferläsionen, den benignen und Borderline-Tumoren her. Die frühen Formen sind noch durch eine geringe Anzahl von genomischen Aberrationen gekennzeichnet, belegt durch wenige oder fehlende LOH Funde. Eine Zunahme der numerischen Aberrationen, wahrscheinlich zusammen mit einer Akkumulation von veränderten Genen treten im weiteren Verlauf auf. Frühe Schritte dabei sind möglicherweise Alterationen von Chromosom 6, 7 und X, Verluste von Chromosom 3 und 1 (Diebold et al., 1996), bzw. Chromosom 7 und 9 (Chenevix-Trent et al., 1994; Kerr et al., 1996), von denen LOH-Muster in benignen Tumoren gefunden wurden, die auch typisch für maligne Formen sind. Roy et al. (1997) fanden in solitären benignen Tumoren einen häufigen LOH von 7p und 9p in Übereinstimmung mit den vorherigen Beobachtungen. Demgegenüber liegt in der Regel noch keine Inaktivierung von p53 in diesen Stadien vor und scheint daher charakteristisch für ein späteres Ereignis bei der Tumorgenese zu sein (Berchuck et al., 1994b; Kim et al.,

1994). In Ausnahmefällen zeigten benigne Tumoren allerdings auch eine p53 Mutation, nämlich in enger Nachbarschaft von malignem Gewebe (Zheng et al., 1991, 1993 und 1995). Oftmals finden sich histologisch benigne Tumoren in unmittelbarer Nähe zu invasiven Tumor-Arealen, ein Hinweis für eine Transformation der benignen in die invasive Form (Puls et al., 1992; Zheng et al., 1993). Die verschieden differenzierten Zellen in unterschiedlichen Arealen eines Tumors entstehen im weiteren Prozeß durch klonale Expansionen (Roy et al., 1997).

Der Befund, daß K-RAS-Mutationen auch häufig in Borderline-Tumoren auftreten, unterstützt die Annahme, daß diese Mutation ein frühes Ereignis darstellt und zudem die Borderline-Tumoren Vorläufer von invasiven Tumoren darstellen (Gallion et al., 1995). Weiterhin sprechen für eine Entwicklung des OvCa. aus benignen Formen über die Borderline-Tumoren Mikrosatelliten-Instabilitäten, die allerdings bei den invasiven Formen fehlen, und Chromosomenanomalien, z. B. Trisomie von Chromosomen 12 und 7 bei LMP-Tumoren, wenn auch weitaus seltener als beim OvCa. (Pejovic et al., 1996; Tangir et al., 1996; Wolf et al., 1996).

Eine CGH-Analyse mit Borderline-Tumoren zeigte einige chromosomale Imbalancen, die auch in den malignen Formen vertreten sind, z. B. + Chromosom 5 (Wolf et al., 1999). Es wurde die Theorie aufgestellt, daß evtl. verschiedene Mechanismen zu der Entstehung von Borderline-Tumoren führen, die sich trotz einer guten Prognose auch zu letalen Formen weiterentwickeln können (Link et al., 1996 a, b).

Eine gesteigerte Proliferation und invasives Wachstum bei den malignen Formen sind wahrscheinlich an Veränderungen der Chromosomen 8, 17 und X gekoppelt (Diebold et al., 1996). Eine weitere Progression von den geringgradigen zu den hochgradigen Tumoren zeigt sich in einer Zunahme der genomischen Alterationen. Komplexe genetische Rearrangements sind typisch für gering (G3) bis mäßig (G2) differenzierte Ovarialkarzinome, sind aber bei den gut differenzierten Karzinomen (G1) der Anfangsstadien seltener zu finden (Pejovic et al., 1992a).

Eine Entwicklung der benignen und LMP-Tumoren zu malignen Tumoren läßt sich auch aus den epidemiologischen Daten schließen, da das Durchschnittsalter der betroffenen Patientinnen bei den benignen Formen und zum Teil auch bei den LMP-Tumoren noch signifikant unter dem der Patientinnen mit maligner Ausprägung liegt (Wolf et al., 1996). Dieser Tatbestand konnte in dieser Arbeit allerdings nicht bestätigt werden.

Unter der Voraussetzung einer möglichen Transformation von benignen in maligne Formen ist eine Entfernung der benignen Tumoren, wie sie teilweise schon gängig ist, nach der Meinung von Wolf et al. (1996) eine durchaus sinnvolle präventive Maßnahme.

Zu einem ganz anderen Ergebnis kommen McCluskey und Dubeau (1997) aufgrund eigener Untersuchungen und Daten aus bisherigen Veröffentlichungen. Ihrer Meinung nach entstehen die drei Tumor-Formen unabhängig (*de novo*) voneinander. Die Darstellung von McCluskey und Dubeau in Abb. 19 gibt deren Theorie von der Pathogenese von benignen Zystadenomen, LMP-Tumoren und den Karzinomen wieder.

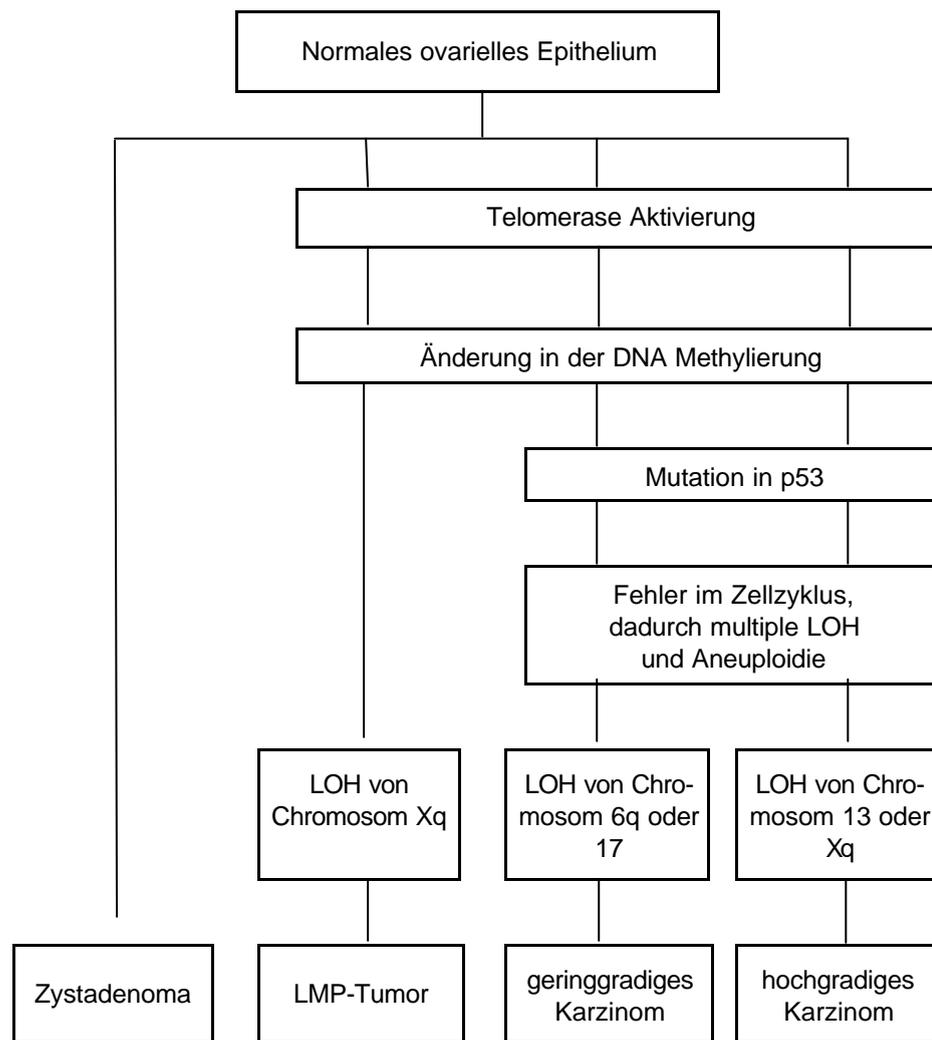


Abb. 19: Chromosomale Veränderungen die nach Meinung von McCluskey und Dubeau zur Entstehung von benignen (Zystadenoma), Borderline- (LMP) und malignen Tumoren führen; entnommen aus McCluskey und Dubeau (1997)

Weitere Untersuchungen, vor allem der frühen Stadien, könnten helfen, die Tumorgene-
 se des OvCa. zu klären. Aufgrund der späten Diagnose dieser Erkrankung, meist erst
 im fortgeschrittenen Stadium, ist geeignetes Material für solche Studien allerdings rela-
 tiv selten.

5.5. Ergebnisse unter Einbeziehung einer weiteren Studie

Die in dieser Arbeit ermittelten Daten wurden mit Daten der Freiburger-Studie von Ar-
 nold et al. (1996) zusammengefaßt (Kiechle et al., Manuskript in Vorbereitung). In die-
 sem, nun 84 Patientinnen umfassenden Kollektiv wurde eine signifikante Korrelation zwi-

schen den Aberrationen und dem *Grading*, aber nicht mit den histologischen Subtypen deutlich.

Die häufigsten Amplifikationen betrafen Chromosom 1q, 3q, 8q, 19p und 20q mit einer Häufigkeit zwischen 55% und 69%. Unterrepräsentationen in 50% bis 54% der Fälle wurden bei den Chromosomen 4q, 13q und 18q ermittelt. Diese Werte korrespondieren mit den zuvor diskutierten in Bezug auf die Häufigkeiten, aber mit einer leicht abweichenden Reihenfolge.

Hochgradige Karzinome (G3) zeigten statistisch signifikant mehr Aberrationen, als die geringgradigen (G1), ein Befund der in Übereinstimmung mit den bisher veröffentlichten Daten steht. Dabei sind vor allem Verluste von 18q und 13q bei undifferenzierten, aggressiveren Tumoren, weniger dagegen bei den endometrioiden Formen beobachtet worden. Zusätzlich fehlten bei endometrioiden Tumoren folgenden Aberrationen: -3p, -7p, +10q und -21q. In undifferenzierten Subtypen fand sich keine Deletion von 2q.

Folgende Veränderungen zeigten eine starke Korrelation zu Anaplasien und einer schlechteren Prognose: +1q, -4q, -6q, -8p, +8q, +11q, -13q, -18q und +20q.

Mit diesen Befunden kann man schon etwaige prognostische Marker näher eingrenzen. Für eindeutigere Aussagen wäre es von Nutzen, alle bisher veröffentlichten Daten zum OvCa. in einer gemeinsamen Studie genauer zu analysieren.

5.6. Bewertung der CGH-Ergebnisse

Die vergleichenden FISH-Ergebnisse dieser Arbeit belegen in eindeutiger Weise die Notwendigkeit, CGH-Daten mit anderen zytogenetischen Verfahren zu überprüfen. Wie konventionelle zytogenetische Methoden ergaben, sind viele solide Tumore durch einen polyploiden Karyotyp gekennzeichnet. Fortgeschrittene Ovarialkarzinome zeigen einen hohen Aneuploidiegrad, Euploidien sind selten (Pfisterer et al., 1994).

