

Genetische Mechanismen der Tumorprogression bei Retinoblastom

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für

Biologie und Geografie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Sebastian Gustmann

aus Bergisch Gladbach

Oktober 2009

Die in der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Anatomie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. N. Dünker

2. Gutachter: Prof. Dr. B. Horsthemke

3. Gutachter: ---

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. A. Ehrenhofer-Murray

Tag der mündlichen Prüfung: 18.02.2010

Aufstellung der wissenschaftlichen Veröffentlichungen

Einen Teil der in dieser Dissertation präsentierten Thematik ist in Form eines Posters bzw. einer Kurzdarstellung und als Publikation in den folgenden Journalen bereits eingereicht oder veröffentlicht worden:

1. Poster & Kurzdarstellung

Gustmann S., Klein-Hitpass L., Lohmann D., Dünker N., 'New candidates for retinoblastoma: genetic analysis narrowing genes on chromosome 16q24', Neurovision 2009

2. Publikationen in Journalen

Dohle D.S., Pasa S.D., Gustmann S., Laub M., Wissler J.H., Jenissen H.P., Dünker N. (2009), 'Chick ex ovo culture and ex ovo CAM assay: How it really works.', JoVE <http://www.jove.com/index/details.stp?id=1620>, doi: 10.3791/1620 (accepted) – siehe CD 1

Gustmann S., Duenker N. (2009), 'In vivo-like organotypic murine retinal wholemount culture.', JoVE. <http://www.jove.com/index/details.stp?id=1634>, doi: 10.3791/1634 (under revision) – siehe CD 2

Meiner Patentante - Barbara Pfarr

... in der Hoffnung, dass meine Dissertation einen Beitrag zur Krebsforschung und langfristig auch zur Erforschung ihres Gehirntumors leistet ...

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Entstehung und Progression des Retinoblastoms	9
1.2	Die Maus als Retinaentwicklungsmodell	12
1.3	Das Huhn als Tumorinvasionsmodell.....	14
1.4	Zielsetzung.....	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Verwendete Materialien	18
2.1.1	Chemikalien.....	18
2.1.2	Puffer und Lösungen	19
2.1.3	Verbrauchsmaterialien und Werkzeuge.....	21
2.1.4	Geräte.....	22
2.1.5	Software	22
2.2	Präparation von Mausgewebe	23
2.2.1	Mausstamm C57BL/J6	23
2.2.2	Zucht und Verpaarung der Mäuse	23
2.2.3	Organentnahme für Positivkontrollen	24
2.2.4	Allgemeine Beschreibung der Retinapräparation	24
2.3	Retinoblastomzelllinien	26
2.4	Molekularbiologische Methoden.....	26
2.4.1	RNA-Isolierung	26
2.4.2	Analyse der RNA-Integrität.....	28
2.4.2.1	RNA-Gel	28
2.4.2.2	2100 Bioanalyzer.....	28
2.4.3	Reverse Transkription.....	29
2.4.4	Polymerase-Kettenreaktion	29
2.4.5	Agarosegelelektrophorese.....	31
2.4.6	Real Time PCR – quantitative Polymerase-Kettenreaktion	32
2.5	Die Affymetrix GeneChip® Plattform.....	34
2.6	Expressionsanalyse mittels <i>GeneChip® 3' expression arrays</i>	38
2.6.1	GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array	40
2.6.2	GeneChip® Human Genome U133A Array	40
2.7	Analyse der Expressionsdaten zur Mausretinaentwicklung	41

2.7.1	Bestimmung signifikant regulierter Gene mittels <i>Comparison Analysis</i>	42
2.8	Bioinformatische Werkzeuge	43
2.9	LOH-Analysen.....	44
2.9.1	LOH-Analyse mittels STR-PCR.....	45
2.9.2	LOH-Analyse mittels GeneChip® SNP-Array	45
2.9.3	CNAG 2.0	48
2.10	Eingrenzung möglicher Kandidatengene im LOH-Bereich.....	50
2.10.1	Identifikation von orthologen Genen des LOH-Bereichs im Mausmodell	50
2.10.2	Identifikation signifikant regulierter Gene innerhalb des LOH-Bereichs in Retinoblastomen mit und ohne LOH	52
2.11	Multiple CNAG basierte SNP-Analyse zur Identifikation von regional übereinstimmendem partiellem LOH in mehreren Tumoren	53
2.12	Etablierung eines <i>in vivo</i> Modells zur Analyse der möglichen Kandidatengene.....	53
2.12.1	Legehennen und Eier	54
2.12.2	Bebrüten von befruchteten Eiern.....	54
2.12.3	<i>Ex ovo</i> Kultur	54
2.12.4	<i>In ovo</i> Kultur	55
2.12.5	Transplantation von Geweben und Organen auf die CAM	56
2.12.5.1	Allotransplantation	57
2.12.5.1.1	Entwicklungsknospen Embryonaltag E3/E4	58
2.12.5.1.2	Augen Embryonaltag E3/E4	58
2.12.5.2	Xenotransplantation.....	58
2.12.5.2.1	Maus E13 Entwicklungsknospen	58
2.12.5.2.2	Blasenkarzinome und Melanome	59
2.12.5.3	Kultivierung von Tumortransplantaten auf der CAM.....	59
2.12.6	Inokulation und Injektion von Retinoblastomzellen	60
2.12.6.1	Vorbereiten von gefärbten und ungefärbten Zellen	60
2.12.6.2	Kontrolle der gefärbten Zellen mittels Durchflusszytometrie.....	60
2.12.6.3	Inokulation von Zellen auf die CAM	61
2.12.6.4	Injektion von Zellen in den Glaskörper	61
2.12.7	Fixierung der Transplantate für die Dokumentation.....	62

2.12.8 Erstellen von Paraffinschnitten	62
2.12.9 Erstellen von Kryoschnitten	64
2.12.10 Invasivitätsassay mittels Alu-Sequenz qPCR.....	64
3 Ergebnisse.....	67
3.1 Qualität der RNA.....	67
3.2 RNA-Qualitätsmessung mittels <i>affy</i>	67
3.3 Eingrenzung des 16q LOH-Bereichs.....	68
3.3.1 Eingrenzung mittels SNP-Array	69
3.3.2 Zusammenfassung der LOH-Analysen.....	71
3.3.3 Erweitertes Screening asservierter Retinoblastom-DNAs zur Eingrenzung der snpLOH-Region auf 16q.....	73
3.3.4 Multiple CNAG basierte SNP Analyse zur Identifikation von regional übereinstimmendem partiellem LOH in mehreren Tumoren	74
3.3.5 Signifikant regulierte Gene in der Mausretinaentwicklung	75
3.3.6 Eingrenzung der Kandidatengene mit Hilfe der signifikant regulierten Gene in der Mausretinaentwicklung.....	76
3.3.7 Eingrenzung der signifikant regulierten orthologen Gene in der snpLOH-Region.....	76
3.4 Kontrolle der Expressionsanalyse mittels qPCR.....	78
3.4.1 Cdh13.....	79
3.4.2 6430548M08Rik (human: KIAA0513).....	83
3.4.3 4632415K11Rik, Zdh7c, Cox4nb, Cox4i1 und Slc7a5.....	86
3.4.3.1 4632415K11Rik (human: KIAA1609).....	86
3.4.3.2 Zdh7c	88
3.4.3.3 Cox4nb	90
3.4.3.4 Cox4i	92
3.4.3.5 Slc7a5	93
3.5 Expression von CDH13 in Retinoblastomzelllinien	95
3.6 Etablierung, Optimierung und Erweiterung des Hühnerembryonen- Modells	98
3.6.1 Etablierung der Transplantationstechnik	99
3.6.1.1 Transplantation von Allo- und Xeno-Extremitätenknospen	99

3.6.2	Xenotransplantation von primären humanen Tumoren auf die CAM.....	101
3.6.3	Inokulation von Zellen auf die CAM	103
3.7	Injektion von Y79 Zellen in Hühnerembryonen-Augen.....	103
3.7.1	Kultivierung von Hühneraugen auf der CAM	106
3.7.2	Kultivierung von Mausaugen auf der CAM	108
3.7.3	Quantitativer Nachweis von humaner Alu-DNA mittels qPCR	109
4	Diskussion	111
4.1	LOH-Analyse.....	111
4.2	Cadherin 13	115
4.3	COX4NB, COX4I1, KIAA0513, KIAA1607, SLC7A5 und ZDHHC7.....	118
4.4	Etablierung und Eignung des CAM-Systems	119
4.4.1	Inokulation von Allo-und Xenotransplantaten	120
4.4.2	Invasivität von Retinoblastomzellen im Hühnerembryonen-Modell.....	123
4.5	Fazit.....	125
5	Zusammenfassung	127
6	Literaturverzeichnis	128
7	Anhang.....	141
7.1	Flussdiagramm für scanprogramm_2008-01-14.sh	141
7.2	Abkürzungsverzeichnis	142
7.3	Danksagung.....	143

1 Einleitung

Das Retinoblastom ist einer der häufigsten bösartigen Augentumore des Kindesalters. Es entsteht durch eine Fehlentwicklung der Retina und tritt im Durchschnitt bei einem von 15000 – 20000 lebend Neugeborenen auf. In den meisten Fällen wird ein Retinoblastom durch eine weiße Reflexion in der Pupille, z. B. auf Fotografien, oder durch eine Untersuchung bei einem Arzt erkannt (siehe Abbildung 1).

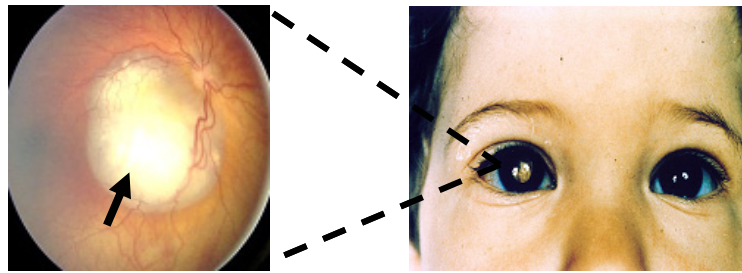


Abbildung 1: Diagnose eines Retinoblastoms bei einem Kind anhand der weißen Reflexion in der Pupille (schwarzer Pfeil: Retinoblastom).

Unbehandelt verläuft die Erkrankung immer tödlich, da sich der Tumor über den Sehnerv ins Gehirn ausbreitet. Bei einer rechtzeitigen Diagnose und Therapie kann die Krankheit in den meisten Fällen geheilt werden. Die Überlebensrate liegt bis zum Alter von 5 Jahren bei über 90%. Die Art der Behandlung von Retinoblastomen hängt hauptsächlich von der Lage und der Größe des Tumors sowie dessen Verbreitung im Auge ab. Die gängigste Behandlungsmethode bei kleinen und gut erreichbaren Tumoren ist die Zerstörung des Retinoblastoms durch Strahlen- (Brachy- oder Tele-), Hitze- (Lichtkoagulation) oder Kältetherapie (Kryokoagulation). Durch diese Behandlung können in den meisten Fällen die Funktion und das Auge selbst erhalten werden. Ist der Tumor sehr groß oder weist er eine Glaskörperaussaat (Metastasierung bzw. Streuung des Tumors in den Glaskörper) auf, ist die Entnahme des Auges (Enukleation) die einzige Behandlungsform, um eine Neuerkrankung zu vermeiden. Im Gegensatz zum guten Behandlungserfolg und der hohen 5-Jahres Überlebensrate ist die Langzeitprognose schlecht. Neben den möglichen Folgen der Therapie durch eine eingeschränkte Sehkraft ist das Risiko der Entstehung von Tumoren außerhalb des Auges (Zweitumore) sowie die verbundene Sterblichkeit erhöht. Das Risiko an Zweitumoren zu erkranken, existiert hauptsächlich bei Patienten mit der erblichen Form des Retinoblastoms. Bei ihnen steigt das Risiko durch den Einsatz

von Strahlentherapie an einem Zweittumor zu erkranken zusätzlich bis um das Fünffache. Aus diesem Grund sind Diagnose und Wahl der richtigen Behandlungsform für die Langzeitprognose von entscheidender Bedeutung. Die Suche nach alternativen Behandlungsmethoden für die Strahlentherapie und somit für die Verbesserung der Langzeitprognose sind Ziele der Erforschung i) der Interaktionen zwischen Tumor und umgebendem Gewebe (Gefäße, Stroma) sowie ii) von Mechanismen, die an der Entstehung und Progression des Retinoblastoms beteiligt sind.

Die Erforschung der Progression des Retinoblastoms ist Inhalt der vorliegenden Dissertation. Aus diesem Grund wird in den folgenden Teilabschnitten neben der Entstehung und Progression des Retinoblastoms, die Strategie für die in der vorliegenden Doktorarbeit durchgeführten Untersuchungen erläutert und die verwendeten Methoden beschrieben.

1.1 Entstehung und Progression des Retinoblastoms

Das Retinoblastom entsteht durch eine Fehlentwicklung während der Retinogenese. Die Fehlentwicklung wird durch Mutationen in beiden Allelen des Tumorsuppressorgens RB1 hervorgerufen, die zur Inaktivierung des Gens führen (Friend et al., 1986). Ein Tumorsuppressorgen ist ein Gen, das bei vorhandener richtiger Funktion, die Entstehung eines Tumors verhindert. In den meisten Fällen wird der Verlust der Funktion eines Allels durch das andere kompensiert, so dass für eine vollständige Inaktivierung des Gens, wie von Knudson in seiner Hypothese beschrieben (Knudson, 1971), eine weitere Mutation auftreten muss. Dies kann wie im Falle des RB1 Gens entweder durch zwei somatische Mutationen (nicht erbliche Form des Retinoblastoms) oder durch eine Keimbahnmutation des einen Allels und einer anschließenden somatischen Mutation des zweiten Allels geschehen (erbliche Form des Retinoblastoms). Das RB1 Gen ist auf Chromosom 13q14 lokalisiert und kodiert für ein nukleäres Phosphorprotein (pRb), das sowohl in der Differenzierung von Zellen als auch im Zellzyklus eine entscheidende Rolle spielt, indem es z. B. mit dem Transkriptionsfaktor E2F1 interagiert (Cobrinik, 2005; Skapek et al., 2006; Weinberg, 1995). Neben dem Retinoblastom ist das RB1 Gen ebenfalls in einem Großteil von anderen humanen Tumoren, wie z. B. Brustkrebs, inaktiviert. Trotz der nun seit 20 Jahren bestehenden Forschung konnte die Ursprungszelle (*cell of origin*) bisher noch nicht identifiziert werden. In der Literatur werden mehrere

Modelle und unterschiedliche Ursprungszellen diskutiert: i) das Transitionszellmodell (*transition-cell* bzw. *death model*) und ii) das Vorläuferzellmodell (*progenitor-cell* bzw. *differentiation model*). Das Transitionszellmodell geht davon aus, dass die Übergangszelle weder multipotent oder endgültig ausdifferenziert ist, noch synaptische Verbindungen geformt hat, dafür aber bereits zu einem bestimmten Zelltyp gehört. Die Übergangszellen wandern zu ihrer vorbestimmten Stelle in der Retina, an der sie ausdifferenzieren. Aufgrund des inaktiven RB1 Gens treten sie nicht aus dem Zellzyklus aus, sondern teilen sich weiter, obwohl sie ausdifferenziert sind. Der Einfluss des RB1 Gens wirkt sich in diesem Modell allein auf die post-mitotischen Übergangszellen aus und hat keinen Einfluss auf die Vorläuferzellen. Im Gegensatz dazu bewirkt die Inaktivierung des RB1 Gens nach dem Vorläuferzellmodell, dass sich bestimmte Vorläuferzellen der Retina ektopisch (außerhalb der normalen Lage) und zu einem Zeitpunkt teilen, an dem die Zellproliferation normalerweise stoppt (Bremner et al., 2004; Chen et al., 2004; Dyer und Bremner, 2005). Unabhängig von dem jeweiligen Modell sind für die Entstehung eines Retinoblastoms ein oder mehrere Mutationen in diesen Zellen nötig, da ein vollständiger Verlust des RB1 Gens nicht die erforderlichen Veränderungen hervorruft, die für die Progression des Retinoblastoms notwendig sind (Lohmann und Gallie, 2004). In diesem Zusammenhang werden in vielen Retinoblastomen zusätzlich zu den Veränderungen am RB1 Locus auch genomische Mutationen in Form von Gendosisveränderungen z. B. durch Zugewinn oder Verlust von genetischem Material nachgewiesen. In den meisten Fällen werden insbesondere Zugewinne im Abschnitt des langen Arms von Chromosom 1 (Chromosom 1q) in etwa 40-50% der Retinoblastome (Corson et al., 2005; Gratias et al., 2005) und im Abschnitt des kurzen Arms von Chromosom 6 (Chen et al., 2002; Grasemann et al., 2005; Orlic et al., 2006) festgestellt. Der Verlust von genetischem Material des langen Arms von Chromosom 16 tritt bei ungefähr 30% der Retinoblastome auf (Gratias et al., 2007; Marchong et al., 2004). Der Verlust von genetischem Material kann mittels *loss of heterozygosity* (LOH-) Analysen (siehe Abschnitt 2.9 auf Seite 44ff) nachgewiesen werden. Der Begriff LOH (Verlust der Heterozygotie) beschreibt den Verlust einer oder mehrerer heterozygoter Loci. Dieser Verlust kann zum Nachweis von möglichen Tumorsuppressorgenen dienen, deren Aktivität gänzlich durch das verlorene Allel gewährleistet wurde, da das andere

Allel zuvor bei einer vorhergegangenen Mutation inaktiviert worden war. Nahezu alle Tumore mit Veränderung auf dem langen Arm von Chromosom 16 zeigen zum Zeitpunkt der Diagnose eine Form der Metastasierung bzw. Tumorzellinvasion in den Glaskörper, die als Glaskörperaussaat bezeichnet wird (Gratias et al., 2007). Bei einem solchen Befund wird das betroffene Auge enukleiert, um eine weitere Ausbreitung des Tumors, die bei einer Augen erhaltenden Therapieform möglich wäre, auszuschließen. Des Weiteren würde eine Strahlentherapie das Risiko einer Zweittumorbildung nur unnötig erhöhen. Eine frühe Erkennung dieser Ausprägung des Retinoblastoms mittels eines genetischen Markers wäre wünschenswert. Als Grundlage bzw. Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit diene eine LOH-Analyse (siehe Teilabschnitt 2.9.1 auf Seite 45) auf der Basis von 11 *short tandem repeat* (STR) Markern (D16S3080, D16S3050, D16S3048, D16S3023, D16S3026, D16S409, D16S3397, D16S3118, D16S3125, D16S3055 und D16S422), die zwei Bereiche auf 16q mit genetischem Verlust bzw. LOH identifizierte (Gratias et al., 2007): i) einen kleinen Bereich von ungefähr 1,3 Mb auf 16q23.1 und ii) eine Region mit ca. 5,6 Mb, die sich von 16q23.3 bis 16q24.2 erstreckte (siehe Abbildung 2).

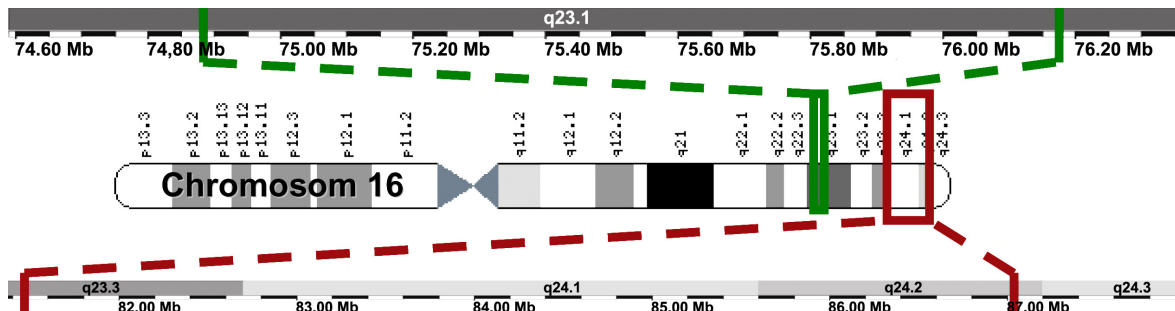


Abbildung 2: Ergebnisse aus der LOH-Untersuchung mittels STR-Marker. Grün: 1,3 Mb LOH-Bereich, rot: 5,6 Mb LOH-Bereich.

Die Gene in den beiden nachgewiesenen LOH-Bereichen stellen mögliche Kandidatengene dar, die für eine Glaskörperaussaat und somit für eine Form der Progression des Retinoblastoms verantwortlich sein können. Die Möglichkeit, dass es sich bei den potenziellen Kandidatengenen um an der Entwicklung der Retina beteiligte Gene handeln könnte, wird durch Fälle bekräftigt, in denen zunächst Tumorsuppressor- oder Onkogene entdeckt worden sind, die sich später aufgrund ihrer Entwicklungsstadien-abhängigen Expression in gesunden Geweben als wichtige Regulatoren der Differenzierung und des Zellwachstums herausgestellt haben (Wechsler-Reya und Scott, 2001). Da Ereignisse während der

Retinaentwicklung für die Entstehung und Progression des Retinoblastoms verantwortlich sind, ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Entwicklungsgen während der Retinaentwicklung das gesuchte Kandidatengene ist, sehr hoch. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit parallel zu der LOH-Analyse eine Eingrenzung der potenziellen Kandidatengene mit Hilfe einer Expressionsanalyse zur Retinaentwicklung der Maus durchgeführt, da eine solche Analyse an humanem Gewebe aus naheliegenden Gründen nicht möglich ist. Die Grundlagen dieser Strategie sind im nächsten Teilabschnitt beschrieben.

1.2 Die Maus als Retinaentwicklungsmodell

Das Mausmodell war für die im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit geplante retinale Genexpressionsanalyse besonders geeignet, da es ein experimentell leicht zugängliches Modellsystem ist, in dem die Retinaentwicklung ausführlich dokumentiert wird (Cepko et al., 1996; Martins und Pearson, 2008; Péquignot et al., 2003).

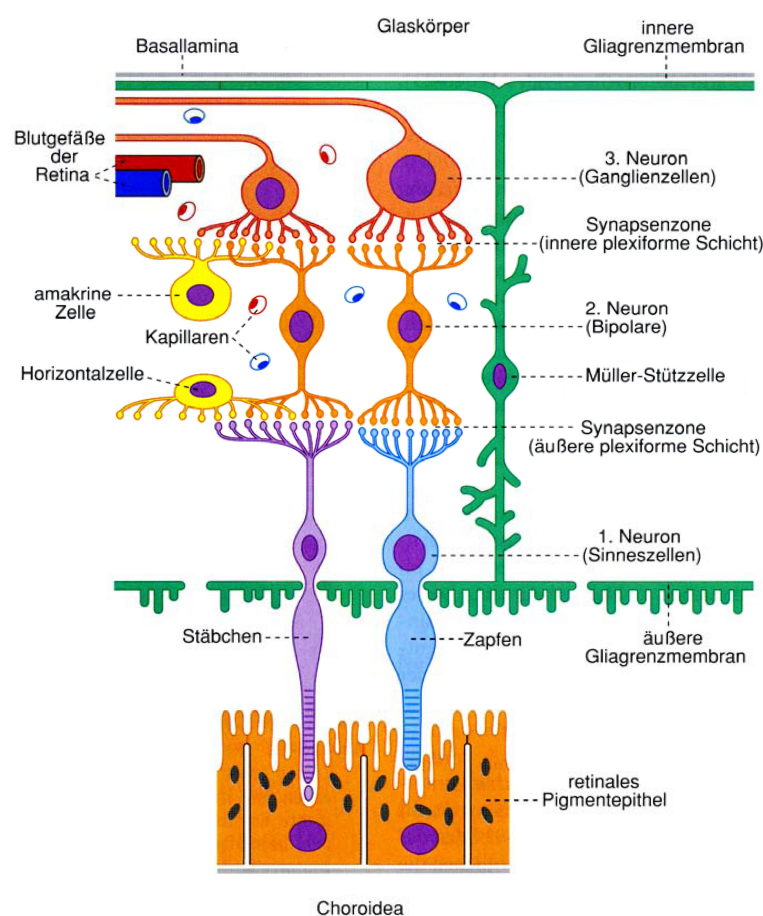


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aufbaus der menschlichen Retina. Modifiziert nach: Trepel, Neuroanatomie: Struktur und Funktion (Trepel, 2004).

Die Entstehung der sieben Hauptzelltypen der Retina (siehe Abbildung 3) aus den Vorläuferzellen sowie deren endgültige Schichtung in der vollständig entwickelten Retina ist sowohl ein zeitlich wie räumlich exakt aufeinander abgestimmter Vorgang.

Die Koordination der Retinaentwicklung erfolgt durch ein Zusammenspiel aus extrinsischen Faktoren und einer genau definierten Regulation der Expression (Cepko et al., 1996; Martins und Pearson, 2008). Die komplexe Organisation führt schon während der Retinogenese zu einer morphologischen Schichtung (Martins und Pearson, 2008).

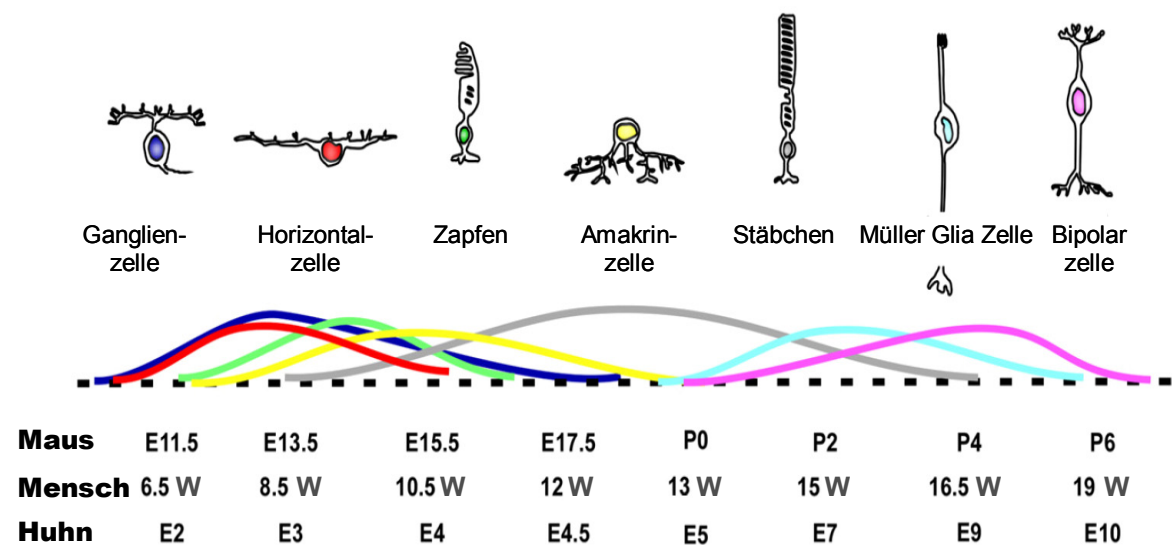


Abbildung 4: Zeitliche Koordination der Ausdifferenzierung der Retina bei Maus, Mensch und Huhn (W = Woche, E = Embryonaltag, P= Postnataltag). Bemerkung: In der Retina des Huhns werden nur Zapfen gebildet. Modifiziert nach Martins und Pearson (2008).

Die Differenzierung der retinalen Zellen erfolgt über mehrere Entwicklungstage hinweg, wobei die Menge der neu ausdifferenzierten Zellen zunächst zu und ab einem bestimmten Tag wieder abnimmt. Die Zeiträume der Ausdifferenzierung der Zellen überschneiden sich und die Menge der neu ausdifferenzierten Zellen weisen an genau definierten Tagen ihren Scheitelpunkt auf (siehe Abbildung 4). Die morphologische Struktur ist nicht allein das Ergebnis von Migration und Differenzierung. Es ist ebenfalls das Ergebnis von Apoptose, die in vier sogenannten Apoptosephasen während der Retinaentwicklung der Maus vermehrt auftritt und zur Eliminierung von nicht mehr benötigten Zellen dient. Die vier Apoptosephasen der Mausretina fallen auf die Embryonaltage (E) E15 bis E17 (Frade und Barde, 1999; Sidman, 1957) und die Postnataltage (P) P2, P9 und P15 (Péquignot et al., 2003). Die Apoptosephase von E15 bis E17 korreliert annähernd

mit dem Peak der Ganglienzelldifferenzierung (Frade und Barde, 1999; Sidman, 1957). Die Zelltodphase am zweiten Postnataltag weist hohe Apoptoseraten von Zellen in der inneren Neuroblastenschicht (*inner neuroblast layer*; INbl) auf, aus der sich die spätere Ganglienzellschicht (*ganglion cell layer*; GCL) entwickelt. Während der Apoptosephase am Postnataltag 9 sind die meisten apoptotischen Zellen in der inneren Körnerschicht (*inner nuclear layer*; INL), die aus Amakrin-, Bipolar- und Horizontalzellen besteht, lokalisiert. Am Postnataltag 15 weisen sowohl die äußere Körnerschicht (*outer nuclear layer*; ONL), in der die Kerne der Photorezeptoren liegen, als auch die Ganglienzellschicht eine hohe Apoptoserate von Zellen auf. Ab dem 20. postnatalen Tag gilt die Entwicklung der Mausretina als abgeschlossen.

Auf der Grundlage der oben beschriebenen Mechanismen der Retinaentwicklung und der in dem vorherigen Teilabschnitt erläuterten Modelle zur Entstehung und Progression des Retinoblastoms wurden folgende Mausstadien für die Expressionsanalyse ausgewählt: die Embryonaltage (E) E13, E15, E17, die Postnataltage (P) P0, P2, P5, P9, P12, P15, P20 und das adulte Stadium (Ad).

Die Auswahl der Mausstadien deckte sowohl die einzelnen Zelldifferenzierungsphasen der Retinazellen (siehe Abbildung 4): i) Ganglienzellen (E13, E15, E17), ii) Horizontalzellen (E13, E15), iii) Zapfen (E13, E15), iv) Amakrinzellen (E13, E15, E17), v) Stäbchen (E15, E17, P0, P2), vi) Müller Gliazellen (P0, P2, P5), vii) Bipolarzellen (P0, P2, P5) als auch die einzelnen Zelltodphasen E15, P2, P9 und P15 ab. Zusätzlich wurde das Ende der Retinaentwicklung (P20), ein Stadium zwischen den Zelltodphasen P9 und P15, P12 sowie ein adultes Stadium als Endpunkt der Entwicklung und des Wachstums ausgewählt. Durch diese Wahl wurden alle entwicklungsrelevanten Phasen der Mausretinaentwicklung abgedeckt.

Die Entwicklungstage wurden in dieser Doktorarbeit in ganzen und nicht in halben Tagen angegeben, wie in Abbildung 4 auf Seite 13 zu sehen. Der Tag, an dem nach der Verpaarung der Mäuse über Nacht ein Vaginalpfropf eine erfolgreiche Begattung anzeigte, wurde als Tag 0 definiert.

1.3 Das Huhn als Tumorinvasionsmodell

Am Universitätsklinikum Essen wird eine Vielzahl von Retinoblastomen pro Jahr behandelt. In maximal 20 bis 30 Fällen pro Jahr wird das Auge entnommen und eine Tumorbiopsie durchgeführt. Da am Universitätsklinikum mehrere

Arbeitsgruppen an der Erforschung des Retinoblastoms arbeiten und die entnommenen Biopsien hauptsächlich zur Diagnose in Form einer genetischen Charakterisierung dienen, ist es sehr schwierig ohne Begründung in Form von vorliegenden Ergebnissen und in der Arbeitsgruppe etablierten Versuchsansätzen Retinoblastombiopsien bzw. Proben von Retinoblastombiopsien zu erhalten. Aus diesem Grund war es ein Teilziel der vorliegenden Dissertation ein Testsystem zu etablieren, das für die Erforschung des Invasivitätsverhaltens von Retinoblastomzellen und die Progression von Retinoblastomen genutzt werden kann. Das System sollte im Hinblick auf die Verwendbarkeit für primäre Retinoblastome optimiert und erweitert werden. Dabei sollten zum einen die Beschränkungen von reinen *in vitro* Zellkulturversuchen aufgehoben und die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die *in vivo* Situation erreicht, zum anderen eine Alternative zu klassischen Tierversuchen im Maus- oder Rattenmodell gefunden werden. Ein geeignetes Modell und Testsystem ist das Hühnerembryonen-Modell, welches ein *in vivo* System darstellt, ohne ein Tiermodell zu sein, und somit Experimente *in ovo* oder *ex ovo* nicht als Tierversuch gelten (siehe Abbildung 5).

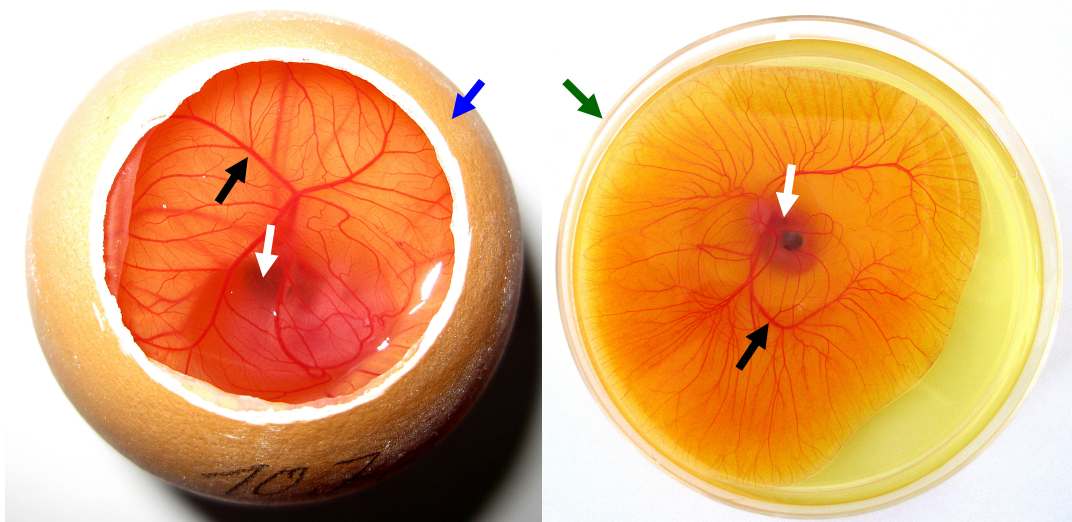


Abbildung 5: *In ovo* (links) und *ex ovo* (rechts) Kultur. Weißer Pfeil: Hühnerembryo, schwarzer Pfeil: Blutgefäß, blauer Pfeil: Eischale, grüner Pfeil: Petrischale.

Das Hühnerembryonen-Modell ist ein bewährtes und verlässliches Testsystem für Tumor- (Deryugina und Quigley, 2008; Ribatti, 2008) und Angiogenesestudien (Ribatti, 2008). Aufgrund der späten Entwicklung des Immunsystems (Immunoinkompetenz bis zum embryonalen Tag E17) stellen Hühnerembryonen im Gegensatz zu immun supprimierten Mausmodellen ein geeignetes und

unkompliziertes System zur Erforschung von Metastasierung und Invasivität von Tumorzellen dar. Selten wird hierfür der Embryo selbst, als vielmehr das für den Gasaustausch zuständige und somit mit einer Lunge vergleichbares Organ, die Chorioallantoismembran (CAM), verwendet. Ein sogenannter CAM-Assay kann entweder in der sogenannten *in ovo* oder *ex ovo* Kultur durchgeführt werden (Deryugina und Quigley, 2008; Dohle et al., 2009; Fischer, 1993; Tufan, 2004). Bei der *in ovo* Kultur wird die Eischale und -haut an einer Stelle des Eies vorsichtig entfernt (sog. Fenstern), so dass die CAM zugänglich wird. Für die *ex ovo* Kultur wird das Ei aufgeschlagen und der gesamte Inhalt des Eies samt Embryo in ein Gefäß überführt, in dem sich der Embryo mit der CAM entwickelt (siehe Abbildung 5; Dohle et al., 2009). Die Bildung der CAM beginnt mit dem 4. – 5. embryonalen Entwicklungstag, wenn sich die äußere mesodermale Schicht der Allantois (embryonale Harnblase) mit der mesodermalen Schicht des Chorion (äußere Fruchthüllen des Embryos) vereinigt und zwischen diesen Schichten ein Blutgefäßsystem ausgebildet wird. Ab dem 12. Tag ist die CAM mit ihrem Blutgefäßsystem komplett entwickelt und umgibt den Embryo vollständig. Ab dem 8. bis 10. Tag kann die CAM für Zellinokulationen oder Tumortransplantate ohne Spezies-Spezies Restriktionen genutzt werden (Deryugina und Quigley, 2008). Histologisch besteht die CAM aus drei Schichten: i) einem äußeren Ektoderm (Periderm und Basalmembran), das sich aus dem Chorion entwickelt hat und der Eischale anliegt, ii) einem Mesoderm mit dem Blutgefäßsystem und iii) einem Entoderm, das aus der mesodermalen Schicht der Allantois hervorgegangen ist. Das weitverzweigte und ausgeprägte Blutgefäßsystem der CAM bietet einen idealen Nährboden für Tumortransplantate und Tumorzellsuspensionen (Dohle et al., 2009) und ist somit zur Erforschung von Tumorzellinvasion und -intravasion sowie Dissemination und Metastasenbildung (Deryugina und Quigley, 2008) sehr geeignet. Allerdings ist in der Literatur noch nicht eindeutig geklärt, ob eine Traumatisierung bzw. Verletzung der CAM für das Wachstum des Transplantats nötig oder nur fördernd ist (Armstrong et al., 1982; Ossowski, 1988; Petruzzelli et al., 1993). Hingegen ist bei inokulierten Zellen dokumentiert, dass bei traumatisierter CAM selbst Fibroblastenzellen die Fähigkeit aufweisen, in die CAM einzuwandern (Armstrong et al., 1982) und, dass bei einer unverletzten CAM nur Mikroaggregate auf der Oberfläche gebildet werden (Ossowski, 1988). Das Periderm der CAM stellt demnach für die Zellen eine undurchdringliche Barriere

dar. Im Gegensatz hierzu stehen jedoch Untersuchungen zur pro-angiogenetischen Kapazität von Tumorzellen, bei denen die Zellen in einen gelartigen Block (z. B. Matrigel) gegossen werden. In diesem Versuchsaufbau sowie beim Austesten von pro-angiogenetischen Faktoren darf die CAM nicht verletzt werden (Deryugina und Quigley, 2008).

1.4 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Dissertation war die Eingrenzung von Kandidatengenen, die zur Progression von Retinoblastomen mit einem Verlust von genomischem Material bzw. einem LOH auf Chromosom 16q und Metastasierung in den Glaskörper führen.

Dazu sollten

1. die in einer Vorstudie (Gratias et al., 2007) eingegrenzten LOH-Bereiche mit Hilfe einer hochauflösenden, Mikroarray-basierten *single nucleotide polymorphism* (SNP)-Analyse bestätigt und weiter eingegrenzt werden.
2. mögliche Kandidatengene anhand von Expressionsanalysen der Mausretinaentwicklung mit Hilfe von DNA-Mikroarrays und mittels Real Time PCR bzw. quantitativer PCR (qPCR) identifiziert werden.
3. mit Hilfe des CAM-Modells ein *in vivo* Testsystem für die Untersuchung möglicher Kandidatengene etabliert und optimiert sowie für zukünftige Untersuchungen an primären Retinoblastomen erweitert werden.

2 Material und Methoden

Die Eingrenzung der möglichen Kandidatengene erfolgte überwiegend mit Hilfe von DNA-Mikroarrays sowie unter Verwendung bioinformatischer Werkzeuge und selbst geschriebener Skripte. Einige Arbeiten wurden im Labor des Kooperationspartners und Zweitbetreuers dieser Arbeit, Herrn Prof. Dr. Dietmar Lohmann, aus dem Institut für Humangenetik am Universitätsklinikum Essen durchgeführt. Diese Methoden sind zwar in der vorliegenden Arbeit aufgelistet und erklärt, werden aber nicht im Detail besprochen. Eine ausführliche Beschreibung ist in den angegebenen Publikationen zu finden. Der zweite Themenkomplex ist die Etablierung, Optimierung und Erweiterung eines CAM-Modells für die spätere Untersuchung der möglichen Kandidatengene.

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien

2-Propanol, for molecular biology >99%	I9516-500ML	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
3DPX Mountant for histology 100ml	44581	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) Dihydrochlorid	D 9542	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Agarose NEEO Ultra	2267.4	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
beta-Mercaptoethanol	M7522-100ml	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Bromphenolblau	B-8026	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Chloroform >99%	C2432-500ML	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Dako Mounting Medium	S3023	Dako, USA (CA)
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	K028.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Di-Natriumtetraborat-10-Hydrat	Art. 6308	Merck, Darmstadt
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	P04-04510	PAN-BIOTECH GmbH, Aidenbach
DMSO (Dimethylsulfoxid)	D2650	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Dneasy Blood & Tissue Kit (50)	69504	Qiagen GmbH, Hilden
dNTP-Set (2'-Deoxynukleosid 5'-Triphosphat), 100 mM	10297-018	Invitrogen, Karlsruhe
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), ohne Ca und Mg, für 50l	P04-36050P	PAN-BIOTECH GmbH, Aidenbach
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	L182-50	Biochrom AG, Berlin
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure), Konz. 0,5 M	11278	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Essigsäure	3738.4	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol, 200 proof (absolute), for molecular biology	E7023-500ML	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Ethidiumbromid	46067	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Foetal Bovine Serum Gold (FBS)	A15-151	PAA Laboratories GmbH, Pasching (AT)

Fötales Rinderserum, hitzeinaktiviert (FBS bzw. FCS)	1902-Lot#	PAN-BIOTECH GmbH, Aidenbach
Glycerol 87%	40.941.000	Merck Pharma GmbH, Darmstadt
Glycin	3908.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HCl (Salzsäure)	109970	Merck Pharma GmbH, Darmstadt
HCl (Salzsäure), 37 % ROTIPURAN	4625.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Human Retina Total RNA	636579	Clontech Laboratories, USA (CA)
Insulin (bovine pancreas)	I6634-100mg	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Isopropanol (2-Propanol)	I9516-500ML	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
KCl (Kaliumchlorid)	49.330.500	Merck Pharma GmbH, Darmstadt
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	4873	Merck Pharma GmbH, Darmstadt
L-Glutamine 200 mM (100x) liquid	25030-024	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin-SL 200mM	G7513-100ml	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	HN 03.3	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol	32213	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O (Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat)	6346	Merck Pharma GmbH, Darmstadt
NaCl (Natriumchlorid)	3957.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
NaOH (Natronlauge)	109137	Merck Pharma GmbH, Darmstadt
Nuclease-free Water (not DEPC-treated)	AM9939	Applied Biosystems/Ambion, USA (TX)
Oligo (dT)20 Primer, 50 µM	18418	Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA)	P6148	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Penicillin-Streptomycin Lösung	15140-122	Invitrogen, Karlsruhe
Pikrinsäurelösung, gesättigt, 1,3 %	P6744-1GA	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Mini Kits	MINI26	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
QuantiTect Rev. Transcition Kit (200)	205313	Qiagen GmbH, Hilden
Rnase A (17,500U)	19101	Qiagen GmbH, Hilden
RNase AWAY	A998.3	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
RNAsecure™ Reagent	AM7005	Applied Biosystems/Ambion, USA (TX)
Sodiumdodecylsulfat-Pellets (SDS)	CN30.3	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SYBR Green PCR Master Mix	4309155	Applied Biosystems, USA (CA)
Taq DNA-Polymerase rekombinant	GC 002-1000	BioTherm, Gaithersburg
TaqMan Gene Expression Master Mix	4369016	Applied Biosystems, USA (CA)
TaqMan Gene Universal Master Mix	4304437	Applied Biosystems, USA (CA)
Tissue-Tek, OCT Compound	4583	Sakura Finetek Europe B.V., Niederlande
TrackIt 100 bp DNA Ladder	10488	Invitrogen, Karlsruhe
TRIS	AE15.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trizma base, >99,9% (TRIS)	T6066-100G	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
TRizol Reagenz	15596-018	Invitrogen, Karlsruhe
Xylol-Ersatz 4I, Shandon Xylene Substitute	6764506	Thermo scientific electron corporation, UK

2.1.2 Puffer und Lösungen

Bouin-Lösung (100 ml)

- 75 ml gesättigte (1.3 %) wässrige Pikrinsäurelösung
- 25 ml Formalin (= wässrige Formaldehydlösung, 36% - 40%)
- 5 ml Eisesig (konzentrierte Essigsäure) - erst bei Verwendung hinzufügen

0,5 M EDTA-Lösung mit pH 8,0 (100 ml)

14,62 g EDTA,
80 ml deionisiertes Wasser,
pH-Wert unter Rühren mit 10 N NaOH auf pH 8,0 einstellen
auf 100 ml mit deionisiertem Wasser auffüllen.