Von den insgesamt zehn Patientinnen, bei denen die CGH-Ergebnisse mittels FISH im Rahmen dieser Arbeit überprüft wurden, zeigten vier nach der FISH-Analyse einen aneuploiden Karyotyp und ergaben in der Mehrzahl der untersuchten Loci von der CGH abweichende Resultate. Es fanden sich in 49 untersuchten Loci unterschiedliche Ergebnisse, wobei in 40 Fällen der aneuploider Karyotyp die Ursache der Unstimmigkeiten zwischen den beiden Methoden war. Wie schon zu Beginn der Diskussion ausgeführt wurde, können in der CGH nur relative Veränderungen der Chromosomenhäufig-

keiten zueinander, nicht aber Zugewinne oder Verluste kompletter Chromosomensätze oder der Mehrzahl der Chromosomen detektiert werden. Aneuploidien, erst entstanden nach einer Verdopplung des gesamten Chromosomensatzes, würden in der CGH einen abweichenden Karyotyp ergeben. Chromosomale Regionen, die in der CGH unauffällig erscheinen, liegen tatsächlich in verdoppelter Kopienzahl vor, während in der CGH aufgezeigte deletierte Bereiche möglicherweise noch in normaler zweifacher Ausführung zu finden sind. Nur Amplifikationen werden in dem CGH-Ergebnis richtig wiedergegeben. Unter diesem Aspekt sind die eben diskutierten CGH-Ergebnisse der 52 Tumor-Fälle, aber auch alle anderen CGH-Daten in der Literatur wesentlich kritischer zu sehen und teilweise sogar anzuzweifeln. Besonders gilt dies für die von der CGH detektierten Verluste. Diese Bereiche könnten noch in diploider Ausführung zu finden sein und sind somit keine Regionen für potentielle TSG. Dagegen könnten bisher unauffällige Bereiche Proto-Onkogene beherbergen, da sie entgegen der CGH-Beurteilung in amplifizierter Form vorliegen könnten.

Die weiteren diskrepanten Ergebnisse zwischen CGH und FISH, abgesehen von denen der aneuploiden Fälle, sind auf Limitationen beider Methoden zurückzuführen, wie schon zu Beginn der Diskussion ausgeführt. Diese Beobachtungen werden in Kürze als Leitartikel in dem Journal 'Cancer Genetic and Cytogenetic' veröffentlicht (Jacobsen et al., in Druck).

Die Ergebnisse der FISH- und LOH-Analysen sind in ihrer Aussagekraft der CGH überlegen. Allerdings sind solche Untersuchungen erst mit Kenntnis gewisser chromosomaler Veränderungen durchzuführen, um die geeigneten Marker und Sonden einsetzen zu können. Daher ist eine CGH im Vorfeld weiterer molekular-zytogenetischer Verfahren sinnvoll. Die erhaltenen CGH-Daten sind bei einer gleichzeitigen Abklärung des Ploidie-Grades z. B. mittels Durchflußzytometrie und somit richtiger Interpretation von grundlegender Bedeutung.

5.7. Ausblick

Es müssen für ein Verständnis der Geschehnisse auf Zell-Ebene weitere Mutationsanalysen durchgeführt werden. Entscheidend für die physiologischen Abläufe in der Zelle sind letztendlich optimale Proteinkonzentrationen und die Funktionalität der Proteine. Ein Zugewinn an genetischem Material kann durch eine verminderte Transkriptions-

oder auch Translationsrate, sowie durch eine geringere Aktivität oder eine verkürzte Lebensdauer des betroffenen Proteins mehr oder weniger kompensiert werden. Genomisches *Imprinting*, also die monoallelische Expression bestimmter parenteraler Gene durch Modifikationen, kann den Totalausfall eines Gens bedeuten, wenn das 'aktive' Allel durch LOH verloren geht oder durch andere Mutation verändert wird. Die genauen Muster des *Imprinting* sind noch genauso wenig geklärt, wie eine mögliche Reversibilität dieser zellulären Modifikationen.

Für weitere Untersuchungen ist nach Auswertung dieser Arbeit vor allem der 4q-Arm von Interesse, da noch wenig Gene in diesem Bereich bekannt sind und dieser Arm in dieser Studie oft von Deletionen betroffen war. Weiterhin sind natürlich gerade die auffälligen kleineren Regionen für folgende Feinkartierungen sehr interessant. Im Zusammenhang mit einer Untersuchung der Expressionsmuster und einer Funktionsanalyse der betroffenen Proteine können genauere Aussagen zu einer möglichen Relevanz dieser Gene bei der Karzinogenese gemacht werden.

Unter Berücksichtigung einer möglichen Polyploidie/Aneuploidie, deren Grad in jedem Fall vor der Interpretation der CGH-Daten abgeklärt werden sollte, würden die gefundenen chromosomalen Alterationen in ihrer Gesamtheit einen noch weniger übersichtlichen Karyotyp ergeben. Über die genaue Art der Aberrationen (z. B. Amplikons: hsr oder dmins) sowie weiterer strukturellen Veränderungen, die in der CGH nicht erkannt werden (z. B. Insertionen, Inversionen, Translokationen, Isochromosomen), können nur weitere zytogenetische Methoden Aufschluß geben. Mit der in diesem Labor weiterentwickelten Methode der *multi-colour* FISH (Weimer et al., 1999) können auch gerade die sonst nur schwer typisierbaren dmins und weitere kleinere aberrante Chromosomenbereiche unabhängig von der klassischen Karyotypisierung über das Bänderungsmuster aufgrund ihrer differenzierten Anfärbung mit verschiedenen chromosomenspezifischen fluoreszenten Farbstoffen eindeutig zugeordnet werden.

Generell kann man davon ausgehen, noch längst nicht alle Gene und deren Proteine, die die Zellteilung und Differenzierung kontrollieren, zu kennen. Gerade für ein Verständnis der Besonderheiten der Tumorerkrankungen und für mögliche medizinische Ansätze zur Bekämpfung dieser Krankheiten ist aber dieses Wissen von grundsätzlicher Bedeutung.

6. Zusammenfassung

Im onkologischen Labor der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Kiel wurde die Methode der Comparativen-Genomischen-Hybridisierung (CGH) etabliert, um mit ihrer Hilfe genetische Veränderungen in Tumormaterial von Ovarialkarzinom-Patientinnen zu detektieren und lokalisieren.

In dieser Studie wurden 64 Tumoren mittels der CGH untersucht. Die ermittelten numerischen Aberrationen deckten sich in ihrer Komplexität und zum größten Teil in den beobachteten Über- und Unterrepräsentationen mit bereits publizierten Daten. Bisher wurde erst eine deutsche Studie (Arnold et al., 1996) von CGH-Untersuchungen an OvCa.-Material herausgegeben. Daher war eine Überprüfung dieser Freiburger Daten mit einer weiteren Studie aus einer anderen bundesdeutschen Region von Interesse, sowie ein Vergleich dieser Daten mit anderen OvCa.-CGH-Analysen aus Finnland (Tapper et al., 1997) und den USA (Iwabuchi et al., 1995 und Sonoda et al., 1997). Übereinstimmende Ergebnisse in diesen Studien würden die Theorie von epigenetischen Faktoren als Ursache für die Entstehung des OvCa. in den westlichen Industrieländern unterstützen.

Zu wiederkehrenden Aberrationen in dieser 'Kieler-Studie' gehörten Zugewinne von chromosomalem Material von 8q (59,6%), gefolgt von 3q (55,8%), 20q (50%) und Chromosom 19 (q: 48,1%, p: 46,2%) sowie Chromosom 1 (q: 44,2%, p: 42,3%). Von Verlusten waren hauptsächlich die Chromosomen 4q (50%), 13q (48,1%), 5q, 6q (je 42,3%) und 18q (40,4%) betroffen. Ein Verlust von 17q wurde nicht mit der Prägnanz ausgemacht, wie sie teilweise andere Studien ergaben. Dabei spielt wahrscheinlich dieses Chromosom eine nicht unwesentliche Rolle bei der Tumorgenese des Ovarialkarzinoms.

In der Daten-Analyse wurden die malignen getrennt von den benignen und Borderline-Tumoren bewertet. Die Gruppe der malignen Tumoren setzte sich überwiegend aus serösen G3-Stadien zusammen. Die Ergebnisse dieser Studie spiegeln deshalb hauptsächlich Charakteristika dieses Subtyps wieder, während in anderen Studien, bei zum Teil kleineren Fallzahlen, Gruppen mit größerer Heterogenität untersucht wurden. Eine individuelle Berechnung der Grenzwerten in der CGH-Auswertung führte zudem noch zu einer Abgrenzung zu den bisherigen Studien und ist für die Unterschiede zu anderen

Daten aus der Literatur mit verantwortlich. Generell zeigen sich beim OvCa. speziell wiederkehrende Alterationen, die in dieser Studie bestätigt wurden.

Weiterhin wurde zur Überprüfung der CGH-Daten FISH-Untersuchungen auf 'touch-Präparaten' von zehn Patientinnen durchgeführt. Bei der Überprüfung von insgesamt 139 Loci fanden sich 48 diskrepante Ergebnisse, die in der Mehrzahl auf einen polyploiden/aneuploiden Karyotyp zurückzuführen waren (bei vier der zehn Patientinnen), der in der CGH nicht erkannt wird. Dieses Ergebnis zeigt eindeutig die Notwendigkeit, den Ploidie-Grad vor der Interpretation der CGH-Daten abzuklären. Unter diesem Aspekt sind die CGH-Daten dieser und anderer Arbeitsgruppen neu zu bewerten, da sie in einigen Fällen vermutlich falsch interpretiert wurden.

7. Literaturverzeichnis

- Abdollahi A., Roberts D., Godwin A.K., Schultz D.C., Sonoda G., Testa J.R., Hamilton T.C. (1997): Identification of a zinc-finger gene at 6q25: a chromosomal region implicated in development of many solid tumors. *Oncogene* 14: 1973-1979.
- Abdollahi A., Bao R., Hamilton T.C. (1999): LOT1 is a growth suppressor gene down-regulated by the epidermal growth factor receptor ligands and encodes a nuclear zinc-finger protein. *Oncogene* 18: 6477-6487.
- Aberle H., Bierkamp C., Torchard D. (1995): The human plakoglobin gene localizes on chromosome 17q21 and is subjected to loss of heterozygosity in breast and ovarian cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6384-6388.
- Abeyasinghe H.R., Cedrone E., Tyan T., Xu J., Wang N. (1999): Amplification of C-MYC as the Origin of the Homogeneous Staining Region in Ovarian Carcinoma Detected by Micro-FISH. *Cancer Genet Cytogenet* 114: 136-143.
- Anzick S.L., Kononen J., Walker R.L., Azorsa D.O., Tanner M.M., Guan X.-Y., Sauter G., Kallioniemi O.-P., Trent J.M., Meltzer P.S. (1997): AIB1, a Steroid Receptor Coactivator Amplified in Breast and Ovarian Cancer. *Science* 277: 965-968.
- Arnold N., Hägele L., Walz L., Schempp W., Pfisterer J., Bauknecht T., Kiechle M. (1996): Overrepresentation of 3q and 8q material and loss of 18q material are recurrent findings in advanced human ovarian cancer. *Genes Chrom Cancer* 16: 46-54.
- Atkin N.B., Baker M.C. (1987): Abnormal chromosomes including small metacentrics in 14 ovarian cancers. *Cancer Genet Cytogenet* 26: 355-361.
- Baker V.V., Borst M.P., Dixon D., Hatch K.D., Shingleton H.M., Miller D. (1990): c-myc amplification in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 38: 340-342.
- Bandera C.A., Takahashi H., Behbakht K., Liu P.C., Li Volsi V.A., Benjamin I., Morgan M.A., King S.A., Rubin S.C., Boyd J. (1997): Deletion mapping of two potential chromosome 14 tumor suppressor gene loci in ovarian carcinoma. *Cancer Res* 57: 513-515.
- Banga S.S., Kim S., Hubbard K., Dasgupta T., Jha K.K., Patsalis P., Hauptschein R., Gamberi B., Dalla-Favera R., Kraemer P., Ozer H.L. (1997): SEN6, a locus for SV40-mediated immortalization of human cells, maps to 6q26-27. *Oncogene* 14: 313-321.
- Barnekow A., Paul E., Scharl M. (1987): Expression of the c-src protooncogene in human skin tumors. *Cancer Res* 47: 235-240.
- Baron B.E., Stanger R.R., Hume E., Sadhu A., Mick R., Kerckaert J.P., Deweindt C., Bastard C., Nucifora G., Zeleznik-Le N., Mc Keithan T.W. (1995): BCL6 encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Genes Chrom Cancer* 13: 221-224.
- Bauknecht T., Angel P., Kohler M., Kommos F., Birmelin G., Pfeiderer A., Wagner E. (1993): Gene structure and expression analysis of the epidermal growth factor receptor, transforming growth factor-alpha, myc, jun, and metallothioneine in human ovarian carcinomas: classification in malignant phenotypes. *Cancer* 71: 419-429.

- Baylin S.B., Makos M., Wu J.J., Yen R.W., de Bustros A., Vertino P., Nelkin B.D. (1991): Abnormal patterns of DNA methylation in human neoplasia: potential consequences for tumor progression. *Cancer Cells* 3: 383-390.
- Becker I., Becker K.-F., Röhl M.H., Minkus G., Schütze K., Höfler H. (1996): Single-cell mutation analysis of tumor from stained histologic slides. *Lab Invest* 75: 801-807.
- Bentz M., Huck K., du Manoir S., Joos S., Werner C.A., Fischer K., Döhner H., Lichter P. (1995): Comparative genomic hybridization in chronic B-cell leukemias shows a high incidence of chromosomal gains and losses. *Blood* 85: 3610-3618.
- Bentz M., Plesch A., Stilgenbauer S., Döhner H., Lichter P. (1998): Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chrom Cancer* 21: 172-175.
- Berchuck A., Kamel A., Whitaker R., Kerns B., Olt G., Kinney R. (1990): Overexpression of HER-2/*neu* is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 50: 4087-4091.
- Berchuck A., Kohler M.F., Boente M.P., Rodriguez G.C., Whitaker R.S., Bast R.C.Jr. (1993): Growth Regulation and Transformation of Ovarian Epithelium. *Cancer* 71: 545-551.
- Berchuck A., Elbendary A., Havrilesky L., Rodriguez G.C., Bast R.C. Jr. (1994a): Pathogenesis of ovarian cancers. *J Soc Gynecol Investig* 1: 181-190.
- Berchuck A., Kohler M.F., Marks J.R., Wiseman R., Boyd J., Bast R.C. Jr. (1994b): The p53 tumor suppressor gene frequently is altered in gynecologic cancers. *Am J Obstet Gynecol* 170: 246-252
- Berchuck A. (1995): Biomarkers in the ovary. *J Cell Biochem Suppl* 23: 223-226.
- Berek J.S., Martinez-Maza O. (1994): Molecular and biologic factors in the pathogenesis of ovarian cancer. *J Reprod Med* 39: 241-248.
- Berger D.P., Engelhardt R., Mertelsmann R. (1998): Das rote Buch 1997/98: Hämatologische und internistische Onkologie. Ecomed Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG.
- Bian M., Fan Q., Huang S., Ma J., Lang J. (1995): Amplification of proto-oncogenes in ovarian carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 108: 844-848.
- Bicher A., Ault K., Kimmelman A., Gershenson D., Reed E., Liang B. (1997): Loss of heterozygosity in human ovarian cancer on chromosome. *Gynecol Oncol* 19q. 66: 36-40.
- Böhm M., Wieland I., Schütze K., Rübber H. (1997): Microbeam MOMeNT Non-contact laser microdissection of membrane-mounted native tissue. *Am J Pathol* 151: 63-67.
- Bonner R.F., Emmert-Buck M., Cole K., Pohida T., Chuaqui R., Goldstein S., Liotta L.A. (1997): Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science* 278: 1481-1483.
- Bosari S., Viale G., Radaelli U., Bossi P., Bonoldi E., Coggi G. (1993): p53 accumulation in ovarian carcinomas and its prognostic implications. *Hum Pathol* 24: 1175-1179.

- Brezinová J., Zemanová Z., Cermák J., Michalová K. (2000): Fluorescence In Situ Hybridization Confirmation of 5q Deletions in Patients with Hematological Malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* 117: 45-49.
- Brinkmann U., Gallo M., Polymeropoulos M.H., Pastan I. (1996): The human CAS (cellular apoptosis susceptibility) gene mapping on chromosome 20q13 is amplified in BT474 breast cancer cells and part of aberrant chromosomes in breast and colon cancer cell lines. *Genome Res* 6: 187-194.
- Brock J.-A. K., Liu W.-H., Smith S.T., Young S.R. (1996): Detection of Numerical Chromosome Anomalies in Interphase Cells of Ovarian Carcinomas Using Fluorescence In Situ Hybridization. *Genes Chrom Cancer* 16: 120-129.
- Brooks D.J., Woodward S., Thompson F.H., Dos Santos B., Russell M., Yang J.M., Guan X.Y., Trent J., Alberts D.S., Taetle R. (1996): Expression of the zinc finger gene EVI-1 in ovarian and other cancers. *Br J Cancer* 74: 1518-1525.
- Brown M.R., Chuaqui R., Vocke C.D., Berchuck A., Middleton L.P., Emmert-Buck M.R., Kohn E.C. (1999): Allelic loss on chromosome arm 8p: analysis of sporadic epithelial ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 74: 98-102.
- Bruening W., Prowse A.H., Schultz D.C., Holgado-Madruga M., Wong A., Godwin A.K. (1999): Expression of OVCA1, a candidate tumor suppressor, is reduced in tumors and inhibits growth of ovarian cancer cells. *Cancer Res* 19: 4973-4983.
- Bryan E.J., Watson R.H., Davis M., Hitchcock A., Foulkes W.D., Campbell I.G. (1996): Localization of an ovarian cancer tumor suppressor gene to a 0.5-cM region between D22S284 and CYP2D, on chromosome 22q. *Cancer Res* 56: 719-721.
- Carney M.E., Maxwell G.L., Lancaster J.M., Gumbs C., Marks J., Berchuck A., Futreal P.A. (1998): Aberrant splicing of the TSG101 tumor suppressor gene in human breast and ovarian cancers. *J Soc Gynecol Investig* 5: 281-285.
- Casey G. (1997): The BRCA1 and BRCA2 breast cancer genes. *Curr Opin in Oncol* 9: 88-93.
- Catalan J., Autio K., Wessman M., Lindholm C., Knuutila S., Sorsa M., Norppa H. (1995): Age-associated micronuclei containing centromeres and the X chromosome in lymphocytes of women. *Cytogenet Cell Genet* 68: 11-16.
- Chan W.Y., Cheung K.K., Schorge J.O., Huang L.W., Welch W.R., Bell D.A., Berkowitz R.S., Mok S.C. (2000): Bcl-2 and p53 protein expression, apoptosis, and p53 mutation in human epithelial ovarian cancers. *Am J Pathol* 156: 409-417.
- Cheng J.Q., Godwin A.K., Bellacosa A., Taguchi T., Franke T.F., Hamilton T.C., Tschlis P.N., Testa J.R. (1992): AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9267-9271.
- Chenevix-Trench G., Leary J., Kerr J., Michel J., Kefford R., Hurst T., Parsons P.G., Friedlander M., Khoo S.K. (1992): Frequent loss of heterozygosity on chromosome 18 in ovarian adenocarcinoma which does not always include the DCC locus. *Oncogene* 7: 1059-1065.

- Cher M.L., MacGrogan D., Bookstein R., Brown J., Jenkins R.B., Jensen R.H. (1994): Comparative genomic hybridization, allelic imbalance, and FISH on chromosome 8 in prostate cancer. *Genes Chrom Cancer* 11: 153-162.
- Cliby W., Ritland S.R., Hartmann L., Dodson M., Halling K.C., Keeney G., Podratz K.C., Jenkins R.B. (1993): Human epithelial ovarian cancer allelotype. *Cancer Res* 53: 2393-2398
- Colitti C.V., Rodabaugh K.J., Welch W.R., Berkowitz R.S., Mok S.C. (1998): A novel 4 cM minimal deletion unit on chromosome 6q25.1-q25.2 associated with high grade invasive epithelial ovarian carcinomas. *Oncogene* 16: 555-559.
- Cooke I.E., Shelling A.N., Le Meuth V.G. (1996): Allele loss on chromosome arm 6q and fine mapping of the region at 6q27 in epithelial ovarian cancer. *Gene Chrom Cancer* 15: 223-233.
- Courjal F., Cuny M., Rodriguez C., Louason G., Speiser P., Katsaros D., Tanner M.M., Zeillinger R., Theillet C. (1996): DNA amplifications at 20q13 and MDM2 define distinct subsets of evolved breast and ovarian tumours. *Br J Cancer* 74: 1984-1989.
- Davis M., Hitchcock A., Foulkes W.D. (1996): Refinement of two chromosome 11q regions of loss of heterozygosity in ovarian cancer. *Cancer Res* 56: 741-744.
- Devlin J., Elder P.A., Gabra H. (1996): High frequency of chromosome 9 deletion in ovarian cancer: evidence for three tumour-suppressor loci. *Br J Cancer* 73: 420-423.
- Diebold J., Deisenhofer I., Baretton G.B., Blasenbren S., Suchy B., Schneiderbanger K., Meier W., Haas C.J., Löhns U. (1996): Interphase Cytogenetic Analysis of Serous Ovarian Tumors of Low Malignant Potential: Comparison with Serous Cystadenomas and invasive Serous Carcinomas. *Laboratory Investigation* 75: 473-485.
- Dittmer D., Pati S., Zambetti G., Chu S., Teresky A.K., Moore M., Finlay C., Levine A.J. (1993): Gain of function mutations in p53. *Nat Genet* 4: 42-46.
- Dobrovic A., Simpfendorfer D. (1997): Methylation of the BRCA1 Gene in Sporadic Breast Cancer. *Cancer Res* 57: 3347-3350.
- Dodson M.K., Cliby W.A., Xu H.J., DeLacey K.A., Hu S.X., Keeney G.L., Li J., Podratz K.C., Jenkins R.B., Benedict W.F. (1994): Evidence of functional RB protein in epithelial ovarian carcinomas despite loss of heterozygosity at the RB locus. *Cancer Res* 54: 610-613.
- Dracopoli N.C., Bruns G.A.P., Brodeur G.M., Landes G.M., Matisse T.C., Seldin M.F., Vance J.M., Weith A. (1994): Report of the first international workshop on human chromosome 1 mapping 1994. *Cytogenet Cell Genet* 67: 144-174.
- du Manoir S., Speicher M.R., Joos S., Schröck E., Döhner H., Kovacs G., Robert-Nicoud M., Lichter P., Cremer T. (1993): Detection of complete and partial gains and losses by comparative genomic hybridization. *Hum Genet* 90: 590-610.
- du Manoir S., Schröck E., Bentz M., Speicher M.R., Joos S., Ried T., Lichter P., Cremer T. (1995): Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 19: 27-41.
- Easton D.F., Ford D., Bishop D.T. (1995): Breast and ovarian cancer incidence of BRCA-1 mutation carriers. *Am J Hum Genet* 56: 265-271.