Berechnung der einzusetzenden Menge EDTA in g: $m = c \cdot M \cdot V$

m: Masse, [m] = 1 g

c: Stoffmengenkonzentration, [c] = 1 mol/l (veraltet: Molarität)

M: Molare Masse, [M] = 1 g/mol

V: Volumen, [V] = 1 l

$m = c \cdot M \cdot V = 0,5 \text{ mol/l} \cdot 292,25 \text{ g/mol} \cdot 0,1 \text{ l} = 14,62 \text{ g}$

5x Ladepuffer (50 ml), RNA-Gel

20 µl 0,5 M EDTA
25 ml Glycerol (Glycerin)
kleine Spatelspitze Bromphenolblau
KEIN Xylencyanol
auf 50 ml mit DEPC-behandeltem Wasser / deionisiertem Wasser auffüllen
in je 1 ml aliquotiert einfrieren

vor erster Verwendung 40 µl (1/25 Volumen) RNasecure hinzugeben
20 min bei 60°C inkubieren
bei 4°C lagern

6x Ladepuffer (50 ml), DNA-Gel

24 µl 0,5 M EDTA
30 ml Glycerol
kleine Spatelspitze Bromphenolblau
kleine Spatelspitze Xylencyanol
auf 50 ml mit deionisiertem Wasser auffüllen

PBS (Phosphate Buffer Saline) Dulbecco

95,5 g/l DPBS bzw. PBS
in deionisiertem Wasser gelöst

Phosphatpuffer pH 7,4 (1000 ml)

182 ml Lösung A + 818 ml Lösung B

Lösung A 9,078 g KH₂PO₄ in 1000 ml deionisiertem Wasser auflösen

Lösung B 11,876 g Na₂HPO₄·2H₂O in 1000 ml deionisiertem Wasser auflösen

4% ige Paraformaldehyd-Lösung (100 ml)

4 g Paraformaldehyd (PFA) in 100 ml Phosphatpuffer lösen

15%- bzw. 30%iger Saccharosepuffer (100 ml)

15 bzw. 30 g Saccharose in 100 ml Phosphatpuffer unter rühren lösen

50x TAE-Puffer (1000 ml)

242 g TRIS,
750 ml destilliertes Wasser
57,1 ml Eisessig (Essigsäure, Ethansäure)
100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
auf 1000 ml mit deionisiertem Wasser
pH-Wert erneut überprüfen, gegebenenfalls mit Eisessig auf pH 8,0 nachtitrieren
zum Gebrauch der Stammlösung die 50x Stammlösung 1:50 verdünnen

2.1.3 Verbrauchsmaterialien und Werkzeuge

Einmal-Küvetten aus Polystyrol, 1,5 ml		Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Falcons 15 ml	188271	Greiner Bio-one GmbH, Solingen
Falcons 50 ml	227261	Greiner Bio-one GmbH, Solingen
Filterspitzen, 10 µl	770020	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Filterspitzen, 10 µl	770030	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Filterspitzen, 1000 µl	770400	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Filterspitzen, 20 µl	770050	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Filterspitzen, 200 µl	770200	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Filterspitzen, 200 µl	770280	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Hamilton 33-G Kanüle (15 mm)	18073-15	Fine Science Tools, Heidelberg
MicroAmp® 96- & 384-Well Optical Adhesive Film	4311971	Applied Biosystems, Forster City, USA
MicroAmp® Adhesive Seal Applicators	4333183	Applied Biosystems, Forster City, USA
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode	4306737	Applied Biosystems, Forster City, USA
MicroAmp® Splash Free 96-Well Base	4312063	Applied Biosystems, Forster City, USA
Microlance 3, 23G x 1", Nr. 16	300800	BD Microlance, Drogheda, Ireland
Microlance 3, 27G x 3/4", Nr. 20	302200	BD Microlance, Drogheda, Ireland
Mikroliterspritze 1702 TLLX, 25 µl	80222	Hamilton, Reno (NV) USA
Objektträger		Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Objektträger 76 mm x 26 mm, Mattrand geschnitten	K0123b	Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünd
Pasteurpipetten		Brand GmbH, Wertheim
PCR-Tubes RNase- und DNase-frei 0,2 ml		Eppendorf AG, Hamburg
Petrischale, 100 mm x 20 mm	664160	Greiner Bio-one GmbH, Solingen
Petrischale, 60 mm x 15 mm	628102	Greiner Bio-one GmbH, Solingen
Petrischale, 92 mm x 16 mm	821.472	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Pinzetten DUMONT #5	11252-30	Fine Science Tools, Heidelberg
Pinzetten DUMONT #7	11271-30	Fine Science Tools, Heidelberg
Pinzettenschere, gerade, 8cm	15000-00	Fine Science Tools, Heidelberg
Pipeten, 1000µl	70.762	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Pipeten, 20µl - 200µl	70.760.002	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Plastibrand UV-Küvette, mikro (8,5mm), Einmalküvette	7592	Brand GmbH, Wertheim
Plastik Pipetten, 10 ml	607180	Greiner Bio-one GmbH, Solingen
Plastik Pipetten, 25 ml	760180	Greiner Bio-one GmbH, Solingen
Plastik Pipetten, 5 ml	606180	Greiner Bio-one GmbH, Solingen
Reaktionsgefäß, RNase- und DNase-frei, Safelock 1,5 ml		Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäß, Safelock 0,5 ml, 1,5 ml und 2,0 ml		Eppendorf AG, Hamburg
Rührfisch, dreiseitig, 80 mm	442-0391	VWR, Darmstadt
Schere, gerade klein spitz	14094-11	Fine Science Tools, Heidelberg
Sieblöffel	15758	Geuder AG, Heidelberg
Skalpell (steril)		
Spritze ohne Nadel 1ml	BS-01T	Terumo Deutschland GmbH, Eschborn
Standardschere, gerade, spitz / stumpf	14007-14	Fine Science Tools, Heidelberg
Superfrost Plus Objektträger 25 mm x 75 mm	03-0060	R. Langenbrink Labor u. Medizint., Teningen
Zellkulturflaschen		Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden

2.1.4 Geräte

Automatische Pipettierhilfe „Accu-Jet“	Brand GmbH, Wertheim
Automatische Pipettierhilfe „Discovery“, Typ P10, P20, P100, P1000	Abimed GmbH, Langenfeld
Automatische Pipettierhilfe, Typ Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg
Becherglas	Brand GmbH, Wertheim
Biocap DNA/RNA (S/N: RNA 1022408)	ERLAB D.F.S., Vertretungsbüro Köln
CO ₂ -Brutschrank, Hera Cell 150	Heraeus, Hanau
CO ₂ -Brutschrank, Typ Nuaire	Nuaire, Caerphilly, UK
Dispergiergerät, T 10 basic (3420000)	IKA Labortechnik, Staufen
Dispergierständer, IKA R 104 (3343000)	IKA Labortechnik, Staufen
Dispergierwerkzeug, S10N5G (3304000)	IKA Labortechnik, Staufen
Eierinkubator BSS 160 (8101)	Grumbach, Germany
Flächenbrüter, Typ 3000 mit Wendeeinsatz (9503)	Siepmann GmbH Germany
Fluoreszenzlampe	Nikon Corporation, Tokyo
Fluoreszenz-Mikroskop, Eclipse E600	Nikon GmbH, Düsseldorf
Heizblock, Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg
Horizontal-Elektrophoresekammer (Midigel), EHO-2	Kisker, Steinfurt
Kamera AxioCam	Carl Zeiss, Jena
Lichtmikroskop	Leitz, Wetzlar
Magnetrührer mit Heizplatte, RCT basic	IKA Labortechnik, Staufen
Mikroskop, Anxiovert 25	Carl Zeiss, Jena
Netzteil E143	Consort, Turnhout, Belgien
Neubauer-Zählkammer 0,100mm tief, 0,005mm ²	Neubauer
Paraffinwerkbank, Shandon Histocentre 2	Thermo scientific electron corporation, UK
pH-Meter, WTW Serie	inoLab, Weilheim
Photometer, Lichtstrahlhöhe 8,5 mm	Eppendorf AG, Hamburg
Präparations-Binokular Mikroskop mit Diskussion- und Fototubus	Nikon GmbH, Düsseldorf
Shandon Excelsior, ES	Thermo scientific electron corporation, UK
Sterilbank, Nuaire	Nuaire, Caerphilly, UK
Sterilbank, TC 48	Gelaire Flow Laboratories GmbH, Meckenheim
Thermocycler „Mastercycler“ mit 96 Vertiefungen	Eppendorf AG, Hamburg
Vortex-Mixer, Yellowline TTS 2	IKA Labortechnik, Staufen
Zellzentrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zellzentrifuge Allegra X-22R	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld
Zellzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Zellzentrifuge Thermo Cytospin 4	Shandon Labortechnik, Frankfurt

2.1.5 Software

INTAS GDS, Version 1.3, 09.1994	INTAS GDS, Göttingen
7300 System Sequence Detection Software (SDS) Version 1.4.0.25 mit RQ Study Application	Applied Biosystems, USA
Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems GmbH, München
Copy Number Analyzer for GeneChip® 2.0 (CNAG 2.0)	http://www.genome.umin.jp/
FluorChem 8800	Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA
GraphPadPrism 4.0	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
NIS-Elements Basic Research (BR) 3.0 Imaging Software	Nikon GmbH, Düsseldorf

Office XP Professional	Microsoft® Corporation, Remond, USA
openSUSE 10.3 und 11.1	openSUSE Project, www.opensuse.org
R 2.3 und 2.4	The R Foundation for Statistical Computing
Spotfire	TIBCO Software Inc., USA
WINDOWS 2000, XP und Vista	Microsoft® Corporation, Remond, USA

2.2 Präparation von Mausgewebe

Als Modellorganismus für die Retinaentwicklung diente der Mausstamm C57BL/J6. In dieser Arbeit wurden, wie bereits in der Einleitung erwähnt, die Entwicklungsstadien am Embryonaltag (E) 13, 15, 17 sowie die postnatalen Stadien (P) Tag 0, 2, 5, 9, 12, 15, 20 und das adulte Stadium (Ad) für die Retinaentwicklungsstudie verwendet. Alle Stadien zusammen werden im Weiteren als Entwicklungsreihen bezeichnet. Die postnatalen Stadien stammen alle aus einem Wurf, der eine Mindestgröße von sieben Jungtieren haben musste.

In diesem Abschnitt wird zunächst kurz auf den Mausstamm sowie dessen Zucht eingegangen. Im Anschluss erfolgt ein Teilabschnitt über die Organentnahme für Positivkontrollen und zum Schluss eine Beschreibung der Retinapräparation.

2.2.1 Mausstamm C57BL/J6

Der Mausstamm C57BL/6J ist ein in der Forschung verwendeter Inzuchtstamm der Hausmaus (*Mus musculus*). 1921 wurde dieser Stamm zum ersten Mal von dem Gründer der Jackson Laboratory C. C. Little gezüchtet. C57BL/6J-Mäuse eignen sich hervorragend als Modellorganismus, da sie leicht zu züchten, langlebig und robust sind sowie eine geringe Anfälligkeit gegenüber Krebs aufweisen. Sie verteidigen ihr Nest und ihre Jungtiere nicht. Durch ihre Neigung zum Beißen ist die Handhabung nicht so unproblematisch wie bei gutmütigen Labormausstämmen wie BALB-C. Weitere inoffizielle Bezeichnungen für den Mausstamm C57BL/6J sind „C57 Black 6“ oder nur „Black 6“.

2.2.2 Zucht und Verpaarung der Mäuse

Die Zucht und terminierte Verpaarung der Mäuse vom Stamm C57BL/6J erfolgte in den Räumen des Zentralen Tierlaboratoriums (ZTL) des Universitätsklinikums Essen und wurde von den Tierpflegern des ZTLs durchgeführt. Für die terminierte Verpaarung wurden ein männliches und zwei weibliche Tiere über Nacht in einem Makrolonkäfig Typ II (ca. 360 cm²) gehalten. Zum Nachweis einer Begattung wurden die Weibchen am nächsten Morgen auf einen Vaginalpfropfen kontrolliert. Trächtige Weibchen wurden für die Aufzucht der Jungtiere einzeln in einem

Makrolonkäfig Typ III (ca. 800 cm²) gehalten. Die Haltung nicht trächtiger Weibchen zwischen den Verpaarungen erfolgte in 5er - 10er Gruppen in einem Makrolonkäfig Typ III. Die Böcke wurden für diesen Zeitraum einzeln in einem Makrolonkäfig Typ II gehalten.

2.2.3 Organentnahme für Positivkontrollen

Die Tötung der Mäuse zur Organentnahme erfolgte nach § 4 TSCHG (Tierschutzgesetz). Für die Entnahme des Organs z. B. des Herzens wurde die Maus durch Dekapitation (E13 bis P12) oder zervikale Dislokation (P15 bis Ad) getötet. Die Bauchdecke wurde aufgeschnitten und das Herz entnommen. Die RNA bzw. cDNA der entnommenen Organe diente in erster Linie als Positivkontrolle der mittels Real Time PCR untersuchten Gene der Maus.

2.2.4 Allgemeine Beschreibung der Retinapräparation

Für die Präparation der Retinae wird die Maus durch Dekapitation (E13 bis P12) oder Genickbruch (P15 bis Ad) getötet (§ 4 TSCHG). Anschließend werden die Augen enukleiert und in eine Schale mit PBS gegeben. Um RNA- oder Proteindegradation weitestgehend zu unterbinden, wird die Retinapräparation auf Eis und in kaltem PBS durchgeführt. Embryonen werden direkt nach ihrer Entnahme in eisgekühltes PBS gegeben. Aus organisatorischen Gründen können die Mausembryonen nur der Reihe nach für die Retinaisolierung verwendet werden. Bei einer hohen Embryonenzahl besteht hierbei die Gefahr, dass die Qualität der isolierten RNA bzw. Proteine mit jedem Embryo abnehmen kann.

Abbildung 6 (siehe Seite 25) zeigt einzelne Schritte der Retinapräparation. Das entnommene Auge wird mit einer Pinzette fixiert, während der Sehnerv mit der zweiten Pinzette nahe am Auge gegriffen und durch vorsichtiges Ziehen entfernt wird. Durch die entstandene Öffnung in der Schicht aus Sklera, Aderhaut und Pigmentepithel, werden die Pinzetten vorsichtig in die Öffnung geführt, ohne die Retina zu verletzen. Durch entgegengesetztes Ziehen der Pinzetten werden die zu entfernenden Schichten bis zum Glaskörper aufgerissen und umgestülpt (siehe Abbildung 6D auf Seite 25), so dass sie vom Glaskörper abgezogen werden können. Zum Entfernen der Linse und des Glaskörpers wird die Retina vorsichtig mit einer Pinzette fixiert. Der Glaskörper wird seitlich mit der anderen Pinzette gegriffen und durch sehr behutsames Ziehen entfernt. Je nach Verwendung wird die Retina mit einer 100 µl Pipette mit abgeschnittener 1 ml Pipettenspitze

aufgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Überschüssiges PBS wird mit einer 200 µl Pipette vorsichtig entfernt. Anschließend wird die Retina auf Trockeneis schock gefroren und für die weitere Verwendung bei -80°C gelagert.

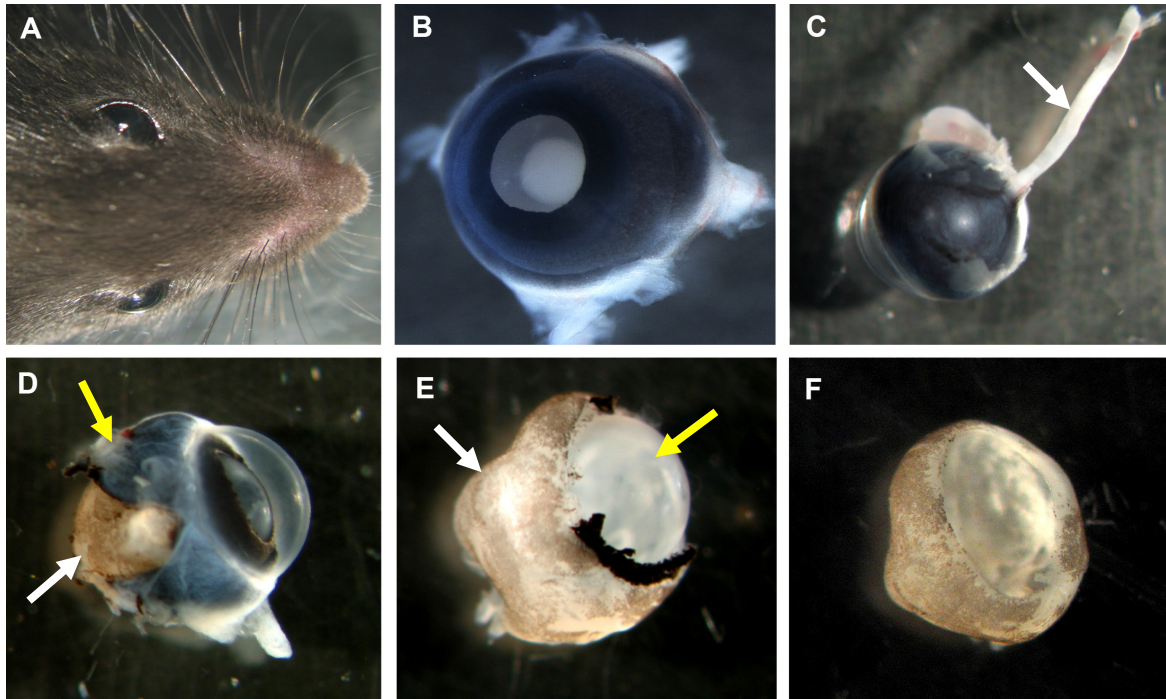


Abbildung 6: Einzelne Schritte der Retinapräparation: A) Mausauge, B) Frontalansicht eines entnommenen Auges, C) rückwärtige Ansicht des entnommenen Auges mit Sehnerv (weißer Pfeil), D) teilpräpariertes Auge mit anpräparierter Schicht aus Sklera, Aderhaut und Pigmentepithel (gelber Pfeil) und freiliegender Retina (weißer Pfeil), E) Retinabecher (weißer Pfeil) mit Glaskörper (gelber Pfeil), F) präparierte Retina ohne Glaskörper.

Für die einzelnen Entwicklungsstadien existieren für die Präparation spezifische Besonderheiten, die bei der Retinapräparation beachtet werden müssen. Eine ausführliche Beschreibung des Präparationsablaufes für die Entwicklungsstadien E15, P2, P15 und Ad (siehe Abbildung 7) mit einer anschaulichen Videodokumentation wurde zur Publikation eingereicht (Gustmann und Dünker, 2009) und der vorliegenden Arbeit beigelegt (siehe CD 2 im Anhang).



Abbildung 7: Größenvergleich von Mausaugen unterschiedlicher Entwicklungsstadien. Von links nach rechts: Embryonaltag 15, Postnataltag 2, Postnataltag 15 und adultes Auge.

2.3 Retinoblastomzelllinien

Die Zelllinien WERI-Rb1 und Y79 wurden ursprünglich vom DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) bezogen. Die Zelllinien RBL 13, RBL 15, RBL 30, RBL 247C3, RBL 355 und RBL 383 stammen aus dem Institut für Zellbiologie des Universitätsklinikums Essen. Es handelt sich bei diesen Zelllinien um Suspensionszellen. Die Retinoblastomzelllinien wurden in einer Zellkulturflasche mit Rb-Voll Medium (Tabelle 1) bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Das Passagieren der Zellen bzw. das Erneuern des Mediums erfolgte entweder nach jeder Entnahme der Zellen für Versuche oder wenn die Farbe des Mediums von orange nach gelb wechselte.

Tabelle 1: Rezept des Rb-Voll Mediums, in dem die Rb-Zelllinien kultiviert wurden.

	Menge	Endkonzentration
DMEM (Sigma, D6429)	500 ml	
FBS	75 ml	15%
Penizillin / Streptavidin	5 ml	100 U + 100 µg/ml
L-Glutamin (200 mM)	10 ml	4 mM
Insulin (10 mg/ml)	0,5 ml	50 µM
β-Mercaptoethanol	0,5 ml	10 µg/ml

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 RNA-Isolierung

Bei der Isolation der RNA wurde auf RNase-freies Arbeiten geachtet. Alle verwendeten Materialien, Oberflächen und Flaschen sowie die Handschuhe wurden mit RNase AWAY (Molecular Bio Products) abgewischt. Zum Pipettieren wurden nur RNase-freie Filterspitzen verwendet. Die RNA-Isolation aus Mausretina und anderen Mausgeweben (z. B. Herz), sowie aus den Retinoblastomzellen erfolgte mittels TRIzol (Invitrogen). Das Original-Protokoll wurde auf Ausbeute und vor allem RNA-Qualität für Retinae hin optimiert. Im Folgenden wird die RNA-Isolierung von mehreren Proben, wie sie bei Retinaeproben durchgeführt wurde, beschrieben. Die Beschreibung der einzelnen Schritte begrenzt sich auf jene, die vom Original-Protokoll abweichen oder dieses ergänzen. Bei der Isolierung mehrerer Proben wurden die einzelnen Proben solange bei -80°C bzw. auf Trockeneis gelagert, bis sie verwendet wurden. Frisches Material wurde auf Eis gelagert. Das Homogenisieren der Retina sowie der Retinoblastomzellen erfolgte unter einem Abzug. Nach Zugabe von 800 µl

kaltem TRIzol zu der Probe (Retina oder Zellen) wurde sie mit Hilfe einer 1 ml Spritze mit 23G Kanüle und unter anschließender Verwendung einer 27³/₄G Kanüle homogenisiert. Mausgewebe wurde mit einem Dispergiergerät in TRIzol zerkleinert. Die homogenisierten Proben wurden auf Eis gelagert und anschließend zusammen für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, um sicher zu stellen, dass alle Nukleoproteinkomplexe dissoziiert waren. Für die RNA-Fällung wurden pro Probe 500 µl kaltes reines Isopropanol (RNase-frei) in einem RNase-freien 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis vorgelegt sowie für die Fällung mit Ethanol je 1 ml kaltes 75%iges Ethanol verwendet. Der Überstand (Isopropanol-Gemisch oder Ethanol-Gemisch) der RNA-Fällung wurde jeweils in drei Schritten sehr vorsichtig mit Filterspitzen unterschiedlicher Volumina abgenommen. Die ersten ca. 800 µl wurden mit einer 1 ml Filterspitze abgenommen. Danach wurde eine 200 µl Filterspitze verwendet. Anschließend wurde die Probe wieder kurz zentrifugiert, wobei das Reaktionsgefäß in derselben Ausrichtung wie zuvor in die Zentrifuge gestellt wurde, um ein Ablösen des RNA-Pellets zu vermeiden. Nach erneuter Zentrifugation wurde der restliche Überstand mit einer 10 µl Filterspitze vollständig entfernt. Nach jeder Entnahme des Überstandes wurde die Flüssigkeit in der Filterspitze kontrolliert, ob sich ein Stück des RNA-Pellets darin befand. Traf dies zu, wurde der entnommene Überstand zurück in das Reaktionsgefäß überführt und kurz zentrifugiert. Dieses sehr vorsichtige und gründliche Abnehmen des Überstandes erfolgte aus zweierlei Gründen. Zum einen verfälschen Isopropanol- und Ethanolrückstände die Messung des RNA-Gehalts und zum anderen ist die Menge an RNA, die aus einer Retina (besonders aus den embryonalen Stadien sowie P0 und P2) isoliert wird, sehr gering, so dass kein Stückchen des Pellets mit dem Überstand verworfen werden sollte. Nach der Entnahme des Ethanols wurden die RNA Pellets bei RT im offenen Reaktionsgefäß unter einer RNA/DNA-Biocap vollständig getrocknet (ca. 20 – 30 min), um das restliche Ethanol aus dem Pellet zu entfernen. Die RNA-Pellets wurden nach dem Trocknen in Nuklease-freiem Wasser (Ambion) resuspendiert. Die Wassermenge hing dabei von der Menge der isolierten RNA bzw. von der Pelletgröße ab und basierte auf Erfahrung. Für RNA, die aus Retina isoliert wurde, wurden standardmäßig 15 µl Nuklease-freies Wasser verwendet. Für ca. zwei Stunden wurde die resuspendierte RNA zum Quellen auf Eis inkubiert und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Vor dem

Einfrieren oder zu einem späteren Zeitpunkt wurde die RNA-Menge fotometrisch (Eppendorf Photometer) bestimmt. Die RNA der 9 Mausretinaentwicklungsreihen, die für die Expressionsanalyse mittels Mikroarrays isoliert worden war, wurde mit einem NanoDrop ND 1000 Spectrometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA) gemessen.

2.4.2 Analyse der RNA-Integrität

Die RNA-Qualität ist von besonderer Bedeutung, da sie sich auf alle nachfolgenden Verfahren auswirkt. Eine schlechte RNA-Qualität kann dazu führen, dass man bei späteren Analysen keine Ergebnisse oder falsche Ergebnisse erhält. Für diese Arbeit wurden zwei Bestimmungsmethoden für die Messung der RNA-Integrität verwendet: i) das RNA-Gel und ii) der Agilent 2100 Bioanalyzer.

2.4.2.1 RNA-Gel

Zur schnellen routinemäßigen Kontrolle der RNA-Integrität wurde ein 1,2% iges oder 1,5% iges natives Agarosegel verwendet. Die Angaben zur Erstellung und Durchführung der Gelelektrophorese werden im Abschnitt 2.4.5 beschrieben.

Bei intakter RNA sollten im Gel deutlich zwei scharfe getrennte Banden zu sehen sein, die den ribosomalen RNAs 28S (human ca. 5,0 kb und Maus ca. 4,7 kb) und 18S (human und Maus ca. 1,9 kb) entsprechen. Dabei sollte die 28S rRNA Bande ungefähr zweifach so intensiv sein wie die 18S rRNA Bande. Weiterhin sollten für eine gute RNA-Qualität keine Schlieren in oder in der Nähe der Geltaschen sichtbar sowie keine zusätzlichen Banden zwischen den Geltaschen und der 28S Bande vorhanden sein. Dies sind Indizien für DNA-Kontamination. Schlieren ab der 28S Bande sind ein deutlicher Hinweis auf degradierte RNA. Die Fluoreszenz der Banden sollte nach Möglichkeit zur Qualitätsbestimmung densitometrisch z. B. mit dem Programm FluorChem 8800 bestimmt werden. Das Verhältnis 28S/18S der Intensitäten ermöglicht eine Aussage über die RNA-Qualität. Ein 28S/18S-Verhältnis von 1,5 bis 2 weist auf eine gute bis sehr gute RNA-Qualität hin. Für diese Arbeit wurde nur RNA ohne DNA Verunreinigung, ohne Degradation und von mindestens guter Qualität verwendet.

2.4.2.2 2100 Bioanalyzer

Die Bestimmung der RNA-Qualität mittels Bioanalyzer wurde im Rahmen der Expressionsanalyse mittels DNA-Mikroarray durchgeführt und zusammen mit

diesen bei Herrn PD Dr. Ludger Klein-Hitpass im Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) am Zentrum für Medizinische Biotechnologie am Universitätsklinikum Essen in Auftrag gegeben. Der Agilent 2100 Bioanalyzer ist ein auf Strömungstechnik basierendes Gerät zur Messung von Proteinen, Nukleinsäuren und Zellen. Die Qualitätsbestimmung der RNA erfolgt nach dem sogenannten *Lab-on-a-Chip* Verfahren, das Elektrophorese, chromatografische Auftrennungen, Färbungen und Detektion von mehreren Proben auf einem Mikrochip ermöglicht. Die Analyse von 5 Entwicklungsreihen mit je 11 Proben bzw. Entwicklungsstadien (E13 bis Ad) erfolgte mit RNA Nano Chips (Agilent RNA 6000 Nano Kit, # 5067-1511). Die RNA wurde für jedes Stadium in einer Konzentration von 50 ng/µl in einer Gesamtmenge von 100 ng bei Herrn PD Klein-Hitpass für die Analyse abgeben. Die Qualitätskontrolle wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Ralf Küppers im Institut für Zellbiologie am Universitätsklinikum Essen durch Herrn Dr. Enrico Tiacci durchgeführt. Die Bewertung der RNA erfolgte auf Grundlage des sogenannten RIN-Wertes (RNA Integrity Number).

2.4.3 Reverse Transkription

Reverse Transkription beschreibt den Vorgang, bei dem mRNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben wird. Die Reverse Transkriptase stammt ursprünglich von RNA-Viren (z. B. HI-Virus) und wird mittlerweile in einer Vielzahl von genetisch veränderten Formen für die Reverse Transkription genutzt. Für die Reverse Transkription wurde in dieser Dissertation das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (# 205313, Qiagen) nach dem Standardprotokoll verwendet. Die erhaltene cDNA (20µl á 0,05 µg/µl) wurde mit 80 µl Nuklease-freiem Wasser (Ambion) 1:5 verdünnt (100 µg/µl á 0,01 µg/µl) und für die weitere Verwendung bei – 20°C gelagert.

2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ist eine Methode, um ausgesuchte DNA-Sequenzen *in vitro* in beliebiger Zahl zu vervielfältigen. Sie ist hoch sensitiv und benötigt nur geringe Mengen Ausgangsmaterial. Die Spezifität basiert auf zwei Oligonukleotidprimern, die die zu vervielfältigende Sequenz flankieren. Die Synthese des PCR Produkt erfolgt mittels des hitzetoleranten Enzyms Taq-Polymerase, das ursprünglich aus dem Archaeobakteriums *Thermus aquaticus* stammt und mittlerweile in einer Vielfalt von genetisch veränderten Formen

eingesetzt wird. Der PCR-Prozess, die Amplifikation, erfolgt in einem Thermozykler und besteht meist aus 20-40 Wiederholungen von Denaturierung (Melting), Primer-Anlagerung (Annealing) und Synthese des neuen DNA-Stranges (Elongation). In der hier beschriebenen Arbeit wurde für die PCR nur GAPDH Primer (siehe Tabelle 2) als Kontrolle für die Reverse Transkription verwendet. Die GAPDH-Primer waren so designt, dass sie sowohl für Maus- als auch humane DNA verwendet werden konnten.

Tabelle 2: Angaben zu den GAPDH-Primern

Gen	Primer	Produkt	Annealing Temperatur	Sequenz
GAPDH human, mouse	forward	444 bp	59°C	CAT CAC CAT CTT CCA GGA GC
	reverse			ATG ACC TTG CCC ACA GCC TT

Tabelle 3: Thermozyklerprogramm

1) Erste Denaturierung	5 min bei 95 °C
2) Denaturierung	30 s bei 95 °C
3) Annealing	30 s bei 59 °C
4) Elongation	1 min bei 72 °C
5) Letzte Elongation	5 min bei 72 °C
Anzahl der Zyklen	27 (Schritte 2 - 4)

Tabelle 4: Einfacher GAPDH-Mastermix sowie Verwendung

1x GAPDH-Mastermix	
H2O	31,5 µl
10x PCR-Puffer	5 µl
MgCl ₂	3 µl
GAPDH-FOR (10mM)	2,5 µl
GAPDH-REV (10mM)	2,5 µl
dNTP	1 µl
Taq-Polymerase	0,3 µl
cDNA + GAPDH-Mastermix	5 µl + 45 µl
Konzentration der eingesetzten cDNA	0,01 µg/µl

In Tabelle 3 sind die Angaben für das Thermozyklerprogramm (Mastercycler, Eppendorf) und in Tabelle 4 die Angaben für einen GAPDH-PCR Ansatz verzeichnet. Es wurden nur solche cDNA Proben für die Real Time PCR verwendet, bei der die Auswertung des Agarosegels eine kräftige deutliche Bande in der Höhe von 444 bp ergaben.

2.4.5 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode zur massenspezifischen Auftrennung von DNA und dient somit auch der Quantifizierung von PCR-Produkten. Die Methode beruht auf der Tatsache, dass unterschiedlich große DNA Fragmente unterschiedlich schnell im Gel wandern. Durch einen Fluoreszenzfarbstoff (Ethidiumbromid, Gel-Red) können die Fragmente im UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Tabelle 5: Rezepte für Agarosegele (12 cm x 14 cm). Bevorzugte Gele: 80 ml und 20 Taschen für RNA-Gele, 150 ml und 12 Taschen für GAPDH-PCR Produkte. Das Ethidiumbromid wurde in einer 1%igen Lösung (Lsg.) eingesetzt. Die Endkonzentration im Gel betrug jeweils 0,5 µg/µl.

Agarose		50x TAE-Puffer in µl	Ethidiumbromid in µl (1%ige Lsg.)	Wasser auffüllen auf g bzw. ml	Taschenvolumen in µl	
1,2%ig in g	1,5%ig in g				12 Taschen	20 Taschen
0,96	1,20	1600	4,00	80	27,27	15,05
1,20	1,50	2000	5,00	100	35,90	19,81
1,80	2,25	3000	7,50	150	57,48	31,71

Die Rezepte für Agarosegele (12 cm x 14cm) unterschiedlicher Konzentration, sowie Geldicke und somit Taschenvolumen sind in Tabelle 5 für die verwendete Gelkammer (EHO-2, Kisker) angegeben. Für die Beladung des Gels wurden 20 µl – 25 µl der mit 6x Laderpuffer versetzten GAPDH-Proben oder 3 µl – 5 µl *Maker TrackIt™ 100 bp DNA Ladder* (# 10488-058, Invitrogen) in die Geltaschen pipettiert. Standardmäßig erfolgte die Auftrennung bei 100 V Gleichspannung für ca. 1 Stunde. Im Anschluss wurde das Gel für die Auswertung unter UV-Licht mit Hilfe eines Geldokumentationsgerätes fotografiert.

Bei RNA-Gelen wurde statt des 6x Laderpuffers ein 5x Laderpuffer mit RNAsecure (Ambion) und ohne Xylencyanol verwendet (siehe Puffer und Lösungen). Xylencyanol läuft bei 1,5%igen Gelen auf der Höhe der 28S-Bande und maskiert sie. Dies führt vor allem bei der densitometrischen Einschätzung der RNA-Qualität zu einem niedrigeren 28S/18S Verhältnis. Es wurden nach Möglichkeit 0,5 µg RNA eingesetzt. Die RNA aus den Retinoblastomzellen wurde in einer Menge von 1 µg eingesetzt. Das Gesamtvolumen betrug standardmäßig 10 µl, um die verwendete RNA-Menge der Retinaprobe so gering wie möglich zu halten. x µl RNA wurden auf Eis mit 7,5 µl - x µl Nuklease-freiem Wasser und 2,5 µl 5x Laderpuffer versetzt, gemischt und abzentrifugiert. Dieser Ansatz wurde 5 min bei

65°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Nachdem die Proben abzentrifugiert worden waren, wurden sie auf das Agarosegel geladen.

2.4.6 Real Time PCR – quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Im Gegensatz zur einfachen PCR erlaubt es die Real Time PCR bzw. quantitative PCR (qPCR) die Bildung der PCR-Produkte in Echtzeit zu erfassen, nicht nur deren Endkonzentration. Dies wird durch einen Fluoreszenzfarbstoff ermöglicht, der entweder im Falle von SYBR Green an doppelsträngige DNA bindet und somit aktiviert wird oder bei Verwendung einer TaqMan Sonde während der Kettenverlängerung aktiviert wird. Mit SYBR Green ist es möglich, konventionelle Primer zu verwenden. Die Detektionsmethode ist in diesem Fall sequenz-unabhängig, d. h., jede Art gebildeter doppelsträngiger DNA wird angezeigt. In dieser Arbeit wurde das 7300 Real Time PCR System von Applied Biosystems verwendet. Es wurden sowohl Simplex- (einfache) als auch Duplex- (zweifache) bzw. Multiplex- (mehrfache) PCR-Ansätze durchgeführt. Bei einer Multiplex-PCR werden mehrere Gene in einem Well durch Gen-spezifische TaqMan Sonden gemessen, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (z. B. FAM und VIC) markiert sind, wodurch jedes Gen gesondert detektiert werden kann.

Die Auswertung und die Analyse der Expressionsdaten erfolgte mit der *7300 System Sequence Detection Software (SDS) Version 1.4.0.25* mit *RQ Study Application* anhand des Ct-Wertes (*threshold cycle*). Der Ct-Wert beschreibt die Zyklenzahl am Anfang der exponentiellen Phase der Amplifikation, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über das Grundrauschen ermittelt wird. Für die Analyse der Expressionsdaten wurde die sogenannten $\Delta\Delta Ct$ (*Relative Quantification*) *Study* der Software verwendet. Bei dieser Analyse werden die Mittelwerte für die jeweiligen Proben, wie z. B. der verschiedenen Entwicklungsstadium, aus unabhängigen Einzelmessungen berechnet. Für die Berechnung der Fehlerbalken für das Ergebnisbalkendiagramm wurde das 95%-Konfidenzintervall als Vertrauensintervall gewählt. Die Mittelwerte von zwei untersuchten Proben sind signifikant unterschiedlich, wenn sich die Fehlerbalken zweier Konfidenzintervalle der jeweiligen Mittelwerte nicht überschneiden. Bei der Auswertung nach dem $\Delta\Delta Ct$ -Prinzip wird von dem Ct-Wert aller Proben des untersuchten Gens der jeweilige Ct-Wert eines zweiten Gens, der sogenannten endogenen Kontrolle, subtrahiert, wodurch für jede Probe ein ΔCt erhalten wird. Von dem ΔCt -Wert einer Probe wird wiederum der ΔCt einer als Kalibrator

definierten Probe subtrahiert, und somit der $\Delta\Delta Ct$ -Wert einer Probe erhalten. Der $\Delta\Delta Ct$ -Wert ist der negativlogarithmierte relative Expressionswert zur Basis 2:

$$\begin{aligned}\Delta Ct &= Ct_{Gen} - Ct_{Endogenkontrolle} \\ \Delta\Delta Ct &= \Delta Ct_{Probe} - \Delta Ct_{Kalibrator} \\ 2^{-\Delta\Delta Ct} &= \text{relativer Expressionswert}\end{aligned}\quad (1)$$

Für die endogene Kontrolle wurde sowohl bei den humanen als auch bei den Mausproben ein GAPDH TaqMan Assay eingesetzt. Bei Expressionsuntersuchungen der Mausretina wurden die Proben des adulten Stadiums (Ad) als Kalibrator und bei den Retinoblastomzellen eine in cDNA umgeschriebene, käuflich erwerbliche humane Retina RNA (CloneTech) verwendet. Als Positivkontrollen wurden bei den Analysen der Mausretina das Gewebe von Organen verwendet, bei denen das untersuchte Gen hoch exprimiert war. Bei den Untersuchungen der Retinoblastomzellen wurde die Plasmid-DNA eines käuflich erwerblichen CDH13 Clones (4811561, Invitrogen), der für ein anderes Projekt cloniert worden war, verwendet. Für diese Art der Positivkontrolle konnte keine Endogenkontrolle verwendet werden, wodurch auch keine relativen Expressionswerte berechnet werden konnten. Als Negativkontrolle wurde bei jedem Versuch Wasser verwendet.

Tabelle 6: Rezepte für den jeweiligen Mastermix und dessen Verwendung pro 20 μ l Ansatz. Mausgen: 4632415K11Rik, 6430548M08Rik, Zdhhc7, Cox4nb, Cox4i1 oder Slc7a5.

20 μl Ansatz pro Well			
Mastermix	15 μ l		
cDNA (der jeweiligen Verdünnung)	5 μ l		
Expressionsanalyse von Retinoblastomzelllinien			
	CDH13	GAPDH	
2x TaqMan Gene Expression Master Mix	10 μ l	10 μ l	
20x TaqMan Gene Expression Assay	1 μ l		
20x Human GAPDH endogenous control		1 μ l	
RNase-freies Wasser	4 μ l	4 μ l	
Expressionsanalysen zur Mausretinaentwicklung			
	Simplex		Duplex
	Cdh13	Gapdh	Mausgen + Gapdh
2x TaqMan Universal Master Mix	10 μ l		
2x TaqMan Gene Expression Master Mix		10 μ l	10 μ l
20x TaqMan Gene Expression Assay	1 μ l		1 μ l
10 μ M Rodent GAPDH Forward Primer [100 nM]		0,2 μ l	0,2 μ l
10 μ M Rodent GAPDH Reverse Primer [100 nM]		0,2 μ l	0,2 μ l
20 μ M Rodent GAPDH Probe (VIC) [200 nM]		0,2 μ l	0,2 μ l
RNase-freies Wasser (GAPDH)		4,4 μ l	
RNase-freies Wasser (TaqMan)	4 μ l		
RNase-freies Wasser (Duplex)		3,4 μ l	

Pro Probe, Kontrolle und TaqMan Assay wurden jeweils Triplets verwendet. Ein 20 µl PCR Ansatz erfolgte nach dem Standardprotokoll für TaqMan Assays von Applied Biosystems (siehe Tabelle 6 auf Seite 33). In Tabelle 7 ist das verwendete Standardprogramm und in Tabelle 8 sind die verwendeten TaqMan Assays aufgeführt.

Tabelle 7: Verwendetes Standardprogramm für das 7300 Real Time PCR System

Schritte	Wiederholungen	Temperatur	Zeit in min
1	1	50.0 °C	02:00
2	1	95.0 °C	10:00
3	40	95.0 °C	00:15
		60.0 °C	01:00
Messung der Fluoreszenz			

Tabelle 8: Verwendete Expression TaqMan Assays und endogene Kontrollen

TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, USA)		
Genname	Mastermix	Artikelnummer
4632415K11Rik	Duplex	Mm00551339_m1
6430548M08Rik	Duplex	Mm00552223_m1
Zdhhc7	Duplex	Mm00505997_m1
Cox4nb	Duplex	Mm00477859_m1
Cox4i1	Duplex	Mm01250094_m1
Slc7a5	Duplex	Mm00441516_m1
Cdh13	Simplex	Mm00490584_m1
CDH13	Simplex	Hs00169908_m1

Endogene Kontrollen (Applied Biosystems, USA)

Name	Artikelnummer
TaqMan® Rodent GAPDH Control Reagents	4308313
Human GAPDH endogenous control (VIC/MGB Probe, primer limited)	4326317E

2.5 Die Affymetrix GeneChip® Plattform

Für diese Arbeit wurden zwei Arten von DNA-Mikroarrays der Affymetrix GeneChip® Plattform verwendet: i) *GeneChip® 3' expression arrays* (siehe Teilabschnitt 2.6 auf Seite 38) und ii) *GeneChip® SNP arrays* (siehe Teilabschnitt 2.9.2 auf Seite 45).

Das Prinzip der Mikroarray-Technologie wurde laut Ekins (Ekins und Chu 1999) erstmals Mitte der 1980er Jahre von Ekins selbst und anderen Wissenschaftlern auf mehreren Konferenzen und in verschiedenen Artikeln in Bezug auf Immunoassays beschrieben. Heutzutage stellt diese Technologie eine der modernsten Methoden der Molekularbiologie dar, die in unterschiedlicher Form ihre Anwendung findet. Die Bezeichnung Mikroarray beschreibt einen planaren Träger aus Kunststoff, Glas oder membranbasierendem Material, der in

miniaturisierte chemische Reaktionsgebiete mit festgelegter Anordnung aufgeteilt ist. Dieser Aufbau ermöglicht viele parallele Experimente unter Verwendung einer geringen Menge an Versuchsmaterial. Bei DNA-Mikroarrays (teilweise auch DNA-Chips genannt) werden auf dem Träger DNA-Moleküle in Form von Spots bzw. Punkten rasterförmig aufgebracht. Jeder Spot enthält Millionen DNA-Sonden, die alle dieselbe Sequenz besitzen. Je nach Art des DNA-Mikroarrays besteht die aufgebrachte DNA entweder aus PCR-Produkten, cDNA oder aus synthetisch hergestellten Oligonukleotiden.

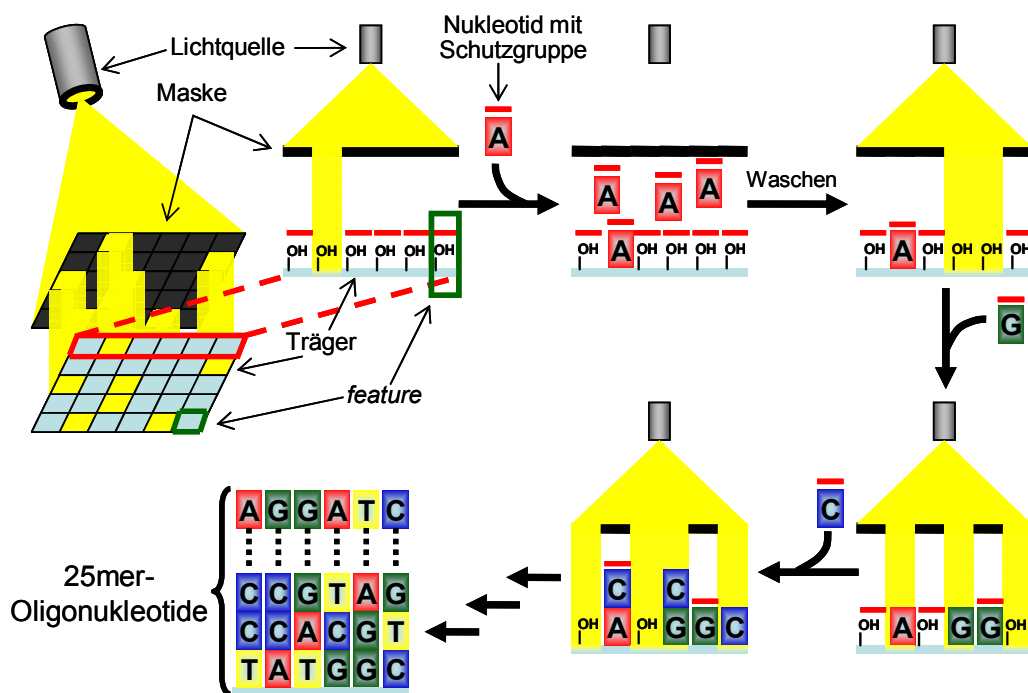


Abbildung 8: Schematische Darstellung der GeneChip® Synthese nach dem fotolithografischen Verfahren. Der Träger ist mit einer Ankersubstanz mit fotolabiler Schutzgruppe beschichtet. Mit Hilfe einer Lochmaske wird das Licht nur zu dem *feature* bzw. Spot durchgelassen, bei denen in der jeweiligen Syntheserunde ein Nucleotid hinzugefügt werden soll. Durch das Licht werden die Schutzgruppen in dem Spot entfernt, so dass die Hydroxylgruppen in diesem Spot für eine Bindung eines Nucleotids zur Verfügung stehen. Jedes Nucleotid besitzt selbst wieder eine Schutzgruppe, die sicherstellt, dass jeweils nur ein Nucleotid pro Syntheserunde angefügt wird. Die überschüssigen Nucleotide werden abgewaschen und eine neue Syntheserunde beginnt. Maximal werden 100 (4x 25) Synthesesyklen benötigt, um ein GeneChip® mit 25mer-Oligonukleotiden zu erzeugen.