- Eccles D.M., Cranston G., Steel C.M. (1990): Allele losses on chromosome 17 in human epithelial ovarian carcinoma. *Oncogene* 5: 1599-1601.
- Eccles D.M., Gruber L., Stewart M. (1992a): Allele loss on chromosome 11p is associated with poor survival in ovarian cancer. *Dis Markers* 10: 95-99.
- Eccles D.M., Russel S.E.H., Haites N.E., Atkinson R., Bell D.W., Gruber L., Hickey I., Kelly K., Kitchener H., Leonard R., Lessells M., Lowry S., Miller I., Milner B., Steel M. (1992b): Early loss of heterozygosity on 17q in ovarian cancer. *Oncogene* 7: 2069-2072.
- Eccles D.M., Brett L., Lessells A., Gruber L., Lane D., Stell C.M., Leonard R.C.F. (1992c): Overexpression of the p53 protein and allele loss at 17p13 ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 65: 40-44.
- Ehlen T., Dubeau L. (1990): Loss of heterozygosity on chromosomal segments 3p, 6q and 11p in human ovarian carcinomas. *Oncogene* 5: 219-223.
- Elfving P., Cigudosa J.C., Lundgren R., Limon J., Mandahl N., Kristoffersson U., Heim S., Mitelman F. (1990): Trisomy 7, trisomy 10, and loss of the Y chromosome in short-term cultures of normal kidney tissue. *Cytogenet Cell Genet* 53: 123-125.
- Engel H., Friedrich J., Kleespies C., Kurbacher C.M., Schondorf T., Grecu O., Kolhagen H., Mallmann P. (1998): Detection of chromosomal aberrations in tumor cells and tumor infiltrating lymphocytes by molecular cytogenetics in patients with gynecological cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 106: 159-165.
- Enomoto H., Ozaki T., Takahashi E., Nomura N., Tabata S., Takahashi H., Ohnuma N., Tanabe M., Iwai J., Yoshida H., Matsunaga T., Sakiyama S (1994): Identification of human DAN gene, mapping to the putative neuroblastoma tumor suppressor locus. *Oncogene* 9: 2785-2791.
- Fazili Z., Sun W., Mittelstaedt S., Cohen C., Xu X.X. (1999): Disabled-2 inactivation is an early step in ovarian tumorigenicity. *Oncogene* 18: 3104-3113.
- Filmus J., Trent J.M., Pullano R., Buick R.N. (1986): A cell line from an ovarian carcinoma with amplification of the K-ras gene. *Cancer Res* 46: 5179-5182.
- Foulkes W.D., Black D., Solomon E., Trowsdale J. (1991): Allele loss on chromosome 17q in sporadic ovarian cancer. *Lancet* 338: 444-445.
- Foulkes W.D., Ragoussis J., Stamp W.G.H., Allan G.J., Trowsdale J. (1993a): Frequent loss of heterozygosity on chromosome 6 in human carcinoma. *Br J Cancer* 67: 551-559.
- Foulkes W.D., Black D.M., Stamp G.W.H., Solomon E., Trowsdale J. (1993b): Very frequent loss of heterozygosity throughout chromosome 17 in sporadic ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 54: 220-225.
- Foulkes W.D., Campbell I.G., Stamp G.W., Trowsdale J. (1993c): Loss of heterozygosity and amplification on chromosome 11q in human ovarian cancer. *Br J Cancer* 67: 268-273.
- Futreal P.A., Barrett J.C., Wisemann R.W. (1992): Dinucleotide repeat polymorphism in the THRA1 gene. *Cancer Res* 52: 2624-2627.
- Gabra H., Taylor L. Cohen B.B. (1995): Chromosome 11 allele imbalance and clinicopathological correlates in ovarian tumours. *Br J Cancer* 72: 367-375.

- Gallion H.M., Pieretti M., de Priest P.D., van Nagell J.R. Jr. (1995): The molecular basis of ovarian cancer. *Cancer* 76: 1992-1997.
- Garcia R., Parikh N.U., Saya H., Gallick G.E. (1991): Effect of herbimycin A on growth and pp60c-src activity in human colon tumor cell lines. *Oncogene* 11: 1983-1989.
- Gayther S.A., Warren W., Mazoyer S., Russell P.A., Harrington P.A., Chiano M., Seal S., Hamoudi R., van Rensburg E.J., Dunning A.M., et al. (1995): Germline mutations of the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer families provide evidence for a genotype-phenotype correlation. *Nat Genet* 11: 428-433.
- Gayther S.A., Mangion J., Russell P., Seal S., Barfoot R., Ponder B.A., Stratton M.R., Easton D. (1997): Variation of risks of breast and ovarian cancer associated with different germline mutations of the BRCA2 gene. *Nat Genetics* 15: 103-105.
- Godwin A.K., Vanderveer L., Schultz D.C. (1994): A common region of deletion on chromosome 17q in both sporadic and familial epithelial ovarian tumors distal to BRCA1. *Am J Hum Genet* 55: 666-677.
- Guan X.Y., Cargile C.B., Anzick S.L., Thompson F.H., Meltzer P.S., Bittner M.L., Taetle R., McGill J.R., Trent J.M. (1995): Chromosome Microdissection Identifies Cryptic Sites of DNA Sequence Amplification in Human Ovarian Carcinoma. *Cancer Res* 55: 3380-3385.
- Guan X.Y., Xu J., Anzick S.L., Zhang H., Trent J.M., Meltzer P.S. (1996): Hybrid selection of transcribed sequences from microdissected DNA: isolation of genes within within amplified region at 20q11-q13.2 in breast cancer. *Cancer Res* 56: 3446-3450.
- Haas C.J., Diebold J., Hirschmann A., Rohrbach H., Lohrs U. (1999): In serous ovarian neoplasms the frequency of Ki-ras mutations correlates with their malignant potential. *Virchows Arch* 434: 117-120.
- Hando J.C., Nath J., Tucker J.D. (1994): Sex chromosomes, micronuclei and aging in women. *Chromosoma* 103: 186-192.
- Harrison J., Ross S. (1998): False negative result with alpha satellite probe on uncultured cells. *Am J Hum Genet* 4 (Suppl): A 137.
- Hatta Y., Takeuchi S., Yokota J., Koeffler H.P. (1997): Ovarian cancer has frequent loss of heterozygosity at chromosome 12p12.3-13.1 (region of TEL and Kip1 loci) and chromosome 12q23-ter: evidence for two new tumor-suppressor genes. *Br J Cancer* 75: 1256-1262.
- Heim S., Mandahl N., Jin Y., Stromblad S., Lindstrom E., Salford L.G., Mitelman F. (1989): Trisomy 7 and sex chromosome loss in human brain tissue. *Cytogenet Cell Genet* 52: 136-138
- Heim S., Mitelmann F. (1995): *Cancer Cytogenetics*. 2nd ed New York: Wiley-Liss, Inc.
- Hesketh, R. (1997): *The oncogene and tumor suppressor gene factsbook*. 2nd Edition, Academic Press.
- Hiramoto T., Nakashi T., Sumiyoshi T., Fukuda T., Matsuura S., Tauchi H., Komatsu K., Shibasaki Y., Inui H., Watatani M., Yasutomi M., Sumii K., Kajiyama G., Kamada N., Miyagawa K., Kamiya K. (1999): Mutations of a novel human RAD54 homologue, RAD54B, in primary cancer. *Oncogene* 18: 3422-3426.

- Hosokawa Y., Arnold A. (1998): Mechanism of Cyclin D1 (CCND1, PRADI) Overexpression in Human Cancer Cells: Analysis of Allele-Specific Expression. *Gene Chrom Cancer* 22: 66-71.
- Houldsworth J., Chaganti R.S.K. (1994): Comparative Genomic Hybridization: An Overview. *Am J Pathol* 145: 1253-1260.
- Hruza C., Dobianer K., Beck A. (1993): HER-2 and INT-2 amplification estimated by quantitative PCR in paraffin-embedded ovarian cancer tissue samples. *Eur J Cancer* 29A: 1593-1597.
- Hsiao M., Low J., Dorn E., Ku D., Pattengale P., Yeargin J., Haas M. (1994): Gain-of-function mutations of the p53 gene induce lymphohematopoietic metastatic potential and tissue invasiveness. *Am J Pathol* 145: 702-714.
- Huntsman D., Resau J.H., Klineberg E., Auersperg N. (1999): Comparison of c-met Expression in Ovarian Epithelial Tumors and Epithelia of the Female Reproductive Tract by Quantitative Laser Scan Microscopy. *Am J Pathol* 155: 343-348.
- Hussain S.P., Harris C. (1998): Molecular Epidemiology of Human Cancer: Contribution of Mutation Spectra Studies of Tumor Suppressor Genes. *Cancer Res* 58: 4023-4037.
- Imyanitov E.N., Birrel G.W., Filippovich I., Sorokina N., Arnold J., Mould M.A., Wright K., Walsh M., Mok S.C., Lavin M.F., Chenevich-Trent G., Khanna K.K. (1999): Frequent loss of heterozygosity at 1p36 in ovarian adenocarcinomas but the gene encoding p73 is unlikely to be the target. *Oncogene* 18: 4640-4642.
- Isola J., De Vries S., Chu L., Ghazvini S., Waldman F. (1995): Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am J Pathol* 145: 1301-1308.
- Iwabuchi H., Sakamoto M., Sakunaga H., Ma Y.Y., Carcangiu M.L., Pinkel D., Yang-Feng T.L., Gray J.W. (1995): Genetic analysis of benign, low-grade, and high-grade ovarian tumours. *Cancer Res* 55: 6172-6180.
- Jacobs I.J., Kohler M.F., Wiseman R.W., Marks J.R., Whitaker R., Kerns B.A., Humphrey P., Berchuck A., Ponder B.A., Bast R.C. Jr. (1992) Clonal origin of epithelial ovarian carcinoma: analysis by loss of heterozygosity, p53 mutation, and X-chromosome inactivation. *J Natl Cancer Inst* 84: 1793-8.
- Jacobsen A., Arnold N., Weimer J., Kiechle M.: Comparison of Comparative Genomic Hybridization and Interphase Fluorescence in situ Hybridization in Ovarian Carcinomas: Possibilities and Limitations of Both Techniques, *Cancer Genet Cytogenet*; in Druck
- Jenkins R.B., Bartelt D. Jr., Stalboerger P., Persons D., Dahl R.J., Podratz K., Keeney G., Hartmann L. (1993): Cytogenetic studies of epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 71: 76-86.
- Joos S., Bergerheim U.S.R., Pan Y., Matsuyama H., Bentz M., du Manoir S., Lichter P. (1995): Mapping of chromosomal gains and losses in prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Genes Chrom Cancer* 14: 267-276.

- Kaghad M., Bonnet H., Yang A., Creancier L., Biscan J.C., Valent A., Minty A., Chalon P., Le-lias J.M., Dumont X., Ferrara P., McKeon F., Caput D. (1997): Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 90: 809-819.
- Kalikin L.M., Frank T.S., Svoboda-Newmann S.M., Wetzel J.C., Cooney K.A., Petty E.M. (1997): A region of interstitial 17q25 allelic loss in ovarian tumors coincides with a defined region of loss in breast tumors. *Oncogene* 14: 1991-1994.
- Kallioniemi A., Kallioniemi O.-P., Sudar D., Rutovitz D., Gray J.W., Waldman F., Pinkel D. (1992): Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258: 818-821.
- Kallioniemi O.-P., Kallioniemi A., Piper J., Isola J., Waldmann F.M., Gray J.W., Pinkel D. (1994): Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chrom Cancer* 10: 231-243.
- Kamb A., Gruis N.A., Weaver-Feldhaus J., Liu Q., Harshman K., Tavitigian S.V., Stockert E., Day III R.S., Johnson B.E., Skolnick M.H. (1994): A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264: 436-440.
- Kataoka M., Yamagata S., Akiyama S., Watanabe T., Takagi H., Thant A.A., Ida K., Saga S., Kishi J., Hamaguchi M. (1996): Matrix metalloproteinase 2 and 9 in esophageal cancer: correlation with organ metastasis. *Int J Oncol* 8: 773-779.
- Kerckaert J.P., Deweindt C., Tilly H., Quief S., Lecocq G., Bastard C. (1993): LAZ3, novel zinc finger encoding gene, is disrupted by recurring chromosome 3q27 translocations in human lymphomas. *Nat Genet* 5: 66-70.
- Kerr J., Leary J.A., Hurst T. (1996): Allelic loss on chromosome 7q in ovarian adenocarcinomas: two critical regions and a rearrangement of the PLANH1 locus. *Oncogene* 13: 1815-1818.
- Kiechle-Schwarz M., Pfeleiderer A., Sreekantaiah C., Berger C.S., Medchill M.T., Sandberg A.A. (1991): Cluster of trisomy 12 to tumors of the female genitourinary tract. *Cancer Genet Cytogenet* 54: 273-275.
- Kiechle-Schwarz M., Bauknecht T., Wienker T., Walz L., Pfeleiderer A. (1993): Loss of constitutional heterozygosity on chromosome 11p in human ovarian cancer: positive correlation with grade of differentiation. *Cancer* 72: 2423-2432.
- Kiechle-Schwarz M., Bauknecht T., Karck U., Kommoss F., du Bois A., Pfeleiderer A. (1994): Recurrent cytogenetic aberrations and loss of constitutional heterozygosity in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 55: 198-205.
- Kiechle-Schwarz M., Bauknecht T., Schmidt J., Walz L., Pfeleiderer A. (1995): Recurrent cytogenetic aberrations in human ovarian carcinomas. *Cancer Detect Prevent* 19: 234-243.
- Kim T.M., Benedict W.F., Xu H.J., Hu S.X., Gosewehr J., Velicescu M., Yin E., Zheng J., d'Ablaing G., Dubeau L. (1994): Loss of heterozygosity on chromosome 13 is common only in the biologically more aggressive subtypes of ovarian epithelial tumors and is associated with normal retinoblastoma gene expression. *Cancer Res* 54: 605-609.

- King B.L., Carter D., Foellmer H.G., Kacinski B.M. (1992): *Neu* proto-oncogene amplification and expression in ovarian adenocarcinoma cell lines. *Am J Pathol* 140: 23-31.
- Kinzler K.W., Vogelstein B. (1997): Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers [news]. *Nature* 386: 761-763.
- Kirchhoff M., Gerdes T., Maahr J., Rose H., Bentz M., Döhner H., Lundsteen C. (1999): Deletions below 10 megabasepairs are detected in comparative genomic hybridization by standard reference intervals. *Genes Chrom Cancer* 25: 410-413.
- Klein C.A., Schmidt-Kittler O., Schardt J.A., Pantel K., Speicher M.R., Riethmüller G. (1999): Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci* 96: 4494-4499.
- Knudson A.G. Jr. (1971): Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 820-823.
- Kohler M., Janz I., Wintzer H.O., Wagner E., Bauknecht T. (1989): The expression of EGF receptors, EGF-like factors and c-myc in ovarian and cervical carcinomas and their potential clinical significance. *Anticancer Res* 9: 1537-1548.
- Kohler M.F., Kerns B.J., Humphrey P.A. (1993): p53 overexpression and mutation in early stage epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 81: 643-650.
- Koike M., Takeuchi S., Yokota J., Park S., Hatta Y., Miller C.W., Tsuruoka N., Koeffler H.P. (1997): Frequent Loss of Heterozygosity in the Region of the D7S523 Locus in Advanced Ovarian Cancer. *Gene Chrom Cancer* 19: 1-5.
- Koike M., Takeuchi S., Park S., Hatta Y., Yokota J., Tsuruoka N., Koeffler H.P. (1999): Ovarian cancer: loss of heterozygosity frequently occurs in the ATM gene, but structural alterations do not occur in this gene. *Oncology* 56: 160-163.
- Koreth J., Bakkenist C.J., Mc Gee J.O.D. (1999): Chromosomes, 11q and cancer: a review. *J Pathol* 187: 28-38.
- Kuokkanen S.M., Cargile C.B., Heiskanen M.A., Kononen J., Kallioniemi O.P., Kallioniemi A., Moch H., Meltzer P.S., Trent J. (2000): Amplicon mapping in human ovarian adenocarcinoma by BAC contig assembly, EST mapping and tissue microarray. *AACR*
- Kuroki T., Fujiwara Y., Tsuchiya E., Nakamori S., Imaoka S., Kanematsu T., Makamura Y. (1995): Accumulation of genetic changes during development and progression of hepatocellular carcinoma. *Genes Chrom Cancer* 13: 163-167.
- Kuukasjärvi T., Tanner M., Pennanen S., Kahru R., Visakorpi T., Isola J. (1997): Optimizing DOP-PCR for universal amplification of small samples in comparative genomic hybridization. *Gen Chrom Cancer* 18: 94-101.
- Lahti J.M., Valentine M., Xiang J., Jones B., Amann J., Grenet J., Richmond G., Look A.T., Kidd V.J. (1994): Alterations in the PITSLRE protein kinase gene complex on chromosome 1p36 in childhood neuroblastoma. *Nature Genet* 7: 370-375.
- Lamie A., Peters G. (1991): Chromosome 11q13 abnormalities in human cancer. *Cancer Cells* 3: 413-420.
- Lane D.P., Benchimol S. (1990): p53: oncogene or anti-oncogene. *Genes Dev* 4: 1-8.

- Launonen V., Stenback F., Puistola U., Bloigu R., Huusko P., Kytola S., Kauppila A., Winqvist R. (1998): Chromosome 11q22.3-q25 LOH in ovarian cancer: association with a more aggressive disease course and involved subregions. *Gynecol Oncol* 71: 299-304.
- Lee J.H., Kavanagh J.J., Wildrick D.M. (1990): Frequent loss of heterozygosity on chromosome 6q, 11p, and 17 in human ovarian carcinomas. *Cancer Res.* 50: 2724-2728.
- Lee J.H., Kang Y.S., Park S.Y., Kim B.G., Lee E.D., Lee K.H., Park K.B., Kavanagh J.J., Wharton J.T. (1995): p53 mutation in epithelial ovarian carcinoma and borderline ovarian tumor. *Cancer Genet Cytogenet* 43-50.
- Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B. (1998): Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396: 643-649.
- Li S.B., Schwartz P.E., Lee W.H. (1991): Allele loss at the retinoblastoma locus in human ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 83: 637-640.
- Liang B.C., Meltzer P.S., Guan X.Y., Trent J.M. (1995): Gene amplification elucidated by combined chromosomal microdissection and comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 80: 55-59.
- Link C.J.Jr., Kohn E., Reed E. (1996a): The relationship between borderline ovarian tumors and epithelial ovarian carcinoma: epidemiologic, pathologic, and molecular aspects. *Gynecol Oncol* 60: 347-354.
- Link C.J., Reed E., Sarosy G., Kohn E.C. (1996b): Borderline ovarian tumors. *Am J Med* 101: 217-225.
- Liu Y., Heyman M., Wang Y. (1994): Molecular analysis of the retinoblastoma gene in primary ovarian cancer cells. *Int J Cancer* 58: 663-667.
- Llano E., Pendas A.M., Freije J.P., Nakano A., Knauper V., Murphy G., Lopez-Otin C. (1999): Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors. *Cancer Res* 59: 2570-2576.
- Lu K.H., Weitzel J.N., Kodali S. (1997): A novel 4-cM minimally deleted region on chromosome 11p15.1 associated with high grade nonmucinous epithelial ovarian carcinomas. *Cancer Res* 57: 387-390.
- Mandai M., Konishi I., Komatsu T., Mori T., Arao S., Nomura H., Kanda Y., Hiai H., Fukumoto M. (1995): Mutation of the nm23 gene, loss of heterozygosity at the nm23 locus and K-ras mutation in ovarian carcinoma: correlation with tumor progression and nm23 gene expression. *Br J Cancer* 72: 691-695.
- Masciullo V., Sgambato A., Pacilio C., Pucci B., Ferrandina G., Palazzo J., Carbone A., Cittadini A., Mancuso S., Scambia G., Giordano A. (1999): Frequent Loss of Expression of the Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p27 in Epithelial Ovarian Cancer. *Cancer Res* 59: 3790-3794.
- Mazars R., Pujol P., Maudelonde T. (1991): p53 Mutations in ovarian cancer: A late event? *Oncogene* 6: 1685-1690.
- McCluskey L.L., Dubeau L. (1997): Biology of ovarian cancer. *Gynecol Cancer* 9: 465-470.