Bei der GeneChip® Plattform handelt es sich um ein Oligonukleotid basiertes Verfahren, bei dem die Sonden Nucleotid für Nucleotid mittels eines fotolithografischen Verfahrens in maximal 100 Synthesesyklen generiert werden (Chee et al., 1996; Fodor et al., 1991; Fodor et al., 1993; Gunderson et al., 1998;

Lindblad Toh et al., 2000; Lipshutz et al., 1999; Lockhart et al., 1996; Mei et al., 2000; Pease et al., 1994; Wang et al., 1998; Wodicka et al., 1997). Eine Sonde besteht aus 25mer-Oligonukleotiden (siehe Abbildung 8 auf Seite 35).

Unabhängig von der Art des Experimentes lassen sich die allgemeinen Arbeitsprozesse eines DNA-Mikroarrayexperiments in fünf Schritte aufteilen: i) Synthese, ii) Markieren und iii) Hybridisieren der Proben (cDNA bzw. cRNA) sowie iv) Waschen und v) Scannen des Mikroarrays. Affymetrix nutzt für die Hybridisierung mit Biotin markierte cRNA. Hierbei dient das Biotin nicht als Farbstoff, sondern als Anker für den eigentlichen Fluoreszenzfarbstoff, ein Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat, das nach der Hybridisierung in einem weiteren Schritt angelagert wird. Während der Hybridisierung formen markierte cRNAs mit den Oligonukleotiden auf dem Array via Watson-Crick-Basenpaarung Heteroduplexe. Nach der Hybridisierung erfolgt ein Waschschriff, um die nicht hybridisierten Proben und die für die Hybridisierung verwendeten Chemikalien zu entfernen. Die Auswertung des Hybridisierungsexperiments entstanden in dieser Dissertation durch das Auslesen der Arrays mit Hilfe des *Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 G7* bzw. des *GeneArray® 2500 Scanner* von Agilent Technologies (Affymetrix, Inc., ©2005) und durch die anschließende computergestützte Bildprozessierung mittels der *Affymetrix GeneChip® Operating Software (GCOS) with autoloader, version 1.4* (Affymetrix, Inc., ©2003-2005a) bzw. *Affymetrix® Mikroarray Suite (MAS) version 5.0* (Affymetrix, Inc., ©2002a). (Angaben abhängig vom verwendeten GeneChip – siehe Tabelle 9 auf Seite 38 und Tabelle 12 auf Seite 48). Neben der Bildprozessierung steuert GCOS zusätzlich den Wasch- und Scanvorgang, verwaltet die Proben- und Experimentinformationen und kann zur Analyse der Expressionsdaten verwendet werden (Affymetrix, Inc., ©2003-2005a; Affymetrix, Inc., ©2003-2005b). Das Array wird mit Hilfe des Scanners Pixel für Pixel ausgelesen, wobei mehrere Pixel ein *feature* bzw. einen Spot repräsentieren. Das Bild des gescannten Arrays in Form von Pixelintensitätswerten wird in einem sogenannten *image file* bzw. *data file* mit der Dateiendung „.dat“ gespeichert. Aus dieser Datei berechnet GCOS anschließend mit Hilfe des *Cell Analysis* Algorithmus die Intensitätswerte der einzelnen *probecells*, die sogenannten *cell intensity data*, und speichert die Daten in einer „.cel“-Datei. Die Intensitätswerte der *cell intensity data* wertet GCOS Chip-spezifisch (hier: *GeneChip® 3' expression arrays* oder *GeneChip® SNP arrays*) aus und speichert diese in einem

sogenannten *chip file* („.chp“-Datei). Als letztes erstellt GCOS eine Reportdatei („.rpt“) aus der „.chp“-Datei, die eine Zusammenfassung der Kontroll- bzw. Qualitätsinformationen enthält (Affymetrix Developer Network, ©2009; Affymetrix, Inc., ©2002-2004). Auf einem GeneChip werden zwei verschiedene Arten von Sonden bzw. *probes* verwendet: sogenannte *perfekt match* (PM) und *mismatch* (MM) *probes*. Die Sequenz der MM-Sonde unterscheidet sich von der korrespondierenden PM-Sonde nur im mittleren Nukleotid und dient zur Kontrolle der spezifischen Bindung. PM- und MM-Sonden sind in sogenannten *probecells* bzw. *features* organisiert. Jedes *feature* besteht aus mehreren Millionen Sonden (siehe Abbildung 9B).

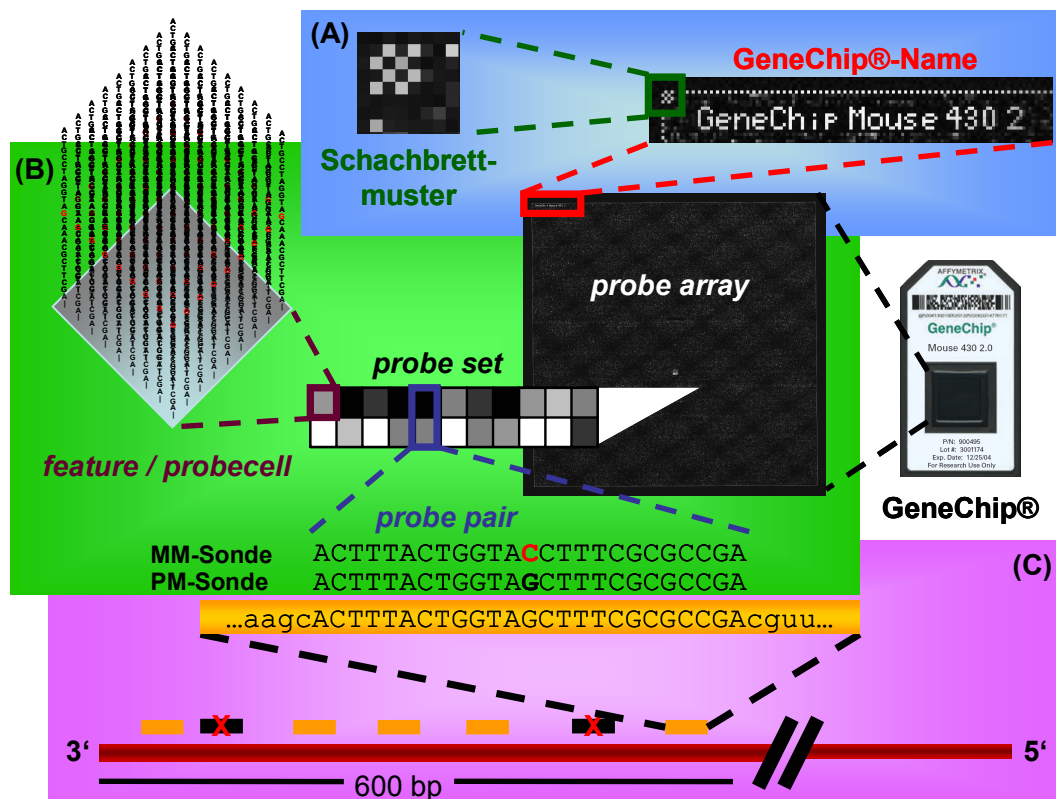


Abbildung 9: Genereller Aufbau eines GeneChips am Beispiel eines GeneChip® 3' expression arrays. A) B2-Oligo Kontrollen (Sonden und spike-in Oligonukleotide) werden auf allen GeneChips verwendet und erscheinen an den Ecken des Chips als Schachbrettmuster und an den Begrenzungen des Chips sowie in den meisten Fällen in der linken Ecke als Chipname. B) Detaillierter Aufbau eines Expressionsarrays (Erläuterung siehe Text). MM: *mismatch*; PM: *perfekt match*. C) Die PM-Sonden werden in der Regel so designt, dass sie nach Möglichkeit spezifisch eine Sequenz (orangener Balken) innerhalb von 600 bp des 3'-Endes eines Transkripts (roter Balken) detektieren. Jedoch eignet sich nicht jede mögliche Sequenz in der Praxis als Detektionssequenz und somit zum Design einer PM-Sonde (schwarzer durchgestrichener Balken). Weitere Angaben zum Sondendesign wie z. B. Abweichungen zu diesem Design sind in den Tech Notes von Affymetrix (Affymetrix, Inc., ©2001-2007; Affymetrix, Inc., ©2003) zu finden.

2.6 Expressionsanalyse mittels *GeneChip® 3' expression arrays*

GeneChip® 3' expression arrays dienen der Expressionsanalyse vollständiger Genome. Der generelle Aufbau eines GeneChips ist in Abbildung 9 (siehe Seite 37) anhand des Aufbaus eines *GeneChip® 3' expression arrays* gezeigt. Bei diesem Mikroarray-Typ werden ein PM *feature* und das dazugehörige MM *feature* als *probe pair* bezeichnet. Die Expression eines Gens wird auf einem Chip im Normalfall durch 11 bis 20 Sondenpaare nachgewiesen, die zusammen ein sogenanntes *probe set* formen. Auf einem GeneChip sind mehrere tausend *probe sets* vertreten, die zusammen ein sogenanntes *probe array* ergeben (Abbildung 9B auf Seite 37). Auf einem *probe array* sind neben den Sonden zur Detektion der Genexpression zusätzlich Kontrollsonden vorhanden.

Für diese Dissertation wurden der *GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array* (Affymetrix, Inc., ©2004b) und der *GeneChip® Human Genome U133A Array* (Affymetrix, Inc., ©2003-2004) verwendet. Der Unterschied im Aufbau der beiden Chips ist in Tabelle 9 wiedergegeben.

Tabelle 9: Spezifische Angaben über die verwendeten *GeneChip® 3' expression arrays* (Affymetrix, Inc., ©2001-2007; Affymetrix, Inc., ©2003-2004; Affymetrix, Inc., ©2004b). Zu lesen: X *probe sets* analysieren Y Transkripte und Varianten von Z Genen.

	GeneChip® Human Genome U133A	GeneChip® Mouse Genom 430 2.0
Anzahl der <i>probe sets</i> (X)	~22000	~45000
Anzahl der Transkripte (Y)	~18400	~39000
Anzahl der Gene (Z)	~14500	~34000
Größe der <i>features</i>	11 µm	11 µm
Anzahl der <i>probe pairs</i> pro <i>probe set</i>	11	11
Scanner	GeneArray® 2500 Scanner (Agilent Technologies)	Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 G7
Software	Affymetrix® Microarray Suite (MAS) version 5.0	Affymetrix GeneChip® Operating Software (GCOS) with autoloader, version 1.4

Die Expressionsanalysen mittels dieser beiden Arrays wurden am Zentrum für Medizinische Biotechnologie im Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) im BioChip Labor unter der Leitung von Herrn PD Klein-Hitpass am Universitätsklinikum Essen durchgeführt (http://www.uni-due.de/home/fb/ifz/forschung/bcl/de_startseite.shtml). Das BioChip Labor nutzt für seine Analysen die oben genannte Affymetrix GeneChip® Plattform.

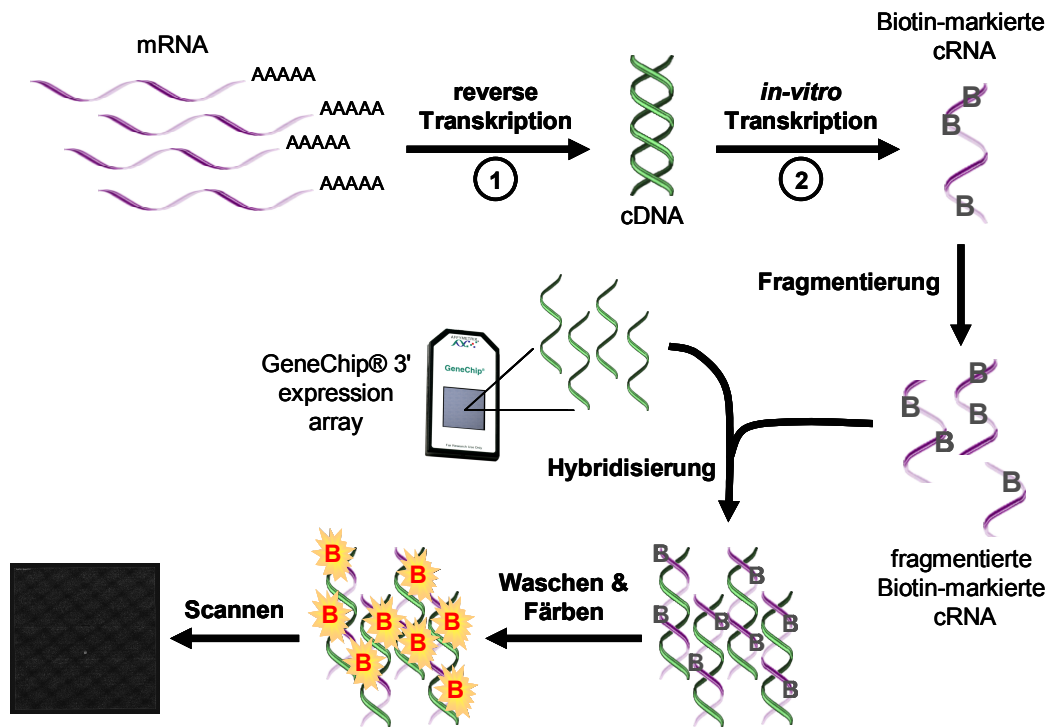


Abbildung 10: Schematischer Ablauf einer GeneChip Expressionsanalyse. Das detaillierte Vorgehen für die Schritte 1) und 2) sind für die Analyse mittels des GeneChip® Human Genome U133A Arrays dem Protokoll von Affymetrix (Affymetrix, Inc., ©2005-2009) und für die Analyse mittels des GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Arrays dem Protokoll von Ambion (Ambion, Inc., ©2008) zu entnehmen. 1) Erst- und Zweitstrang-Synthese sowie cDNA Aufreinigung, 2) Synthese von Biotin markierter cRNA bzw. aRNA sowie deren Aufreinigung.

Tabelle 10: Ergebnisdateien der Auswertung eines Expressionsexperiments mittels GCOS

Datei Bezeichnung	Dateiendung	Beschreibung
Data Datei	*.dat	Die Data Datei beinhaltet die Pixelintensitätenwerte des gescannten Arrays.
Cell Intensity Datei	*.cel	Die Cell Intensity Datei wird von GCOS aus der Data Datei erstellt und beinhaltet die einzelnen Intensitätswerte jeder <i>probecell</i> . Die Intensitätswerte werden von GCOS mit Hilfe des Cell Analysis Algorithmus aus den jeweiligen Pixelintensitäten berechnet.
Chip Datei	*.chp	Die Chip Datei enthält die Expressionsdaten der einzelnen <i>probe sets</i> , die von GCOS qualitativ und quantitativ aus den Intensitätswerten der einzelnen <i>probecells</i> der Cell Intensity Datei berechnet wurden.
Report Datei (*.rpt) im Excelformat	*.xls	Zusammenfassung der Qualitätsinformationen für jede einzelne Expressionsanalyse. Der Report wird von GCOS aus der Chip Datei erstellt.
Bilddatei	*.jpg	Bild Datei des gescannten Arrays.
MAGE-ML Datei	*.xml	Enthält die exportierten Informationen über die jeweilige Expressionsanalyse im MAGE-ML Format.

Die aufgereinigte RNA wurde in der benötigten Menge und Konzentration an Herrn PD Klein-Hitpass übergeben und die Durchführung der fünf Schritte: i) Anfertigen, ii) Markieren und iii) Hybridisieren der cRNA, sowie iv) Waschen und v) Scannen des Mikroarrays (siehe Abbildung 10 auf Seite 39) seiner langjährigen Expertise anvertraut. Nach Abschluss des Expressionsexperiments erhält man von Herrn PD Klein-Hitpass eine CD oder DVD mit der in Tabelle 10 (siehe Seite 39) aufgeführten Dateien, sowie ggf. eine oder mehrere Excel-Dateien, die die Expressionswerte des Experiments nach einer Analyse mit dem MAS5 (Affymetrix, Inc., ©2002-2004; Affymetrix, Inc., ©2002a; Affymetrix, Inc., ©2002b; Affymetrix, Inc., ©2003-2005b) oder GCRMA (GeneChip robust multi-array analysis) Algorithmus (Wu et al., 2004) enthalten.

2.6.1 GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array

Für die Expressionsanalyse zur Retinaentwicklung wurden jeweils alle Stadien einer Entwicklungsreihe mit Hilfe des *GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Arrays* untersucht. Da die Menge der RNA der Stadien E13 – P0 generell sehr gering ist, wurde anstelle des Standard-Kits von Affymetrix (*Affymetrix GeneChip® One-Cycle Target Labeling and Control Reagents*: Affymetrix, P/N 900493) das *MessageAmp™ II-Biotin Enhanced Kit* von Ambion (Ambion, AM1791) für das Synthetisieren und Markieren der cRNA verwendet. Dieses Kit wurde von Herrn PD Klein-Hitpass an Stelle des sonst für geringe Mengen verwendete Affymetrix Kits (*GeneChip® Two-Cycle Target Labeling and Control Reagents*: Affymetrix, P/N 900494) ausgewählt, da die cRNA Synthese des Kits von Ambion eine höhere Effizienz bei gleichbleibendem Expressionsverhältnis aufweist (Johnson et al., 2005; Setterquist et al., 2005). Es wurden je Stadium 250 ng RNA in 8 µl Nuklease-freiem Wasser verwendet.

2.6.2 GeneChip® Human Genome U133A Array

Mittels des *GeneChip® Human Genome U133A Arrays* wurde die Expression mehrerer Retinoblastome und Retinoblastomzelllinien sowie einer käuflich erworbenen humanen Retina RNA (Clontech) Probe untersucht. Die Daten wurden von Herrn Prof. Lohmann zur Verfügung gestellt. Die Daten der Retinoblastome wurden für die Arbeiten von Gratias et al. 2005 und 2007 analysiert. Angaben über die Gewinnung der RNA, Mikroarrayanalyse und die Prozessierung der Daten sind den oben genannten Publikationen zu entnehmen.

In Tabelle 11 sind die untersuchten Retinoblastome mit Materialnummer sowie Angaben über 16q LOH und Glaskörperaussaat aufgeführt. Die Daten wurden aus Gratias et al. 2007 übernommen.

Tabelle 11: Für die Analyse verwendete Retinoblastome mit Angaben über 16q LOH und Glaskörperaussaat (aus Gratias et al. 2007).

Materialnummer	16q LOH	Glaskörperaussaat
M19484	Ja	diffus
M22590	Ja	diffus
M22641	Ja	<i>keine Angaben</i>
M22860	Ja	nein
M24794	Ja	diffus
M20517	Nein	nein
M22058	Nein	<i>keine Angaben</i>
M22067	Nein	nein
M22233	Nein	<i>keine Angaben</i>
M23209	Nein	lokal
M23449	Nein	diffus
M23818	Nein	diffus
M23869	Nein	diffus
M23978	Nein	nein
M24307	Nein	<i>keine Angaben</i>
M24431	Nein	nein
M24733	Nein	diffus
M24784	Nein	<i>keine Angaben</i>
M24821	Nein	<i>keine Angaben</i>

2.7 Analyse der Expressionsdaten zur Mausretinaentwicklung

Da jedes Entwicklungsstadium der Mausretina nur einmal mittels Mikroarrays untersucht wurde, können für die Auswertung der Expressionsstudie keine statistischen Verfahren verwendet werden, die für eine Berechnung $n=3$ pro Probe voraussetzen (z. B. alle ANOVA basierten Verfahren). Einen Ausweg bietet die in GCOS implementierte sogenannte *Comparison Analysis* (Vergleichende Analyse). Beim Vergleich zwei oder mehrerer Arrays ist eine Normalisierung notwendig. Mit Hilfe der Normalisierung werden sogenannte *batch-effects* korrigiert. *Batch-effects* sind technische Variationen wie z. B. Temperatur, Lot der Chipserie und Luftfeuchtigkeit, die sich auf die Ergebnisse eines Sets von Mikroarrays (*batch*) auswirken und nicht durch die biologischen Variationen der Proben hervorgerufen

werden (Alter et al., 2000; Benito et al., 2004; Fare et al., 2003; Hartemink et al., 2001; Johnson et al., 2007). Bei der *Comparison Analysis* werden die Expressionsunterschiede zweier normalisierter GeneChips selben Typs nachgewiesen und quantifiziert. Hierfür werden zur Berechnung und Quantifizierung der Expressionsunterschiede der *One-Step Tukey's Biweight* Algorithmus und der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet. Durch Vergleich der *probe pair* Intensitäten zwischen den beiden Chips anhand des *One-Step Tukey's Biweight* Algorithmus wird die sogenannte *signal log ratio* berechnet. Die *signal log ratios* geben die relativen Expressionswerte zur Basis 2 wieder und somit den Expressionsunterschied zwischen dem Experiment bezogen auf den Kontrollarray. Um eine Aussage über die Signifikanz der berechneten *signal log ratio* treffen zu können, werden in der *Comparison Analysis* sogenannte *change p-values* und *change calls* berechnet. Die *change p-values* werden aus den jeweiligen *probe pair* Intensitäten eines *probe sets* der beiden zu vergleichenden GeneChips anhand des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests bestimmt. Der jeweilige *change p-value* kann mit Hilfe der *cut-off* Variablen γ_1 und γ_2 in die *change calls* *Increase* (I, Zunahme), *Marginal Increase* (MI, geringe Zunahme), *no change* (NC, keine Veränderung), *Marginal Decrease* (MD, geringe Abnahme) und *Decrease* (D, Abnahme) übersetzt werden (Affymetrix, Inc., ©2002-2004; Affymetrix, Inc., ©2002b):

- *Increase*: $change\ p\text{-value} < \gamma_1$
- *Marginal Increase*: $\gamma_1 \leq change\ p\text{-value} < \gamma_2$
- *no change*: $\gamma_2 \leq change\ p\text{-value} \leq 1-\gamma_2$
- *Marginal Decrease*: $1-\gamma_2 < change\ p\text{-value} \leq 1-\gamma_1$
- *Decrease*: $1-\gamma_1 < change\ p\text{-value}$

2.7.1 Bestimmung signifikant regulierter Gene mittels *Comparison Analysis*

Die einzelnen Arrays der Mausretinaentwicklungsstadien wurden mit Hilfe des MAS5 Verfahren (Affymetrix, Inc., ©2002-2004; Affymetrix, Inc., ©2002a; Affymetrix, Inc., ©2002b; Affymetrix, Inc., ©2003-2005b) analysiert (Einzel-Array-Analyse). Für diese Dissertation wurde das *global scaling* als Normalisierungsmethode verwendet. Hierbei werden die Arrays auf eine gewählte Durchschnittsintensität (in dieser Arbeit: 1000) eingestellt. Anschließend wurden alle Arrays mit Hilfe der *Comparison Analyse* von Affymetrix ausgewertet. Der

Wert der *cut-off* Variabel γ_1 wurde bei der durchgeführten *Comparison Analysis* auf 0,002 und der Wert von γ_2 auf 0,002667 gesetzt. Dies sind Erfahrungswerte von Herrn PD Klein-Hitpass. Als *baseline* bzw. Kontrollarray diente der Array mit den Expressionsdaten des adulten Stadiums, gegen den alle anderen 10 Stadien verglichen wurden. Das adulte Stadium wurde als Kontrollarray gewählt, da dieses die Retina im voll entwickelten Zustand widerspiegelt. Nachdem jeder Array gegen den Kontrollarray abgeglichen worden ist, wurden von jedem Vergleich nur die *probe sets* beibehalten, die als *change call* ein D oder I erhalten haben und somit signifikant reguliert waren. Zum Schluss wurden alle *probe sets* ermittelt, die bei mindestens einem der Vergleiche einen signifikanten Expressionsunterschied aufwiesen. Anhand dieser *probe sets* wurden die Ergebnisse aller *Comparison* Analysen mit den Daten aller Einzel-Array-Analysen in eine Datei bzw. Tabelle zusammengefügt. Felder einer Zeile, dessen *probe set* in einem der Stadien keine signifikante Regulation aufwies, blieben leer.

2.8 Bioinformatische Werkzeuge

Neben Excel wurden für die Manipulation von Tabellen sowie die Prozessierung von Mikroarray-Daten die Programmierumgebung der *Shell*, sowie *AWK*, *R* und Bioconductor mit Hilfe des Betriebssystems Linux verwendet.

Linux ist ein plattformunabhängiges Mehrbenutzer-Betriebssystem, das dem Betriebssystem Unix ähnlich ist. Während dieser Dissertation wurde mit der Distribution openSUSE (Software- und Systementwicklung) 10.3 und 11.1 gearbeitet. Zur Prozessierung der Daten wurde die *Bourne again shell* (*Bash*) innerhalb von openSUSE verwendet. Sie stellt eine vollwertige Skriptsprache zur Programmierung dar, indem sich häufig wiederkehrende Kommandofolgen der *Shell* durch Skripte automatisieren lassen.

Die Programmiersprache *AWK* wurde 1977 von Alfred V. Aho, Peter J. Weinberger und Brian W. Kernighan entwickelt, deren erster Buchstabe im Nachnamen namengebend war. *AWK* ist eine textorientierte Skriptsprache, die eine Eingabe oder Dateien zeilenweise verarbeitet.

R ist sowohl eine freie Statistik-Software mit einer Umgebung für statistische Datenbearbeitung und die Erstellung von Grafiken als auch eine interpretierte (Programmtext muss Schritt für Schritt in Maschinencode übersetzt werden) und objektorientierte Programmiersprache. *R* ist so gestaltet, dass es durch sogenannte Pakete und selbst geschriebene Ergänzungen erweitert werden kann.

Bioconductor ist ein Open Source Projekt, das sich der Entwicklung von Software, sowie Methoden zur statistischen Auswertung und Visualisierung von Daten aus biologischen Experimenten, die durch Plattformen mit hohem Datendurchsatz (z. B. DNA-Mikroarrays) erzeugt worden sind, widmet (Gentleman et al., 2004). Ein Großteil der von Bioconductor veröffentlichten Anwendungen sind für das Statistikprogramm *R* geschrieben, die in Form von Paketen zu *R* hinzugefügt werden können.

Die *Shell* und *AWK* wurden meist in Form von eigenständig geschriebenen Skripten bzw. Programmen verwendet. Diese werden innerhalb dieser Dissertation zwar erwähnt aber nicht näher erläutert (Ausnahme: *scanprogramm_2008-01-14.sh* auf Seite 53), da eine Einführung in die Programmierung und Syntax der verwendeten Programmiersprachen den Umfang dieser Arbeit erheblich erhöht hätte. Für die Analyse der Expressionsdaten die mit Hilfe der *GeneChip® 3' expression arrays* erzeugt worden sind, wurden das Paket *affy* (Gautier et al., 2004) verwendet. *affy* ist ein Paket mit Funktionen für das Speichern, Verwalten und Analysieren von Expressionsdaten, die mit Hilfe eines GeneChip erstellt wurden (Gautier et al., 2004). Das Paket beinhaltet betriebsfertige Analyseroutinen für die Vorverarbeitung und Qualitätskontrolle (z. B. der RNA-Qualität). Für die Vorverarbeitung der in dieser Arbeit verwendeten Expressionsdaten wurde die Funktion *mas5()* (Gautier et al., 2009; Irizarry et al., 2009) verwendet, die die Expressionsdaten nach dem MAS5 Algorithmus von Affymetrix analysiert.

2.9 LOH-Analysen

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden für die LOH-Analyse verwendet: i) STR-PCR und ii) SNP-Array. Die Isolierung der DNA aus den Retinoblastomen und deren korrespondierenden Blutproben, sowie die Durchführung und Auswertung der LOH-Analyse mittels STR-PCR erfolgte im Labor von Herrn Prof. Lohmann. Angabe zur Entnahme, Lagerung der Proben, sowie zur DNA-Isolierung sind aus diesem Grund den Publikationen von Gratias et al. 2005 und 2007 sowie Tschentscher et al. 2000 zu entnehmen. Die Durchführung der Mikroarrayanalysen wurde wie zuvor bei den Expressionsarrays der Expertise von Herrn PD Klein-Hitpass anvertraut.

2.9.1 LOH-Analyse mittels STR-PCR

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, bildeten unter anderem die Ergebnisse einer STR-Analyse den Ausgangspunkt dieser Arbeit. Die STR-PCR basiert auf der sogenannten *quantitative microsatellite analysis* (Ginzinger et al., 2000). STRs Loci mit hohem polymorphen Informationsgehalt werden mit Hilfe von Primern, die am 5'-Ende mit FAM, PET, oder NED fluoreszenzmarkiert sind (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) analysiert. Der Zustand des Genoms in einem Locus wird anhand des Peakintegrals (PI) der STR-PCR mit Hilfe des Allelverhältnisses aus Tumor- und korrespondierender Blutprobe bestimmt (Gratias et al., 2005; Gratias et al., 2007; Richter et al., 2003; Tschentscher et al., 2000). Eine Beschreibung der Auswertung ist in den Publikationen Gratias et al. 2005 und 2007 Richter et al. 2003 und Tschentscher et al. 2000 zu finden. Der Nachteil der STR-PCR ist, dass nicht alle STRs für LOH-Analysen genutzt werden können und dass die Abdeckung innerhalb des Genoms (im Mittel ca. alle 4000000 bp ein STR) relativ gering ist. Eine höhere Abdeckung innerhalb des Genoms erreichen *single nucleotide polymorphism* (SNP, dt. Einzelnukleotid-Polymorphismen).

2.9.2 LOH-Analyse mittels GeneChip® SNP-Array

SNP-Arrays sind Oligonukleotidarrays mit hoher Dichte (engl. *high-density oligonucleotide arrays*), die zum Nachweis von SNPs innerhalb eines Genoms dienen. SNPs sind Veränderungen einzelner Basenpaare im Genom, die im Genpool einer Population etabliert sind. SNPs treten im Mittel alle 400 Basenpaare auf. Dies bedeutet, dass ungefähr 10 Millionen SNPs im menschlichen Genom vorkommen. Über 6,5 Millionen gültige Referenz SNPs (refSNP, reference SNP) sind in der SNP-Datenbank dbSNP (dbSNP, database of Single Nucleotide Polymorphism – build 130: Apr 30, 2009) von NCBI eingetragen. Die meisten SNPs liegen in Form von zwei Allelen vor. Zweidrittel dieser SNPs lassen sich auf einen Austausch von Cytosin mit Thymin aufgrund von spontan auftretender Desaminierung von 5-Methylcytosin (methylierte Form von Cytosin) zurückführen. Der überwiegende Teil an SNPs ist in Introns lokalisiert. Der Einsatz von Oligonukleotidarrays für SNP-Studien wurde 1998 von Wang et al. (Wang et al., 1998) etabliert und zwei Jahre später wurde diese Technik zum ersten Mal zur Analyse von LOHs in Tumoren verwendet (Lindblad Toh et al., 2000; Mei et al., 2000). Der Vorteil von SNPs zur Analyse von LOHs gegenüber anderen

Methoden wie z. B. RFLP (engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*), CGH (engl. *Comparative genomic hybridization*) oder STR-Analyse ist, dass auch ein sogenanntes *copy number neutral LOH* wie z. B. durch Uniparentale Disomie (UPD) hervorgerufen, nachgewiesen werden kann (Mei et al., 2000).

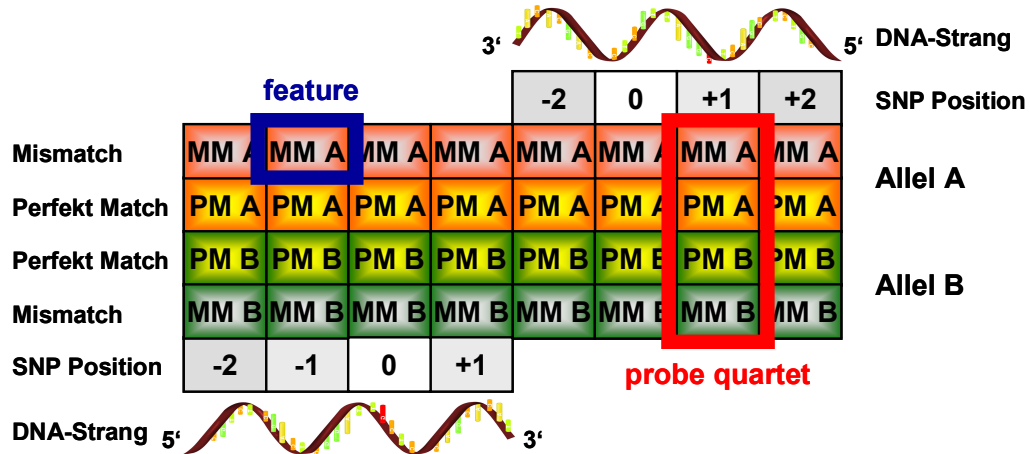


Abbildung 11: Schematischer Aufbau eines SNP-Array *probe sets*. Jeder SNP ist auf dem Array durch eine Sammlung von sogenannten *probe quartets* repräsentiert. Durch ein *probe quartet* werden jeweils zwei Allele A und B eines SNPs abgefragt – zur Erinnerung: Die meisten SNPs kommen nur in zwei Allelen vor. Für jedes Allel existiert ein *perfekt match* (PM) und ein *mismatch* (MM) pro *probe quartet*. Ein Element eines *probe quartet* wird als *feature* bezeichnet, das ebenfalls wie bei Expressionsarrays aus 25-mer Oligonukleotidmolekülen bestehen. Die Position des zu untersuchenden SNPs liegt nicht ausschließlich in der Mitte des 25-mer Oligonukleotids, sondern sind je nach *probe quartet* der mittleren Position der *probe* vor- (z. B. +1, +3, +4 Nukleotide) bzw. nachgelagert (z. B. -1, -2, -4 Nukleotide). Zusätzlich werden durch die *probe quartets* die beiden Stränge einer DNA berücksichtigt (*Sense*- bzw. *Antisense*-Strang).

Für diese Arbeit wurden zwei unterschiedliche SNP-Arrays von Affymetrix verwendet. An zwei Tumor- und korrespondierender Blutproben (M5715 und M24794) wurde mittels des *GeneChip® Human Mapping 50K Array Xba240* die generelle Machbarkeit der Analyse von Retinoblastomen mit Hilfe von SNP-Arrays getestet und etabliert. Mit dem *GeneChip® Human Mapping 250K Sty Array* wurden im Anschluss zehn weitere Tumor- und dazugehörigen Blutproben (M143, M7608, M11390, M16607, M18436, M21111, M24230, M28169, M33769, M33827) untersucht. Der *GeneChip® Human Mapping 50K Array Xba240* kann über 50000 SNPs und der *GeneChip® Human Mapping 250K Sty Array* über ungefähr 238000 SNPs detektieren. Aufgrund der größeren Anzahl an detektierbaren SNPs ist die Auflösung des *GeneChip® Human Mapping 250K Sty Arrays* im Vergleich zum *GeneChip® Human Mapping 50K Array Xba240* höher. Die Ausprägung eines SNPs wird auf einem SNP-Array durch eine Sammlung von

probe quartets anhand von vier Charakteristika geprüft (siehe Abbildung 11 auf Seite 46): i) PM und MM, ii) Allel A oder B, iii) die Lage des SNPs sowie iv) die Ausrichtung des DNA-Strangs.

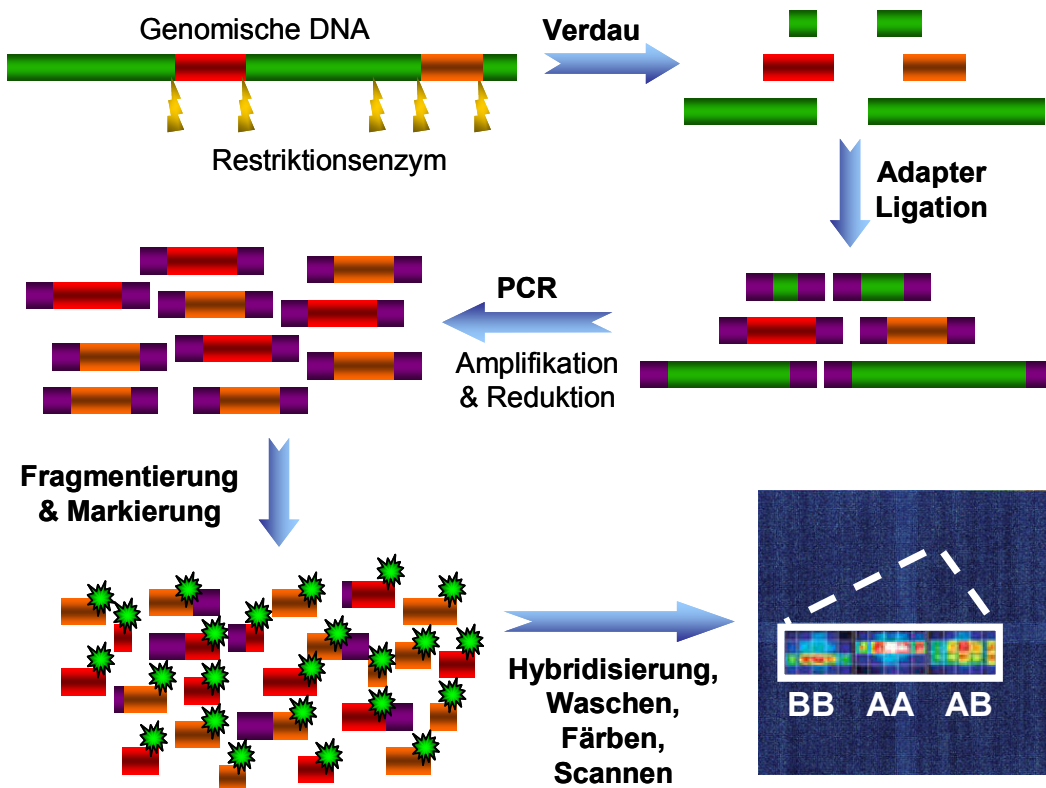


Abbildung 12: Ablauf einer SNP-Array Analyse. Pro Ansatz werden 250 ng genomische DNA mit einem Restriktionsenzym (XbaI oder StyI) geschnitten. Alle entstandenen DNA-Stücke werden über den klebrigen vier Basenpaar-Überhang mit einem sogenannten Adapter verbunden, der als Erkennungssequenz für den spezifischen Primer des anschließenden Amplifikationsschrittes dient. Die Bedingungen der PCR wurden so optimiert, dass die amplifizierten Produkte eine Größe von 250 bis 2000 (Affymetrix, Inc., ©2004a) bzw. 200 bis 1100 (Affymetrix, Inc., ©2005-2006b) haben. Die PCR-Produkte werden in einem weiteren Schritt fragmentiert und markiert. Die markierte DNA wird auf dem GeneChip® hybridisiert. Der abschließende Schritt besteht aus dem Waschen, dem Färben und dem Scannen des Chips. Grüne Balken: DNA-Stücke, die zu groß oder zu klein sind, rote und orange Balken: DNA-Stücke mit der richtigen Größe, lila Balken: Adapter.

In Tabelle 12 (siehe Seite 48) sind die Unterschiede in der Beschaffenheit der *features* für die beiden SNP-Arrays dargestellt. Die beiden SNP-Array Varianten wurden nach den jeweiligen Standardprotokollen von Affymetrix (Affymetrix, Inc., ©2004a; Affymetrix, Inc., ©2005-2006b), dem sogenannten GeneChip® Mapping Assay prozessiert (siehe Abbildung 12). Die Umwandlung der Daten für die anschließende Analyse mit CNAG 2.0 erfolgte mit GCOS Version 1.4 (Affymetrix, Inc., ©2003-2005a; Affymetrix, Inc., ©2003-2005b). Im Gegensatz zu den Expressionsarrays übernimmt die in GCOS implementierte Zusatzsoftware

GTYPE (Affymetrix GeneChip® Genotyping Analysis Software) die Erzeugung der „.chp“-Datei (siehe Tabelle 9 auf Seite 39). In diesem Fall sind in dieser Datei unter anderem die Informationen über die Ausprägung der Allele eines SNPs in Form von sogenannten *genotype calls* (Genotyp Signale) gespeichert. Die *genotype calls* werden mit Hilfe des *Dynamic Model* (DM) Algorithmus und des *Bayesian Robust Linear With Mahalanobis* (BRLMM) Algorithmus aus den Intensitätswerten jeder *probecell* berechnet (Affymetrix, Inc., ©2005-2006a; Affymetrix, Inc., ©2006). Das letzte Bild in Abbildung 12 auf Seite 47 zeigt drei der vier möglichen *genotype calls*, die die jeweiligen Ausprägungsformen der Allele eines SNPs repräsentieren: i) AA und ii) BB (Homozygotie) sowie iii) AB (Heterozygotie). Der vierte *genotype call* ist der „no call“. Dieser sagt aus, dass dem jeweiligen SNP keiner der drei anderen *genotype calls* zugeordnet werden konnte.

Tabelle 12: Detaillierte Angaben zu den beiden verwendeten SNP-Arrays

	GeneChip® Human Mapping 50K Array Xba 240	GeneChip® Human Mapping 250K Sty Array
Anzahl der features	2,5 Millionen	6,5 Millionen
Größe der features	8 µm x 8 µm	5 µm x 5 µm
Anzahl der features/SNP	40	24 oder 40
Scanner	Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 oder höher	Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 G7
Software	Affymetrix GeneChip® Operating Software (GCOS), version 1.1.1 with Patch 5 oder höher	Affymetrix GeneChip® Operating Software (GCOS) with autoloader, version 1.4

2.9.3 CNAG 2.0

Die LOH-Analyse mittels der SNP-Arrays wurde mit dem *Copy Number Analyzer for GeneChip® 2.0* (CNAG 2.0) durchgeführt (Nannya et al., 2005). Die Software kann über die Internetseite <http://www.genome.umin.jp/> bezogen werden. CNAG ist ein kostenloses akademisches Analysetool für GeneChip® SNP Arrays. Die Software benötigt für eine Analyse von jeder Probe die *Cell Intensity* und die *Chip* Datei (CNAG manuals, online).

Die Arraydaten der jeweiligen Tumor- und korrespondierenden Blutprobe wurden in dieser Arbeit als *paired sample* eingelesen. Für die Untersuchung wurde die Allel-spezifische Analyse mit Standardeinstellungen verwendet. Die Ergebnisse dieser Analyse werden von CNAG grafisch im sogenannten *display mode* auf dem

Bildschirm ausgegeben. Anhand der sogenannten *SNP call bar* Anzeige und der Visualisierung der Allel-basierten Analyse (*allele based analysis*) wurde die LOH-Region jedes untersuchten Tumors bestimmt (Abbildung 13).

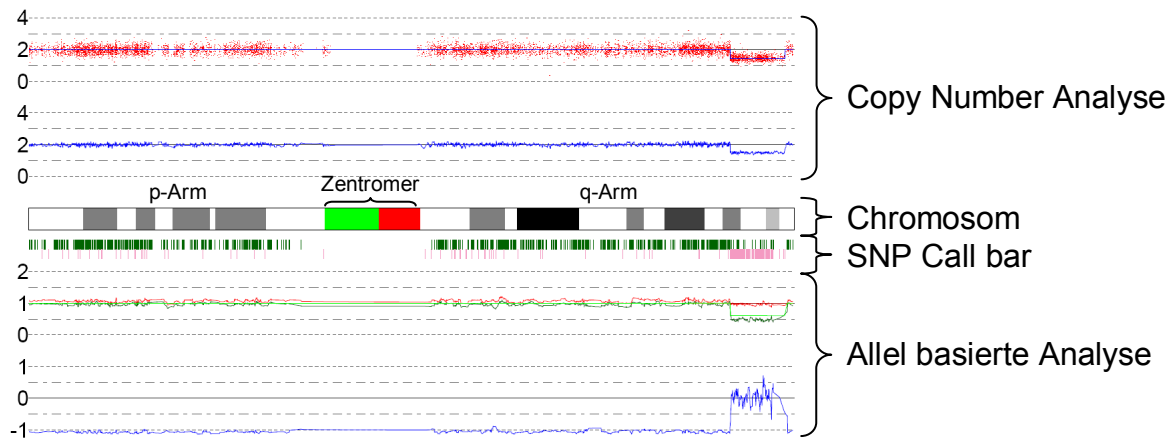


Abbildung 13: Aufbau der Ausgabe der *display modes* von CNAG. 'Copy Number Analyse' zur Bestimmung der Kopienzahl eines Locus im Genom. 'SNP Call bar' gibt wieder, ob ein Locus heterozygot (grüne Balken) oder homozygot (pinke Balken) für ein Allel ist oder ob keins von beiden sicher bestimmt werden kann (kein Balken). Die 'Allel basierte Analyse' spiegelt die jeweilige Anzahl der beiden gemessenen Allele wider. p-Arm: kurzer Chromosomenarm, q-Arm: langer Chromosomenarm.