- McGill J.R., Beitzel B.F., Nielsen J.L., Walsh J.T., Drabek S.M., Meador R.J., von Hoff D.D. (1993): Double Minutes Are Frequently Found in Ovarian Carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 71: 125-131.
- Meden H., Marx D., Rath W. (1992): Overexpression of c-erbB-2 oncogene in primary ovarian cancers: incidence and prognostic significance in 243 patients (in German). *Geburtshilfe Frauenheilkd* 52: 667-673.
- Meden H., Marx D., Raab T. (1995): EGF-R and overexpression of the oncogene c-erbB-2 in ovarian cancer: immunohistochemical findings and prognostic value. *J Obstet Gynecol* 21: 167-178.
- Meden H., Kuhn W. (1997): Overexpression of the oncogene c-erbB-2 (HER2/neu) in ovarian cancer: a new prognostic factor. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 71: 173-179.
- Meden H., Marx D., Schauer A. (1997): Prognostic significance of p105 (c-erbB-2 HER2/neu) serum levels in patients with ovarian cancer. *Anticancer Res* 17: 757-760.
- Medl M., Sevalda P., Czerwenka K., Dobianer K., Hanak H., Hruza C., Klein M., Leodolter S., Mullauer-Ertl S., Rosen A. (1995): DNA amplification of HER-2/neu and INT-2 oncogenes in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 59: 321-326.
- Mertens F., Johansson B., Höglund M., Mitelman F. (1997): Chromosomal Imbalance Maps of Malignant Solid Tumors: A Cytogenetic Survey of 3185 Neoplasms. *Cancer Res* 57: 2765-2780.
- Mohapatra G., Moore D.H., Kim D.H., Grewal L., Hyun W.C., Waldman F.M., Pinkel D., Feuerstein B.G. (1997): Analyses of brain tumor cell lines confirm a simple model of relationships among fluorescence in situ hybridization, DNA index, and comparative genomic hybridization. *Genes Chrom Cancer* 20: 311-319.
- Mok S.C., Chan W.Y., Wong K.K., Cheung K.K., Lau C.C., Hg S.W., Baldini A., Colitti C.V., Rock C.O., Berkowitz R.S. (1998): DOC-2, a candidate tumor suppressor gene in human epithelial ovarian cancer. *Oncogene* 16: 2381-2387.
- Muthuswamy S.K., Muller W.J. (1995): Activation of Src family kinases in Neu-induced mammary tumors correlates with their association with distinct sets of tyrosine phosphorylated proteins in vivo. *Oncogene* 11: 1801-1810.
- Nacheva E.P., Grace C.D., Bittner M., Ledbetter D.H., Jenkins R.B., Green A.R. (1998): Comparative genomic hybridization: A comparison with molecular and cytogenetic analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 100: 93-105.
- Narod S.A., Feunteun J., Lynch H.T. (1991): Familial breast-ovarian cancer locus on chromosome 17q12-q23. *Lancet* 338: 82-83.
- Ness R.B., Cottreau C. (1999): Possible Role of Ovarian Epithelial Inflammation in Ovarian Cancer. *J Natl Cancer Inst* 91: 1459-1467.
- Nielsen K.V., Niebuhr E., Ejlersen B., Holstebro S., Madsen M.W., Briand P., Mouridsen H.T., Bolund L. (1997): Molecular cytogenetic analysis of a nontumorigenic human breast epithelial cell line that eventually turns tumorigenic: validation of an analytical approach combining karyotyping, comparative genomic hybridization, chromosome painting, and single-locus fluorescence in situ hybridization. *Genes Chrom Cancer* 20: 30-37.

- Ohtani-Fujita N., Fujita T., Aoike A. (1993): CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor suppressor gene. *Oncogene* 8: 1063-1067.
- Okamoto A., Sameshima Y., Yokoyama S. (1991): Frequent allelic losses and mutations of the p53 gene in human ovarian cancer. *Cancer Res.* 51: 5171-5176.
- Orth K., Hung J., Gazdar A. (1994): Genetic instability in human ovarian cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9495-9499.
- Orphanos V., McGrown G., Hey Y. (1995): Allelic imbalance of chromosome 6q in ovarian tumours. *Br J Cancer* 71: 666-669.
- Orsetti B., Courjal F., Cuny M., Rodriguez C., Theillet C. (1999): 17q21-q25 aberrations in breast cancer: combined allelotyping and CGH analysis reveals 5 regions of allelic imbalance among which two correspond to DNA amplification. *Oncogene* 18: 6262-6270.
- Palacios J., Gamallo C. (1998): Mutations in the β -Catenin Gene (CTNNB1) in Endometrioid Ovarian Carcinomas. *Cancer Res* 58: 1344-1347.
- Papp J., Csokay B., Bosze P. (1996): Allele loss from large regions of chromosome 17 is common only in certain histological subtypes of ovarian carcinomas. *Br J Cancer* 74: 1592-1597.
- Park J., Cartwright C.A. (1995): Src activity increases and Yes activity decreases during mitosis of human colon carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 15: 2374-2382.
- Pejovic T., Heim S., Mandahl N., Elmfors B., Flodérus U.M., Furgyik S., Helm G., Willen H., Mitelmann F. (1990): Trisomy 12 is a consistent chromosome aberration in benign ovarian tumors. *Genes Chrom Cancer* 2: 48-52.
- Pejovic T., Himmelmann A., Heim S., Mandahl N., Floderus U.M., Furgyik S., Elmfors B., Helm G., Willen H., Mitelman F. (1992a): Prognostic impact of chromosome aberrations in ovarian cancer. *Br J Cancer* 65: 282-286.
- Pejovic T., Heim S., Mandahl N., Baldetorp B., Elmfohrs B., Floderus U., Furgyik S., Helm G., Himmelmann A., Willen H., Mitelmann F. (1992b): Chromosome aberration in 35 primary ovarian carcinomas. *Genes Chrom Cancer* 4: 58-68.
- Pejovic T., Iosif C.S., Mitelman F., Heim S. (1996): Karyotypic Characteristics of Borderline Malignant Tumors of the Ovary: Trisomy 12, Trisomy 7 and r(1) as Nonrandom Features. *Cancer Genet Cytogenet* 92: 95-98.
- Persons D.L., Hartmann L.C., Herath J.F., Borell T.J., Cliby W.A., Keeney G.L., Jenkins R.B. (1993): Interface Molecular Cytogenetic Analysis of Epithelial Ovarian Carcinomas. *Am J Pathol* 142: 733-741.
- Pfleiderer A., Breckwoldt M., Martius G. (2000): Gynäkologie und Geburtshilfe. Georg Thieme Verlag.
- Pfisterer J., Kommos F., Sauerbrei W., Renz H., du Bois A. Kiechle-Schwarz M., Pfleiderer A. (1994) Cellular DNA content and survival in advanced ovarian carcinoma. *Cancer* 74: 2509-15.

- Pieretti M., Cavalieri C., Conway P.S., Gallion H.H., Powell D.E., Turker M.S. (1995a): Genetic alterations distinguish different types of ovarian tumors. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 64: 434-440.
- Pieretti M., Powell D.E., Gallion H.H., Case E.A., Conway P.S., Turker M.S. (1995b): Genetic alterations on chromosome 17 distinguish different types of epithelial ovarian tumors. *Hum Pathol* 26: 393-397.
- Pieretti M., Powell D.E., Gallion H.H., Conway P.S., Case E.A., Turker M.S. (1995c): Hypermethylation at a Chromosome 17 "Hot Spot" Is a Common Event in Ovarian Cancer. *Hum Pathol* 26: 398-401.
- Piper J., Rutovitz D., Sudar D., Kallioniemi A., Kallioniemi O.P., Waldman F.M., Gray J.W., Pinkel D. (1995): Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 19: 10-26.
- Prives C., Hall P.A. (1999): The p53 pathway. *J Pathol* 187: 112-126.
- Puls L.E., Powell D.E., DePriest P.D., Gallion H.H., Hunter J.E., Kryscio R.J., Van Nagell J.R. (1992): Transition from benign to malignant epithelium in mucinous and serous ovarian cystadenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 47: 53-57.
- Riccio A., Aaltonen L.A., Godwin A.K., Loukola A., Percesepe A., Salovaara R., Masciullo V., Genuardi M., Paravatou-Petsotas M., Bassi D.E., Ruggeri B.A., Klein-Szanto A.J., Testa J.R., Neri G., Bellacosa A. (1999): The DNA repair gene MBD4 (MED1) is mutated in human carcinomas with microsatellite instability. *Nat Genet* 23: 266-268.
- Richard F., Muleris M., Dutrillaux B. (1994): The frequency of micronuclei with X chromosome increases with age in human females. *Mutat Res* 316: 1-7.
- Ried T., Just K.E., Holtgreve-Grez H., du Manoir S., Speicher M.R., Schröck E., Latham C., Blegen H., Zetterberg A., Cremer T., Auer G. (1995): Comparative genomic hybridization of formalin-fixed, paraffin-embedded breast tumors reveals different patterns of chromosomal gains and losses in fibroadenomas and diploid and aneuploid carcinomas. *Cancer Res* 55: 5415-5423.
- Rimessi P., Gualandi F., Morelli C., Trabanelli C., Wu Q., Possati L., Montesi M., Barrett J.C., Barbanti-Brodano G. (1994): Transfer of human chromosome 3 to an ovarian carcinoma cell line identifies three regions on 3p involved in ovarian cancer. *Oncogene* 9: 3467-3474.
- Roberts C.G., Tattersall M.H.N. (1990): Cytogenetic study of solid ovarian tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 48: 243-253.
- Ross J.S., Yang F., Kallakury B.V., Sheehan C.E., Ambros R.A., Muraca P.J. (1999): HER-2/neu oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization in epithelial tumors of the ovary. *Am J Clin Pathol* 111: 311-316.
- Roy W.J. Jr., Watson R.H., Hitchcock A., Campbell I.G. (1997): Frequent loss of heterozygosity on chromosome 7 and 9 in benign epithelial ovarian tumours. *Oncogene* 15: 2031-2035.
- Russell S.E.H., Hickey G.I., Lowry W.S., White P., Atkinson R.J. (1990): Allele loss from chromosome 17 in human ovarian cancer. *Oncogene* 5: 1581-1583.

- Russell H. (2000): Isolation and mapping of a human septin gene to a region on chromosome 17q, commonly deleted in sporadic epithelial ovarian tumors. *AACR*
- Saegusa M., Machida D., Okayasu I. (2000): Loss of DCC gene expression during ovarian tumorigenesis: relation to tumour differentiation and progression. *Br J Cancer* 82: 571-578.
- Saito S., Sirahama S., Matsushima M., Suzuki M., Sagae S., Kudo R., Saito J., Noda K., Nakamura Y. (1996): Definition of a commonly deleted region in ovarian cancers to a 300-kb segment of chromosome 6q27. *Cancer Res* 56: 5586-5589.
- Sandhu A.K., Kaur G.P., Reddy D.E., Rane N.S., Athwal R.S. (1996): A gene on 6q14-21 restores senescence to immortal ovarian tumor cells. *Oncogene* 12: 247-252.
- Sasano H., Garret C.T., Wilkinson D.S., Siverberg S., Comerford J., Hyde J. (1990): Protooncogene amplification and tumor ploidy in human ovarian neoplasms. *Hum Pathol* 21: 382-301.
- Sato T., Saito H., Morita R., Koi S., Nakamura Y. (1991) Allelotype of human ovarian cancer. *Cancer Res* 51: 5118-5122.
- Schildkraut J., Bastos E., Berchuck A. (1997): Relationship between lifetime ovulatory cycles and overexpression of mutant p53 in epithelial ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 89: 932-938.
- Schreiber G., Dubeau L. (1990): c-myc proto-oncogene amplification detected by polymerase chain reaction in archival human ovarian carcinomas. *Am J Pathol* 137: 653-659.
- Schröck E., Thiel G., Lozanova T., du Manoir S., Meffert M.C., Jauch A., Speicher M.R., Nürnberg P., Vogel S., Jänisch W., Donis-Keller H., Ried T., Witkowski R., Cremer T. (1994): Comparative genomic hybridization of human malignant gliomas reveals multiple amplification sites and nonrandom chromosomal gains and losses. *Am J Pathol* 144: 1203-1218.
- Schultz D.C., Vanderveer L., Buetow K.A., Boente M.P., Ozolz R.F., Hamilton T.C., Godwin A.K. (1995): Characterization of chromosome 9 in human ovarian neoplasia identifies frequent genetic imbalance on 9q and rare alterations involving 9p, including CDKN2. *Cancer Res* 55: 2150-2157.
- Schultz D.C., Vanderveer L., Berman D.B., Hamilton T.C., Wong A.J., Godwin A.K. (1996): Identification of two candidate tumor suppressor genes on chromosome 17p13.3. *Cancer Res* 56: 1997-2002.
- Shayesteh L., Lu Y., Kuo W.L., Baldocchi R., Godfrey T., Collins C., Pinkel D., Powell B., Mills G.B., Gray J.W. (1999): PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet* 21: 99-102.
- Sheridan E., Hancock B.W., Goyns M.H. (1993): High incidence of mutations of the p53 gene detected in ovarian tumours by the use of chemical mismatch cleavage. *Cancer Lett* 68: 83-89.
- Shibata K., Kikkawa F., Nawa A., Thant A.A., Naruse K., Mizutani S., Hamaguchi M. (1998): Both Focal Adhesion Kinase and c-Ras Are Required for the Enhanced Matrix Metalloproteinase 9 Secretion by Fibronectin in Ovarian Cancer Cells. *Cancer Res* 58: 900-903.

- Shimizu S., Suzukawa K., Kodera T., Nagasawa T., Abe T., Taniwake M., Yagasaki F., Tanaka H., Fujisawa S., Johansson B., Ahlgren T., Yokota J., Morishita K. (2000): Identification of Breakpoint Cluster Regions at 1p36.3 and 3q21 in Hematologic Malignancies With t(1;3)(p36;q21). *Genes Chrom Cancer* 27: 229-238.
- Shridhar V., Staub J., Huntley B., Cliby W., Jenkins R., Pass H.I., Hartmann L., Smith D.I. (1999): A novel region of deletion on chromosome 6q23.3 spanning less than 500, Kb in high grade invasive epithelial ovarian cancer. *Oncogene* 18: 3913-3918.
- Shivapurkar N., Sood S., Wistuba I.I., Virmani A.K., Maitra A., Milchgrub S., Minna J.D., Gazdar A.F. (1999): Multiple Regions of Chromosome 4 Demonstrating Allelic Losses in Breast Carcinomas. *Cancer Res* 59: 3576-3580.
- Slamon D.J., Godolphin W., Jones L.A., Holt J.A., Wong S.G., Keith D.E. (1989): Studies of the HER-2/*neu* proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244: 707-712.
- Smith S.A., Easton D.F., Evans D.G.R., Ponder B.A.J. (1992): Allele loss in the region 17q12-21 in familial breast and ovarian cancer nonrandomly involve the wild-type chromosome. *Nat Genet* 2: 128-131.
- Sonoda S., Palazzo J., du Manoir S., Godwin K.A., Feder M., Yakushiji M., Testa J.R. (1997): Comparative Genomic Hybridization Detects Frequent Overrepresentation of Chromosomal Material From 3q26, 8q24, and 20q13 in Human Ovarian Carcinomas. *Genes Chrom Cancer* 20: 320-328.
- Speicher M.R., Jauch A., Walt H., du Manoir S., Ried T., Jochum W., Sulser T., Cremer T. (1995): Correlation of microscopic phenotype with genotype in a formalin-fixed, paraffin-embedded testicular germ cell tumor with universal DNA amplification, comparative genomic hybridization, and interphase cytogenetics. *Am J Pathol* 146: 1332-1340.
- Sreekantaiah C., Pulivarthi H.R., Xu L., Sacks P.G., Schantz S.P., Chaganti R.S.K. (1994): Consistent chromosomal losses in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Genes Chrom Cancer* 11: 29-39.
- Srivatsa P.J., Cliby W.A., Keeney G.L., Dodson M.K., Suman V.J., Roche P.C., Podratz K.C. (1996): Elevated nm23 protein expression is correlated with diminished progression-free survival in patients with epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 60: 363-372.
- Sugita M., Tanaka N., Davidson S., Sekiya S., Varella-Garcia M., West J., Drabkin H.A., Gemmill R.M. (2000): Molecular Definition of a Small Amplification Domain within 3q26 in Tumors of Cervix, Ovary, and Lung. *Cancer Genet Cytogenet* 117: 9-18.
- Taetle R., Aickin M., Yang J.M., Panda L., Emerson J., Roe D., Adair L., Thompson F., Liu Y., Wisner L., Davis J.R., Trent J., Alberts D.S. (1999a): Chromosome Abnormalities in Ovarian Adenocarcinoma: I. Nonrandom Chromosome Abnormalities From 244 Cases. *Gene Chrom Cancer* 25: 290-300.
- Taetle R., Aickin M., Panda L., Emerson J., Roe D., Thompson F., Davis J., Trent J., Alberts D. (1999b): Chromosome Abnormalities in Ovarian Adenocarcinoma: II. Prognostic Impact of Nonrandom Chromosome Abnormalities in Gene 244 Cases. *Gene Chrom Cancer* 25: 46-52.
- Takano H., Okamoto A., Terashima Y., Yokota J. (1995): High incidence of allelic loss at the RB gene locus in advanced human ovarian cancer. *Int J Oncol* 6: 129-135.

- Tangir J., Loughridge N.S., Berkowitz R.S., Muto M.G., Bell D.A., Welch W.R., Mok S.C. (1996): Frequent Microsatellite Instability in Epithelial Borderline Ovarian Tumors. *Cancer Res* 56: 2591-2505.
- Tapper J., Bützow R., Wahlström T., Seppälä M., Knuutila S. (1997): Evidence for divergence of DNA copy number changes in serous, mucinous and endometrioid ovarian carcinomas. *Br J Cancer* 75: 1782-1787.
- Tapper J., Sarantaus L., Vahteristo P., Nevanlinna H., Hemmer S., Seppälä M., Knuutila S., Butzow R. (1998): Genetic Changes in Inherited and Sporadic Ovarian Carcinomas by Comparative Genomic Hybridization: Extensive Similarity Except for a Difference at Chromosome 2q24-q32. *Cancer Res* 58: 2715-2719.
- Tashiro H., Miyazaki K., Okamura H., Iwai A., Kukumoto M. (1992): c-myc over-expression in human primary ovarian tumors: ist relevance to tumor progression. *Int J Cancer* 50: 828-833.
- Tavassoli M., Ruhrberg C., Beaumont V., Reynolds K., Kirkham N., Collins W.P., Farzaneh F. (1993): Whole Chromosome 17 Loss in Ovarian Cancer. *Genes Chrom Cancer* 8: 195-198.
- Tavassoli M., Steingrimsdottir H., Pierce E., Jiang X., Alagoz M., Farzaneh F., Campbell I.G. (1996): Loss of heterozygosity on chromosome 5q in ovarian cancer is frequently accompanied by TP53 mutation and identifies a tumour suppressor gene locus at 5q13. 1-21. *Br J Cancer* 74: 115-119.
- Taylor R.R., Linnoila R.I., Gerardts J. (1995): Abnormal expression of the retinoblastoma gene in ovarian neoplasms and correlation to p53 and K-ras mutations. *Gynecol Oncol* 58: 307-311.
- Telenius H., Carter N.P., Bebb C.E., Nordenskjöld M., Ponder B.A.J., Tunnacliffe A. (1992): Degenerate oligonucleotide-primed PCR: General amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13: 718-725.
- Thompson F.H., Liu Y., Emerson J., Weinstein R., Makar R., Trent J.M., Taetle R., Alberts D.S. (1994a): Simple numeric abnormalities as primary karyotype changes in ovarian carcinoma. *Genes Chrom Cancer* 10: 262-266.
- Thompson F.H., Emerson J., Alberts D., Liu Y., Guan X.-Y., Burgess A., Fox S., Taetle R., Weinstein R., Makar R., Powell D., Trent J. (1994b): Clonal Chromosome Abnormalities in 54 Cases of Ovarian Carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 73: 33-45.
- Thompson F.H., Nelson M.A., Trent J.M., Guan X.Y., Liu Y., Yang J.-M., Emerson J., Adair L., Wymer J., Balfour C., Massey K., Weinstein R., Alberts D.S., Taetle R. (1996): Amplification of 19q13.1-q13.2 in ovarian cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 87: 55-62.
- Thompson F.H., Taetle R., Trent J.M., Liu Y., Massey-Brown K., Scott K.M., Weinstein R.S., Emerson J.C., Alberts D.S., Nelson M.A. (1997): Band 1p36 Abnormalities and t(1;17) in Ovarian Carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 96: 106-110.
- Tibiletti M.G., Bernasconi B., Furlan D., Riva C., Trubia M., Buraggi G., Franchi M., Bolis P., Mariani A., Frigerio L., Capella C., Taramelli R. (1996): Early involvement of 6q in surface epithelial ovarian tumors. *Cancer Res.* 56: 4493-4498.