Die *SNP call bar* Anzeige besteht aus Balken bzw. Strichen, die durch ihre Position in der Anzeige und durch die Farbcodierung das Verhältnis der SNPs von Tumor- und Blutprobe in einem Locus widerspiegelt. Es existieren drei Arten von *SNP call bars*: i) *discordant call bar SNPs* (grün), *hetero call bar SNPs* (pink) und *no call bar SNP* (farblos bzw. werden nicht angezeigt). *Hetero call bar SNPs* (hcbSNP) symbolisieren, dass sowohl die SNPs der Tumor- als auch die der Blutprobe in diesem Locus heterozygot sind. *Discordant call bar SNPs* (dcbSNP) zeigen an, dass die SNPs der Blutprobe heterozygot und die SNPs der Tumorprobe homozygot in diesem Locus sind. Eine Region mit wenigen oder keinen hcbSNP und überwiegend dcbSNP weist somit auf ein LOH-Ereignis hin. Zusammen mit einem signifikanten Unterschied der beiden Kurven der Allel-basierten Analyse mittels *Hidden Markov Model* (HMM) repräsentiert diese Region ein LOH. Ein signifikanter Unterschied ist gegeben, sobald diese beiden Kurven nicht übereinander liegen. Auf der Grundlage des *display modes* wurde die ungefähre Position des ersten und letzten dcbSNP innerhalb der LOH-Region bestimmt. Die genaue Position dieser beiden SNPs wurde anhand der Informationen des jeweils exportierten *raw data output file* definiert. Die Art jedes

SNPs ist in dieser Datei durch eine Kombination der vier Zahlen 0, 1, 2 und 3 in den Spalten „Call_test“ und „Call_reference“ kodiert. Hierbei stehen die Zahlen für die jeweilige *genotype call* der Tumor- bzw. Blutprobe: 1=AA, 2=AB, 3=BB und 0= nicht informativ (no call). Somit steht die Kombination 2 | 2 für einen hcbSNP, 1 | 2 oder 3 | 2 für einen dcbSNP bzw. ein mögliches LOH-Ereignis. Alle anderen Kombinationen aus 0, 1, 2 und 3 repräsentieren einen nicht informativen *call bar SNP*. Anhand der ersten und letzten Position eines dcbSNP wurde die LOH-Region definiert. Die Bereiche zwischen der LOH-Region und dem letzten nicht informativen SNP vor einem hcbSNP spiegeln einen möglichen LOH-Bereich wider.

2.10 Eingrenzung möglicher Kandidatengene im LOH-Bereich

Die Eingrenzung der möglichen Kandidatengene erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurden die Gene, die in dem durch die SNP-Analysen identifizierten 16q LOH-Bereich liegen und zu den signifikant regulierten Genen während der Mausretinaentwicklung ortholog sind, bestimmt. Im zweiten Schritt wurde überprüft, welche dieser im ersten Schritt identifizierten Gene eine unterschiedliche signifikante Regulation in Tumoren mit und ohne 16q LOH aufweisen. Das Vorgehen bei diesen beiden Schritten ist in den nächsten beiden Teilabschnitten beschrieben.

2.10.1 Identifikation von orthologen Genen des LOH-Bereichs im Mausmodell

Für die Bestimmung der Gene, die in dem durch die SNP-Analysen identifizierten 16q LOH-Bereich liegen und zu den signifikant regulierten Genen während der Mausretinaentwicklung ortholog sind, wurde das Datenbankauswertungswerkzeug *BioMart* (Durinck et al., 2005; Haider et al., 2009; Smedley et al., 2009) auf der Homepage des bioinformatischen Forschungsprojekts *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>) verwendet. *BioMart* nutzte für die Suchanfrage zum Zeitpunkt der Bestimmung die damals aktuelle *Ensembl* Version 52 (Ensembl release 52, Dec 2008). *BioMart* (BioMart Projekt, Homepage) ist ein suchorientiertes Datenvernetzungs- und Datenverwaltungswerkzeug, das ein oder mehrere Datenbanken für seine Suchanfrage verwenden kann. Es ist in einer Vielzahl von Sequenz-, Genom-, biologischen Netzwerk- und Annotationsdatenbanken wie *Uniprot*, *HapMap*, *Ensembl* und weitere integriert und ermöglicht

dem Anwender, die Datenbanken nach spezifischen Fragestellungen zu durchsuchen. Als Eingabemaske fungiert die Web basierte Benutzerschnittstelle *MartView* (Haider et al., 2009; Smedley et al., 2009).

Tabelle 13: Parameter der Suchanfrage zur Bestimmung der orthologen Gene mittels *BioMart*

Database	Ensembl 52	
Dataset	Homo sapiens genes (NCBI36)	
Filter (REGION)	Chromosom	16
	Gene start (bp)	81468930
	Gene Stop (bp)	88008134
Attributes (Homologs)	GENE	Ensembl Gene ID
Attributes (Homologs)	MOUSE ORTHOLOGS	Mouse Ensembl Gene ID
		Mouse % Identity
		Mouse Chromosome
		Mouse Chromosome Start (bp)
		Mouse Chromosome End (bp)
		Orthology Type

gespeicherte Textdatei chr16_81468930-88008134_mouse-homologs.tab

In Tabelle 13 sind die Suchparameter angegeben, die für die Bestimmung der orthologen Gene verwendet wurden. Des Weiteren wurde mit einer zweiten Suchanfrage die Affymetrix *probe set* Kennung (Affymetrix ID) des *GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Arrays* für die orthologen Mausgene, die alle auf dem Mauschromosom 8q im Bereich von 120807633 bp bis 125565897 bp liegen, ermittelt (siehe Tabelle 14). Die erhaltene Ergebnisse wurde unter Ausschluss von mehrfach gleichen Treffern (Kästchen „Unique results only“ aktiviert) jeweils als TSV-Datei (*tab-separated values* - Tabulator getrennte Textdatei) exportiert.

Tabelle 14: Parameter der Suchanfrage zur Ermittlung der Affymetrix Ids des *GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Arrays* mittels *BioMart*.

Database	Ensembl 52	
Dataset	Mus musculus genes (NCBIM37)	
Filter (REGION)	Chromosom	8
	Gene start (bp)	120807633
	Gene Stop (bp)	125565897
Attributes (Features)	GENE	Ensembl Gene ID
		Associated Gene Name
Attributes (Features)	EXTERNAL	Affy mouse430 2

gespeicherte Textdatei mouse_chr8_120807633-125565897_Ensembl-ID2AffyId_v52.tab

Beide Dateien wurden über die *Mouse Ensembl Gene ID* mit Hilfe eines *AWK*-Skriptes fusioniert. Diese Datei wurde mit den Ergebnissen der *Comparison*

Analyse (siehe Seite 42) über die Affymetrix ID des Mausarrays mittels *AWK* und *Shell* basierter Skripte abgeglichen. Die aus diesem Abgleich erhaltene Textdatei beinhaltet die von Ensembl exportierten Informationen, sowie die Expressionswerte der einzelnen Mausentwicklungsstadien für die Gene in dem durch die SNP-Analysen identifizierten 16q LOH-Bereich, die zu den signifikant regulierten Genen während der Retinaentwicklung der Maus ortholog sind.

2.10.2 Identifikation signifikant regulierter Gene innerhalb des LOH-Bereichs in Retinoblastomen mit und ohne LOH

Zur Bestimmung der signifikant regulierten Gene innerhalb des mittels SNP-Analysen identifizierten 16q LOH-Bereichs in Retinoblastomen mit und ohne 16q LOH wurde der *Mann-Whitney-U-Test* verwendet. Die Berechnung wurde mit dem Programm GraphPad Prism 4.0 durchgeführt. Die signifikant regulierten Gene wurden mit den Genen, die in dem durch die SNP-Analysen identifizierten 16q LOH-Bereich liegen und zu den signifikant regulierten Genen während der Retinaentwicklung der Maus ortholog sind, abgeglichen. Die Textdatei mit den orthologen Genen und den Expressionswerten der Mausretinaentwicklungsstadien wurde um die Expressionswerte der Retinoblastome und der Retina-RNA-Probe erweitert. Diese Erweiterung erfolgte über *AWK*-Skripte mit Hilfe des Affymetrix ID des *GeneChip® Human Genome U133A Arrays*, sowie einer Textdatei aus einer dritten BioMart Suchanfrage (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Parameter der Suchanfrage zur Ermittlung der Affymetrix IDs des *GeneChip® Human Genome U133A Arrays* mittels *BioMart*.

Database		Ensembl 52
Dataset		Homo sapiens genes (NCBI36)
Filter (REGION)	Chromosom	16
	Gene start (bp)	81468930
	Gene Stop (bp)	88008134
Attributes (Features)	GENE	Ensembl Gene ID
		Description
		Gene Start (bp)
		Associated Gene Name
Attributes (Features)	EXTERNAL	Affy HG U133A
gespeicherte Textdatei	chr16_81468930-88008134_Ensembl-ID2hsAffyID_GeneStart_v52.tab	

Für die Erweiterung wurden die Expressionsdaten der Arrays mit dem Paket *affy* mit dem damals aktuellen *chip definition file* (CDF) von Bioconductor 2.3 (Maintainer: Biocore Data Team, <http://bioconductor.org/packages/2.3/data/>

annotation/) vorverarbeitet. Ein CDF beschreibt den Aufbau eines Affymetrix GeneChips und somit unter anderem auch die Lage der einzelnen *probe pairs* für ein *probe set*.

2.11 Multiple CNAG basierte SNP-Analyse zur Identifikation von regional übereinstimmendem partiellem LOH in mehreren Tumoren

Zur Detektion von LOH-Bereichen, die in mehreren Tumoren innerhalb eines definierten Abschnitts SNPs mit LOH aufweisen, ist ein auf der Skriptsprache *AWK* und der *Linux-Shell* basierendes Analyseprogramm (*scanprogramm_2008-01-14.sh*) eigenständig programmiert worden. Die Analyse erfolgte unter Nutzung der von CNAG interpretierten GeneChip Daten aus Teilabschnitt 2.9.3 anhand der Informationen des jeweils exportierten *raw data output file*. Das Programm durchsucht die Chromosomen SNP-weise nach dcbSNPs innerhalb eines definierten Bereichs bzw. Fensters. Als Bedingung für ein LOH-Ereignis musste in jedem der zu überprüfenden Tumore mindestens ein dcbSNP innerhalb des Fensters liegen. Trifft diese Bedingung zu, werden die dcbSNPs mit der niedrigsten und der höchsten Positionsangabe innerhalb des zu untersuchenden Fensters bestimmt und anhand dieser Positionsangaben das jeweilige LOH-Fenster definiert (Flussdiagramm des Programms im Anhang). Das Programm vergleicht in seinem ersten Durchgang die Daten von allen Tumoren in Dreiergruppen in allen möglichen Kombinationen von Tumorgruppenzusammensetzungen. Folglich können minimal drei Tumore mit diesem Programm untersucht werden. Im darauf folgenden Schritt werden Vierergruppen, dann Fünfergruppen usw. nach dem Schema der Dreiergruppen analysiert, bis die maximale Anzahl an Tumoren erreicht ist. In dieser Arbeit wurden acht der zehn in Teilabschnitt 2.9.2 mit dem *GeneChip® Human Mapping 250K Sty Array* von Affymetrix analysierten Tumore mit Hilfe des Programms untersucht. Die Fenstergröße betrug in diesem Ansatz 10 Kb bzw. ± 5000 bp vom jeweils ausgehenden SNP.

2.12 Etablierung eines *in vivo* Modells zur Analyse der möglichen Kandidatengene

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Methoden zur Etablierung eines Testsystems für die Kandidatengene sind größtenteils in dem Video-gestützten Manuskript Dohle et al. 2009 (die Erstautorenschaft teilt sich der Autor dieser

Doktorarbeit mit Frau S. D. Pasa und Herrn D. S. Dohle) dokumentiert, dass vom Journal of Visualized Experiment zur Publikation angenommen wurde (30.09.09) und dieser Arbeit beigelegt ist (siehe CD 1).

2.12.1 Legehennen und Eier

Die Eier stammten von LOHMANN BROWN CLASSIC Legehennen der Firma Lohmann Tierzucht GmbH (Cuxhaven, www.ltz.de) und wurden über den Züchter Sörries-Trockels Vermehrungszucht GmbH (Hewingsen, Gemeinde Möhnesee) bezogen. Die LOHMANN BROWN CLASSIC Legehennen (LB-Legehennen) stellt eine moderne Hybridkreuzung dar, die auf hohe Legeleistung gezüchtet wurde. Die Eier der LB-Legehennen haben eine braune Schalenfarbe.

2.12.2 Bebrüten von befruchteten Eiern

Die befruchteten Eier wurden für 64 bis 76 Stunden in einem Flächenbrüter inkubiert. Hierfür wurden die Eier von grobem Schmutz mechanisch mit einem groben Papiertuch gereinigt und auf den Wendeeinsatz des Flächenbrüters gelegt. Die Eier auf dem Wendeeinsatz wurden alle zwei Stunden mit Hilfe eines Motors im Deckel gewendet. Über drei mit deionisiertem Wasser gefüllten Wasserrinnen im Boden des Brüters wurden die Eier vor Austrocknung bewahrt. Die Inkubationstemperatur lag bei 37,8°C. Ein Teil der befruchteten Eier einer Lieferung wurde vor dem Bebrüten für drei Tage bei ca. 13°C mit der stumpfen Seite nach oben gelagert. Die Unterbrechung der Entwicklung kann bis zu einer Woche ausgedehnt werden, ohne dass sich die Lagerung negativ auf die Entwicklung des Hühnerembryos auswirkt. Durch das versetzte Bebrüten der Eier wurde gewährleistet, dass Hühnerembryonen in den bevorzugten Entwicklungsstadien durchgängig für Experimente zur Verfügung standen. Nach ca. dreitägiger Inkubationszeit wurden die Eier für die *in ovo* oder *ex ovo* Kultur verwendet.

2.12.3 Ex ovo Kultur

Eine detaillierte Beschreibung zur Erstellung einer *ex ovo* Kultur vom Aufschlagen des Eis über das Überführen des Embryos in die Petrischale (siehe Abbildung 14 auf Seite 55) bis hin zum Transfer in den Brutschrank findet sich in der Publikation Dohle et al. 2009 und wird in dem zugehörigen Video anschaulich dokumentiert (siehe CD 1). Das Aufschlagen des Eis und das Überführen des Embryos in die Petrischale sind sehr komplexe Vorgänge, bei denen die Einhaltung der richtigen

Technik von entscheidender Bedeutung für das Gelingen der *ex ovo* Kultur und für das spätere Überleben des Embryos ist. Die Überlebensrate liegt mit der in Dohle et al. (2009) beschriebenen Technik im Vergleich zu anderen *ex ovo* Kulturen bei über 50%.

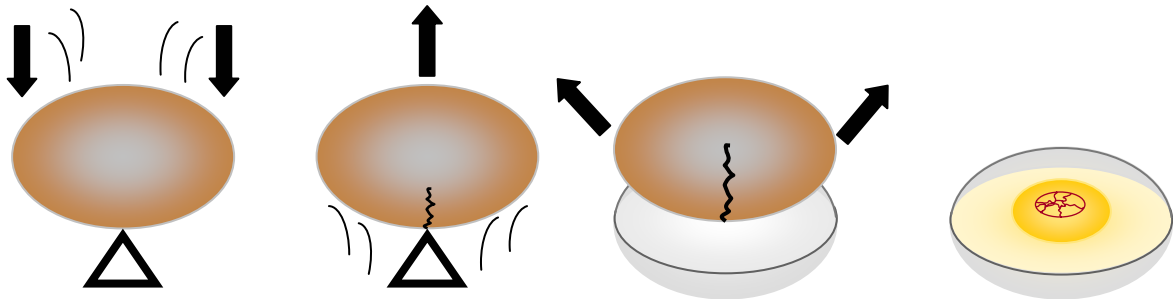


Abbildung 14: Schematisch Darstellung zur Erstellung einer *ex ovo* Kultur in drei Schritten: i) Aufschlagen des Eies mit Hilfe eines dreiseitigen Magnetrührfisches, ii) Übersetzen in eine Petrischale und iii) Öffnen des Eies.

2.12.4 *In ovo* Kultur

Im Gegensatz zur *ex ovo* Kultur wurde jeweils ein Ei aus dem Flächenbrüter genommen und senkrecht mit der stumpfen Spitze nach oben in den Deckel eines 50 ml FALCON Röhrchen gestellt. Mit einer feinen Säge wurde die Schale des Eis ca. 1,5 cm von der stumpfen Spitze parallel zum Äquator ringsum soweit angesägt, dass die Schale an dieser Stelle weitestgehend entfernt, die Eihaut aber noch intakt war. Der Bereich zum Sägen wurde so gewählt, dass möglichst viel Eischale, die die Luftkammer des Eis bedeckt, entfernt wurde und der Inhalt des Eis mindestens 1 mm vom entstandenen Rand entfernt war. An einer von der Eischale befreiten Stelle wurde mit einem spitzen sterilen Skalpell von schräg unten vorsichtig in das Ei durch die Eihaut gestochen. Das Skalpell wurde entlang der gesägten Linie geführt, wobei ein leichter Druck nach oben ausgeübt wurde. Der entstandene Deckel wurde kurz vor dem vollständigen Umrunden des Eis mit dem Skalpell angehoben und entfernt. Im Idealfall wurde mit dem Entfernen des Stückes Eischale auch die zweite Schicht der Eihaut auf dem Eierinhalt entfernt. Im Regelfall musste jene mit einer sterilen gebogenen Pinzette, vorsichtig gegriffen und abgezogen werden, ohne das Gefäßsystem des oberliegenden Embryos oder jenen selbst zu verletzen. Beim Abziehen der Eihaut haftete häufig einer der Hagelschnüre an ihr (siehe Abbildung 15 auf Seite 56). In einem solchen Fall wurde die Eihaut soweit angehoben, dass die Hagelschnur mit einer sterilen spitzen Schere durchgeschnitten werden konnte. Die *in ovo* Kultur wurde in einem

Eierhalter (ein FALCON Deckel oder eine Plastikeierpalette) gestellt und die Öffnung im Ei mit einem FALCON Deckel abgedeckt. Das Ei wurde anschließend in den Brutschrank (bevorzugt in das obere Fach) gestellt. Bevor das nächste Ei aufgesägt wurde, wurden das Skalpell, die Pinzette und die Schere mit einem mit 70%igem Ethanol getränkten Tuch gesäubert.

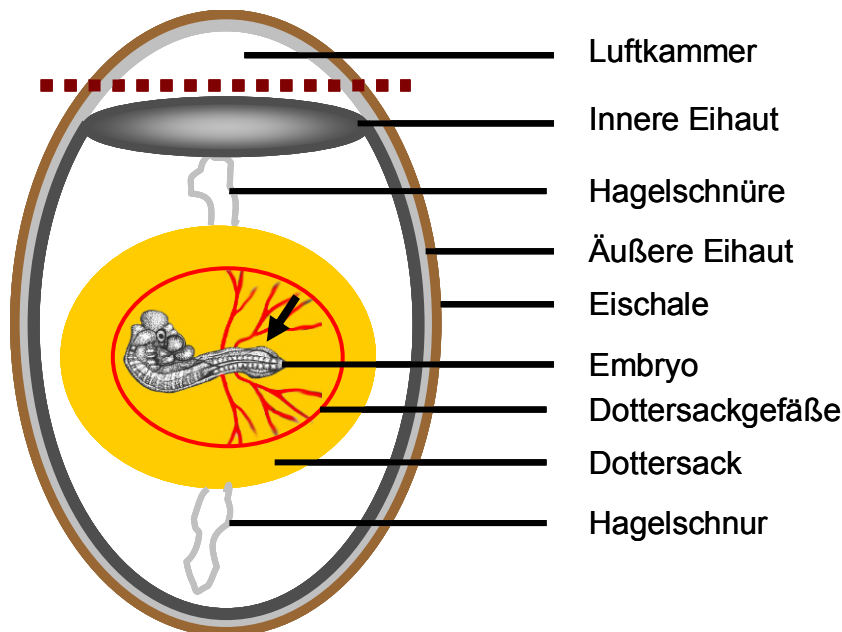


Abbildung 15: Schematische Darstellung eines drei Tage alten Hühnerembryos im Ei mit Kennzeichnung der im Text beschriebenen Strukturen. Die rote gestrichelte Linie kennzeichnet die ungefähre Höhe, auf der das Ei für eine *in ovo* Kultur aufgesägt wird. Schwarzer Pfeil zeigt auf die Extremitätenknospe des Hühnerembryos.

Die Vorteile das Ei zu diesem frühen Stadium und auf die beschriebene Weise zu fenstern sind, dass i) das Gefäßsystem beim Abziehen der Eihaut noch nicht so stark verletzungsempfindlich ist, wie ab dem vierten Entwicklungstag und ii) das Ei nicht geschürt werden muss, um die Position der CAM zu bestimmen, wie es bei Hühnerembryonen ab Tag 8 nötig ist. Der letzte Punkt ist dadurch begründet, dass der Embryo am Tag 3 an der Oberseite liegt und ab Tag 5 anfängt, nach unten abzusacken. Während dieser Zeit entwickelt sich die CAM, die die Eigenart aufweist, sich von der Oberseite des Eies an der Eihaut entlang nach unten zu entwickeln. Die Überlebensrate liegt bei erfolgreichem Fenstern bis Tag 17 bei über 99%.

2.12.5 Transplantation von Geweben und Organen auf die CAM

In diesem Teilabschnitt erfolgt zunächst eine allgemeine Beschreibung der Transplantation von Geweben oder Organen auf die CAM. Im Anschluss werden

die Gewinnung und / oder Besonderheiten der für die Etablierung verwendeten Transplantate aufgeführt. Diese Methode soll in naher Zukunft für die Züchtung und Kultivierung von Retinoblastomen sowie für Experimente und Analysen mit Retinoblastomen dienen. Aus diesem Grund war es notwendig, möglichst unterschiedliche Proben auf der CAM anwachsen zu lassen. Die in diesem Teilabschnitt beschriebene Methode und deren Ergebnisse sind in Dohle et al. 2009 publiziert.

Als Wirt für eine erfolgreiche Transplantation sind Hühnerembryonen von Tag 8 bis Tag 10 am besten geeignet. Bei jüngeren Embryonen ist die CAM noch nicht ausreichend ausgebildet, um eine Versorgung des Transplantats zu gewährleisten. Bei älteren Embryonen ist die Versorgung gewährleistet, jedoch ist von der Verwendung von Hühnerembryonen über Tag 10 hinaus abzuraten, da die Kultivierungsdauer durch den Schlupf und die allmähliche Ausbildung des Immunsystems begrenzt ist. Ab Embryonaltag (E) 17 ist das Immunsystem des Embryos ausreichend ausgebildet, um eine Abstoßung des Transplantats zu bewirken. Auf eine Empfänger-CAM können mehrere Transplantate platziert werden.

Für die Transplantationen wurden Hühnerembryonen von Tag 8 bis Tag 10 für die Versuche verwendet. Als Transplantationsort wurde nach Möglichkeit eine Gefäßverzweigung gewählt. Die Stelle, auf die das Transplantat platziert werden sollte, wurde zuvor mit einer Pinzette leicht verletzt. Die Pinzette wurde mit mäßigem Druck in einem relativ flachen Winkel zur CAM über die ausgewählte Stelle gestrichen, ohne eine Verletzung des Blutgefäßsystems zu verursachen. Das Transplantat wurde mit so wenig PBS wie möglich auf einer Stelle der CAM abgelegt, an der kein weiteres Transplantat platziert werden sollte. Dieser Schritt diente dazu, überschüssiges PBS vom Transplantat zu entfernen. Anschließend wurde das Transplantat auf die ausgewählte Stelle gelegt und mit der Pinzette leicht auf der CAM festgedrückt um einen Kontakt zur verletzten Stelle der CAM sicherzustellen. Bei empfindlichen Transplantaten, wie z. B. den Entwicklungsknospen von Hühnerembryonen, wurde auf das Ablegen zum Entfernen des PBSs sowie auf das Andrücken verzichtet.

2.12.5.1 Allotransplantation

Allotransplantate sind Zellen, Gewebe oder Organe, die von derselben Art von Organismen stammen wie der Wirtsorganismus. In dieser Arbeit wurden die im

Folgenden beschriebenen Allotransplantationen maximal bis zum Tag 19 kultiviert, da ein Schlüpfen ab Tag 20 nicht auszuschließen war.

2.12.5.1.1 Entwicklungsknospen Embryonaltag E3/E4

Eier zur Gewinnung der Donorembryonen wurden nach 3 bis 4 Tagen aus dem Flächenbrüter genommen und wie für eine *ex ovo* Kultur in eine Petrischale aufgeschlagen. Der Embryo wurde mit einer Pinzettenschere von den Dottersackgefäßen getrennt und mit einem Sieblöffel in eine große Petrischale mit kaltem PBS (4°C – 8°C) überführt. In ihr wurde der Embryo vom Dotter durch Schwenken des Sieblöffels weitgehend befreit und in eine kleine Petrischale mit kaltem PBS gehoben. Mit Hilfe von Pinzetten wurde der Embryo von den ihn umgebenden Membranen vorsichtig befreit. Die Entwicklungsknospen der Flügel und Beine wurden so nahe wie möglich am Körper abgetrennt, mit den Pinzetten vorsichtig gegriffen und auf die Empfänger-CAM, wie im Teilabschnitt 2.12.5 erläutert, transplantiert.

2.12.5.1.2 Augen Embryonaltag E3/E4

Wie zuvor anhand der Transplantation der Entwicklungsknospen beschrieben, wurde ein 3 Tage alter Embryo einer Präparation der Augen zugänglich gemacht. Die Augen wurden sehr vorsichtig mit etwas umgebendem Gewebe frei präpariert. Das umgebende Gewebe diente hauptsächlich der Übertragung auf die Empfänger-CAM, ohne die Augen durch Greifen mit einer Pinzette zu verletzen. Auf zusätzliches Absetzen zum Entfernen von PBS und auf das Andrücken wurde in diesem Fall verzichtet.

2.12.5.2 Xenotransplantation

Xenotransplantate sind Gewebe, Zellen oder Organe, die zwischen unterschiedlichen Arten übertragen werden. Für diese Dissertation wurden Entwicklungsknospen von Mausembryonen und humane Tumore auf die CAM von Hühnerembryonen transplantiert. Diese wurden bis Tag 16 (maximal Tag 17) kultiviert, da ab dem 17. Tag die Ausbildung des Immunsystems soweit fortgeschritten war, dass es entweder zur Abstoßung der Transplantate kam oder, wie in den meisten Fällen geschehen, der Hühnerembryo starb.

2.12.5.2.1 Maus E13 Entwicklungsknospen

Mäuse wurden so terminiert verpaart, dass die Mausembryonen zum Entwicklungstag 8 der Hühnerembryonen das gewünschte Entwicklungsstadium

erreicht hatten (hier E13). Das trächtige Muttertier wurde durch zervikale Dislokation getötet und mit dem Rücken nach unten auf eine Wachsplatte fixiert. Die Bauchdecke wurde mit 70% Ethanol benetzt, entlang der Mittellinie aufgeschnitten und zur Seite weggeklappt sowie festgesteckt. Beide Hörner des Uterus mit den Embryonen wurden mit einer Schere abpräpariert und in ein Becherglas mit kaltem PBS (4°C – 8°C) überführt. Die Embryonen wurden getrennt und pro Präparation ein Embryo in eine Petrischale mit kaltem PBS überführt. Die Uteruswand und die Embryonalhüllen wurden vorsichtig mit Hilfe von Pinzetten entfernt. Der Embryo wurde durch Dekapitation getötet und die Entwicklungsknospen der Arme und Beine entweder mit einer Pinzettenschere abgeschnitten oder mit den Pinzetten abgekniffen und, wie im Teilabschnitt 2.12.5 zuvor beschrieben, auf die CAM des Wirtsembryos überführt.

2.12.5.2.2 Blasenkarzinome und Melanome

Tumor Biopsien wurden während einer Operation in einem 2 ml Kryoröhrchen mit 1 ml Leibovitz's L-15 Medium (# 31415-029, Invitrogen) oder Rb-Voll Medium (siehe Tabelle 1) gesammelt. Für die Transplantation wurden die Tumore von umgebendem Gewebe weitestgehend befreit. Anschließend wurden sie mit Hilfe von zwei sterilen Skalpelln in 1 mm³ - 2 mm³ große Stücke geschnitten und auf die Empfänger-CAM transferiert. Die Verwendung von Tumorstücken von der Oberfläche des Tumors wurde aufgrund der erhöhten Gefahr von Kontamination mit Muskel- oder Bindegewebe vermieden. Um die Oberfläche und somit die Wahrscheinlichkeit des Anwachsens zu erhöhen, wurden die Tumorstücke mehrmals mit einer Pinzettenschere ein- aber nicht durchgeschnitten.

2.12.5.3 Kultivierung von Tumortransplantaten auf der CAM

Für die Kultivierung von Tumortransplantaten über mehrere Generationen von Hühnerembryonen wurde der Wirtsembryo durch Dekapitation getötet. Das Tumortransplantat wurde aus der CAM herausgeschnitten und in eine Petrischale mit kaltem PBS überführt. Überstehende CAM wurde mit Hilfe einer Pinzettenschere entfernt. Bei größeren Transplantatstücken wurden die Tumore auf eine Größe von 1 mm³ - 2 mm³ zerkleinert. Anschließend wurden die Tumorstücke auf die CAM des Empfängerembryos transplantiert.

2.12.6 Inokulation und Injektion von Retinoblastomzellen

Die in diesem Teilabschnitt beschriebenen Methoden und deren Ergebnisse sind in Dohle et al. 2009 publiziert.

2.12.6.1 Vorbereiten von gefärbten und ungefärbten Zellen

Unabhängig von der Retinoblastomzelllinie wurden konfluente Zellen mit Hilfe einer Pipettierhilfe mit einer sterilen 25 ml Plastikpipette mehrmals auf- und abpipettiert, um die Zellen weitgehend zu vereinzeln. Anschließend wurden die Zellen in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt. 15 μ l der Zellen wurden verwendet um deren Zellzahl mittels einer Neubauer Zählkammer unter einem Lichtmikroskop auszuzählen. In der Zwischenzeit wurden die Zellen im Falcon Röhrchen bei 1000 rpm für 3 min und bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation mit Hilfe einer Zellkulturpumpe abgesaugt. Für die Lebenddokumentation der Zellen wurden die Zellen in PBS in einer Konzentration von 10^7 Zellen/ml resuspendiert und nach dem Standardprotokoll des *PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Mini Kits* (MINI26, Sigma) gefärbt. PKH26 ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der aufgrund einer langen aliphatischen Kette in die Zellmembran von Zellen eingebaut wird. Die Kontrolle der Zellfärbung erfolgte vor und nach den Versuchen mittels Durchflusszytometrie (siehe unten). Ein Teil der gefärbten Zellen wurden wieder in Kultur genommen. Nach Beendigung des jeweiligen Versuchs wurde die Zellfärbung der in Kultur genommenen Zellen ein weiteres Mal mittels Durchflusszytometrie kontrolliert, um sicher zu stellen, dass die Zellfärbung weiterhin vorhanden war. Die Vorbereitung der Zellen wurde durch das Einstellen der benötigten Zellkonzentration für den jeweiligen Versuch mit DMEM oder PBS abgeschlossen. Die Zellkonzentration für Inokulationen auf die CAM betrug standardmäßig $3 \cdot 10^6$ Zellen/ml und für die Injektion in den Glaskörper standardmäßig 10^7 Zellen/ml.

2.12.6.2 Kontrolle der gefärbten Zellen mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, im Laboralltag häufig als FACS (fluorescence activated cell sorting) bezeichnet, ist eine Technik zum Messen, Zählen und Analysieren von Zellen und anderen mikroskopischen Partikeln, wie z. B. fluoreszenzmarkierte Proteine, innerhalb eines Flüssigkeitsstroms. Für die Messung werden die in Lösung befindlichen Partikel bzw. Zellen angesaugt und durch eine Kapillare an einem Sensormodul vorbeigeleitet. Beim Passieren des Moduls werden die Zellen mit einem Laserstrahl angestrahlt und die Emission, Reflexion und Streuung des

Laserstrahls gemessen und die Absorption bestimmt. Anhand dieser Messwerte können Rückschlüsse auf die chemische und physikalische Struktur, wie z. B. Größe, optische Dichte und Fluoreszenzmarkierung, von jedem einzelnen Partikel gezogen werden. Das Akronym FACS™ ist eine geschützte Marke der Firma Becton Dickinson (BD).

Zur Kontrolle der Färbung zu Beginn und gegen Endes eines Versuches wurden jeweils 200 µl mit ca. 250000 Zellen für eine Messung mittels Durchflusszytometrie verwendet. Als Negativkontrolle dienten jeweils ungefärbte Zellen in derselben Menge und Konzentration.

2.12.6.3 Inokulation von Zellen auf die CAM

Die Zellen können entweder mit oder ohne Begrenzung durch einen Plastikring auf die CAM gegeben werden. In dieser Dissertation wurden beide Varianten verwendet. Die Plastikringe wurden aus einer sterilen 1 ml Pipettenspitze mit Hilfe eines scharfen Skalpells hergestellt. Um scharfe Schnittkanten zu vermeiden, ist zu beachten, dass die Ringe mit einem Schnitt und nicht durch Sägen erzeugt werden. Die Dicke eines Rings betrug zwischen 0,5 mm und 1 mm. Nach Kontrolle unter einem Mikroskop wurden solche Ringe, die keinerlei scharfe Kanten aufwiesen, für solche Versuche verwendet, bei denen die CAM nicht verletzt werden durfte. Alle anderen wurden bei Versuchen eingesetzt, bei denen die Verletzung der CAM zur Versuchsdurchführung gehört (siehe 2.12.10 auf Seite 64). Das Platzieren des Ringes erfolgte mit Hilfe einer Pinzette. Zur Inokulation wurden 20 µl einer Zelllösung von $3 \cdot 10^6$ Zellen/ml direkt auf die CAM oder in den Ring pipettiert. Bei jenem Vorgang durfte die Pipettenspitze die CAM nicht berühren, außer Verletzungen der CAM waren erwünscht. Als Kontrolle wurde, abhängig von der Zellsuspension, entweder dieselbe Menge DMEM oder PBS verwendet.

2.12.6.4 Injektion von Zellen in den Glaskörper

Die Injektion der Zellen in den Glaskörper von 6 bis 14 Tagen alten Hühnerembryonen wurde mit Hilfe einer Hamilton Mikroliterspritze mit 33-G Kanüle durchgeführt. Spritze und Kanüle wurden vor jeder Injektion mit 70% Ethanol mehrmals gründlich und anschließend mehrmals mit sterilem PBS durchgespült. Die Spritze wurde mit der vorbereiteten Zellsuspension (10^7 Zellen/ml) gefüllt. Die Injektionsstelle wurde so gewählt, dass bei der Injektion weder eine Verletzung eines Blutgefäßes der CAM noch eine Verletzung des

Embryos (z. B. am Gehirn) durch zu weites Einstechen hervorgerufen wurde. Die Kontrolle der Einstichstelle sowie der Vorgang der Injektion wurde unter einem Mikroskop durchgeführt. Die Kanüle wurde mit einem schnellen kontrollierten Stoß ins Auge gestochen und 10 µl bis maximal 20 µl der Zellsuspension zügig, aber nicht zu schnell, ins Auge injiziert. Nach der Injektion wurde die Kanüle 1 s – 2 s im Auge belassen, um ein Auslaufen der Zellsuspension zu vermeiden (siehe Video auf CD 1). Für den Fall, dass die CAM mit der Kanüle nicht durchstochen werden konnte (bei Embryonen älter als Tag 10), wurde die CAM an einer Stelle mit sehr wenigen oder nicht sichtbaren Blutgefäßen vorsichtig mit zwei Pinzetten aufgerissen. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 4 Tagen wurden die Embryonen durch Enthauptung getötet und die Augen enukleiert. Die Augen wurden für Kryoschnitte fixiert, wenn die injizierten Zellen gefärbt waren und für Paraffinschnitte fixiert, wenn die Zellen ungefärbt waren. Die Herstellung von Paraffinschnitten ist mit PKH26-gefärbten Zellen nicht möglich, da der Farbstoff durch Lösungsmittel wie z. B. Ethanol aus der Zellmembran ausgewaschen wird.

2.12.7 Fixierung der Transplantate für die Dokumentation

Zum Nachweis des Anschlusses der Transplantate an das CAM-Blutgefäßsystem wurden die Wirtshühnerembryonen durch Dekapitation getötet und in eine Petrischale 40 ml bis 50 ml 4% PFA-Puffer gegeben und für mindestens eine Stunde bei 4°C inkubiert. Nach der Fixierung wurde das Transplantat großräumig aus der CAM geschnitten und in eine Petrischale mit 70% Ethanol oder PBS überführt. Der Anschluss des Transplantats an das Gefäßsystem wurde fotografisch dokumentiert, wobei sowohl die dorsale als auch die ventrale Seite der CAM fotografiert wurden. Eine vorherige Fixierung mit PFA-Puffer bot den Vorteil, dass das Blut während der Aufnahmen längere Zeit in den Gefäßen verweilte als bei einer Dokumentation ohne vorheriger Fixierung. In einem Großteil der Fälle wurden die Transplantate in der Bouin-Lösung fixiert und für Paraffinschnitte weiter verwendet (siehe Teilabschnitt 2.12.8).

2.12.8 Erstellen von Paraffinschnitten

Die Kontrolle der Entwicklung der Extremitätenknospen erfolgte anhand von Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbter Paraffinschnitte. Die Wirtshühnerembryonen wurden ab Tag 16 durch Dekapitation getötet. Die Transplantate wurden entweder mit 4%-PFA-Puffer fixiert und nach der Dokumentation in Bouin-Lösung nachfixiert

oder aus der CAM ausgeschnitten und wie die enukleierten Augen direkt in der Bouin-Lösung für mindestens 2 Stunden fixiert. Nach der Fixierung in der Bouin-Lösung wurden die Präparate mehrmals gründlich mit 70%igem Ethanol gewaschen und bis zum Einbetten in Paraffin bei 4°C in 70% Ethanol gelagert. Vor dem Einbetten in Paraffin wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, das Ethanol durch einen Xylol-Ersatzstoff aus dem Präparat gewaschen und in Paraffin eingebettet. Für diese drei Schritte wurde das Kurzprogramm des Shandon Excelsior (Thermo electron corporation, UK) verwendet, so dass die Präparate zum Schluss nur noch in Paraffinblöcke gegossen werden mussten. Mit einem Rotationsmikrotom wurden 6 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden in ein warmes Wasserbad überführt und mehrere Schnitte auf einen Objektträger aufgezogen. Zum Strecken der Schnitte wurde der Objektträger zunächst auf eine Heizplatte (38°C) und anschließend in einen Wärmeschrank (50°C) gelegt. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt (Protokoll siehe Tabelle 16) und eingedeckelt.

Tabelle 16: Protokoll für Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Histoclear	entparaffinieren	5 min
Histoclear	entparaffinieren	5 min
Isopropanol	spülen	kurz eintauchen
96% Ethanol	hydrieren	3 min
70% Ethanol	hydrieren	3 min
deionisiertes Wasser	hydrieren	3 min
Hämatoxylin	Kernfärbung	2 - 5 min
Leitungswasser	spülen	5 - 10 min
Salzsäure in Ethanol	differenzieren	kurz eintauchen
Leitungswasser	bläuen	5 - 10 min
Eosin	Cytoplasmafärbung	2 - 5 min
96% Ethanol	dehydrieren	kurz eintauchen
96% Ethanol	dehydrieren	kurz eintauchen
96% Ethanol	dehydrieren	kurz eintauchen
Isopropanol	dehydrieren	kurz eintauchen
Isopropanol	dehydrieren	1 min
Histoclear	klären	5 min
Histoclear	klären	5 min

Durch die HE-Färbung wurden Zellkerne blau, Zytoplasma rosa, kollagene Bindegewebsfasern rot, Muskelgewebe rot und Knorpel blau gefärbt. Zur Dokumentation wurden die gefärbten Gewebsschnitte unter einem

Forschungsmikroskop betrachtet, Regionen von Interesse fotografiert und die Bilder als tif-Datei gespeichert.

2.12.9 Erstellen von Kryoschnitten

Bei den präparierten Augen mussten für die Fixierung für Kryoschnitte Cornea und Linse entfernt werden. Die Augen wurden anschließend in einem 4%igen PFA-Puffer für 2 Stunden auf einem Schüttler bei 4°C immersionsfixiert. Die Kryoprotektion erfolgte durch einen Inkubationsschritt in 15%igem Saccharosepuffer sowie einer weiteren Inkubation in einem 30%igen Saccharosepuffer für jeweils 2 Stunden bei 4°C auf einem Schüttler. Nach der Kryoprotektion wurden die Augen in TissueTek Einbettmedium langsam mit Hilfe von Trockeneis aufgefroren. Nachdem das TissueTek vollständig ausgehärtet war, wurden die Proben bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert. Mit Hilfe eines Gefriermikrotoms wurden 10 µm dicke Kryoschnitte hergestellt und auf einen angewärmten Superfrostobjektträger aufgenommen. Durch die positive elektrostatische Ladung des Objektträgers wurde der Gewebsschnitt kovalent gebunden. Die Gewebsschnitte wurden ca. 2 Stunden auf einem 37°C warmen Wärmeblock getrocknet und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Für die Färbung der Zellkerne wurden die Objektträger mit den Gewebsschnitten aufgetaut, 3x 5 min mit PBS gewaschen und für 10 min mit 4',6'-Diamidino-2-Phenylindoledihydrochloride (DAPI) in einer Konzentration von 1:800 gelöst in PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation sowie der anschließende Waschschrift von 3x 5 min wurden in einer lichtdichten Feuchtkammer für Objektträger durchgeführt. Zum Schluss wurden die Gewebsschnitte mit 2 Tropfen *Flourescent Mounting-Medium* (Dako) und einem Deckglas eingedeckt. Zur Dokumentation wurden die gefärbten Gewebsschnitte unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet, Regionen von Interesse fotografiert und die Bilder als tif-Datei gespeichert. Die Montage der Aufnahmen mit unterschiedlichen Filtern erfolgte mit Adobe Photoshop 7.0.

2.12.10 Invasivitätsassay mittels Alu-Sequenz qPCR

Der in diesem Teilabschnitt beschriebene Invasivitätsassay ist ein PCR-basierter *in ovo* Ansatz zum Nachweis von Alu Sequenzen in zur Intravasation befähigten humanen Zellen. Die Methode und die Primer für den Nachweis der Alu Sequenz wurden von Kim et al. 1998 etabliert und von Mira et al. 2002 auf ein SYBR Green

basiertes qPCR Verfahren übertragen (Kim et al., 1998; Mira et al., 2002). Die Primer sind so designt, dass sie innerhalb der Bereiche der humanen Alu Sequenz liegen, die bei einem Großteil der Sequenzen konserviert ist (Kim et al., 1998). Für die Untersuchung der Invasivität von Tumorzellen werden die Zellen auf die verletzte CAM einer *in ovo* Kultur appliziert (siehe Abbildung 16).

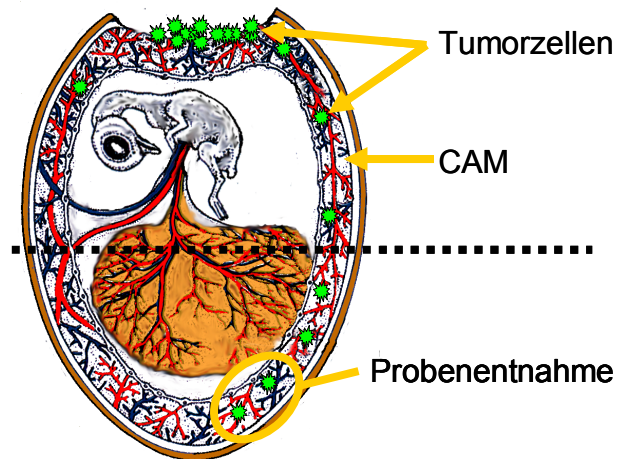


Abbildung 16: Schematische Darstellung eines *in ovo* CAM Tumorzell-Invasivitätsassays für die Alu-qPCR. Die CAM-Entnahme erfolgt am Ende des Versuchs in der unteren Hälfte des Eies. Schwarze Linie teilt Ei in obere und untere Hälfte.

Nach zwei oder mehr Tagen werden Proben der der Inokulationsstelle gegenüber liegenden CAM entnommen, schockgefroren und genomische DNA isoliert, die für die qPCR verwendet wird. In dieser Arbeit sollte das Invasivitätsverhalten der Retinoblastomzelllinien mit dieser Methode untersucht sowie für eine spätere Untersuchung von Retinoblastomen optimiert werden. Im Gegensatz zu den Ursprungspublikationen wurde die im Teilabschnitt beschriebene *in ovo* Kultur sowie die *ex ovo* Kultur verwendet. Bei letzterer Kulturform wurden die Zellen in einen auf der CAM liegenden Plastikring inokuliert. Mit Hilfe des Rings wurden zum einen die Zellen räumlich auf der CAM begrenzt und zum anderen die Stelle der Applikation markiert. Für die Inokulation wurden 20 µl einer Zellsuspension mit einer Konzentration von $3 \cdot 10^6$ Zellen/ml auf eine verletzte CAM eines 10 Tage alten Hühnerembryos pipettiert. Die Verletzung der CAM wurde durch leichtes Kratzen mit der Pipettenspitze auf der CAM hervorgerufen. Nach einer Inkubation von drei Tagen wurden die CAM-Proben entnommen. Für die Probennahme in der *in ovo* Kultur wurde das Ei in der Äquatorebene mit einer Schere aufgeschnitten, die beiden Hälften getrennt und der Embryo durch Dekapitation getötet. Aus der unteren Eierhälfte wurde die CAM von der Eierwand mit Hilfe einer gebogenen

Pinzette gelöst und mittels einer Schere ein Stück CAM abgeschnitten. Das CAM-Stück wurde anschließend mit PBS kurz abgespült, um überschüssiges Eiweiß zu entfernen, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und schockgefroren. Für die Probennahme in der *ex ovo* Kultur wurde ein Bereich gewählt, der von der durch den Plastikring markierten Applikationsstelle der Zellen am weitesten entfernt war. Mit Hilfe einer spitzen Schere wurde ein Stück CAM ausgeschnitten, mit PBS kurz abgespült und in einem 2 ml Reaktionsgefäß schockgefroren. Die DNA-Isolation erfolgte mit Hilfe des *Dneasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen) und nach dem Standardprotokoll für Gewebe des Herstellers. Für die Etablierung der SYBR Green qPCR wurde DNA von Y79 Zellen mittels des DNA-Isolations-Kits nach dessen Standardprotokoll für Zellen isoliert und in verschiedenen Konzentrationen getestet, um die minimal nachweisbare Menge an DNA bzw. Zellen zu bestimmen. Die Sequenz der Primer ist in Tabelle 17 angegeben (Kim et al., 1998; Mira et al., 2002).

Tabelle 17: Angaben zu den verwendeten Primern für die Alu-qPCR

Gen	Primer	Produkt	Annealing Temperatur	Sequenz
Alu (human)	<i>forward</i>	224	68	ACG CCT GTA ATC CCA GCA CTT
<i>most conserved areas</i>	<i>revers</i>			TCG CCC AGG CTG GAG TGC A

Für die Einstellungen des 7300 Real Time PCR Systems wurden die Angaben von Mira et al., 2002 übernommen (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: Verwendetes Programm für die Alu-qPCR auf einem 7300 Real Time PCR System

Schritte	Wiederholungen	Temperatur	Zeit in min
1	1	50.0 °C	02:00
2	1	95.0 °C	10:00
3	30	95.0 °C	00:15
		68.0 °C	01:00
Schmelzkurvenbestimmung		95.0 °C	00:15
		60.0 °C	01:00
		95.0 °C	00:15
		60.0 °C	00:15

3 Ergebnisse

3.1 Qualität der RNA

Wie bereits im Abschnitt Material und Methoden erläutert, wurde für die Versuche RNA von mindestens guter Qualität verwendet. Die Qualitätskontrolle der RNA erfolgte für die Real Time PCR-Versuche überwiegend mittels RNA-Gele. Für die Expressionsanalyse der Mausretina wurde die RNA-Qualität mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers bestimmt.

Die RIN-Werte der mit dem Agilent 2100 Bioanalyser gemessenen 5 Entwicklungsreihen lagen für die embryonalen und postnatalen Stadien zwischen 9 und 10, für die adulten Stadien zwischen 8 und 9. Die RNA wies somit sehr gute Qualität auf und erreichte in einigen Stadien den maximal Wert 10. Tabelle 19 zeigt die RIN-Werte der Entwicklungsreihe, die für die DNA-Mikroarray Experimente verwendet wurde.

Tabelle 19: Angaben zur Konzentration, Menge und *RNA Integrity Number* (RIN-) Werte der für die Expressionsanalyse der Mausretina verwendeten Entwicklungsreihe. E: Embryonaltag, P: Postnataltag, Ad: adultes Stadium.

Stadium	Konzentration in ng/µl	RNA Menge in ng	RIN-Wert
E13	34,9	388,7	10,0
E15	176,3	2291,4	9,9
E17	410,3	5334,0	10,0
P0	392,0	5095,6	9,9
P2	629,6	8185,1	9,9
P5	660,5	8586,8	9,8
P9	679,0	8827,4	9,7
P12	660,3	8583,9	9,6
P15	400,3	5203,4	9,2
P20	427,1	5551,8	9,2
Ad	357,0	4640,4	8,3

3.2 RNA-Qualitätsmessung mittels *affy*

Die beiden Grafiken in Abbildung 17 (siehe Seite 68) zeigen den 5'-3' cRNA-Verlauf der hybridisierten Proben, den die *AffyRNAdeg()* Funktion des *affy* Pakets anhand aller *probe sets* auf dem Chip berechnet hat.

Sowohl die Proben der jeweiligen *GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Arrays* als auch die Proben der *GeneChip® Human Genome U133A Arrays* steigen von 5'

nach 3' in ihren Werten an, was durchgängig für eine gute bis sehr gute RNA-Qualität spricht.

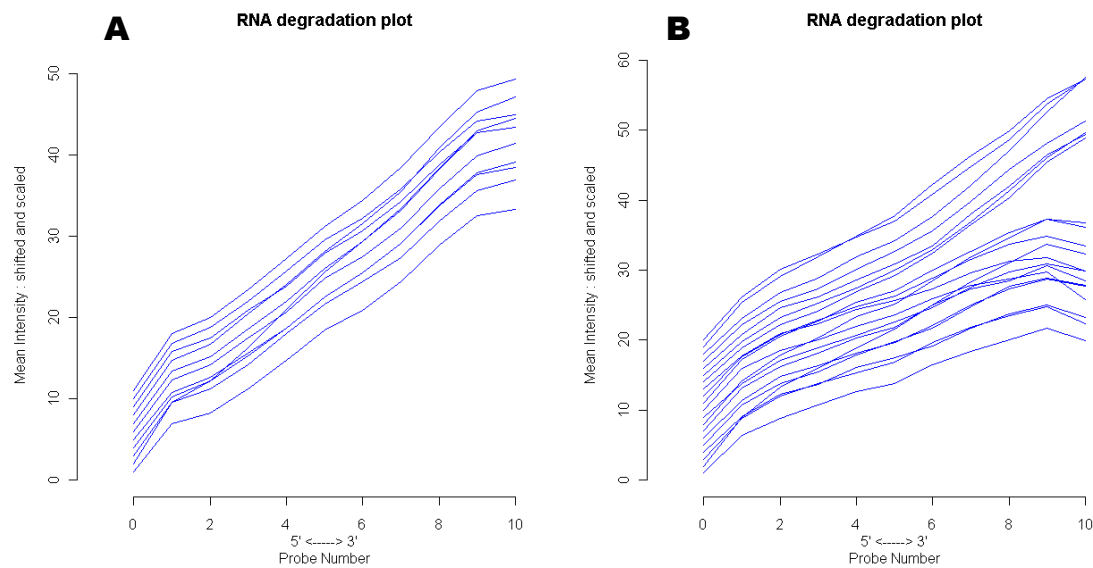


Abbildung 17: RNA-Qualitätsmessung der verwendeten GeneChips mit Hilfe der *AffyRNAdeg()* Funktion aus dem Bioconductor Paket *affy*. A) Messung der 11 *GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Arrays*. B) Messung der 21 *GeneChip® Human Genome U133A Arrays*.

3.3 Eingrenzung des 16q LOH-Bereichs

Als Ausgangspunkt für die vorliegende Dissertation dient die in der Einleitung dargestellte STR-PCR mit 250 Tumoren- und korrespondierenden Blutproben mit 11 STR-Markern (D16S409, D16S3080, D16S3050, D16S3397, D16S3118, D16S3125, D16S3055, D16S422, D16S3048, D16S3023 und D16S3026). Anhand dieser Analyse konnten 62 Tumore mit LOH auf 16q identifiziert werden. 11 dieser Tumore (G393, M143, M7608, M11390, M16607, M18436, M21111, M24230, M28169, M33769 und M33827) zeigten nur partielle LOH-Regionen auf 16q, wodurch sich der Bereich auf zwei Bereiche eingrenzen ließ: i) einen kleinen Bereich von ungefähr 1,3 Mb auf 16q23.1, der 4 Gene beinhaltet und ii) eine LOH-Region mit ca. 5,6 Mb, die sich von 16q23.3 bis 16q24.2 erstreckt und 56 Gene beinhaltet. Die Angaben zu der Anzahl der Gene sind mit Hilfe der Ensembl Version 52 (Ensembl release 52, Dec 2008) bestimmt worden, auf die sich auch alle weiteren Angaben zur Anzahl von Genen sowie Positionsangaben beziehen. Der erste LOH-Bereich liegt zwischen den STR-Markern D16S3118 (74,9 Mb) und D16S3125 (76,2 Mb) und der zweite Bereich wird von den STR-Markern D16S422 (81,5 Mb) und D16S3023 (87,1 Mb) flankiert. Zur weiteren Eingrenzung wurden

alle Proben bis auf G393 mit Hilfe des *GeneChip® Human Mapping 250K Sty Array* analysiert.

3.3.1 Eingrenzung mittels SNP-Array

Die Tumore M11390 und M143 der zehn mit dem *GeneChip® Human Mapping 250K Sty Array* analysierten Tumore konnten nach der Hybridisierung nicht mit ihren korrespondierenden Blut-Proben korreliert werden und ließen somit keine Bestimmung von LOH mittels CNAG 2.0 zu. Zusätzlich erfolgte eine Auswertung jener zwei Tumor-Blut-Proben (M5715 und M24794) mit CNAG, die zur Bestätigung der Eignung der SNP-Array-Analyse mit Hilfe des *GeneChip® Human Mapping 50K Array Xba 240* von Affymetrix analysiert worden sind. Folglich standen 10 Tumore für die Auswertung zur Verfügung. Die Ergebnisse der Analyse mittels CNAG 2.0 sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

Tabelle 20: Ergebnisse der LOH-Analyse mittels CNAG 2.0 sowie Angaben von Anfang, Ende und Größe der einzelnen LOH-Bereiche. minLOH: minimaler bzw. eindeutiger LOH-Bereich, maxLOH: größtmöglicher LOH-Bereich. SNPs des jeweiligen Arrays (Affy ID) sind als Grenzen für die LOH-Bereiche aufgeführt.

Tumor		LOH in bp			Affy ID	
		Anfang	Ende	Größe	Anfang	Ende
M7608	minLOH	49662756	88668978	39006222	SNP_A-2044600	SNP_A-2041659
	maxLOH	49288366	88827254	39538888	SNP_A-4300915	SNP_A-2148965
M33827	minLOH	47114074	88684276	41570202	SNP_A-4292819	SNP_A-2148965
	maxLOH	31629786	88827254	57197468	SNP_A-2306301	SNP_A-2148965
M33769	minLOH	75511788	88633227	13121439	SNP_A-4245893	SNP_A-4296129
	maxLOH	75407839	88827254	13419415	SNP_A-2249558	SNP_A-2148965
M28169	minLOH	45268370	88668978	43400608	SNP_A-1797773	SNP_A-2041659
	maxLOH	34475024	88827254	54352230	SNP_A-2121610	SNP_A-2148965
M24230	minLOH	74174674	88643119	14468445	SNP_A-2068417	SNP_A-2090057
	maxLOH	73648468	88827254	15178786	SNP_A-2271436	SNP_A-2148965
M21111	minLOH	47504768	88145019	40640251	SNP_A-1892016	SNP_A-2094515
	maxLOH	31511273	88827254	57315981	SNP_A-2004667	SNP_A-2148965
M18436	minLOH	0	88827254	88827254		
M16607	minLOH	81459202	87754012	6294810	SNP_A-2280876	SNP_A-2245741
	maxLOH	81391528	88008134	6616606	SNP_A-4295035	SNP_A-4277307
M24794	minLOH	84481566	88368209	3886643	SNP_A-1711514	SNP_A-1753185
	maxLOH	83372285	88827254	5454969	SNP_A-1757972	SNP_A-1753185
M5715	maxLOH	45293764	88827254	43533490	SNP_A-1745037	SNP_A-1753185

Anhand des *display modes* von CNAG können LOH-Bereich durch eine Region mit wenigen oder keinen *hetero call bar* SNP (hcbSNP) und überwiegend *discordant call bar* SNPs (dcbSNP) sowie einem signifikanten Unterschied der beiden Kurven der 'Allel basierten Analyse' mittels *Hidden Markov Model* (HMM) identifiziert werden. Die Bezeichnung minLOH beschreibt einen Bereich mit überwiegend dcbSNP und somit einen eindeutigen LOH-Bereich. Die Bezeichnung maxLOH beschreibt den Bereich zwischen dem proximalen und dem distalen hcbSNP vor bzw. nach einem minLOH-Bereich und somit den größtmöglichen LOH-Bereich. Diese Regionen beinhalten ausschließlich nicht-informative SNPs und stellen demnach einen unsicheren bzw. einen LOH-Bereich, für den keine eindeutigen Daten vorliegen, dar. Eine Besonderheit tritt im Fall der Probe M16607 auf, die in Abbildung 18 dargestellt ist.

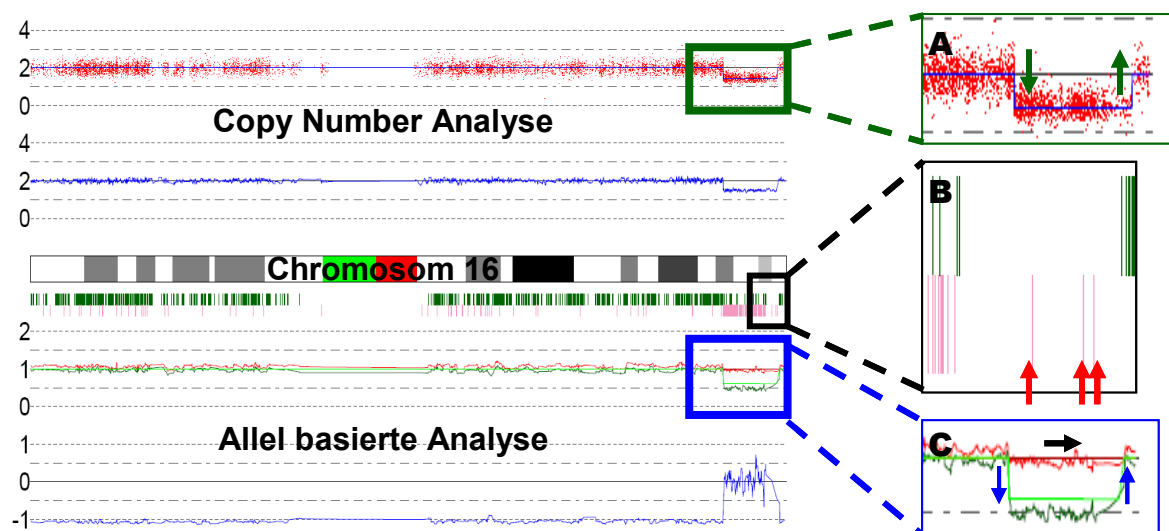


Abbildung 18: Grafische Ausgabe von CNAG im *display mode* am Beispiel von M16607. Zur Verdeutlichung der Analyse relevanter Ausgaben sind diese vergrößert dargestellt. A) Blaue Linie zeigt den HMM-Verlauf der 'Copy Number Analyse' – grüne Pfeile: das Zu- und Abnehmen der Kopienzahl im LOH-Bereich von M16607. B) dcbSNP und hcbSNP im minLOH-Bereich mit niedriger Informationsdichte von M16607 – rote Pfeile: dcbSNPs. C) Grüne bzw. rote Kurve repräsentiert die Anzahl des jeweiligen Allels (A bzw. B) im SNP-Locus innerhalb des LOH-Bereichs von M16607 – blaue Pfeile bzw. schwarzer Pfeil: Verlauf der jeweiligen HMM-Kurve des jeweiligen Allels.

Im Bereich von 86392444 bp bis 87754012 bp sind nur drei dcbSNPs (rote Pfeile) vorhanden. Alle übrigen SNPs sind nicht informativ. Da die 'Allel basierte Analyse' (blaue Box) einen Unterschied in den Allelen (grüne und rote Kurve getrennt) von Tumor und Blutprobe anzeigt und die *Copy Number Analyse* (grüne Box) einen Verlust von genomischem Material (blaue Kurve sinkt von 2 auf ca. 1) der

Tumorprobe registriert, wird dieser Abschnitt als minLOH mit niedriger Informationsdichte bezeichnet (siehe Abbildung 19 auf 72). Die Tumorprobe M18436 weist ein durchgängiges minLOH für Chromosom 16 auf, wohingegen M5715 nur einen großen maxLOH besitzt. Die Informationsdichte ist aufgrund des verwendeten Arrays gering, wodurch keine eindeutige Aussage über ein LOH getroffen werden kann. Eindeutig wird nur ein Verlust von genetischem Material registriert.

3.3.2 Zusammenfassung der LOH-Analysen

Der 1,3 Mb große LOH-Bereich wird durch die Ergebnisse der CNAG-Analyse im Gegensatz zum 5,6 Mb großen Bereich nicht bestätigt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse aus der SNP-Array Analyse, der STR-PCR sowie der STR-PCR, die im Rahmen der Publikation von Gratias et al. 2007 durchgeführt worden sind, stellt die Abbildung 19 (siehe Seite 72) dar. In der Abbildung wird der Bereich gezeigt, der mit Hilfe beider LOH-Analyseverfahren eingegrenzt werden konnte. Die Materialnummern der untersuchten Tumore stehen oben, wobei von rechts nach links zunächst die Tumore aufgelisteten sind, mit denen die SNP- und STR-Analyse durchgeführt wurden. Links davon stehen die Proben, die in Gratias et al. 2007 verwendet wurden. Die farbigen Kästchen geben sowohl die ungefähre Position des jeweiligen Locus des STR-Markers als auch deren genomischen Zustand an (z. B. rot = LOH, siehe STR-PCR Legende). Die farbigen Balken repräsentieren die Ergebnisse der LOH-Analyse mittels CNAG. Ein minLOH-Bereich wird sowohl durch eine rote als auch orange, ein maxLOH-Bereich durch eine grüne und die minLOH-Region mit niedrigem Informationsgehalt durch eine orange Färbung des Balkens angezeigt (siehe SNP-Array Legende). Anhand der Abbildung wird deutlich, dass die STR-PCR Analyse nicht so exakt wie eine hochauflösende SNP-Array Analyse ist. Ein einzelner STR-Marker kann ebenfalls informativ oder nicht informativ, wie ein SNP, sein. Er ist aber der einzige Marker in einem Bereich, in dem bei der SNP-Analyse mehrere SNPs liegen. Detektiert der STR-Marker in einem LOH-Bereich kein LOH aufgrund von z. B. Retention in diesem Locus, so wirkt sich dies auf die Beurteilung bis zum nächsten Marker aus. Bei der Verwendung von SNPs stehen mehrere Marker zur Verfügung, so dass eine Falschaussage eines oder weniger SNPs nicht die Gesamtbeurteilung des Bereichs beeinträchtigt (siehe z. B.: Tumor M21111 in Loci D16S3023 und D16S3026). Aus diesem Grund fließen die Ergebnisse der STR-PCR mit einer

geringeren Gewichtung in die Definition des LOH-Bereichs ein als die Ergebnisse der SNP-Array Analyse.

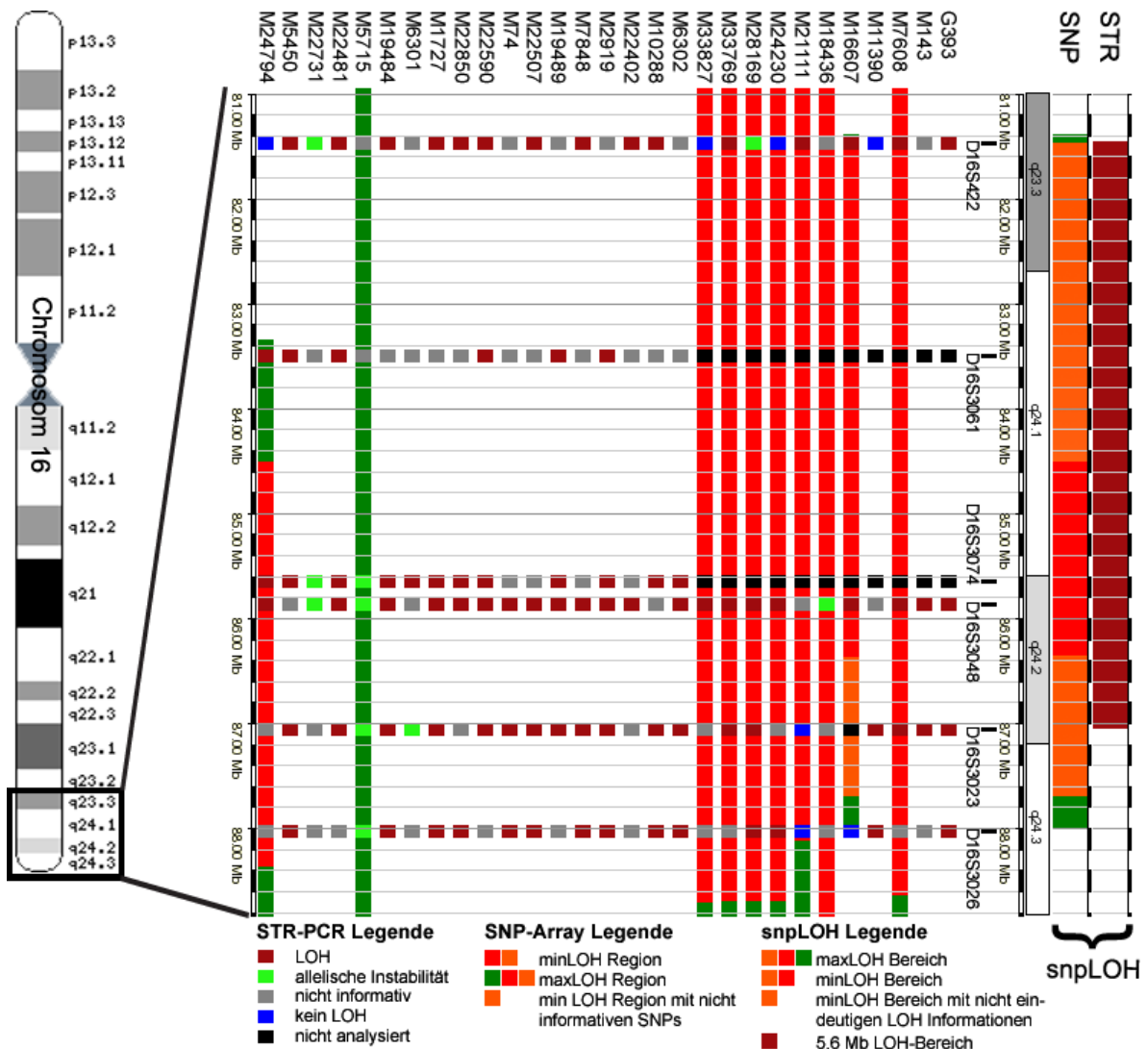


Abbildung 19: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den STR-PCR Analysen sowie den Untersuchungen des SNP-Arrays. Die farbigen Kästchen stellen den genomischen Zustand (siehe STR-PCR Legende) des jeweiligen Locus dar. Die farbigen Balken repräsentieren die Ergebnisse der LOH-Analyse mittels CNAG (siehe SNP-Array Legende). snpLOH: durch die LOH-Analyse eingegrenzte LOH-Region (siehe snpLOH Legende).

Ebenfalls erhalten die Ergebnisse der beiden Tumore M5715 und M24794 für die Beurteilung des LOH-Bereichs eine geringere Gewichtung als die Tumore die mit dem höher auflösenden *GeneChip® Human Mapping 250K Sty Array* analysiert worden sind. Auf Grundlage des unterschiedlichen Einflusses der LOH-Untersuchungsergebnisse ergibt sich folgende Einteilung des identifizierten LOH-Bereichs (siehe Abbildung 19, linker der beiden auf der rechten Seite dargestellten Balken (SNP)):

- proximaler maxLOH-Bereich von 81391528 – 81459202

-
- minLOH von 81459202 bp – 87754012 bp mit geringem Informationsgehalt
 - o proximal: 81459202 bp – 84481566 bp
 - o distal: 86392444 bp – 87754012 bp
 - distaler maxLOH-Bereich von 87754012 bp – 88008134 bp

Er entspricht somit der maxLOH-Region des Tumors M16607. Für die proximale Grenze wurde nicht die Grenze der maxLOH-Region des Tumors M24794 verwendet, da dieser mit dem nicht so hochauflösenden *GeneChip® Human Mapping 50K Array Xba 240* analysiert worden war. Der Einfluss dieses Tumors äußert sich jedoch durch proximalen minLOH-Bereich mit geringem Informationsgehalt. Der eingegrenzte Bereich ist ca. 6,6 Mb groß und somit ca. 1 Mb größer als der 5,6 Mb große LOH-Bereich, der mit Hilfe der STR-PCR ermittelt wurde. Da eine zu kleine Wahl des LOH-Bereichs ohne gesicherte Informationen einen Ausschluss eines Kandidatengens bedeuten könnte, ist der 6,6 Mb große Bereich nicht weiter einzugrenzen. Dieser LOH-Bereich wird aufgrund der eindeutigen Beschreibung im folgenden Verlauf dieser Arbeit mit snpLOH-Region bzw. Bereich bezeichnet.

Das Ergebnis dieses Abschnittes ist, dass

- der 1,3 Mb großer LOH-Bereich der STR-Analyse ausgeschlossen werden konnte,
- der 5,6 Mb große LOH-Bereich bestätigt wurde,
- dieser jedoch durch die SNP-Array-Analyse um ca. eine 1 Mb auf die sogenannte snpLOH-Region erhöhte werden musste.

Eine Abfrage bei *Ensembl (Version 52)* mit Hilfe des *BioMart*s ergab, dass innerhalb dieser Region 86 Gene lokalisiert sind.

3.3.3 Erweitertes Screening asservierter Retinoblastom-DNAs zur Eingrenzung der snpLOH-Region auf 16q

Anhand der Resultate der zuvor durchgeführten STR-PCR Untersuchungsserien, sowie unter Einbeziehung der Ergebnisse der Array-basierten Analysen, wurden fünf neue STR-Marker innerhalb der snpLOH-Region auf Chromosom 16q bestimmt: D16S3098, D16S2641, D16S3061, D16S486 und D16S3074. Mit Hilfe dieser Marker wurden die 188 Tumore gescreent, die in der ersten Analyserunde, die den Ausgangspunkt dieser Arbeit darstellt, keine Loci mit LOH aufwiesen. In allen 188 Tumoren konnte wiederum kein LOH nachgewiesen werden.

3.3.4 Multiple CNAG basierte SNP Analyse zur Identifikation von regional übereinstimmendem partiellem LOH in mehreren Tumoren

Da das erweiterte Screening keine weitere Eingrenzung ergab und die Anzahl der möglichen Kandidatengene innerhalb der snpLOH-Region für eine Analyse mittels qPCR bzw. *in vitro* Zellkulturuntersuchungen zu groß war, wurde mit Hilfe eines auf der Skriptsprache AWK und der Linux-Shell basierten, selbst entwickelten Programms (*scanprogramm_2008-01-14.sh*, Funktion siehe Material und Methoden oder Grafik im Anhang) eine multiple SNP-Analyse durchgeführt. Die Fenstergröße betrug in diesem Ansatz 10 Kb bzw. ± 5000 bp vom jeweils ausgehenden SNP.

Tabelle 21: Ergebnisse der multiplen SNP-Analyse für 8 von 8 und 7 von 8 Tumoren

x von 8 Tumoren	Chromosom	proximale Position in bp	distale Position in bp	Größe in bp	Gen
8	16	81837592	81840912 81846617	3320 9025	CDH13
8	16	82133620	82142657	9037	CDH13
7	13	41915369	41916177	808	
7	13	84273631	84274770	1139	
7	16	78297750	78303107	5357	
7	16	81540502	81545373	4871	CDH13
7	16	81837592	81848061	10469	CDH13
7	16	81979162	81986485	7323	CDH13
7	16	82133620	82142657	9037	CDH13
7	16	82171973	82178594	6621	CDH13
7	16	83228488	83233723	5235	
7	16	83300379	83308096	7717	USP10
7	16	83475793	83476363	570	CRISPLD2
7	16	84943714	84949893	6179	
7	16	85620875	85626887	6012	

In 8 von 8 Tumoren konnten zwei LOH-Fenster im gesamten Genom bestimmt werden. Beide LOH-Fenster liegen auf Chromosom 16q im kodierenden Bereich von Cadherin 13 (human: CDH13, murin: Cdh13) In 7 von 8 Tumoren konnten insgesamt 13 LOH-Fenster im Genom gefunden werden. Zwei der LOH-Fenster liegen auf Chromosom 13 in Abschnitten, in denen kein Gen kodiert ist. Die restlichen 11 LOH-Fenster liegen auf Chromosom 16q, 5 von ihnen liegen im kodierenden Bereich von Cdh13. Jeweils ein LOH-Fenster liegt im kodierenden

Bereich von USP10 (Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10) und CRISPLD2 (cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2). Vier der Fenster liegen in Bereichen, in denen kein bekanntes Gen vorhanden ist (siehe Tabelle 21 auf Seite 74, Lage der Gene basieren auf „Ensembl release 52 - Dec 2008“). Bei 6 von 8 Tumoren konnten 55 LOH-Fenster gefunden werden: 17 auf Chromosom 13 und 38 auf Chromosom 16q. Keiner der 17 LOH-Fenster auf Chromosom 13 liegt im Genbereich von RB1. Wie in Tabelle 21 (siehe Seite 74) zu sehen, weist bei einem Vergleich von 8 Tumoren untereinander das proximal gelegene partiale LOH im Gegensatz zum distal gelegenen partialen LOH einen maximalen und minimalen Wert für die Ausdehnung des LOHs auf. Der minimale Wert der Größe des LOHs gibt den Wert an, mit dem eine Suche nach partialen LOH im gesamten Genom erfolgreich wäre. Das durch den Vergleich von 8 Tumoren identifizierte proximal gelegene LOH-Fenster deckt den Bereich von 81837592 bp bis 81846617 bp ab, das distale LOH-Fenster von 82133620 bp bis 82142657 bp. Beide Fenster liegen in jeweils einem Intron von CDH13 und schließen zwei Exons und ein weiteres Intron ein, in dem eine vorhergesagte nicht kodierende RNA (AC009142.13, ENSG00000222299) innerhalb der Region von 81991649 bp bis 81991721 bp liegt.

Zur Kontrolle, dass mit der gewählten Fenstergröße von 10000 bp kein partiales nicht-LOH bzw. partialer Bereich mit Heterozygotie detektiert wird, wurde dasselbe Programm durch Austausch des Wertes für die Abfrage nach einem dcbSNP durch den Wert für einen hcbSNP befähigt, statt nach dcbSNP nach hcbSNPs zu suchen. Selbst bei einer Fenstergröße von 200000 bp wurde kein in allen 8 Tumoren vorkommender partialer Bereich mit Heterozygotie im snpLOH gefunden.

3.3.5 Signifikant regulierte Gene in der Mausretinaentwicklung

Die Expressionsanalyse der Mausretinaentwicklung mit Hilfe von *GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Arrays* erfolgte in erster Linie zur Eingrenzung der möglichen Kandidatengene und wurde parallel zur SNP-Array-Analyse durchgeführt. Für die Bestimmung von signifikant regulierten Genen wurde der in GCOS eingebundene *Comparison* Algorithmus verwendet. Als Kontrollarray diente der Chip mit dem adulten Stadium, da jenes Entwicklungsstadium sowohl den Endpunkt der Retinaentwicklung als auch den Endpunkt der Entwicklung der Maus darstellt.

Die *Comparison* Analyse ergab, dass 23319 von 45101 *probe sets* bzw. Transkripte von Genen in der Mausretinaentwicklung signifikant reguliert sind. Über die Hälfte der auf dem *GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array* vertretenen *probe sets* sind signifikant reguliert. *Cdh13* ist eins dieser signifikant regulierten Gene.

3.3.6 Eingrenzung der Kandidatengene mit Hilfe der signifikant regulierten Gene in der Mausretinaentwicklung

Durch einen Vergleich der 86 möglichen Kandidatengene in der snpLOH-Region mit den 23319 signifikant regulierten orthologen Genen der Mausretinaentwicklung unter Verwendung des *Ensembl BioMarts* (Ensembl release 52, Dec 2008) sowie *AWK* und *Shell* basierter Skripte erfolgte eine Eingrenzung der möglichen Kandidatengene.

Innerhalb der snpLOH liegen 35 Gene, deren orthologes Ebenbild während der Mausretinaentwicklung eine signifikante Regulation zeigte. Diese 35 Gene waren mit 50 *probe sets* auf dem *GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array* vertreten.

3.3.7 Eingrenzung der signifikant regulierten orthologen Gene in der snpLOH-Region

Zur Bestimmung der signifikant regulierten Gene innerhalb der snpLOH-Region in Retinoblastomen mit und ohne 16q LOH wurde der *Mann-Whitney-U-Test* für die mittels der Expressionsanalyse der Mausretinaentwicklung eingegrenzten 35 möglichen Kandidatengene verwendet. Tabelle 22 (siehe Seite 77) zeigt alle Gene sowie deren Transkripte, die eine signifikante Regulation bei dem Vergleich von Retinoblastomen mit und ohne 16q LOH aufweisen. Neben dem Gennamen und der Startposition des Gens auf dem Chromosom 16 sowie dem p-Wert für die Wahrscheinlichkeit eines Unterschiedes sind in der Tabelle 22 (siehe Seite 77) Angaben über das jeweilige signifikant regulierte Transkript in Form i) der *probe sets* Kennung des *GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Arrays* (Affy HG-U133A Kennung), ii) des jeweiligen relativen Expressionswertes (*signal value*) der humanen Retina Probe (Retina) und iii) des Medians der Expressionswerte des jeweiligen Gens, der mittels *affy* nach der MAS5 Analyse berechneten wurde, für die Tumore mit und ohne 16q LOH sowie iv) einer Einschätzung der drei zuletzt genannten Werte durch Größer-kleiner-Zeichen bezogen auf den jeweiligen Median des Expressionswertes der Tumorproben mit LOH aufgezeigt.

Tabelle 22: Gene mit signifikanter Regulation bei Retinoblastomen mit und ohne 16q LOH

Gen	Startposition in bp	Affy HG-U133A Kennung	Retina***	LOH Median*	kein LOH Median*	p-Wert**
HSBP1	82399094	200942_s_at	2760,22 >	2753,83 <	3898,39	0,0373
MBTPS1	82644872	217543_s_at	465,45 >	475,01 <	646,51	0,0183
	82644872	201620_at	1450,54 >	863,46 <	1577,62	0,0036
KIAA1609	83068608	65438_at	57,72 >	53,10 <	96,53	0,0014
USP10	83291050	209136_s_at	460,10 <	517,82 <	678,77	0,0466
	83291050	209137_s_at	739,52 <	865,46 <	1106,94	0,0183
ZDHHC7	83565573	218606_at	1345,21 >	638,03 <	1079,92	0,0026
KIAA0513	83618911	204546_at	420,87 >	279,82 <	415,67	0,0109
KIAA0182	84202524	212057_at	679,47 <	1518,46 <	2752,79	0,0373
COX4NB	84369737	218057_x_at	550,84 >	472,06 <	745,68	0,0048
COX4I1	84390697	200086_s_at	3142,78 >	1117,58 <	1859,01	0,0048
	84390697	202698_x_at	7149,13 >	3604,25 <	5422,98	0,0036
MTHFSD	85121284	218879_s_at	160,95 <	164,77 <	208,61	0,0234
ZCCHC14	85997378	215427_s_at	14,82 <	15,70 <	27,17	0,0142
SLC7A5	86421131	201195_s_at	1358,57 >	390,79 <	598,01	0,0234
BANP	86542539	219966_x_at	402,97 <	564,90 <	881,83	0,0183
TRAPPC2L	87451007	218354_at	651,33 >	404,00 <	625,23	0,0048
CBFA2T3	87468768	208056_s_at	155,97 <	168,95 <	252,16	0,0084

* der Median wurde aus den mit *affy* (MAS5) erzeugten relativen Expressionswerten berechnet

** Gaußglocken Approximation (*gaussian approximation*)

*** mit *affy* (MAS5) berechneter relativer Expressionswert (*signal value*)

Drei Gene (MBTPS1, USP10 und COX4I1) sind mit zwei *probe sets* vertreten. 5 Gene (USP10, KIAA0182, ZCCHC14, BANP und CBFA2T3) weisen einen höheren Medianwert auf als der Expressionswert der Retinaprobe (rote Größer-kleiner-Zeichen). Alle Medianwerte der Tumore mit 16q LOH sind niedriger als die Medianwerte der Tumore ohne LOH. Die möglichen Kandidatengene haben sich von 35 auf 15 Gene reduziert, allerdings müssen noch solche Gene hinzugezählt werden, die i) in der Maus reguliert sind, aber nicht auf dem humanen Array vertreten sind bzw. mehrere Gene detektieren (7 Gene: CDH13, HSDL1, KCNG4, C16orf74, MA1LC3B, ZC3H18 und C16orf84), sowie ii) die deren Expression mit keinem der beiden Arraytypen gemessen wird (4 Gene: SLC38A8, ATP2C2,

FAM92B und IL17C). Tabelle 23 listet alle 26 möglichen Kandidaten mit Bezeichnung, Startposition in 16q und vollständigen Gennamen auf.

Tabelle 23: Liste der möglichen Kandidatengenen in der snpLOH-Region

Gen	Startposition in bp	vollständiger Genname
CDH13*	81439761	Cadherin 13
HSBP1	82399094	Heat shock factor-binding protein 1
SLC38A8**	82600890	Putative sodium-coupled neutral amino acid transporter 8
MBTPS1	82644872	Membrane-bound transcription factor site-1 protease
HSDL1*	82713389	Hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 1
KCNKG4*	82813324	Potassium voltage-gated channel subfamily G member 4
ATP2C2**	82959634	Calcium-transporting ATPase type 2C member 2
KIAA1609	83068608	TLD domain-containing protein KIAA1609
<i>USP10***</i>	83291050	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10
ZDHC7	83565573	Zinc finger DHHC domain-containing protein 7
KIAA0513	83618911	Uncharacterized protein KIAA0513
FAM92B**	83689466	Protein FAM92B
<i>KIAA0182***</i>	84202524	Genetic suppressor element 1
C16orf74*	84298624	Uncharacterized protein C16orf74
COX4NB	84369737	Neighbor of COX4
COX4I1	84390697	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1
<i>MTHFSD***</i>	85121284	Methenyltetrahydrofolate synthetase domain-containing protein
MA1LC3B*	85983320	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B
<i>ZCCHC14***</i>	85997378	Zinc finger CCHC domain-containing protein 14
SLC7A5	86421131	Large neutral amino acids transporter small subunit 1
<i>BANP***</i>	86542539	Btg3-associated nuclear protein
ZC3H18*	87164343	Zinc finger CCCH domain-containing protein 18
IL17C**	87232502	Interleukin-17C Precursor
C16orf84*	87300392	UPF0432 protein C16orf8
TRAPPC2L	87451007	Trafficking protein particle complex subunit 2-like protein
<i>CBFA2T3***</i>	87468768	Myeloid translocation gene on chromosome 16 protein

* *probe set* des Affy HG-U133A detektiert mehr als ein Gen (Ensembl 52- release Dec 2008)

** weder auf Affy Mouse 430 2.0 noch auf HG-U133A durch ein *probe set* vertreten

*** Median der relativen Expression höher als die relative Expression der Retina Probe

3.4 Kontrolle der Expressionsanalyse mittels qPCR

Bei der Analyse von Mikroarrayexpressionsdaten besteht die Gefahr, dass es bei einem gewissen niedrigen Prozentsatz, je nach verwendetem Algorithmus und Art der Daten, zu sogenannten falsch positiv bzw. falsch negativen Ergebnissen

kommt. Ein falsch positives Ergebnis wäre in diesem Fall ein mögliches Kandidatengen, das nicht signifikant reguliert wäre, wohingegen ein falsch negatives Ergebnis ein Gen wäre, das signifikant reguliert ist, aber nicht als solches erkannt wird. Falsch positive Ergebnisse können mit Hilfe von Expressionsanalysen mittels qPCR ausgeschlossen werden, da diese Methode sensitiver als die Expressionsanalyse mittels DNA-Mikroarray ist. Da keine Proben für die untersuchten Retinoblastome existierten, konnten die Kandidatengene nur mit Hilfe der Mausretinaentwicklungsstadien überprüft werden. Hierfür wurden die 7 Gene, die in Tabelle 24 mit der jeweiligen Funktion bzw. *Gene Ontology* (GO) Eintrag gelistet sind, unter verschiedenen Gesichtspunkten ausgewählt: i) Publikationen mit Verweis auf eine Rolle in der Tumorentstehung oder Progression (CDH13, COX4NB oder COX4I1), ii) hohe Expression in anderen Tumoren (dient als Biomarker), aber im Vergleich zur humanen Retinaprobe sowohl niedrige Expression in Tumoren mit als auch ohne LOH (SLC7A5) und iii) unbekannte Funktion und niedriger p-Wert sowie eine starke Hochregulation nach der Differenzierungsphase der Retina (KIAA1607, ZDHHC7 und KIAA0513).

Tabelle 24: Mittels qPCR untersuchte Gene

Gen	Funktion / the Gene Ontology (GO) Eintrag
CDH13	Regulation von Proliferation, Zell Adhäsion, Migration, Endozytose, Chemotaxis
KIAA1609	bindet Proteine
ZDHHC7	bindet Proteine
KIAA0513	lokalisiert in Kern und Plasmamembran, angereichert im Gehirn
COX4NB	lokalisiert in Kern und Zytoplasma sowie Mitochondrien
COX4I1	Cytochrome-C Oxidase Aktivität, Generierung von Energie und Metabolitenvorläufer
SLC7A5	Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems

Zur besseren Darstellung der Ergebnisse in Tabellenform sind die Angaben der 95%-Konfidenzintervalle zur Bildung der Fehlerbalken innerhalb der Abbildung nicht mit aufgeführt, da der signifikante Unterschied beim Vergleich zweier Stadien mit Hilfe der Fehlerbalken ablesbar ist.

3.4.1 Cdh13

Cadherine sind eine Gruppe paraloger Gene, die für Zell-Zell-Adhäsionsproteine kodieren. Cadherin 13 (human: CDH13) wurde schon vor der endgültigen Eingrenzung der möglichen Kandidatengene mittels qPCR untersucht, da i) es innerhalb der snpLOH-Region liegt, ii) ein vermehrtes bzw. bei 8 von 8 Tumoren ein alleiniges Auftreten von partialem LOH innerhalb der kodierenden Sequenz

aufwies und es iii) das einzige Cadherin des auf dem Chromosom 16q lokalisierten Cadherin-Clusters ist. Abbildung 20 (siehe Seite 81) zeigt die relativen Expressionswerte der qPCR und Abbildung 21 (siehe Seite 81) die relativen Expressionswerte der Mikroarrayanalyse. Eine Auflistung der relativen Expressionswerte für beide Methoden ist in Tabelle 25 aufgeführt.

Tabelle 25: Relative Expressionswerte der Mikroarrayanalyse (*probe sets*) und der qPCR für Cdh13 (Gehirnprobe (n=3): 11,9 und Herzprobe (n=5): 29,4) sowie die Ergebnisse der *Comparison* Analyse für die signifikant regulierten *probe sets*. Rote Werte sind maximale Expressionspeaks. Grüne Werte markieren weitere Expressionspeaks. Blaue Werte bzw. unterstrichene Werte sind nicht signifikant innerhalb von je zwei Stadien (siehe Text). E: Embryonaltag, P: Postnataltag, Ad: adultes Stadium.