- Tibiletti M.G., Trubia M., Ponti E., Sessa L., Acquati F., Furlan D., Bernasconi B., Fichera M., Mihalich A., Ziegler A., Volz A., Facco C., Riva C., Cremonesi L., Ferrari M., Taramelli R. (1998): Physical map of the D6S149-D6S193 region on chromosome 6Q27 and its involvement in benign surface epithelial ovarian tumours. *Oncogene* 16: 1639-1642.
- Tsao S.W., Mok C.H., Oike K. (1991): Involvement of p53 gene in the allelic deletion of chromosome 17p in human ovarian tumors. *Anticancer Res* 11: 1975-1982.
- Underwood L.J., Tanimoto H., Wang Y., Shigemasa K., Parmley T.H., O'Brian T.J. (1999): Cloning of Tumor-associated Differentially Expressed Gene-14, a Novel Serine Protease Overexpressed by Ovarian Carcinoma. *Cancer Res* 59: 4435-4439.
- Vachtenheim J., Horakova I., Novotna H. (1994): Hypomethylation of CCGG sites in the 3' region of H-ras protooncogene is frequent and is associated with H-ras allele loss in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 54: 1145-1148.
- van Dam P.A., Vergote I.B., Lowe G.G. (1994): Expression of c-erbB-2, c-myc, and c-ras oncoproteins, insulin-like growth factor receptor I, and epidermal growth factor receptor in ovarian carcinoma. *J Clin Pathol* 47: 914-919.
- Varras M.N., Sourvinos G., Diakomanolis E., Koumantakis E., Flouris G.A., Lekka-Katsouli J., Michalakis S., Spandidos D.A. (1999): Detection and clinical correlations of ras gene mutations in human ovarian tumors. *Oncology* 56: 89-96.
- Velasco G., Pendas A.M., Fueyo A., Knauper V., Murphy G., Lopez-Otin C. (1999): Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissue and lacking conserved domains in other family members. *J Biol Chem* 274: 4570-4576.
- Viel A., Giannini F., Tumiotto L. (1992): Chromosomal localisation of two putative 11p onco-suppressor genes involved in human ovarian tumours. *Br J Cancer* 66: 1030-1036.
- Vogelstein B., Kinzler K.W. (1993): The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9: 138-141.
- Wake N., Myroslaw M., Hreshehshyn M., Piver S.M., Matsui S., Sandberg A.A. (1980): Specific cytogenetic changes in ovarian cancer involving chromosome 6 and 14. *Cancer Res* 40: 4512-4518.
- Wan M., Sangeorgi F., Felix J.C., Dubeau L. (1996): Association of BRCA1 with gonadotropin-responsive cells. *Lancet* 348: 192-193.
- Wan M., Sun T., Vyas R., Zheng J., Granada E., Dubeau L. (1999): Suppression of tumorigenicity in human ovarian cancer cell lines is controlled by a 2 cM fragment in chromosomal region 6q24-q25. *Oncogene* 18: 1545-1551.
- Wang Z.R., Liu W., Smith S.T., Parrish R.S., Young S.R. (1999): c-myc and chromosome 8 centromere studies of ovarian cancer by interphase FISH. *Exp Mol Pathol* 66: 140-148.
- Watson J.E., Gabra H., Taylor K.J., Rabiasz G.J., Morrison H., Perry P., Smyth J.F., Porteous D.J. (1999): Identification and characterization of a homozygous deletion found in ovarian ascites by representational difference analysis. *Genome Res* 9: 226-233.

- Weimer J., Kiechle M., Senger G., Wiedemann U., Ovens-Raeder A., Schuierer S., Kautza M., Siebert R., Arnold N. (1999): An easy and reliable procedure of microdissection for the analysis of chromosomal breakpoints and marker chromosomes. *Chromosom Res* 7: 355-362.
- Weinberg R.A. (1989): Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res* 49: 3713-3721.
- Weinberg R.A. (1991): Tumor suppressor genes. *Science* 254: 1138-1146.
- Wells D., Sherlock J.K., Handyside A.H., Delhanty J.D.A. (1999): Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. *Nucleic Acids Res* 27: 1214-1218.
- Wertheim I., Tangir J., Muto M.G. (1996): Loss of heterozygosity of chromosome 17 in human borderline and invasive epithelial ovarian tumors. *Oncogene* 12: 2147-2153.
- White P.S., Maris J.M., Beltinger C., Sulman E., Marshall H.N., Fujimori M., Kaufmann B.A., Biegel J.A., Allen C., Hilliard C., Valentine M.B., Look A.T., Enomoto H., Sakiyama S., Brodeur G.M. (1995): A region of consistent deletion in neuroblastoma maps within human chromosome 1p36.2-36.3. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5520-5524.
- Wilson P.J., McGlenn E., Marsh A., Evans T., Arnold J., Wright K., Biden K., Young J., Wainwright B., Wicking C., Chenevix-Trench G., (2000): Sequence Variants of DLC1 in Colorectal and Ovarian Tumours. *Human Mutation* 15: 156-165.
- Wolf N.G., Abdul-Karim F.W., Farver C., Schorck N.J., Schwartz S. (1996): A Molecular Cytogenetic Analysis of Histologically Benign, Low Malignant Potential, and Fully Malignant Components. *Am J Pathol* 149: 511-520.
- Wolf N.G., Abdul-Karim F.W., Farver C., Schröck E., du Manoir S., Schwartz S. (1999): Analysis of ovarian borderline tumors using comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. *Genes Chrom Cancer*. 1999 Aug;25: 307-15.
- Wright K., Wilson P.J., Kerr J., Do K., Hurst T., Khoo S.K., Ward B., Chenevix-Trench G. (1998): Frequent loss of heterozygosity and three critical regions on the short arm of chromosome 8 in ovarian adenocarcinomas. *Oncogene* 17: 1185-1188.
- Wu K-J., Grandori C., Amacker M., Simon-Vermot N., Polack A., Lingner J., Dalla-Favera R. (1999): Direct activation of TERT transkription by c-MYC. *Nature Genetics* 21: 220-224.
- Yang-Feng T.L., Li S., Leung W.-Y., Carcangiu M.L., Schwartz P.E. (1991): Trisomy 12 and K-ras-2 amplification in human ovarian tumors. *Int J Cancer* 48: 678-681.
- Yang-Feng T.L., Li S., Han H., Schwartz P.E. (1992): Frequent loss of heterozygosity on chromosome Xp and 13q in human ovarian cancer. *Int J Cancer* 52: 575-580.
- Ye B.H., Lista F., Lo C.F., Knowles D.M., Offit K., Chaganti R.S., Dalla F.R (1993): Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. *Science* 262: 747-750.
- Young S.R., Liu W.-H., Brock J.-A., Smith S.T. (1996): ERBB2 and Chromosome 17 Centromere Studies of Ovarian Cancer by Fluorescence In Situ Hybridization. *Genes Chrom Cancer* 16: 130-137.

- Yu Y., Xu F., Peng H., Fang X., Zhao Y., Li Y., Cuevas B., Kuo W.L., Gray J.W., Siciliano M., Mills G.B., Bast R.C. Jr. (1999): NOEY2 (ARHI), an imprinted putative tumor suppressor gene in ovarian and breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 214-219.
- Yu V. (2000): Caretaker Brca1: keeping the genome in the straight and narrow. *Breast Cancer Res* 2: 82-85.
- Zhang G.L., Zu K.L., Yu S.Y (1994): Amplification of c-erbB-2 gene in ovarian cancer (in Chinese). *Chung Hua Fu Chan Ko Tsa Chih* 29: 401-403, 444.
- Zheng J., Robinson W.R., Ehlen T., Yu M.C., Dubeau L. (1991): Distinction of low grade from high grade human ovarian carcinomas on the basis of losses of heterozygosity on chromosomes 3, 6, and 11 and HER-2 / *neu* gene amplification. *Cancer Res* 51: 4045-4051.
- Zheng W., Wan M., Zweizig S., Velicescu M., Yu M.C., Dubeau L.(1993): Histologically benign or low-grade malignant tumors adjacent to high-grade ovarian carcinomas contain molecular characteristics of high-grade carcinomas. *Cancer Res* 53: 4138-4142
- Zheng W., Benedict W.F., Xu H-J., Hu S-X., Kim T.M., Velicescu M., Wan M., Cofer K.F., Dubeau L. (1995): Genetic disparity between morphologically benign cysts contiguous to ovarian carcinomas and solitary cystadenomas. *J Natl Cancer Inst* 87: 1146-1153.
- Zheng W., Luo F., Lu J.J., Baltayan A., Press M.F., Zhang Z.F., Pike M.C (2000): Reduction of BRCA1 expression in sporadic ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 76: 294-300.

Danksagung

Ich möchte mich zuerst bei Herrn PD Dr. Arnold für die Unterstützung, das Vertrauen und die Übernahme des Referats bedanken.

Weiterhin gebührt der Dank Herrn Prof. Dr. med. Jonat, Frau Prof. Dr. med. Kiechle und Herrn PD. Dr. Arnold für die Möglichkeit zur Erstellung dieser Arbeit im onkologischen Labor der Frauenklinik in Kiel. Herr PD. Dr. Arnold und Frau Prof. Dr. med. Kiechle haben durch fachliche Anregungen und kompetente Hilfe einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet.

Ein großer Dank geht auch an Jörg, für seine nicht weniger wichtige Unterstützung bei den Computer-Fragen, die fachlich anregenden Diskussionen und vor allem die nette Zusammenarbeit.

Auch einen herzlichen Dank an Evi und Uli, vor allem für die Hilfe am PC.

Ein 'Dankeschön' geht auch an die Anderen aus der Lab-Crew, für die gute Atmosphäre und die netten Kaffeerunden. Hier geht ein besonderer Dank an Doris für ihre zeitweilige Aushilfe und an Katrin für gelegentliches Lesen.

Nochmals ein 'Dankeschön' an Herrn Hedderich für seine Bemühungen um eine statistische Auswertung.

Ein weiterer Dank geht an R.H.

Der größte und herzlichste Dank geht an Reiner, für seine große moralische und tatkräftige Hilfe beim Erstellen dieser Arbeit, für seine Geduld und sein Verständnis.

DANKE

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Arbeit - abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer - nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Diese Arbeit wurde bis jetzt weder ganz noch teilweise einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Die vorliegende Abhandlung wurde noch nicht veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

Teilergebnisse der Arbeit sind in folgenden Publikationen enthalten:

1. Jacobsen A., Arnold N., Weimer J., Kiechle M.: Comparison of Comparative Genomic Hybridization and Interphase Fluorescence in situ Hybridization in Ovarian Carcinomas: Possibilities and Limitations of Both Techniques, Cancer Genet Cytogenet; in Druck
2. Kiechle M. et al., in Vorbereitung