<i>probe set</i> / qPCR	E13	E15	E17	P0	P2	P5	P9	P12	P15	P20	Ad
1423551_at <i>signal log ratio</i>	154,0	357,4	460,1	550,4 1,57	413,8 1,08	527,9 1,82	731,1 1,53	575,3 1,56	486,5 1,35	310,8 0,93	171,3
1454015_a_at	39,0	110,3	56,0	174,0	161,4	234,7	109,9	177,1	100,4	44,2	76,0
1434115_at <i>signal log ratio</i>	342,8	505,6	720,2	896,3 0,92	742,5 0,75	971,7 1,29	947,2 1,11	811,2 1,06	911,9 1,22	681,8 0,73	387,5
1431824_at	5,0	1,7	3,3	5,7	2,0	3,4	2,6	3,8	43,1	2,1	4,3
qPCR	0,63	2,03	2,23	<u>4,74</u>	<u>4,24</u>	5,91	3,70	3,10	2,25	2,12	1,00

Zusätzlich sind in dieser Tabelle die *signal log ratios* der Entwicklungsstadien für die jeweiligen Transkripte aufgeführt, die bei einem Abgleich aller Entwicklungsstadien gegen das adulte Stadium mittels des *Comparison* Algorithmus als signifikant reguliert klassifiziert wurden. Stadien, die nicht signifikant reguliert waren, sind in der Tabelle durch ein leeres Feld dargestellt. Eine positive *signal log ratio* weist eine Hochregulation, eine negative auf eine Runterregulation hin. Dieser Aufbau wird im Folgenden für die Darlegung der Ergebnisse der mittels qPCR analysierten Gene verwendet. Die relativen Expressionswerte der Mikroarrayanalyse sind aus Gründen der Darstellung in einer Tabelle nur mit einer Nachkommastelle aufgeführt. Die *signal log ratio* Werte und die Ergebnisse der qPCR sind mit zwei Nachkommastellen dargestellt, da diese Werte in den meisten Fällen nur eine Stelle vor dem Komma haben. In Abbildung 21 (siehe Seite 81) sind neben den relativen Expressionswerten der Entwicklungsstadien auch die Expressionswerte für Herz (Positivkontrolle) und Gehirn, die ebenfalls eine Positivkontrolle darstellt, aufgeführt.

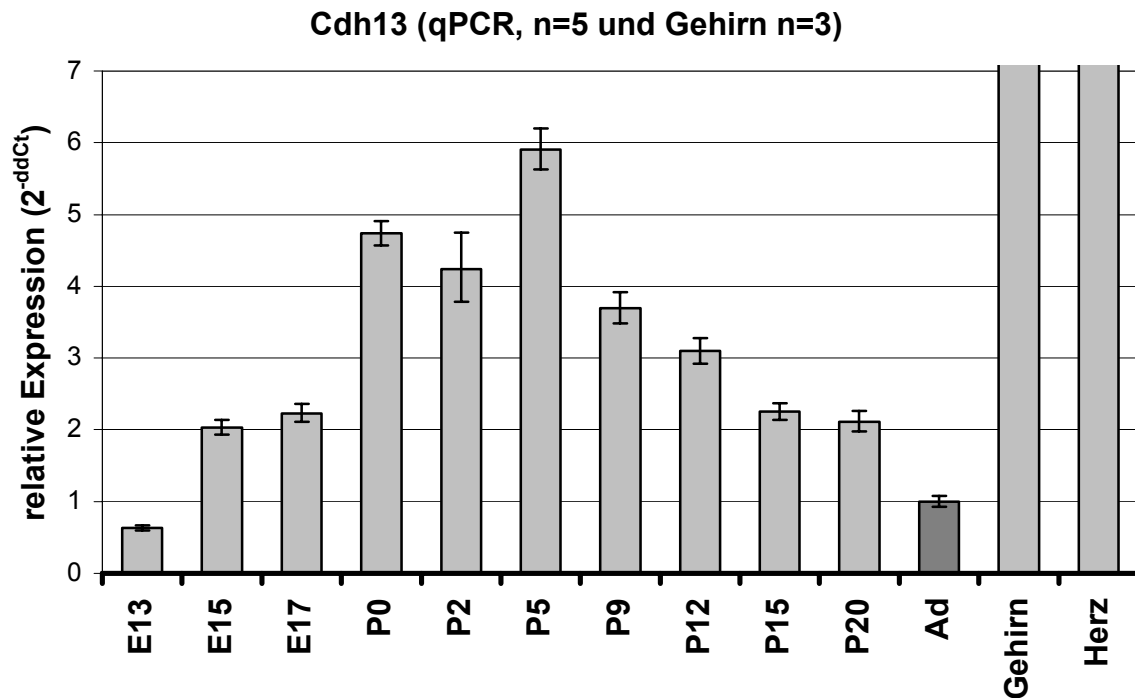


Abbildung 20: Zeitlicher Verlauf der relativen Expressionswerte (qPCR) von Cadherin 13 während der Retinaentwicklung der Maus sowie der relativen Expressionswerte von adultem Mausgehirn und Mausherz (Positivkontrollen). E: Embryonaltag, P: Postnaltag, Ad: adultes Stadium.

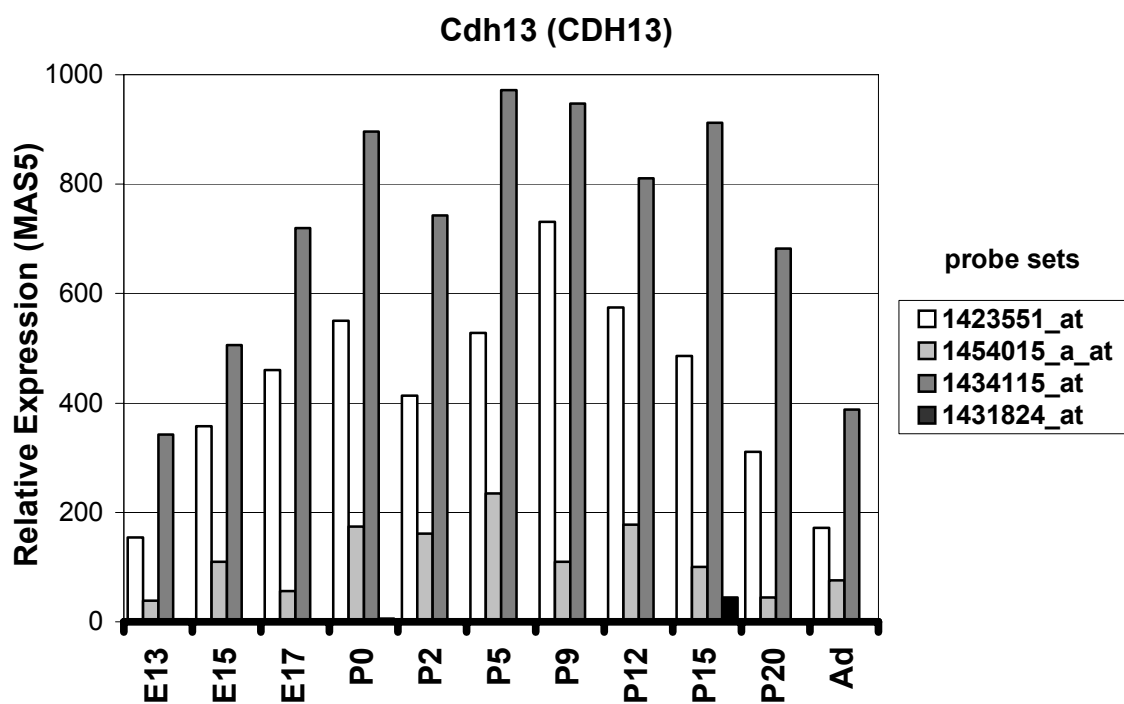


Abbildung 21: Zeitreihenanalyse der Expression von Cadherin 13 während der Mausretinaentwicklung mittels Mikroarray. Auf dem Mikroarray wird die Expression von Cdh13 mit Hilfe von vier *probe sets* bestimmt. E: Embryonaltag, P: Postnaltag, Ad: adultes Stadium.

Die Balken für diese beiden Expressionswerte sind zur besseren Darstellung der jeweiligen Balken der Entwicklungsstadien nicht komplett gezeigt. Der Wert für die Herzprobe beträgt 39,4 und der Wert der Gehirnprobe 11,9. Als Kalibrator zur Berechnung der relativen Expressionswerte wurde das adulte Stadium verwendet. P5 weist den höchsten Wert mit 5,9 auf. Ein zweiter Peak ist ebenfalls bei P0 verzeichnet (4,7). Der P2 Wert ist nicht signifikant unterschiedlich (Balken 95%-Konfidenzintervalls) von P0. Ab E13 steigen die Werte bis P5 an und fallen bis zum adulten Stadium wieder ab. Die Werte von i) E15 und E17, ii) P0 und P2 sowie iii) P15 und P20 sind nicht signifikant unterschiedlich zueinander. Vier Transkripte bzw. *probe sets* von *Cdh13* wurden mit dem *GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array* gemessen (siehe Abbildung 21 auf Seite 81). Von den 4 *probe sets* wurden nur 1423551_at und 1434115_at von der *Comparison Analyse* als signifikant reguliert klassifiziert. Diese beiden Transkripte weisen die höchsten Werte im Vergleich zu den beiden anderen Transkripten auf. Das *probe set* 1431824_at (schwarzer Balken Abbildung 21 auf Seite 81) besitzt im Verhältnis zu den übrigen Expressionswerten einen hohen Peak bei P15 (43,1). *Probe set* 1434115_at (dunkelgraue Balken in Abbildung 21 auf Seite 81) steigt von E13 bis P0 an, fällt bei P2 ca. auf den Wert von E17 und weist bei P5 sein Maximum auf (971,7). Von P5 fällt der Wert über P9 bis zum Stadium P12, steigt bei P15 ca. auf den Wert von P0 an und fällt bis zum adulten Stadium wieder ab. Beim Transkript 1423551_at (weiße Balken in Abbildung 21 auf Seite 81) steigt der relative Expressionswert von E13 bis P0 an, fällt bei P2 und steigt über P5 bis P9 an (731,1). Von P9 fällt der Expressionswert über die Stadien P12, P15, P20 ab. Das *probe set* 1454015_at (hellgraue Balken in Abbildung 21 auf Seite 81) hat einen Peak bei E15, P0, P5 und P12, wobei P5 den höchsten Wert aufweist (234,7).

Ein Vergleich des zeitlichen Verlaufs der Mittelwerte der qPCR Analyse (siehe Abbildung 20 auf Seite 81) mit dem jeweiligen zeitlichen Verlauf der *probe sets* bzw. Transkripte der Mikroarrayanalyse (siehe Abbildung 21 auf Seite 81) zeigt in keinem Fall eine genaue Übereinstimmung. Jedoch entsprechen die jeweiligen Verläufe der Mikroarrayexpressionswerte der jeweiligen Transkripte (ausgenommen 1431824_at) dem Verlauf der qPCR dahin gehend, dass die Werte von E13 bis P5 bzw. P9 ansteigen und von P9 bis zum adulten Stadium abfallen. Die Expression zeigt mit beiden Methoden sowohl in allen Transkripten als auch in der qPCR einen Peak bei P0. Die *signal log ratio* Werte der beiden

Transkripte 1423551_at und 1434115_at weisen bei P5 ihr Maximum und bei P0 einen weiteren Peak auf. Dies entspricht den Ergebnissen der qPCR. Zusätzlich besitzt 1434115_at bei P15 sowohl bei den *signal log ratio* Werten als auch bei den relativen Expressionswerten einen Peak. Das Ergebnis der *Comparison* Analyse findet einen signifikanten Unterschied zwischen den postnatalen Stadien und dem adulten Stadium, allerdings erkennt es keinen Unterschied zwischen den embryonalen Entwicklungsstadien und Ad. Die qPCR Ergebnisse zeigen für die embryonalen Stadien eine signifikante Regulation bezogen auf das adulte Stadium auf. Anhand von Abbildung 21 (siehe Seite 81) ist nicht zu erkennen, weshalb die embryonalen Stadien nicht ebenfalls signifikant reguliert sind. Die embryonalen Expressionswerte entsprechen bei einem visuellen Vergleich mit Hilfe von Abbildung 21 (siehe Seite 81) den postnatalen Stadien, die nach der *Comparison* Analyse als signifikant reguliert bezogen auf das adulte Stadium gelten. Somit kann der Faktor bei der *Comparison* Analyse, der die embryonalen Stadien als nicht signifikant reguliert klassifiziert, mit der sensitiveren Expressionsanalysemethode mittels qPCR als falsch negatives Ergebnis identifiziert werden.

Das Ergebnis der Expressionsanalyse für Cdh13 lässt sich dahin gehend zusammenfassen, dass der Verlauf der in Abbildung 21 (siehe Seite 81) dargestellten relativen Expressionswerte zusammengenommen dem Verlauf der Werte der qPCR (siehe Abbildung 20 auf Seite 81) visuell entspricht.

3.4.2 6430548M08Rik (human: KIAA0513)

Die Bezeichnung des humanen Gens KIAA0513 lautet für orthologe Gene der Maus 6430548M08Rik. Die Ergebnisse der qPCR sind in Abbildung 22 (siehe Seite 84) und die Ergebnisse der Mikroarrayanalyse in Abbildung 23 (siehe Seite 84) dargestellt. In Tabelle 26 (siehe Seite 85) sind die relativen Expressionswerte für beide Methoden aufgelistet. Für die qPCR wurde das adulte Stadium als Kalibrator und Gehirnproben als Positivkontrolle verwendet. Der Expressionswert steigt von E13 bis P20 an und fällt im adulten Stadium bezogen auf P20 signifikant ab. Der Anstieg der Expressionswerte der Stadien P9, P12 und P15 unterscheidet sich nicht signifikant voneinander. Auf dem murinen GeneChip werden 4 Transkripte von 6430548M08Rik analysiert, die nach dem *Comparison* Algorithmus alle signifikant reguliert sind. Von E13 bis P12 steigt die Expression in dem *probe set* 1426446_at an und fällt beim adulten Stadium minimal ab.

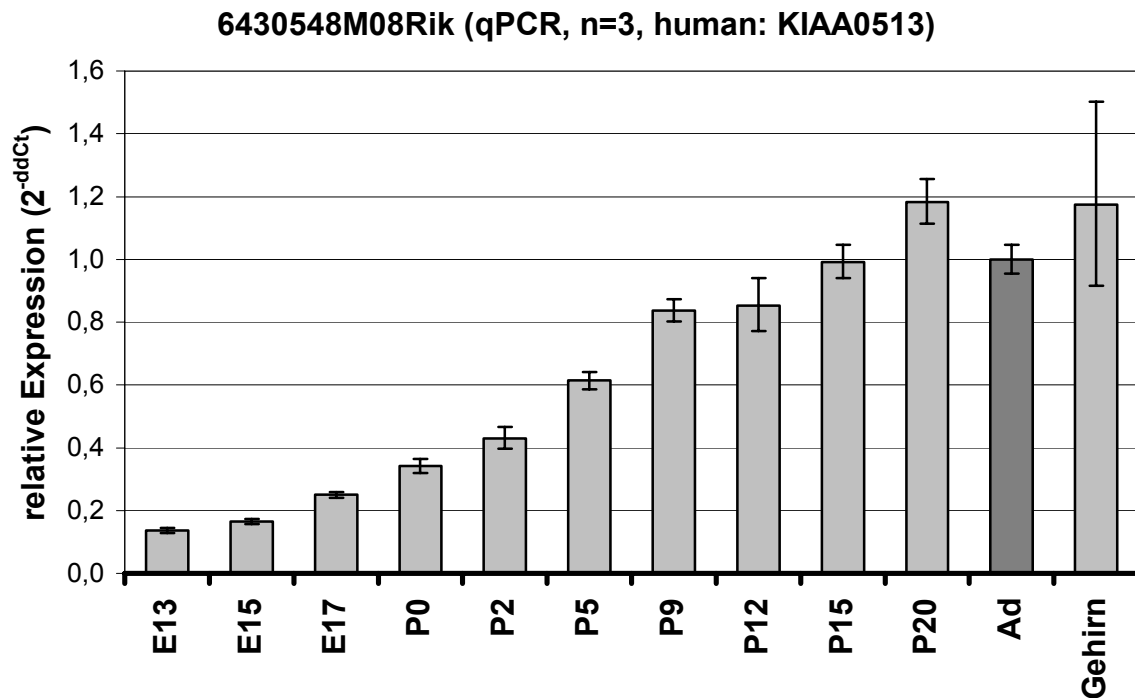


Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf der relativen Expressionswerte (qPCR) von 6430548M08Rik während der Retinaentwicklung der Maus sowie der relativen Expressionswerte der Positivkontrolle (adultes murines Gehirn). E: Embryonaltag, P: Postnataltag, Ad: adultes Stadium.

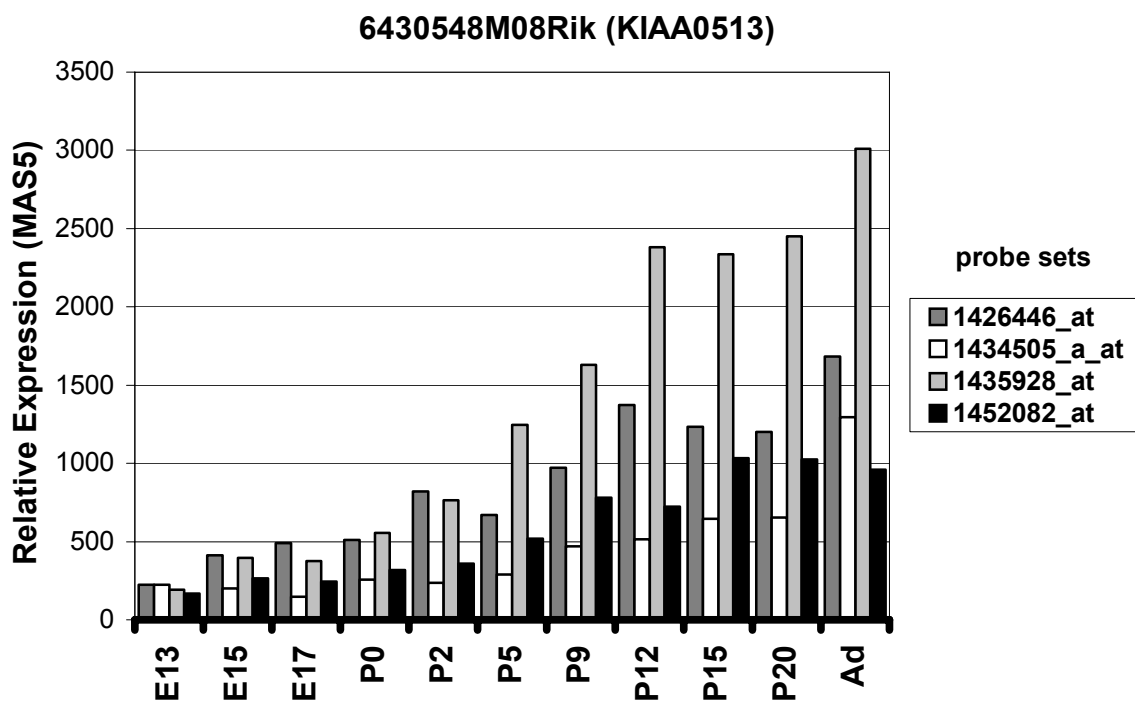


Abbildung 23: Zeitreihenanalyse der Expression von 6430548M08Rik während der Mausretinaentwicklung mittels Mikroarray. Auf dem Mikroarray wird die Expression von 6430548M08Rik mit Hilfe von vier *probe sets* bestimmt. E: Embryonaltag, P: Postnataltag, Ad: adultes Stadium.

Tabelle 26: Relative Expressionswerte der qPCR und der Mikroarrayanalyse für KIAA0513 bzw. 6430548M08Rik sowie die Ergebnisse der *Comparison* Analyse für die jeweiligen signifikant regulierten *probe sets*. Braune Werte weisen in der zeitlichen Reihenfolge (E13 – Ad) auf ein Absinken des Wertes im Vergleich zum vorherigen hin. Rote Werte sind Maximalwerte. Blaue und unterstrichene Werte: kein signifikanter Unterschied in der qPCR. E: Embryonaltag, P: Postnataltag, Ad: adultes Stadium.

probe set / qPCR	E13	E15	E17	P0	P2	P5	P9	P12	P15	P20	Ad
1426446_at	226,5	412,6	490,6	510,8	822,5	668,9	972,4	1373,6	1231,6	1201,1	1683,9
<i>signal log ratio</i>	-2,39	-2,04	-1,55	-1,49	-1,05	-1,17	-0,83				
1434505_a_at	225,8	198,2	148,7	256,6	238,3	288,0	470,8	515,5	645,3	655,0	1296,4
<i>signal log ratio</i>	-2,63	-2,70	-2,39	-2,21	-1,71	-1,46	-1,26	-0,63	-0,66		
1435928_at	193,0	396,2	376,4	554,8	764,9	1243,7	1628,6	2382,7	2334,9	2452,0	3010,9
<i>signal log ratio</i>	-4,10	-2,91	-2,79	-2,25	-2,06	-1,45	-1,14	-0,51	-0,41		
1452082_at	167,8	264,9	246,8	320,5	360,8	516,9	781,6	723,7	1034,6	1026,2	958,4
<i>signal log ratio</i>	-2,52	-1,27	-1,76	-1,58							
qPCR	0,14	0,16	0,25	0,34	0,43	0,61	<u>0,84</u>	<u>0,85</u>	<u>0,99</u>	1,18	1,000

Der relative Expressionswert des Transkript 1434505_a_at fällt von E13 bis E17, steigt bei P0, fällt wiederum bei P2 und steigt ab P2 bis zum adulten Stadium an. Beim *probe set* 1435928_at steigen die Expressionswerte bis Ad, fallen jedoch in den Stadien E17 und P15 im Vergleich zum vorherigen Wert leicht ab. Das Transkript 1452082_at weist als einziges der 4 Transkripte das Maximum des Expressionswertes im Stadium P20 auf. Die Expression steigt von E13 bis P20 an, wobei die Werte E17 und P12 bezogen auf den vorherigen Wert leicht fallen. Der zeitliche Verlauf der Expression des Transkriptes ähnelt dem zeitlichen Verlauf der Expressionswerte in der qPCR sehr deutlich und unterscheidet sich letztendlich nur im Stadium E17. Das leichte Absinken des Wertes des *probe sets* 1452082_at von P9 auf P12 fällt nicht ins Gewicht, da die Werte der qPCR im Bereich von P9 bis P15 nicht signifikant unterschiedlich zueinander sind. Beim Stadium P20 ist der Maximalwert der Expression sowohl von 1452082_at als auch innerhalb des zeitlichen Verlaufs der qPCR erreicht. Die *signal log ratio* Werte der *Comparison* Analyse steigen in allen *probe sets* von E13 in Richtung Ad an. Für die jeweiligen Transkripte sind folgende Stadien, bezogen auf das adulte Stadium, signifikant runterreguliert: i) bei 1426446_at von E13 bis P9, ii) bei 1434505_a_at von E13 bis P15, iii) bei 1435928_at von E13 bis P15 und iv) bei 1452082_at von E13 bis P0. Die Expressionsanalyse von 6430548M08Rik weist keinen schwerwiegenden

Widerspruch bei den Ergebnissen der beiden Analysemethoden (*Comparison* Analyse und qPCR) sowie dem Verlauf innerhalb der Graphen aus der Mikroarrayanalyse und der qPCR auf. Wie zuvor für das Gen *Cdh13* konnten mit Hilfe der qPCR im Gegensatz zur *Comparison* Analyse alle postnatalen Stadien bis auf P15, bezogen auf das adulte Stadium, als signifikant reguliert klassifiziert werden.

3.4.3 4632415K11Rik, *Zdhh7c*, *Cox4nb*, *Cox4i1* und *Slc7a5*

In diesem Teilabschnitt erfolgt die Beschreibung der Expressionsanalyse von jenen Genen, bei denen sich der zeitliche Verlauf der Graphen von qPCR und Mikroarrayanalyse sowie die Zuordnung von signifikant regulierten Expressionswerten der einzelnen Stadien bezogen auf das adulte Stadium, deutlich unterscheiden. Diese Gene weisen somit falsch positive Ergebnisse auf, da sie in einzelnen Stadien laut *Comparison* Analyse signifikant sind, dies aber durch die Ergebnisse der qPCR widerlegt wird. Die Beschreibung bezieht sich bei den folgenden Genen nur auf die Punkte, die zur Identifikation des falsch positiven Ergebnisses führen.

3.4.3.1 4632415K11Rik (human: *KIAA1609*)

Das Gen 4632415K11Rik weist in den Ergebnissen der qPCR keine signifikante Regulation zwischen den Stadien i) E13 bis P0 sowie P9, ii) P12 und P15 sowie iii) P2 und P5 auf. P2 und P5 sind die Stadien mit den höchsten Expressionswerten.

Tabelle 27: Relative Expressionswerte der qPCR und der Mikroarrayanalyse für 4632415K11Rik (rot: höchster Wert, grün: zweit bzw. dritt höchster Wert, braun: niedrigster Wert, blau: nicht signifikant reguliert bezogen auf Ad). E: Embryonaltag, P: Postnataltag, Ad: adultes Stadium.

probe set / qPCR	E13	E15	E17	P0	P2	P5	P9	P12	P15	P20	Ad
1430614_at	638,9	587,1	535,1	263,6	627,3	1136,2	2592,4	3360,0	3753,2	2754,1	2456,0
signal log ratio	-2,01	-2,08	-2,07	-2,48	-2,22	-1,33		0,43	0,60		
qPCR	2,24	2,38	2,45	2,31	3,24	3,47	2,21	1,42	1,19	1,02	1,00

Des Weiteren sind die Expressionswerte von P15 und P20 nicht signifikant unterschiedlich von Ad reguliert (siehe Abbildung 24 auf 87). Die relativen Expressionswerte der Mikroarrayanalyse (siehe Tabelle 27) weisen in den Stadien P12 und P15 ihre höchsten Werte auf. P0 ist das Stadium mit dem niedrigsten relativen Expressionswert sowohl in der Mikroarrayanalyse als auch in der *Comparison* Analyse (siehe Tabelle 27).

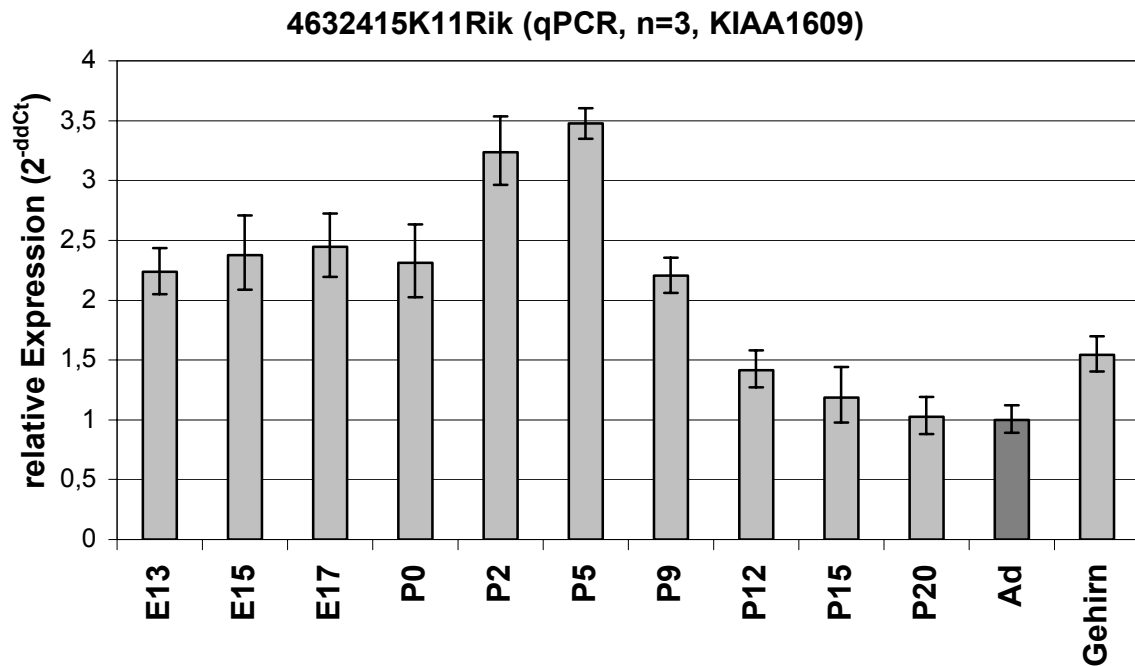


Abbildung 24: Zeitlicher Verlauf der relativen Expressionswerte (qPCR) von 4632415K11Rik während der Retinaentwicklung der Maus sowie der Positivkontrolle (adultes murines Gehirn). E: Embryonaltag, P: Postnataltag, Ad: adultes Stadium.

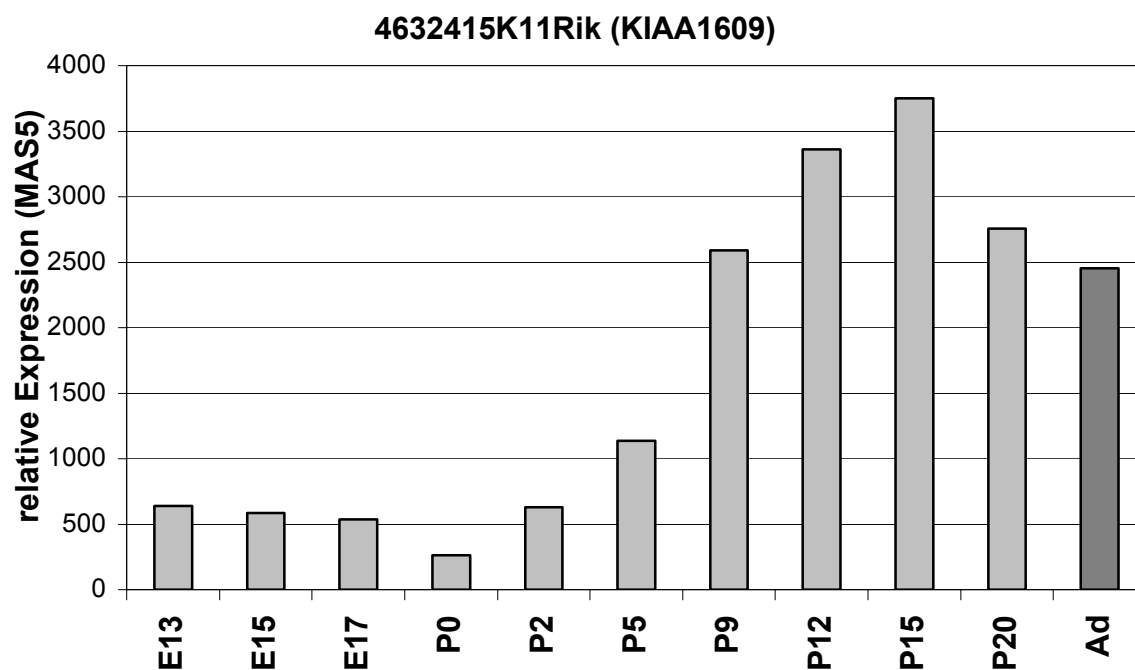


Abbildung 25: Zeitreihenanalyse der Expression von 4632415K11Rik während der Mausretinaentwicklung mittels Mikroarray. E: Embryonaltag, P: Postnataltag, Ad: adultes Stadium.

Das Stadium P15 ist nach den Ergebnissen der qPCR Analyse der zweitniedrigste Wert neben dem Wert von Ad und ist bezogen auf dieses Stadium nicht

reguliert. Der *Comparison* Algorithmus erzeugt somit ein falsch positives Ergebnis für das Stadium P15. Zusätzlich stimmen der allgemeine zeitliche Verlauf der qPCR und der Mikroarrayanalyse nicht überein. Dies ist deutlich an den Maximalwerten der jeweiligen Expressionswerte zu sehen, die zehn Entwicklungstage auseinanderliegen.

3.4.3.2 Zdhhc7

Der höchste Expressionswert von Zdhhc7c liegt laut den Ergebnissen der qPCR Analyse bei P0. Zwischen den Stadien i) E13 – E17, P15 und P20, ii) P5 und P12, sowie iii) P5 und P20 (siehe Abbildung 26 auf Seite 89) ist keine signifikante Regulation vorhanden. Bezogen auf das adulte Stadium sind die Stadien E13 bis E17 sowie P15 nicht signifikant reguliert. Aus Abbildung 27 (siehe Seite 89) und Tabelle 28 ist zu entnehmen, dass P12 und P15 die höchsten Expressionswerte der Mikroarrayanalyse und die embryonalen Stadien sowie P2 die niedrigsten Werte aufweisen. Die embryonalen Stadien E15 und E17 sowie P0 sind bezogen auf Ad nach den Ergebnissen der *Comparison* Analyse die einzigen Stadien, die, bezogen auf das adulte Stadium, signifikant reguliert sind. Die Stadien E15 und E17 sind laut den Ergebnissen der qPCR, verglichen mit dem adulten Stadium, nicht signifikant reguliert. Somit erzeugt der *Comparison* Algorithmus falsch positive Ergebnisse für diese beiden Stadien. Des Weiteren ist der zeitliche Verlauf der qPCR-Ergebnisse mit dem Peak bei P9 nicht identisch mit dem zeitlichen Verlauf der Expressionswerte nach dem MAS5 Algorithmus, deren Peak sechs Entwicklungstage später liegt (P15).

Tabelle 28: Relative Expressionswerte der qPCR und der Mikroarrayanalyse für Zdhhc7 (rot: höchster Wert, grün: zweit höchster Wert, blau: nicht signifikant reguliert bezogen auf Ad). E: Embryonaltag, P: Postnataltag, Ad: adultes Stadium.

probe set / qPCR	E13	E15	E17	P0	P2	P5	P9	P12	P15	P20	Ad
1416545_at	995,2	931,9	969,9	1117,0	985,7	1190,2	1329,0	1610,3	1674,9	1557,5	1109,5
<i>signal log ratio</i>		-0,30	-0,46	-0,48							
qPCR	1,12	1,14	1,07	1,45	1,51	1,85	1,96	1,65	1,28	1,27	1,00

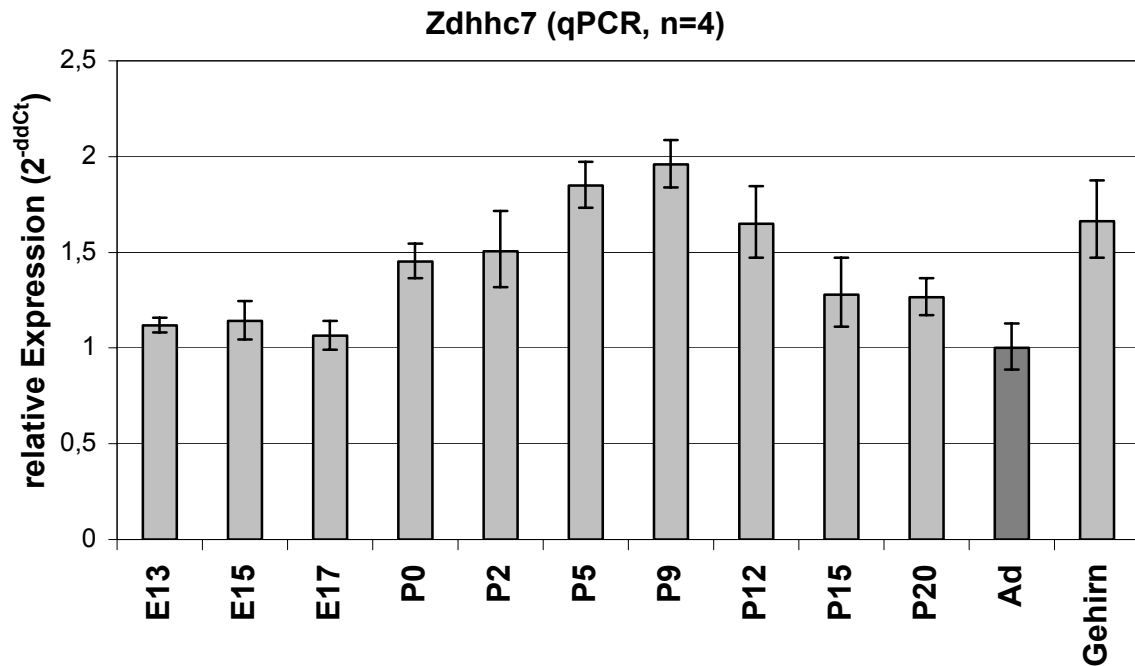


Abbildung 26: Zeitlicher Verlauf der relativen Expressionswerte (qPCR) von *Zdhhc7* während der Retinaentwicklung der Maus sowie der Expressionswert der Positivkontrolle (adultes murines Gehirn). E: Embryonaltag, P: Postnataltag, Ad: adultes Stadium.

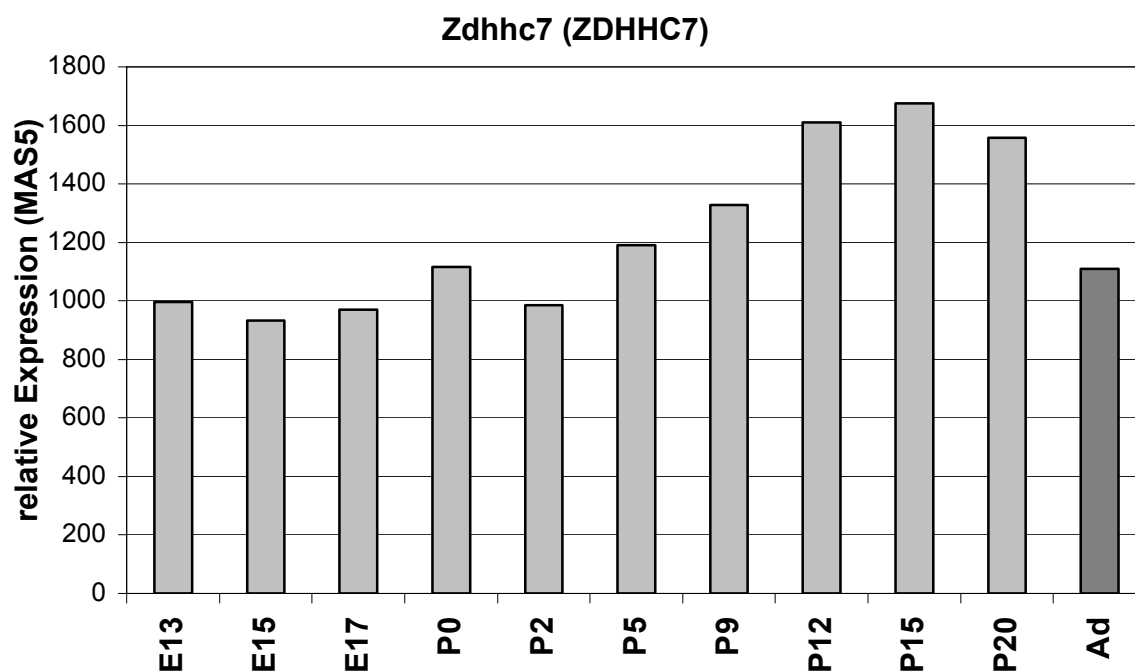


Abbildung 27: Zeitreihenanalyse der Expression von *Zdhhc7* während der Mausretinaentwicklung mittels Mikroarray. E: Embryonaltag, P: Postnataltag, Ad: adultes Stadium.

3.4.3.3 Cox4nb

Für das Gen Cox4nb kommen alle drei Analysen (qPCR, Mikroarray- bzw. MAS5 und *Comparison* Analyse) zu dem Ergebnis, dass das Embryonalstadium E13 das Stadium mit dem höchsten relativen Expressionswert bzw. *signal log ratio* Wert ist. Die Stadien E13, E15 und P5 sind in der qPCR nicht signifikant reguliert. Dies gilt für die Stadien i) E15, P0, P2 und P5, ii) P9 und P12 sowie iii) P12, P15 und Ad. Die Stadien E17 und P20 sind die einzigen Stadien, die einen signifikanten Unterschied jeweils zu allen anderen Stadien aufweisen. Das Stadium P20 ist, gemäß den Ergebnissen der Mikroarrayanalyse, das Stadium mit dem zweithöchsten relativen Expressionswert. Die *signal log ratio* Werte der *Comparison* Analyse weisen in P20 ebenfalls ihren zweithöchsten Wert auf. Aus Tabelle 29 geht deutlich hervor, dass im Gegensatz zu der Mikroarray- (siehe Abbildung 29 auf Seite 91) und *Comparison* Analyse das postnatale Stadium P20 nach den Ergebnissen der qPCR (siehe Abbildung 28 auf 91) den niedrigsten Wert aufweist. Dieser Wert ist, wie bereits erwähnt, einer von zwei relativen Expressionswerten, der signifikant unterschiedlich zu allen anderen Werten ist. Somit steht dieses Ergebnis eindeutig im Widerspruch mit dem Ergebnis aus der Mikroarrayanalyse. Ein weiterer Widerspruch innerhalb des Vergleichs der Ergebnisse der Analysemethoden ist durch die Stadien P12 und P15 gegeben. Gemäß den Ergebnissen der *Comparison* Analyse sind die Expressionswerte jener beiden Stadien bezogen auf das adulte Stadium signifikant unterschiedlich. Nach den Ergebnissen der qPCR sind die Expressionswerte der beiden Stadien allerdings nicht signifikant unterschiedlich zum adulten Stadium und somit falsch positiv für die Ergebnisse der *Comparison* Analyse. Ebenso wie bei den vorherigen Genen ist der zeitliche Verlauf der relativen Expressionswerte der qPCR und der Mikroarrayanalyse bei Cox4nb nicht ähnlich. Der Unterschied ist am deutlichsten im Stadium P20, dessen Expressionswert in der Mikroarrayanalyse am zweithöchsten und in der qPCR am niedrigsten ist.

Tabelle 29: Relative Expressionswerte der qPCR und der Mikroarrayanalyse für Cox4nb (rot: höchster Wert, grün: zweit bzw. dritt höchster Wert, braun: niedrigster Wert, blau: nicht signifikant reguliert bezogen auf Ad). E: Embryonaltag, P: Postnatahtag, Ad: adultes Stadium.

probe set / qPCR	E13	E15	E17	P0	P2	P5	P9	P12	P15	P20	Ad
1448677_at	2870,8	2009,5	2332,8	1801,0	2016,8	1856,1	2145,4	2048,7	2127,2	2719,5	1761,7
<i>signal log ratio</i>	0,83	0,40	0,56				0,44	0,39	0,44	0,77	
qPCR	2,09	1,84	1,43	1,72	1,68	1,83	1,21	1,13	0,95	0,85	1,00

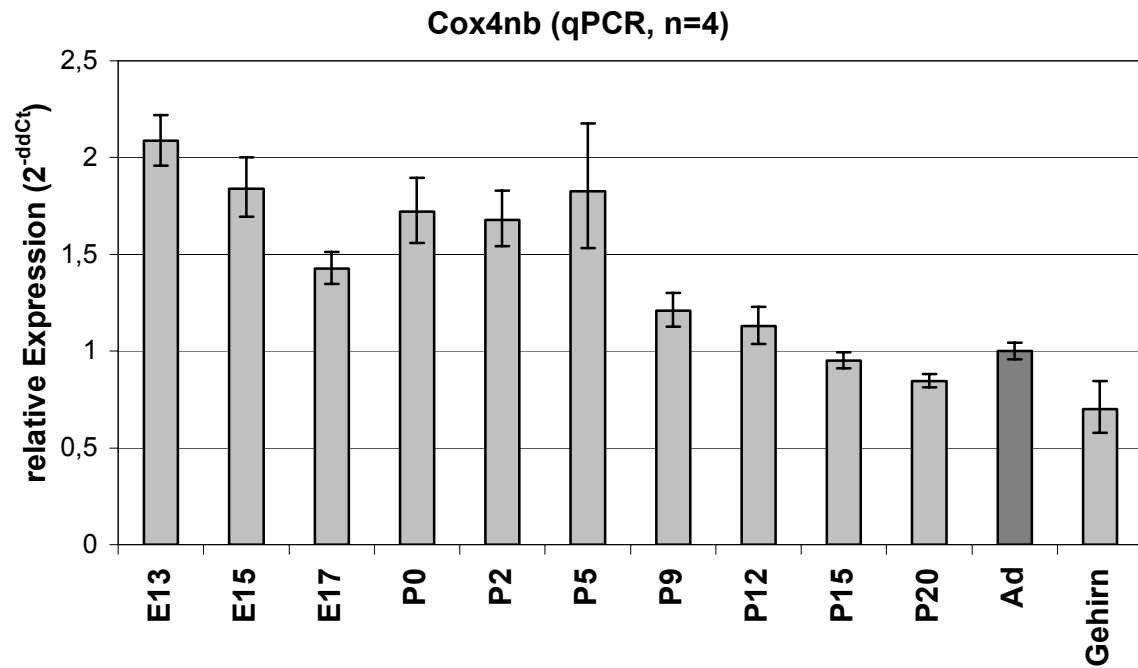


Abbildung 28: Zeitlicher Verlauf der relativen Expressionswerte (qPCR) von Cox4nb während der Retinaentwicklung der Maus sowie der Expressionswert der Positivkontrolle (adultes murines Gehirn). E: Embryonaltag, P: Postnataltag, Ad: adultes Stadium.

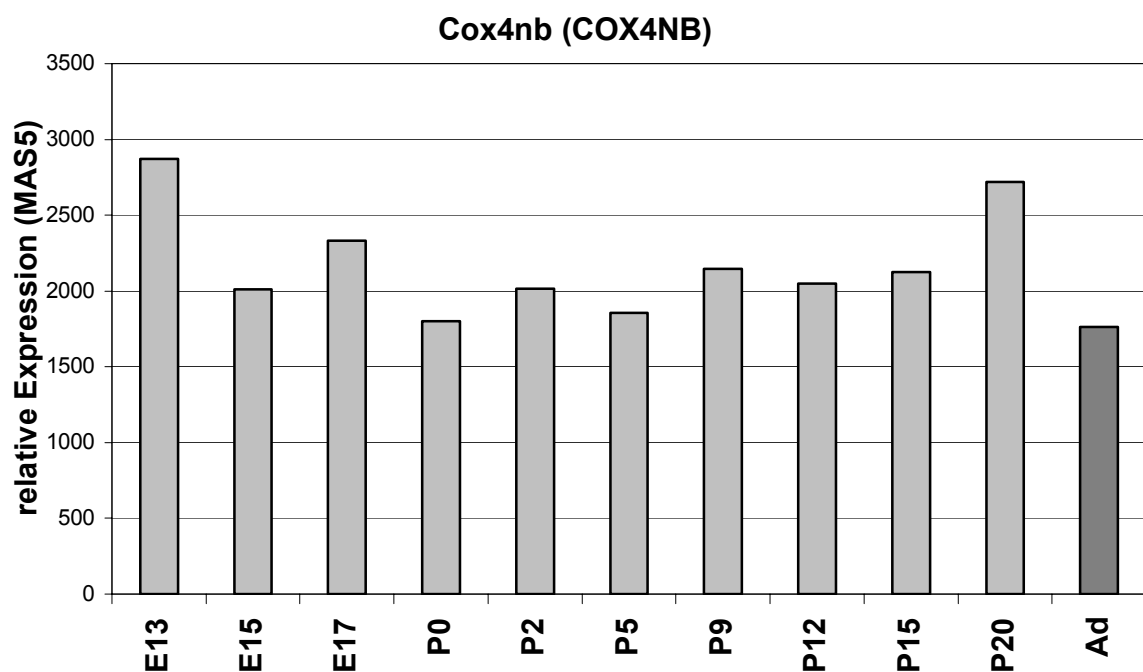


Abbildung 29: Zeitreihenanalyse der Expression von Cox4nb während der Mausretinaentwicklung mittels Mikroarray. E: Embryonaltag, P: Postnataltag, Ad: adultes Stadium.

3.4.3.4 Cox4i

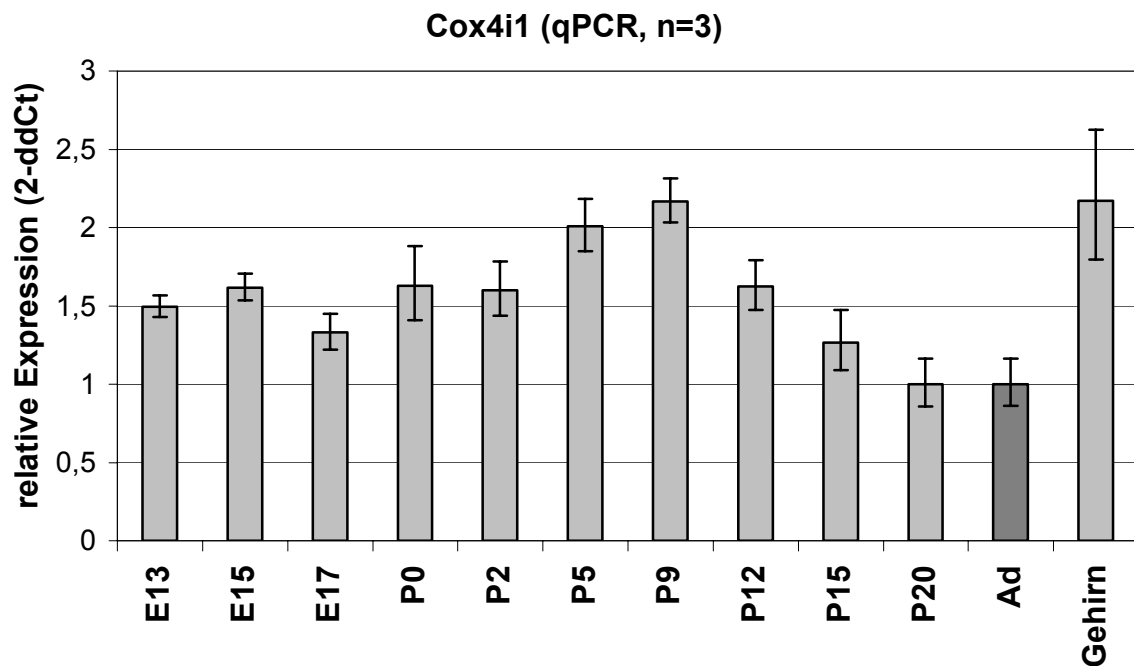


Abbildung 30: Zeitlicher Verlauf der relativen Expressionswerte (qPCR) von Cox4i1 während der Retinaentwicklung der Maus sowie der Expressionswert der Positivkontrolle (adultes murines Gehirn). E: Embryonaltag, P: Postnataltag, Ad: adultes Stadium.

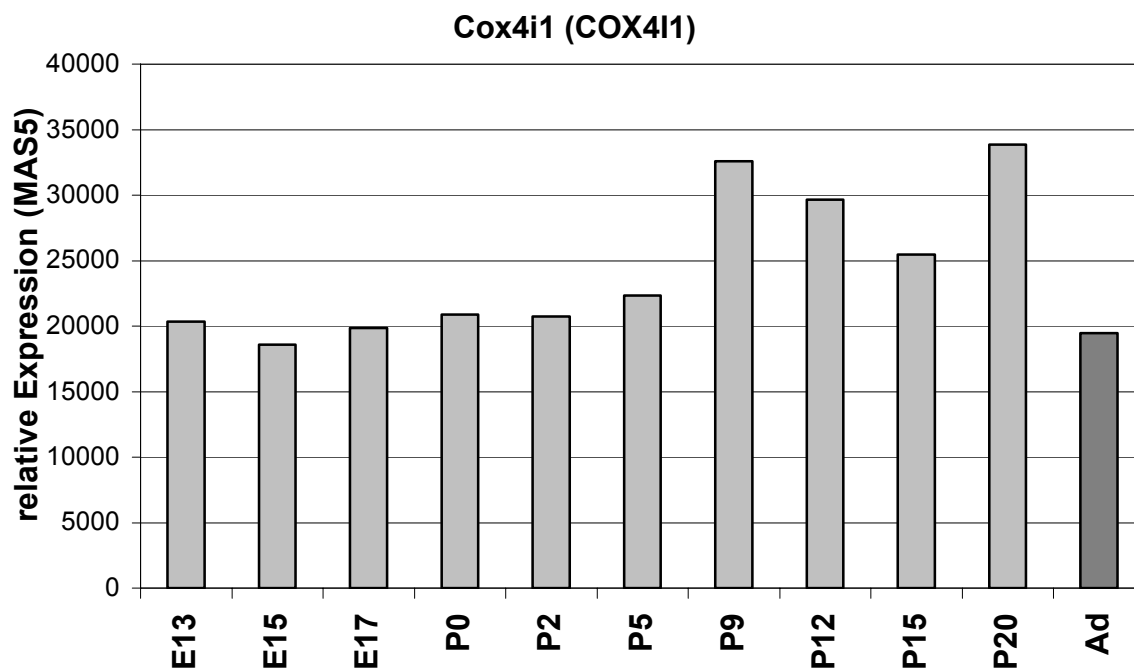


Abbildung 31: Zeitreihenanalyse der Expression von Cox4i1 während der Mausretinaentwicklung mittels Mikroarray. E: Embryonaltag, P: Postnataltag, Ad: adultes Stadium.

Der visuelle Vergleich der relativen Expressionswerte der qPCR und Mikroarrayanalyse in Abbildung 30 und Abbildung 31 (siehe jeweils Seite 92) deutet darauf hin, dass bei diesem Gen falsch positive Ergebnisse für die *Comparison* Analyse vorliegen. Die *Comparison* Untersuchung kommt zu dem Ergebnis, dass die postnatalen Entwicklungsstadien von P9 bis P20, bezogen auf das adulte Stadium, signifikant unterschiedlich reguliert sind. Die Mikroarrayanalyse weist in den Stadien P9 und P20 die höchsten relativen Expressionswerte auf, wobei P20 das Maximum darstellt. Allerdings weisen die relativen Expressionswerte der qPCR Analyse ihren maximalen Wert bei P9 und den zweithöchsten Wert bei P5 auf, wohingegen der Wert von P20 dem Wert des adulten Stadiums entspricht. Die Werte der Stadien i) E13, E17, P0, P2 und P15, ii) E13, E15, P2 und P12, iii) P0 und P5 sowie iv) P5 und P9 sind nicht signifikant unterschiedlich.

Tabelle 30: Relative Expressionswerte der qPCR und der Mikroarrayanalyse für Cox4i1 (rot: höchster Wert, grün: zweit bzw. dritt höchster Wert, braun: niedrigster Wert, blau: nicht signifikant reguliert bezogen auf Ad). E: Embryonaltag, P: Postnataltag, Ad: adultes Stadium.

probe set / qPCR	E13	E15	E17	P0	P2	P5	P9	P12	P15	P20	Ad
1448322_a_at*	20360	18592	19836	20862	20739	22340	32579	29652	25455	33852	19447
signal log ratio							1,57	1,45	1,25	1,62	
qPCR	1,50	1,62	1,33	1,63	1,60	2,01	2,17	1,62	1,27	1,00	1,00

* Die Nachkommastelle wurde aufgrund der Höhe der Werte und aus Platzgründen weggelassen

Ausschlaggebend für die Bestätigung der durch den visuellen Vergleich vermuteten Aussage, dass die Ergebnisse der *Comparison* Untersuchung zu falsch positiven Ergebnissen kommt, ist, dass die Stadien P15 und P20, bezogen auf das adulte Stadium, keinen signifikanten Unterschied in den Expressionswerten der qPCR Analyse zeigen. Zusätzlich befindet sich der Expressionswert von P20, wie zuvor bei dem Gen Cox4nb, in der Mikroarrayanalyse unter den höchsten Expressionswerten, während er bei der qPCR-Untersuchung zu den niedrigsten Werten zählt.

3.4.3.5 Slc7a5

In der qPCR Untersuchung weisen die relativen Expressionswerte von Slc7a5 ihr Maximum im postnatalen Stadium P0 auf, wobei der Wert von E17 nicht viel niedriger liegt. Die beiden Expressionswerte sind zu den postnatalen Stadien E15 und P9 nicht signifikant reguliert. Diese vier Stadien vereinigen die höchsten Expressionswerte. Die relativen Expressionswerte der qPCR Analyse zwischen

i) E13, P2, P5 und P12, ii) P2, P5, P15 und P20 sowie iii) P15, P20 und Ad haben keinen signifikanten Unterschied zueinander (siehe Abbildung 32).

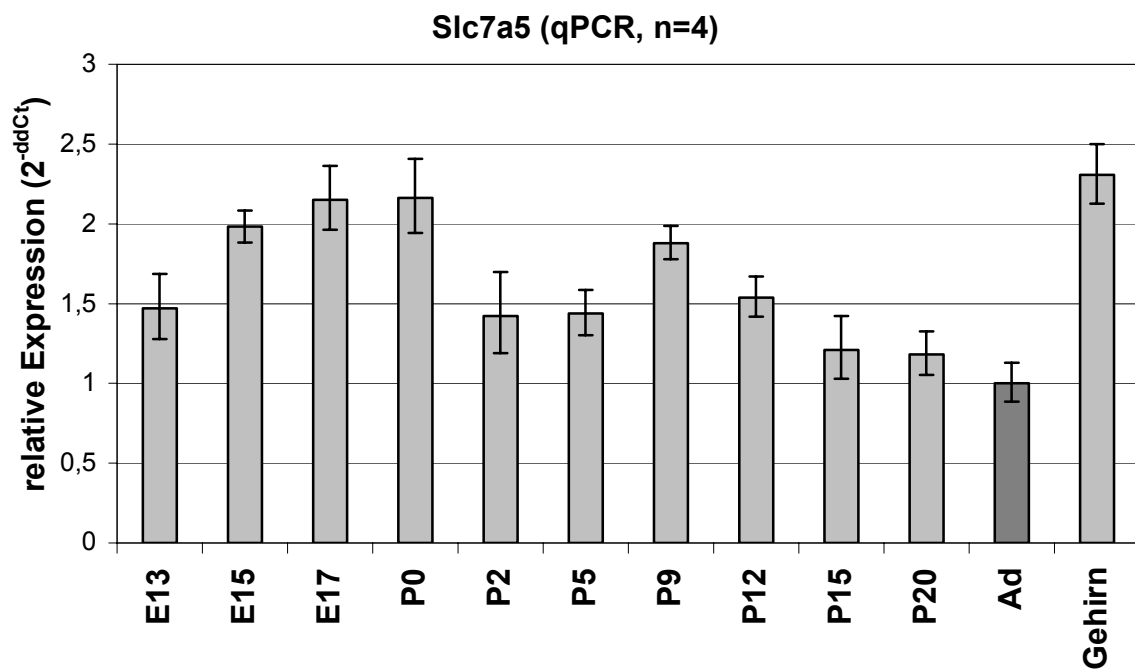


Abbildung 32: Zeitlicher Verlauf der relativen Expressionswerte (qPCR) von Slc7a5 während der Retinaentwicklung der Maus sowie der Expressionswert der Positivkontrolle (adultes murines Gehirn). E: Embryonaltag, P: Postnataltag, Ad: adultes Stadium.

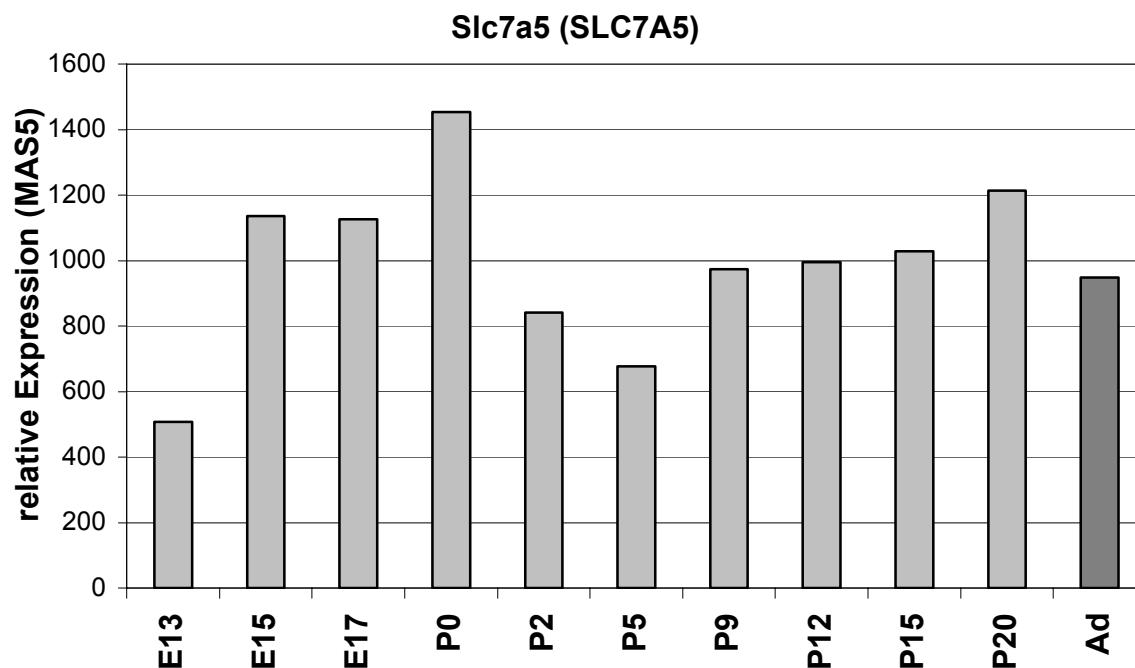


Abbildung 33: Zeitreihenanalyse der Expression von Slc7a5 während der Mausretinaentwicklung mittels Mikroarray. E: Embryonaltag, P: Postnataltag, Ad: adultes Stadium.

Das Maximum der relativen Expressionswerte der Mikroarrayanalyse (siehe Abbildung 33 auf Seite 94) ist wie bei den Werten der qPCR Analyse das Stadium P0. Der zweithöchste Wert liegt bei P20 (siehe Tabelle 31). Die *signal log ratios* Werte der *Comparison* Analyse weisen ihr Maximum bei P0 und den zweit höchsten Wert bei P20 auf. Die Stadien E15 bis P2 und P9 bis P20 sind bezogen auf Ad signifikant reguliert. Die signifikante Regulation der Stadien P15 und P20 widerspricht den Ergebnissen der *Real Time PCR* Analyse. Somit erzeugt der *Comparison* Algorithmus falsch positive Werte. Vergleicht man den zeitlichen Verlauf aus der qPCR und Mikroarrayanalyse, so weisen die Stadien von E13 bis P2 einen ungefähr gleichen zeitlichen Verlauf auf, der für die Stadien P9 bis Ad nicht mehr gilt, da der zweit höchste Peak der Mikroarrayanalyse bei P20 und der einzige der vier höchsten Expressionswerte der qPCR Untersuchung innerhalb von P9 bis Ad bei P9 liegt.

Tabelle 31: Relative Expressionswerte der qPCR und der Mikroarrayanalyse für Slc7a5 (rot: Höchstwerte, grün: zweit höchster Wert, blau: nicht signifikant reguliert bezogen auf Ad). E: Embryonaltag, P: Postnataltag, Ad: adultes Stadium.

probe set / qPCR	E13	E15	E17	P0	P2	P5	P9	P12	P15	P20	Ad
1418326_at	507,8	1136,1	1125,9	1454,6	841,3	677,9	974,1	994,7	1028,4	1214,6	947,9
signal log ratio		0,53	0,52	0,94	0,33		0,36	0,46	0,31	0,74	
qPCR	1,47	1,98	2,15	2,16	1,42	1,44	1,88	1,54	1,21	1,18	1,00

Zusammenfassend zeigt der Vergleich der Expressionsmethoden für die jeweiligen fünf Gene, dass die *Comparison* Analyse falsch positive Ergebnisse erzeugt, die durch die sensitivere Analyse mittels qPCR aufgedeckt werden. Im Falle der Gene Cdh13 und 6430548M08Rik können mit der qPCR Untersuchung falsch negative Ergebnisse revidiert werden.

3.5 Expression von CDH13 in Retinoblastomzelllinien

Anhand eines unveröffentlichten qPCR Versuchs (n=1) von Frau Dr. Grätias (ehemals Arbeitsgruppe Prof. Lohmann; Institut für Humangenetik; Universitätsklinikum Essen) gab es Anzeichen dafür, dass Retinoblastomzelllinien sehr wenig CDH13 exprimieren. Aus diesem Grund wurden die Versuche vom Autor dieser Dissertation in ausreichender Anzahl wiederholt. Für die Zelllinien RBL 355 und RBL 383 konnte keine Expressionsanalyse mittels qPCR durchgeführt werden, da im Fall von RBL 383 entweder die RNA eine schlechte Qualität aufwies oder die Expressionswerte für eine Analyse zu niedrig waren. Bei

der Zelllinie RBL 355 war aufgrund der fast nicht vorhandenen Expression die Anzahl der Messwerte zu niedrig um eine Aussage treffen zu können. Dankenswerterweise wurden von Herrn Dr. Harald Stephan (Universitäts-Kinderklinik Essen, Klinik für Pädiatrische Nephrologie, Abteilung für Hämatologie und Onkologie) zwei cDNA Proben von Retinoblastom Biopsien ab Mitte Juli 2009 zur Verfügung gestellt. Allerdings lag bis zur Abgabe der Doktorarbeit noch kein pathologischer Befund für die beiden Retinoblastome vor.

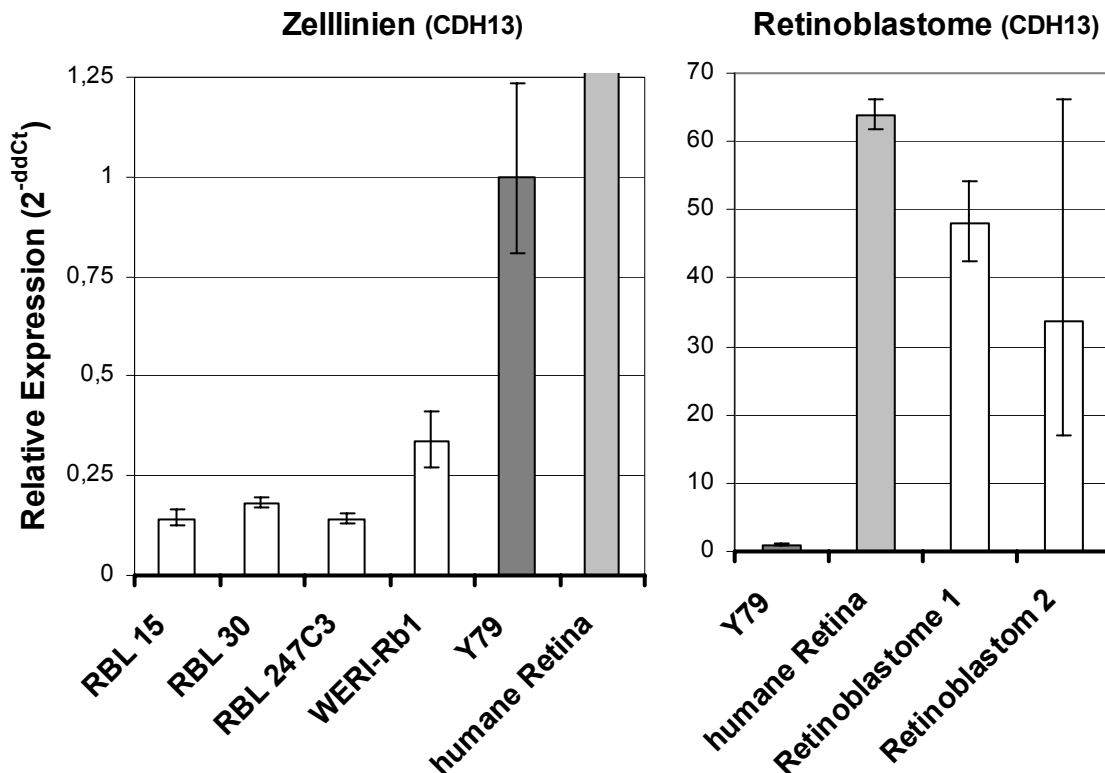


Abbildung 34: Verhältnisse der relativen Expression (qPCR) von Cadherin 13 in den Retinoblastomzelllinien RBL 15, RBL 30, RBL 247C3, WERI-Rb1 und Y79 (linkes Balkendiagramm) sowie in Y79 Zellen, humaner Retina und zwei Retinoblastom-Proben (rechtes Balkendiagramm). Proben Y79 und humane Retina sind in beiden Diagrammen identisch.

Abbildung 34 zeigt die Expression der Retinoblastomzelllinien RBL 15 (n=6), RBL 30 (n=3), RB 247C3 (n=4), WERI-Rb1 (n=10) und Y79 (n=12) im Vergleich zu der humanen Retina Probe von CloneTech (n=5) und den beiden Retinoblastomproben (n=1). Als Kalibrator wurde die Zelllinie Y79 verwendet und als Positivkontrolle die humane Retinaprobe (63,97). Zur besseren Darstellung wurden die Expressionsergebnisse in zwei Graphen aufgeteilt, da sich die Höhe der relativen Expressionswerte der nicht-Zelllinienproben zu denen der Zelllinien um ca. das 30- bis 500-fach unterscheidet. Die Expressionswerte von RBL 15 und

RBL 247C3 sowie die Retinoblastomprobe 2 zu der humanen Probe und dem Retinoblastom 1 sind nicht signifikant unterschiedlich zueinander. Die relativen Expressionswerte aller anderen Proben verhalten sich signifikant unterschiedlich zueinander. Die Zelllinie Y79 weist den höchsten Expressionswert der Zelllinien auf, CDH13 ist aber um das 60-fache niedriger exprimiert als in der humanen Probe. Der Expressionswert von WERI-Rb1 ist um ein Drittel niedriger als derjenige von Y79 und über das doppelte so hoch wie die Werte von RBL 15, RBL 30 und RBL 247C3. Retinoblastom 2 weist aufgrund von Unterschieden innerhalb der gemessenen Tripletts einen sehr hohen Fehlerbalken auf. Die humane Retinaprobe besitzt den höchsten relativen Expressionswert und ist sowohl im Vergleich zu den Zelllinien signifikant höher reguliert als auch im Vergleich zum Retinoblastom 1.

3.6 Etablierung, Optimierung und Erweiterung des Hühnerembryonen-Modells

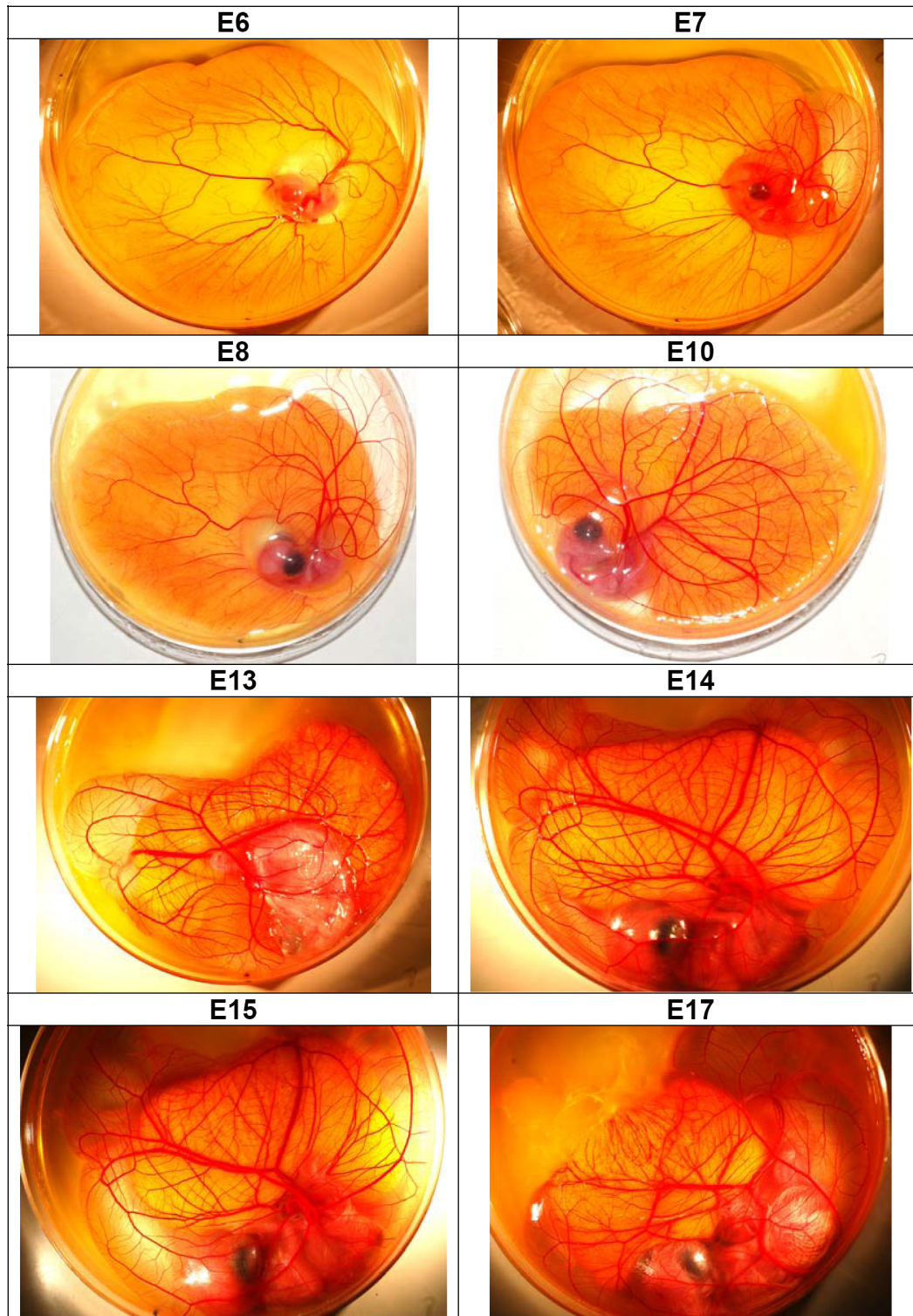


Abbildung 35: Entwicklungsstadien eines Hühnerembryos in der *ex ovo* Kultur. Als Gefäß dient eine extra hohe Petrischale (100 mm x 20 mm). E = Entwicklungs- bzw. Embryonaltag.

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde eine *ex ovo* Kultur etabliert. Die erfolgreiche Etablierung der *ex ovo* Kultur wie sie in Dohle et al. (2009)

beschrieben ist, wird in Abbildung 35 (siehe Seite 98) dokumentiert und verdeutlicht die Entwicklung des Hühnerembryos von Tag 6 bis Tag 17 in der ex ovo Kultur.

3.6.1 Etablierung der Transplantationstechnik

Für eine erfolgreiche Transplantation von Geweben oder Tumoren muss zunächst sichergestellt werden, dass die Technik beherrscht wird. Bradley (1970) schreibt in seiner Veröffentlichung, dass sich die Transplantation von Extremitätsknospen, in die noch keine Nervenendigungen eingesprosst sind, für das Erlernen der Transplantationstechnik am besten eignen da sie sich auf der CAM beim richtigen Beherrschen der Technik zu einer vollständigen Extremität mit Knorpel, Bindegewebe und Gefäßsystem zur Blutversorgung entwickeln (Bradley, 1970; Hall, 1978). Die Blutversorgung wird in diesem Fall vom Hühnerembryo über das Blutgefäßsystem der CAM übernommen. Das Verpflanzen von Allotransplantaten wird schneller beherrscht und ist deswegen zur Etablierung der Technik besser geeignet als Experimente mit Xenotransplantaten.

3.6.1.1 Transplantation von Allo- und Xeno-Extremitätenknospen

Abbildung 36 zeigt die erfolgreiche Entwicklung einer transplantierten Extremitätenknospe eines 3 bis 4 Tage alten Donorhühnerembryos auf der CAM innerhalb von 5 Tagen.

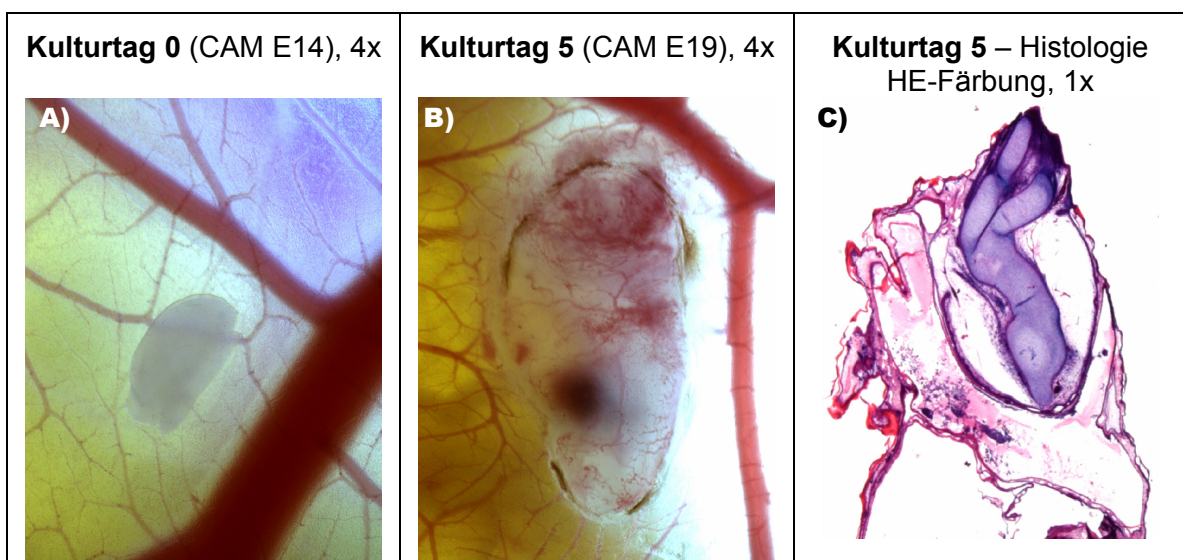


Abbildung 36: Wachstum und Kapillarisation von Allotransplantaten auf der CAM von ex ovo kultivierten Hühnerembryonen. E: Entwicklungstag des Hühnerembryos.

Das Transplantat wurde für diesen Versuch auf die CAM eines 8 Tage alten Wirtsembryos überführt. Anhand der HE-Färbung in Abbildung 36C ist zu

erkennen, dass sich die transplantierte Extremitätenknospe innerhalb von 5 Tagen zu dem Vorläufer eines Flügels mit zwei Phalangen entwickelt hat.

Der nächste Schritt bestand darin, murine Beinknospen von 13 Tage alten Mausembryonen auf der CAM zu kultivieren. Abbildung 37 (A-C) zeigt, dass der Anschluss des Xenotransplantats an das Blutgefäßsystem der CAM innerhalb von 3 Kulturtagen weitestgehend abgeschlossen ist.

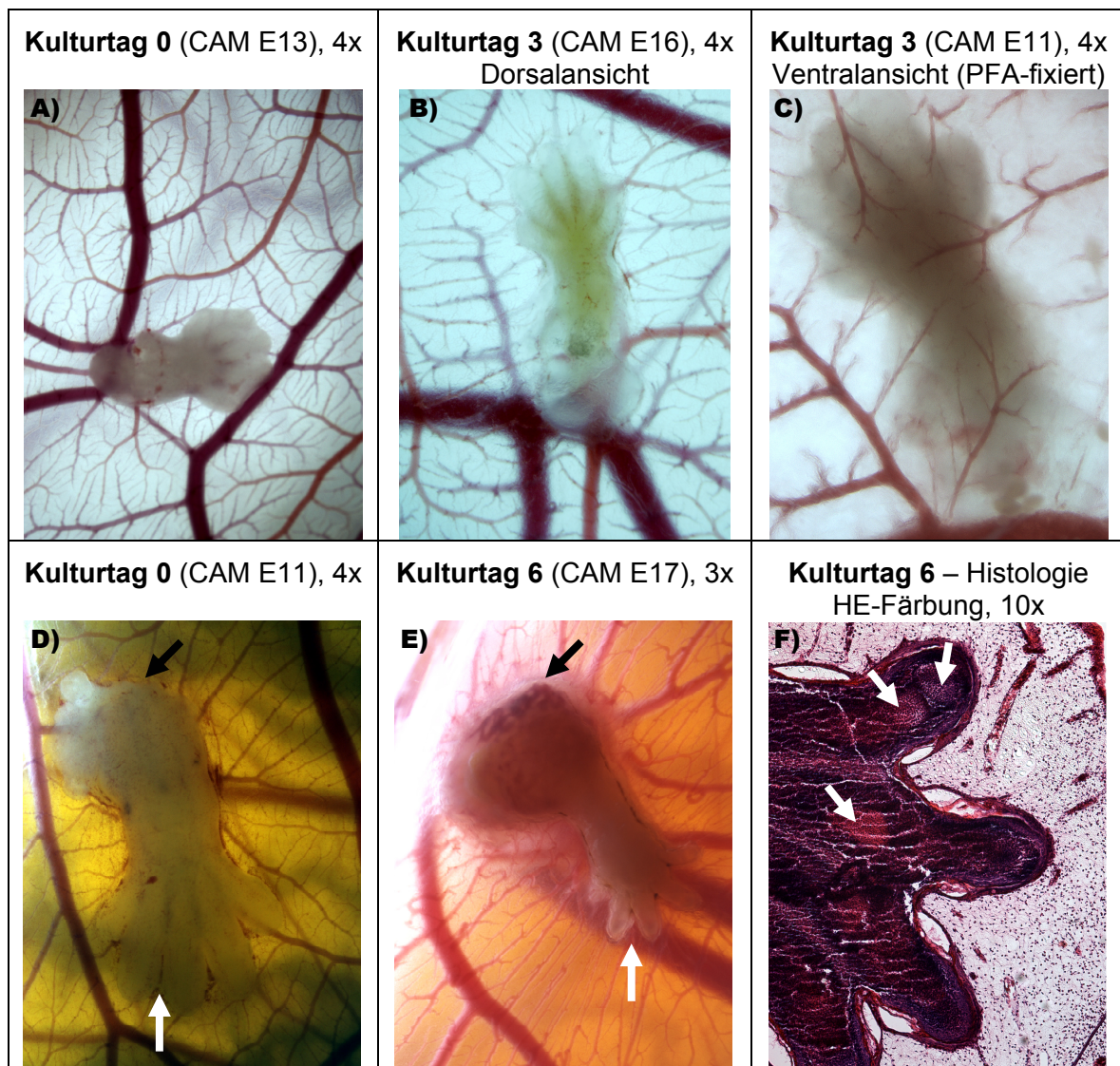


Abbildung 37: Wachstum und Kapillarisation von Maus-Xenotransplantaten auf der CAM von ex ovo kultivierten Hühnerembryonen. E: Entwicklungstag des Hühnerembryos. A-E) Darstellung der Reduktion des interdigitalen Zwischengewebes während der Kultivierung (weiße Pfeile in D und E) sowie Ausprägung einer Schulterpartie (schwarze Pfeile in D und E), F) HE-gefärbter histologischer Schnitt – weiße Pfeile: Fingerstrahlen.

Zusätzlich wird anhand dieser Abbildung 37 die makroskopisch sichtbare Größenzunahme (A und B, D und E) und Differenzierung in Form einer Reduktion des interdigitalen Zwischengewebes dokumentiert (D und E). Die HE-Färbung (F)

verdeutlicht, dass sich die Fingerstrahlen mit dem Wachstum des Transplantats mitentwickeln und somit die Transplantationstechnik auch für Xenotransplantate erfolgreich etabliert wurde.

3.6.2 Xenotransplantation von primären humanen Tumoren auf die CAM

Da für die Etablierung des CAM-Assays keine Retinoblastome zur Verfügung standen (Begründung siehe Abschnitt 1.3 auf Seite 14f), wurde das Anwachsen und Kultivieren von Tumoren anhand von Biopsiematerial humaner Melanomen und Zystektomie-Material primärer Blasenkarzinome etabliert. Die Blasenkarzinome wurden zusätzlich über vier Generationen von Hühnerembryonen weitertransplantiert und -kultiviert (re-grafting), um zu zeigen, dass eine Langzeitkultivierung von Tumormaterial auf der CAM möglich ist. Hierfür wurden die Blasenkarzinome für ca. einen Monat in Schritten von jeweils 7 Tagen 4-mal weitertransplantiert.

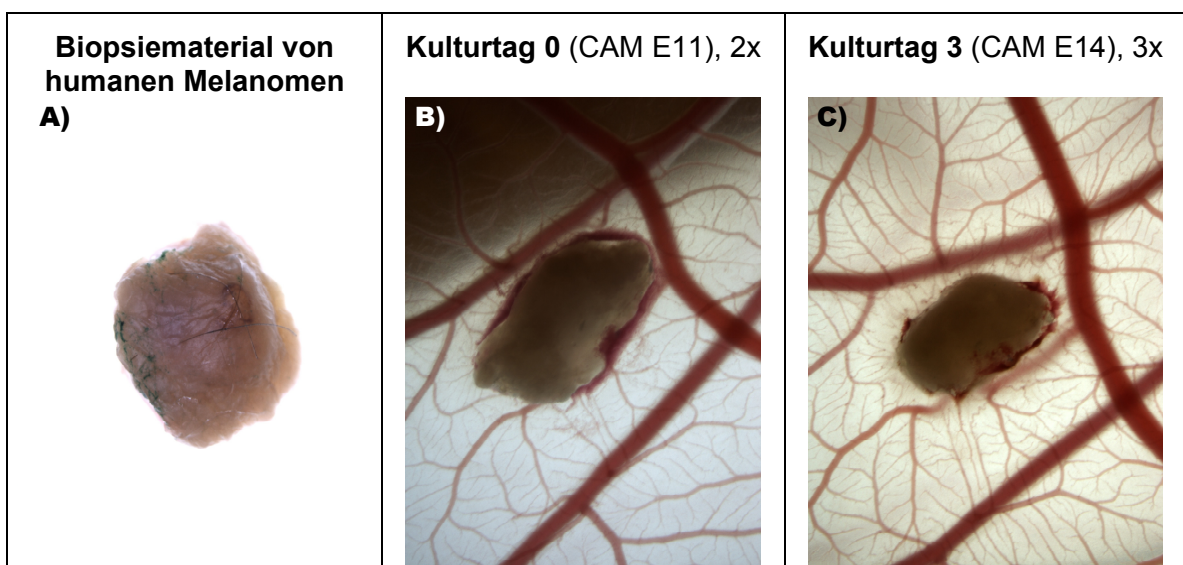


Abbildung 38: A) Biopsiematerial eines humanen Melanoms nach Entnahme (Aufsicht auf die Haut). B und C) Kapillarisation eines transplantierten humanen Melanoms auf der CAM eines ex ovo kultivierten Hühnerembryos. E: Entwicklungstag des Hühnerembryos.

Die Kultivierung und das Anwachsen des Melanoms ist in Abbildung 38 und des Blasenkarzinoms in Abbildung 39 (siehe Seite 102) gezeigt. Der deutliche Zuwachs an Blutgefäßen, der Anschluss an das Blutgefäßsystem der CAM sowie das Zustreben der Blutgefäße der CAM auf das Transplantat kann in beiden Abbildungen beobachtet werden. Abbildung 40A (siehe Seite 102) zeigt die Kapillarisation eines Blasenkarzinoms nach 8 Tagen ex ovo Kultur.

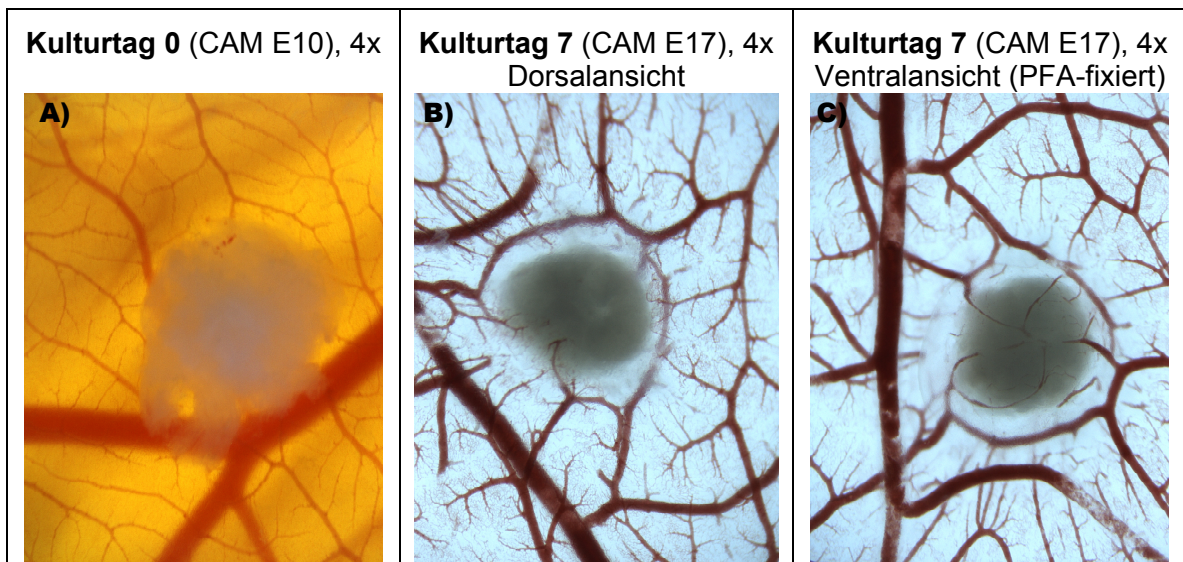


Abbildung 39: Wachstum und Kapillarisation eines transplantierten primären humanen Blasenkarzinoms auf der CAM eines ex ovo kultivierten Hühnerembryos. E: Entwicklungstag des Hühnerembryos.

Die HE-Färbung in Abbildung 40 (B und C) zeigt deutlich, dass sich das Tumorgewebe nach mehreren Transplantationen noch eindeutig von dem Gewebe der CAM unterscheidet, wodurch ausgeschlossen werden kann, dass durch die Transplantationen mit der Zeit nur noch CAM-Gewebe kultiviert wurde. Die Anwachsrate der weitertransplantierten Tumore lag bei über 70%.

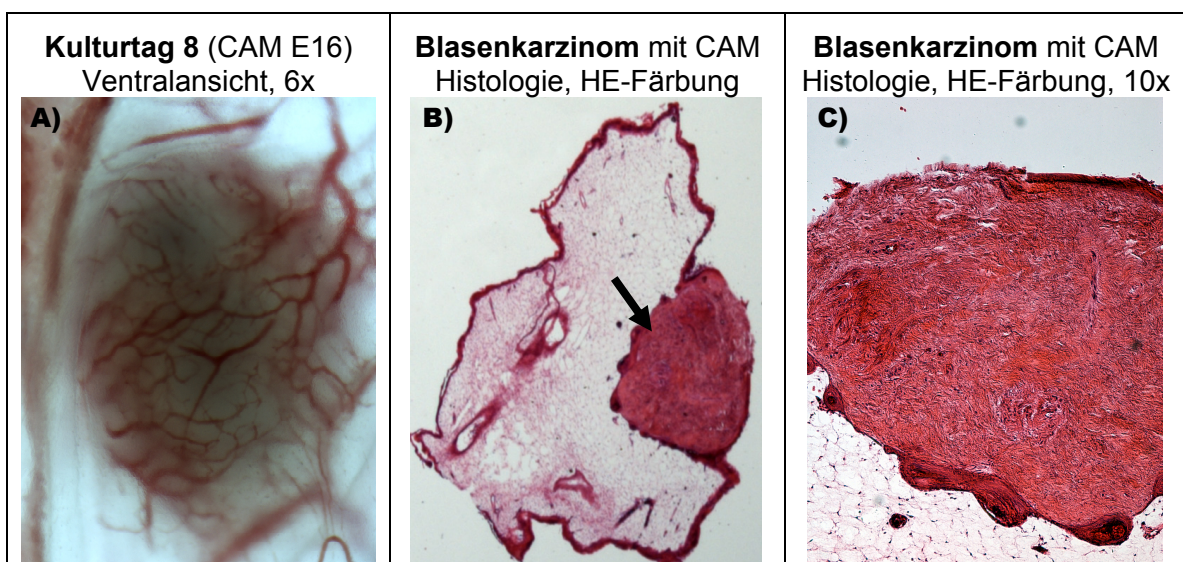


Abbildung 40: Wachstum eines transplantierten humanen Blasenkarzinoms auf der CAM eines ex ovo kultivierten Hühnerembryos: A) Blasenkarzinom mit starker Blutgefäßvernetzung der CAM (PFA-fixiert) Ventralansicht. E: Entwicklungstag des Hühnerembryos. B) Übersicht eines HE-gefärbten histologischen Schnitts von Blasenkarzinom auf CAM - schwarzer Pfeil deutet auf Tumor. C) Tumor in Nahansicht mit CAM im unteren Teil des Bildes.

3.6.3 Inokulation von Zellen auf die CAM

Zur Kontrolle des Überlebens von inokulierten Retinoblastomzellen auf der CAM sowie einer möglichen Invasion der Zellen in die CAM wurden PKH26-gefärbte Y79 Zellen 7 Tage lang auf der CAM mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops beobachtet. Hierfür wurden 20 μl mit 3×10^6 Zellen auf die CAM von 6 bis 10 Tagen alten Hühnerembryonen pipettiert.

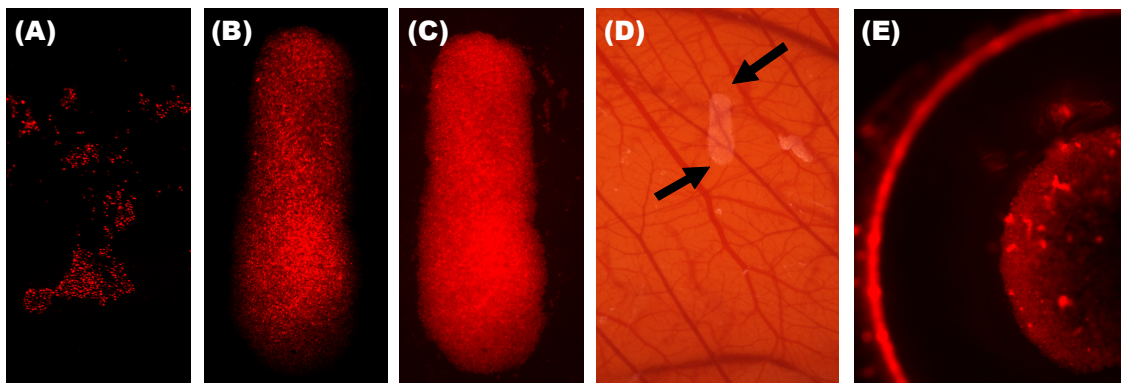


Abbildung 41: Bildung von Mikrotumoren auf der CAM. Fluoreszenzaufnahmen der mit PKH26-gefärbten Y79 Zellen (A-C und E). A) Kulturtag 0, B) Kulturtag 4, C) Kulturtag 7, D) Kulturtag 7 mit Aufsicht aufgenommen, schwarze Pfeile kennzeichnen das Ausmaß des Mikrotumors. E) Ausschnitt eines Plastikrings, in den gefärbte Y79 Zellen auf der CAM inokuliert wurden.

Abbildung 41 zeigt, dass auf die CAM inokulierte Retinoblastomzellen überleben und Mikrotumore bilden (A-C), die mit Fortschreiten der Kultivierung an Volumen zunehmen. Allerdings werden die Mikrotumore nicht, wie zuvor bei den humanen Tumoren beschrieben, an das Blutgefäßsystem der CAM angebunden und führen auch sonst keine Angiogenesereaktion herbei (D).

3.7 Injektion von Y79 Zellen in Hühnerembryonen-Augen

Eine weitere Möglichkeit, das Invasivitätsverhalten von Retinoblastomen zu untersuchen, stellen Experimente dar, bei denen die Retinoblastomzellen in das Auge von Mäusen, Ratten oder Kaninchen subretinal oder in die vordere Augenkammer injiziert werden (Chévez-Barrios et al., 2000; del Cerro et al., 1993; Gallie et al., 1977; McFall et al., 1977). Da jeder dieser Versuche ein Tierexperiment ist und aus diesem Grund für groß angelegte Studien zur Untersuchung von möglichen Kandidatengenomen nicht geeignet ist, wäre ein alternatives Modell wünschenswert. Aus diesem Grund wurde die Möglichkeit untersucht, Retinoblastomzellen ins Auge von Hühnerembryonen zu injizieren. Hierfür wurden 10 μl bis 20 μl einer Y79-Zellsuspension in einer Konzentration von 10^7 Zellen/ml sowie DMEM oder PBS als Kontrolle mit Hilfe einer Hamilton-

Mikrospritze mit 33-G Kanüle nach Möglichkeit durch die CAM in den Glaskörper von 6 bis 14 Tage alten Hühnerembryonen in *ex ovo* Kultur injiziert. Die Ergebnisse dieser Studien sind im Folgenden dargelegt.

Vier Tage nach der Injektion wurde bei einem Teil der Hühnerembryonen das Auge entnommen sowie Cornea und Linse entfernt, um einen freien Blick auf den Glaskörper und in das Auge zu erhalten.

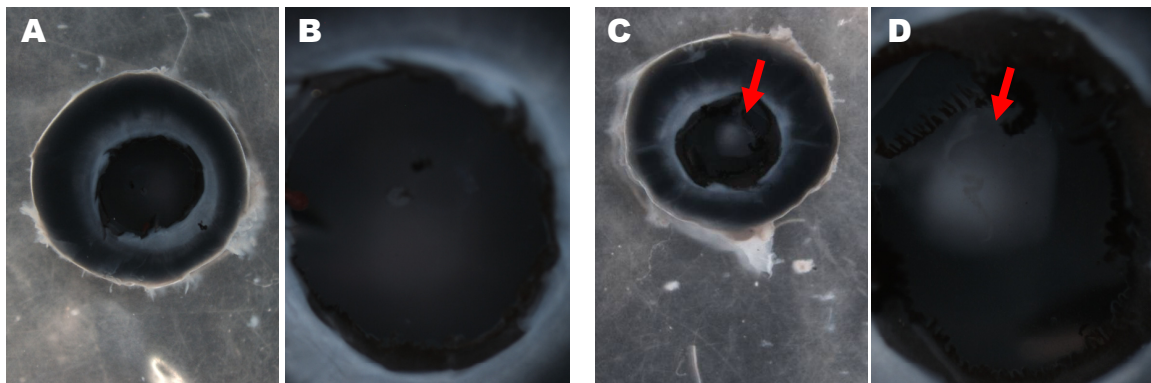


Abbildung 42: Hühneraugen nach dem vierten Tag der Injektion von PBS (A-B) bzw. von Y79 Zellen (C-D) in den Glaskörper. B bzw. D jeweils vergrößerter Ausschnitt. Roter Pfeil: Tumor.

Wie in Abbildung 42 gezeigt, weisen Augen, in die Zellen injiziert wurden, nach 4 Tagen Inkubation eine starke Tumorbildung im Glaskörper auf. Bei den jeweiligen Kontrollaugen, in die DMEM oder PBS gespritzt wurden, ist keine Trübung des Glaskörpers zu beobachten. In Kryoschnitten von Versuchen, bei denen PKH26-gefärbte Y79 injiziert wurden, konnten die „Zelltumore“ ebenfalls beobachtet werden.

Anhand der Fluoreszenzbilder in Abbildung 43G-I (siehe Seite 105) ist zu erkennen, dass neben der Tumorbildung auch eine Auffaltung der Retina durch Ablösen der Photorezeptorschicht vom Pigmentepithel erfolgte. Diese Auffaltung ist auch in HE-gefärbten Paraffinschnitten zu sehen. Weder in den Paraffinschnitten noch in den Kryoschnitten der Kontrollproben zeigt die Retina eine solche Auffaltung. In den HE-gefärbten Schnitten können die Y79 Retinoblastomzellen aufgrund ihrer Größe identifiziert werden, in den Fluoreszenzbildern durch rote Anfärbung der Zellen mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs PKH26. Die Fluoreszenzbilder zeigen eindeutig, dass die Retinoblastomzellen für die Auffaltung verantwortlich sind (siehe Abbildung 43G-I auf Seite 105). Die PKH26-gefärbten Tumorzellen liegen unterhalb der Auffaltungen der Retina.

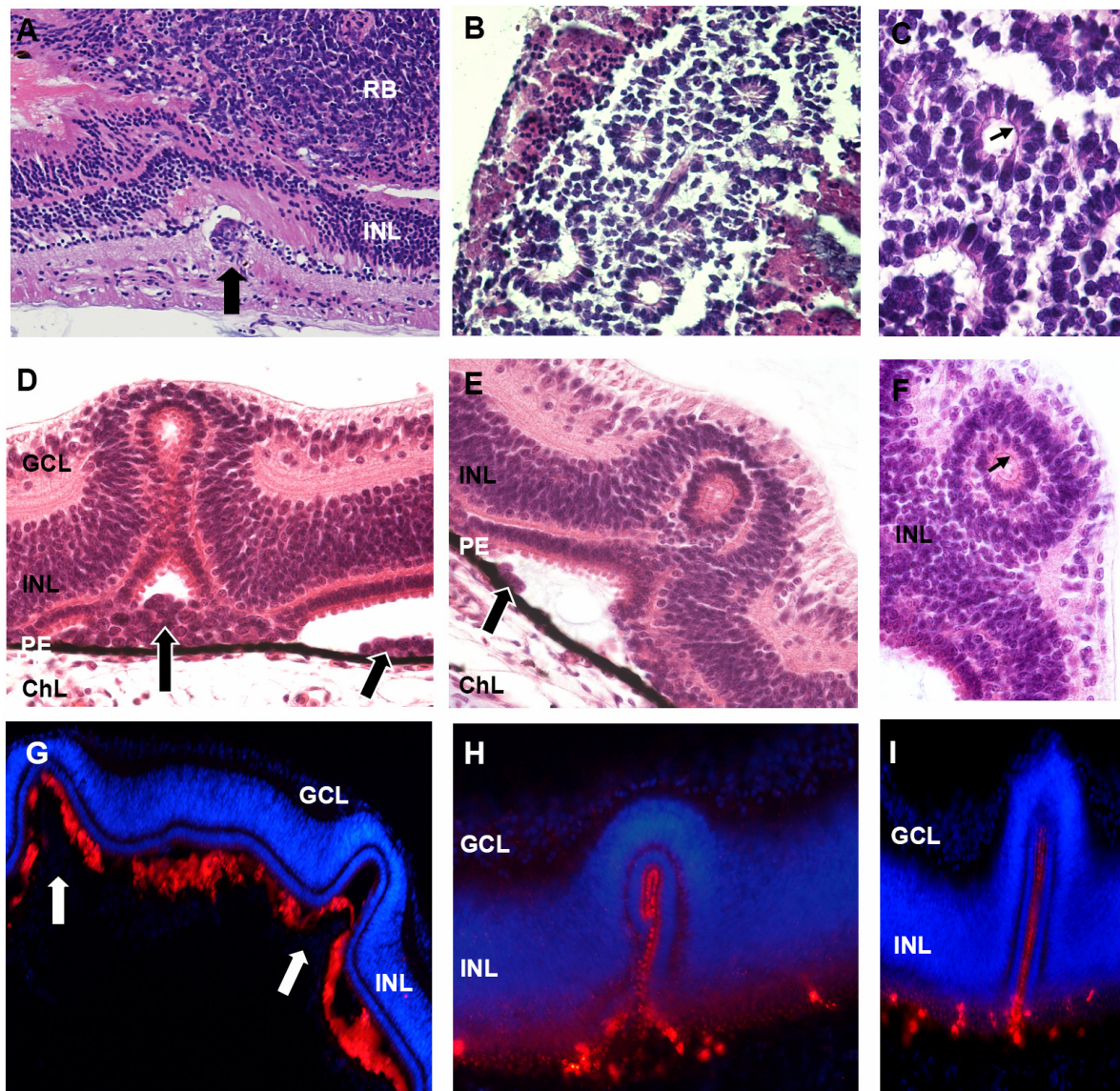


Abbildung 43: Ergebnisse der Injektion von Y79 Retinoblastomzellen in den Glaskörper von Hühnerembryonen anhand von HE-gefärbten Paraffinschnitten (D-F) und PKA26 gefärbten Y79 Zellen in Kryoschnitten (G-I) im direkten Vergleich mit der histologischen Pathologie des Retinoblastoms (A-C). A-C: Auffaltungen (breiter schwarzer Pfeil in A) und typische Flexner-Wintersteiner-Rosetten (B und C) in einem differenzierten Retinoblastom. D-I: Auffaltungen (D, weiße Pfeile in G) und rosettenartige Abschnürungen (E und F) in der Hühnerretina nach Injektion von Y79 Zellen (schwarze Pfeile in D und E; rot markierte Zellen in G-I) in den Glaskörper. Wie bei den rosettenförmigen Abschnürungen nach Injektion von Y79 Zellen in den Glaskörper, umschließen in den Flexner-Wintersteiner-Rosetten die Zellen ein nahezu freies Lumen, das feine zytoplasmatische Fortsätze enthält. Die Zellkerne liegen basal und apikal und werden durch eine Membran begrenzt, die der *Membrana limitans externa* (äußere Gliagrenzmembran) entspricht (kleine schwarze Pfeile in C und F). ChL: Aderhaut (choroideal layer); GCL: Ganglienzellschicht (*ganglion cell layer*); INL: innere nukleäre Schicht (*inner nuclear layer*); RB: Retinoblastom; PE: Pigmentepithel (*pigment epithelium*).

Zusätzlich ist innerhalb der Auffaltung sowie innerhalb der sich aus dem Retinagewebe gebildeten Rosetten eine rote Fluoreszenz sichtbar, die eindeutig auf die gefärbten Zellen zurückgeführt werden kann. Die HE-gefärbten Schnitte zeigen, wie in Abbildung 43D-F (siehe Seite 105) zu sehen, ebenfalls Vorstufen von Rosetten bzw. Abschnürungen aus dem Retinagewebe sowie vollständige Abschnürungen, die oberhalb der inneren Körnerschicht (INL) liegen und in Richtung Glaskörper gerichtet sind. Die nach der Injektion von Y79 Retinoblastomzellen in den Glaskörper beobachteten Auffaltungen und rosettenartigen Abschnürungen weisen eine große Ähnlichkeit mit sogenannten Flexner-Wintersteiner-Rosetten auf, wie sie für das differenzierte humane Retinoblastom beschrieben sind (Mietz et al., 1997). In Flexner-Wintersteiner-Rosetten umschließen die aus der Retina stammenden Zellen einen Hohlraum, in den dünne zytoplasmatische Fortsätze der Zellen hineinreichen. Sowohl in den HE-gefärbten Schnitten von Retinoblastomen (Abbildung 43A-C auf Seite 105) als auch in den HE-gefärbten Schnitten des Versuches liegen die Zellkerne der Abschnürung bzw. Rosetten basal. Apikal werden die Zellen von einer Membran begrenzt, die der Gliagrenzmembran (*Membrana limitans externa*) ähnlich ist (schwarze Pfeile in Abbildung 43C und F auf Seite 105). Bei ersten Vorversuchen mit WERI-Rb1 Zellen konnten die oben beschriebenen Strukturen sowie die Auffaltung der Retina nicht beobachtet werden.

3.7.1 Kultivierung von Hühneraugen auf der CAM

Beobachtungen aus den Versuchen im vorherigen Teilabschnitt, bei denen Retinoblastomzellen in den Glaskörper injiziert wurden, legen nahe, dass Retinoblastomzellen über die Aderhaut (Chorioidea) hinter die Retina gelangen, da keine Verletzungen der Retina beobachtet werden konnten, die außer der Injektionsstelle selbst, ein Eindringen der Zellen von der Glaskörperseite erklären würden. Eine mögliche Erklärung bietet ein bei Vögeln vorkommendes Plexus-ähnliches Gebilde, das beim Vogel in den Glaskörper hineinreicht und stark kapillarisiert ist. Es konnte in Kryoschnitten beobachtet werden, dass sich eine Anzahl von Y79 Zellen in der Nähe bzw. sich am Pecten angesiedelt hatten, jedoch konnte nie zweifelsfrei bewiesen werden, dass diese in den Pecten eindringen.

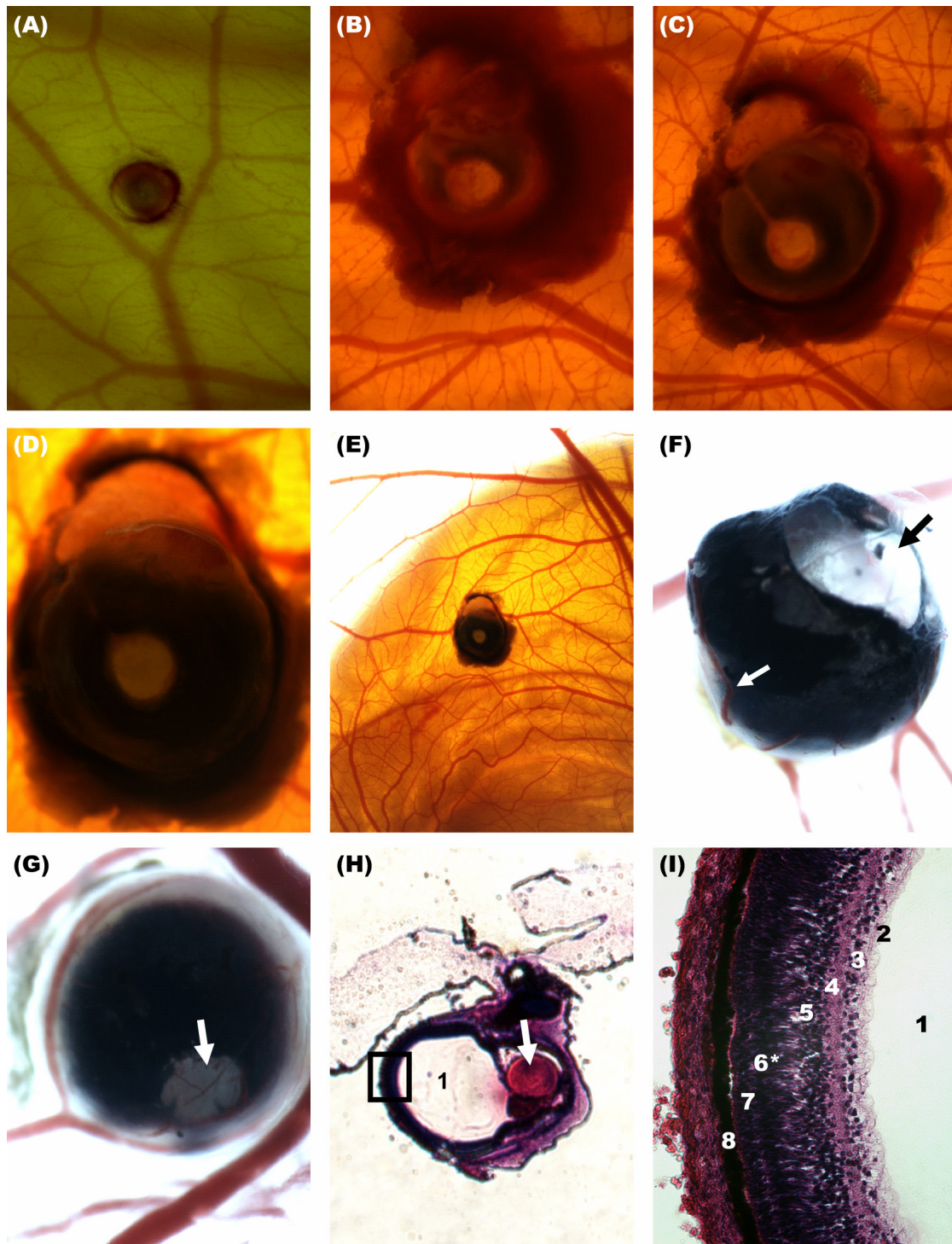


Abbildung 44: Entwicklung eines drei Tage alten embryonalen Hühnerauges auf der CAM: A) Kulturtag 0 (4x), B) Kulturtag 2 (4x), C) Kulturtag 4 (4x), D) Kulturtag 7 (4x), E) Kulturtag 7 (Übersicht), F) PFA-fixiertes Auge – Ventralansicht (unterhalb der CAM) weißer Pfeil zeigt auf Blutgefäß und schwarzer Pfeil auf Hornhaut, G) PFA-fixiertes Auge – Dorsalansicht (oberhalb der CAM) weißer Pfeil: Sicht auf CAM liegende Retina, H) Histologie – HE-Färbung (Übersicht), weißer Pfeil zeigt auf die Linse, 1: Glaskörper, I) markierter Bereich aus (H) mit 1: Glaskörper, 2: Nervenfaserschicht, 3: Ganglienzellschicht, 4: innere plexiforme Schicht, 5: innere Körnerschicht, 6: äußere plexiforme Schicht (* noch nicht voll ausgebildet), 7: äußere Körnerschicht, 8: Pigmentepithel.

Die Annahme, dass die Zellen über den Pecten in die Chorioidea gelangen, könnte nur durch eine Injektion von Y79 Zellen in den Glaskörper von Augen ohne Pecten und somit nur durch einen Tierversuch bestätigt oder widerlegt werden. Ein Ausweg aus dieser Situation wäre, ein Auge ohne Pecten, wie z. B. ein entnommenes Mausauge auf der CAM zu kultivieren. Aus diesem Grund wurden zunächst Augen von drei Tage alten Hühnerembryonen entnommen und auf der CAM kultiviert, um eine generelle Machbarkeit der Inokulation von Augen auf der CAM zu testen.

Die Ergebnisse und die Dokumentation dieser Versuche sind in der Abbildung 44 auf Seite 107 zusammengefasst. Die am dritten Embryonaltag noch pigmentlosen Augen entwickeln im Verlauf von sieben Tagen ein vollständiges Pigmentepithel, ein äußerlich morphologisch voll entwickeltes Auge (Abbildung 44A-E auf Seite 107), das am Blutgefäßsystem der CAM angeschlossen wird (Abbildung 44 F und G auf Seite 107). Anhand von HE-gefärbten Paraffinschnitten erfolgte eine morphologische Beurteilung des Auges mit Schwerpunkt auf der Retina (Abbildung 44H und I auf Seite 107). Abbildung 44 I zeigt, dass das auf der CAM gezüchtete Auge eine retinale Schichtung aufweist, die der eines altersmäßig vergleichbaren Kontrollauges entspricht. Auch die Linse und der Glaskörper sowie das Pigmentepithel sind korrekt ausgebildet (Abbildung 44H und I auf Seite 107). Da in ca. 50% bis 70% der Fälle die Kultivierung erfolgreich war, wurde mit der Kultivierung von Mausaugen auf der CAM begonnen.

3.7.2 Kultivierung von Mausaugen auf der CAM

Bei diesem Versuchsansatz wurden enukleierte Augen von Mäusen des postnatalen Tages 2 auf der CAM kultiviert. Die Wahl fiel auf dieses Stadium, da ab diesem Stadium bei einer normalen Retinaentwicklung der Erfolg des Versuches anhand der ab dem Postnataltag 2 entstehenden Schichtung der Retina nachvollziehbar ist. Die Kultivierung erfolgte hierbei, wie zuvor bei den Hühneraugen und den Tumoren beschrieben. Wie Abbildung 45 (siehe Seite 109) zeigt, wurde das Mausauge an das Gefäßsystem der CAM angeschlossen und auch eine Größenzunahme war zu verzeichnen. Allerdings zeigt der HE-gefärbte histologische Schnitt, dass die normale Morphologie der Retina nicht erhalten bleibt (siehe Abbildung 45C auf Seite 109). Ebenfalls ist eine Degradation der Linse sowie ein geschrumpfter Glaskörper zu sehen, der wahrscheinlich für die Entartung des Retinawachstums verantwortlich ist. Der erste Versuch der

Kultivierung von Mauseugen muss an diesem Punkt als gescheitert angesehen werden.

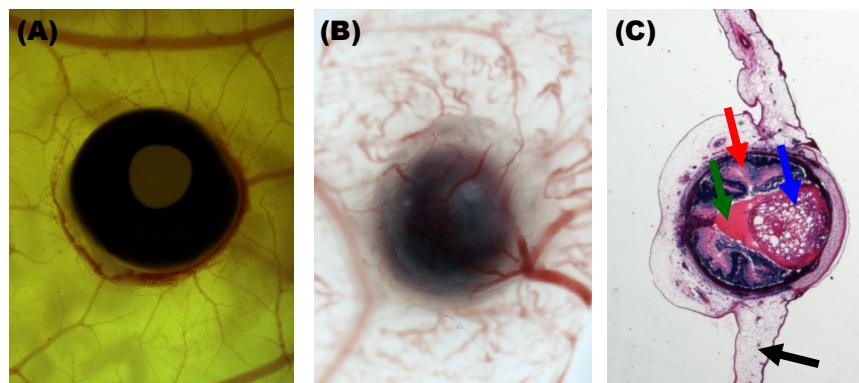


Abbildung 45: Kultivierung von P2 Mauseugen auf der CAM. A) Kulturtag 0, B) Kulturtag 5 (PFA-fixiert) Ventralansicht, C) HE-gefärbter histologischer Schnitt durch 5 Tage kultiviertes P2 Mauseuge – roter Pfeil: entartete Retina, grüner Pfeil: geschrumpfter Glaskörper, blauer Pfeil: degradierte Linse, schwarzer Pfeil: CAM.

3.7.3 Quantitativer Nachweis von humaner Alu-DNA mittels qPCR

Die qPCR Methode zum Nachweis von humaner Alu-DNA in der CAM ließ sich nicht für die Retinoblastomzelllinien bzw. für Y79 Zellen etablieren.

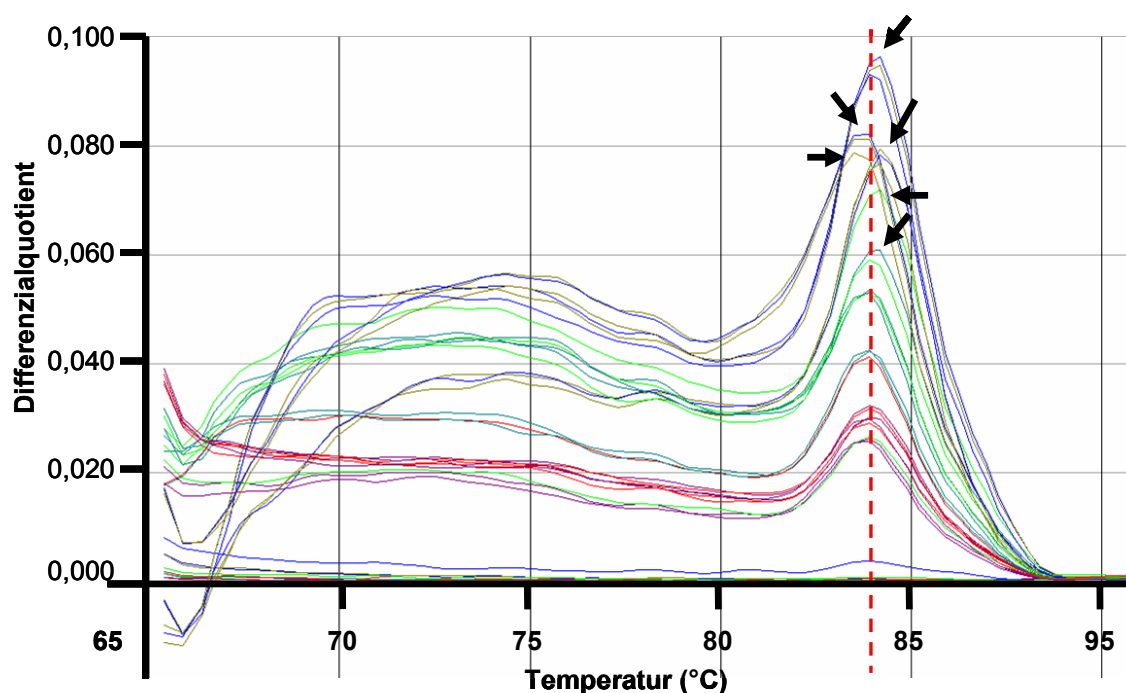


Abbildung 46: Beispiel für die verschiedenen Höhepunkte der Schmelzkurven bei der Alu-qPCR. Rote gestrichelte Linie zeigt die Temperatur an, bei der die meisten Höhepunkte der abgebildeten Schmelzkurven liegen. Schwarze Pfeile deuten auf Höhepunkte von Schmelzkurven, die vom Hauptwert abweichen.

Der Versuch der Etablierung erfolgte zunächst nur mit Hilfe der DNA, die aus den Y79 Zellen aufgereinigt worden war. CAM-DNA aus den Versuchen wurde nicht verwendet. Eine Variation der Zyklenzahl ergab selbst nach Erneuerungen aller Chemikalien und Lösungen positive Signale in den Nullproben. Eine Kontamination durch in der Luft befindliche humane Alu-DNA kann ausgeschlossen werden, da das Zusammenpipettieren aller Mastermixe und das Bestücken der Real Time PCR-Platte sowie das Versiegeln der Platte in einer RNA/DNA-Biocap durchgeführt wurden. Versuche, die mit 30 Zyklen durchgeführt wurden, zeigten kein Signal in der Nullprobe. Die Schmelzkurven zeigen bei 30 Zyklen keinen einheitlichen Peak, wie er bei nur einem PCR-Produkt zu erwarten wäre (siehe Abbildung 46 auf Seite 109) und sind eher plateauförmig als spitz. Kontrollen der PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese ergaben (siehe Abbildung 47), dass wie zu erwarten mehrere Produkte bei der PCR gebildet wurden. Keins dieser Produkte läuft auf der Höhe (224 bp) für ein Alu-PCR-Produkt, das in den Publikationen angegeben ist und erwartet wurde (Kim et al., 1998; Mira et al., 2002).

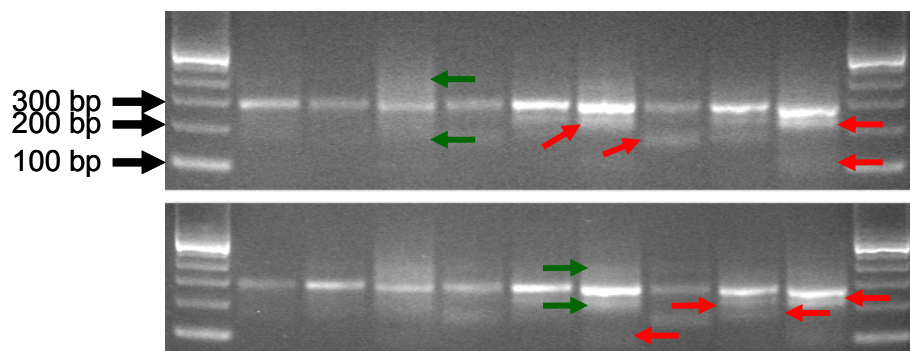


Abbildung 47: Gelelektrophorese der Alu-PCR Produkte. Y79 DNA in verschiedenen Verdünnungsreihen eingesetzt. Hauptprodukt bei ca. 300 bp. Mindestens vier Nebenprodukte (rote Pfeile) sowie Produktgradient (grüne Pfeile) im Gel sichtbar.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Dissertation war die Eingrenzung von Kandidatengenen, die zur Progression von Retinoblastomen mit einem Verlust von genomischem Material bzw. einem LOH auf Chromosom 16q und Metastasierung in den Glaskörper führen.

Dazu wurden die in einer Vorstudie (Gratias et al., 2007) definierten LOH-Bereiche mit Hilfe einer SNP-Analyse weiter eingegrenzt und mögliche Kandidatengene anhand eines Expressionsmikroarrays der Mausretinaentwicklung identifiziert.

Mit dem *ex ovo* CAM-Modell wurde zudem ein *in vivo* Testsystem für die Untersuchung dieser Kandidatengene etabliert sowie für zukünftige Untersuchungen an primären Retinoblastomen erweitert.

Da die richtige Zuordnung der Gene zu ihren Positionsangaben für die folgende Diskussion von elementarer Bedeutung ist, wird an diesem Punkt nochmals darauf hingewiesen, dass sich alle Positionsangaben der Gene sowie die Anzahl der Gene auf die *Ensembl Version 52* (release Dec 2008) beziehen. Diese Version nutzt den Referenzdatensatz NCBI36 für Gene von *Homo sapiens*. Dieser Referenzdatensatz stammt aus 2005 von dem *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) Genome Projekt (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genomeprj&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=9558) und ist die 36. Version. Seit Februar 2009 nutzt Ensembl den Referenzdatensatz GRCh37 von dem *Genome Reference Consortium* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc/index.shtml>), bei dem sich die Positionsangaben erheblich von denen des NCBI36 Referenzdatensatzes unterscheiden. Aus diesem Grund können die in dieser Dissertation beschriebenen Positionsangaben in den neuen Versionen von Ensembl nicht genutzt werden. Die Version 52 ist weiterhin bei Ensembl als Archiv Version online verfügbar (siehe Ensembl release 52, Dec 2008 im Literaturverzeichnis).

4.1 LOH-Analyse

Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse der LOH-Untersuchung mit Hilfe einer hochauflösenden SNP-Array-Analyse definieren einen Bereich von 6,6 MB als minimale LOH-Region (snpLOH) auf dem Chromosom 16q, die sich von ca. 81,4 Mb bis 88,0 Mb erstreckt und 86 Gene beinhaltet. Dieses Ergebnis bestätigt das Ergebnis von Gratias et al. 2007 und widerlegt, ebenso wie die Ergebnisse

von Gratiás et al. 2007, die Ergebnisse von Marchong et al. 2004. Marchong hatte mit Hilfe von Mikrosatelliten Markern eine Region von ca. 60,9 Mb bis 81,5 Mb als LOH-Bereich definiert (Marchong et al., 2004). Die LOH-Analyse von Gratiás et al. 2007 basierte unter anderem auf der STR-PCR Analyse, die als Ausgangspunkt dieser Arbeit diente. Der von Gratiás et al. 2007 definierte LOH-Bereich (*minimal deleted region*) weist 104 Gene auf. Dies sind 18 Gene mehr als die, die in der vorliegenden Arbeit in der snpLOH-Region bestimmt wurden. In Gratiás et al. 2007 konnten 64 der 104 Gene mit Hilfe des *GeneChip® Human Genome U133A Arrays* in einer Expressionsstudie von Retinoblastomen untersucht werden. Die in Gratiás et al. 2007 verwendeten Daten aus dieser Expressionsstudie wurden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls für die Eingrenzung der möglichen Kandidatengene verwendet, nachdem diese mit Hilfe der Expressionsstudie zur Retinaentwicklung der Maus aus den 86 Genen der snpLOH-Region eingegrenzt worden waren. Ebenso wie in Gratiás et al. 2007 wurden aus den 35 möglichen Kandidatengenen mit Hilfe des *Mann-Whitney-U-Tests* diejenigen Gene bestimmt, deren Expression in Retinoblastomen mit und ohne 16q LOH signifikant unterschiedlich sind. Interessanterweise ist ein Großteil der Gene, die von Gratiás et al. 2007 als signifikant unterschiedlich reguliert identifiziert worden sind, auch während der Mausretinaentwicklung in deren orthologen Gegenstücken signifikant reguliert. Von den Genen innerhalb der snpLOH-Region wären nach Gratiás et al. 2007 nur 15 Gene mögliche Kandidatengene. Darunter befinden sich vier Gene (FBXO31, APRT, GALNS und ANKRD11), die nicht im Ergebnisteil der vorliegenden Dissertation aufgelistet sind. GALNS und FBXO31 sind die einzigen Gene der 15 von Gratiás et al. innerhalb der snpLOH-Region beschriebenen Gene, die während der Mausretinaentwicklung nicht signifikant reguliert sind. Zusätzlich detektiert das *probe set* auf den *GeneChip® Human Genome U133A Array* für FBXO31 (222352_at) nach Ensembl eine nicht kodierende Region auf dem Chromosom 16, die vor FBXO31 (85920445 bp bis 85974877 bp) liegt. Die am weitesten distal gelegene Probe von 222352_at auf Chromosom 16q ist auf Höhe von 85918483 bp lokalisiert (http://dec2008.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/Genome?ftype=OligoFeature;id=222352_at). Die Gene APRT und ANKRD11 sind während der Mausretinaentwicklung reguliert. Sie weisen nach dem mit GraphPad Prism 4.0 durchgeführten *Mann-Whitney-U-Test* aber keinen signifikanten Unterschied in der Expression von Retinoblastomen mit

und ohne 16q LOH auf. Ebenfalls unterscheiden sich die p-Werte, die einen signifikanten Unterschied in der Expression von Retinoblastomen mit und ohne LOH anzeigen, für die Gene, deren Expression sowohl in dieser Doktorarbeit als auch in Gratias et al. als signifikant unterschiedlich für Retinoblastome mit und ohne 16q LOH klassifiziert worden sind. Eine mögliche Erklärung könnte in der Verwendung des *affy* Pakets von Bioconductor für die Berechnung der Expressionswerte liegen. Die *affy* Pakete werden mit jeder neuen Version von Bioconductor auf den aktuellsten Stand gebracht. Zusätzlich entspricht der MAS5 Algorithmus dem offiziellen Affymetrix Algorithmus nicht vollständig (Irizarry et al., 2009), da nur die Grundidee des Algorithmus von Affymetrix bekannt ist, aber nicht die genauen Berechnungsstrategien für die Berechnung der relativen Expressionswerte (*signal values*) aus den Intensitätswerten der *cel*-Datei. Affymetrix hat bei seinem Umstieg von GCOS auf die *Expression Console Software* ebenfalls ihre Berechnungsstrategie geändert. Diese Umstellung führt bei der Berechnung der relativen Expressionswerte zu einem Unterschied, der kleiner als 10% ist (http://www.affymetrix.com/support/help/faqs/expression_console/faq_6.jsp). Aus diesem Grund kann ein minimaler Unterschied bei der Berechnung der p-Werte sowie der Medianwerte der relativen Expression bestehen und zu unterschiedlichen Signifikanzen in der Genregulation führen, wie es hier der Fall ist. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Unterschiede könnte eine Anpassung des *Chip Description File* (CDF) an die aktuelle Lokalisation der Gene im Genom sein. Der CDF enthält die Informationen über die Lage und Zuordnung der einzelnen *probes* zu einem *probe set* und somit die Definition aus welchen Intensitätswerten ein relativer Expressionswert berechnet wird. Allerdings wurde für diese Möglichkeit kein Hinweis auf der Bioconductor oder Affymetrix Homepage gefunden, wobei seit der Umstellung der Affymetrix Homepage Ende 2007 nicht mehr alle und vor allem ältere Beschreibungen und Handbücher sowie Erläuterungen zur älteren Software nicht abrufbar sind oder auf die asiatische Homepage führen. Die Gene HSBP1, KIAA0182, MTHFSD, BANP und CBFA2T werden aus den oben diskutierten Gründen in dieser Arbeit im Gegensatz zu Gratias et al. 2007 als signifikant unterschiedlich in Bezug auf ihre Expression von Retinoblastomen mit und ohne 16q LOH detektiert. Letztendlich ist die Anzahl der 26 möglichen Kandidatengene in der snpLOH-Region höher als die Anzahl, die für diese Region aus der

Publikation von Gratiyas et al. 2007 hervorgegangen ist. Allerdings beinhaltet die in der vorliegenden Arbeit erstellte Liste der möglichen Kandidatengene auch Gene, die aufgrund von Faktoren wie Detektion von mehreren Genen durch das jeweilige *probe set* oder Gene, die auf keinem der verwendeten Mikroarrays vorhanden waren. Solche Faktoren wurden in der Veröffentlichung von Gratiyas et al. 2007 nicht berücksichtigt. Zusätzlich müsste die Anzahl der möglichen Kandidatengene auf 21 Gene reduziert werden, wenn man die Definition eines Tumorsuppressorgens auf die möglichen Kandidatengene anwendet, da 5 Gene (USP10, KIAA0182, ZCCHC14, BANP und CBFA2T3) höher als die humane Retinaprobe exprimiert sind. Diese Probe stellt allerdings eine adulte Retinaprobe dar und lässt somit keine Aussage über das Expressionslevel eines Gens während der Retinaentwicklung oder allgemein von kindlicher Retina zu. Diese Gene sollten ebenfalls als potenzielle Kandidatengene betrachtet werden, da die orthologen Gene innerhalb der Retinaentwicklung der Maus signifikant reguliert sind.

Die LOH-Regionen mit minLOH-Bereichen innerhalb des snpLOH zeigen auf, dass noch weiteres Potenzial in der Eingrenzung der Kandidatengenregion mittels SNP-Array existiert. Affymetrix ist mit dem *Genome-Wide Human SNP Array 6.0* schon drei SNP-Array Generationen weiter als der in dieser Arbeit verwendete *GeneChip® Human Mapping 250K Sty Array*. Die neueste Generation an SNP-Arrays bietet die Möglichkeit statt mit ca. 238000 SNPs (*GeneChip® Human Mapping 250K Sty Array*) das Genom mit über 1,8 Millionen genetischen Markern zu untersuchen. Eine so hohe Auflösung des Genoms wäre für die beiden untersuchten Retinoblastome M24794 und M16607 von wissenschaftlichem Interesse, da diese beiden Tumore für die minLOH-Bereiche mit nicht eindeutigen Informationsgehalt verantwortlich sind. Zusätzlich wurde die Probe M24794 mit dem *GeneChip® Human Mapping 50K Array Xba240* analysiert, die eine ungefähr fünffach niedrigere Auflösung des Genoms aufweist als der *GeneChip® Human Mapping 250K Sty Array*.

Für das Retinoblastom ist noch keine Veröffentlichung vorhanden, in der der Bereich auf Chromosom 16q näher mit SNP-Arrays untersucht wurde. Walker et al. (2006) konnten bei 5 von 30 Fällen von multiplen Myelomen einen vollständigen Verlust von Chromosom 16q mit Hilfe von *GeneChip Mapping 50K Xba 240 Arrays* nachweisen (Walker et al., 2006). Gorrington et al. (2009)

untersuchte 50 Proben des Ovarialkarzinoms mittels GeneChip® Human Mapping 250K Sty und / oder 250K Nsp Arrays und 72 Ovarialkarzinome mit *Genome-Wide Human SNP Array 6.0*. In 35,8% der untersuchten Fälle konnte ein minimales LOH in einer Region von 80,54 Mb bis 81,7 Mb nachgewiesen werden, die Cadherin 13 (human: CDH13 bzw. murin: Cdh13) beinhaltet (Gorringe et al., 2009). Die Vermutung, dass CDH13 bei Ovarialkarzinomen eine Rolle spielen könnte, vertrat Kawakami bereits 1999 nach einer Analyse mit Hilfe von STR-Markern bzw. polymorphen Markern (Kawakami et al., 1999). Des Weiteren konnten in Proben von Gallenblasenkarzinomen (Matsuo et al., 2002) und Lungenkrebs (Sato et al., 1998) LOH-Bereiche auf Chromosom 16q bestimmt werden, bei denen CDH13 betroffen war.

Einen Hinweis für die besondere Rolle von CDH13 bei der Progression des Retinoblastoms zeigen die Ergebnisse, die in der vorliegenden Arbeit durch partielle LOH-Analyse mit Hilfe des selbst geschriebenen Programms gewonnen wurden. Mithilfe dieser Analyse konnte hier gezeigt werden, dass 8 von 8 Tumoren ein partiales LOH innerhalb des kodierenden Bereichs von CDH13 aufweisen. Zwischen diesen beiden partialen LOHs liegt eine noch nicht weiter charakterisierte ncRNA.

4.2 Cadherin 13

Cadherin 13 gehört zur Superfamilie der Cadherine und ist eines der Cadherine des Cadherin-Clusters auf Chromosom 16q. Bekannte Synonyme für CDH13 sind H-(heart)-Cadherin und T-(truncated)-Cadherin. Es ist das einzige Cadherin, das weder eine zytoplasmatische noch eine Transmembrandomäne aufweist, sondern über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker an die Zellmembran gebunden ist. CDH13 bildet nur schwache Zell-Zell-Kontakte, die für die sogenannten klassischen Cadherine typisch sind. Cadherine allgemein spielen eine Rolle bei der dynamischen Regulation von morphogenen Prozessen bei der Entwicklung und der Gewebsintegrität (Ivanov et al., 2001). Für Cadherin 13 konnte gezeigt werden, dass es das Wachstum von Axonen inhibiert (Fredette et al., 1996) sowie ein negativer Regulator für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF, *Epidermal Growth Factor*) in humanen Neuroblasten- und Neuroblastomazellen ist (Takeuchi et al., 2000; Takeuchi und Ohtsuki, 2001). Chan et al. (2008) konnten zeigen, dass 32% bis 38% der 42 untersuchten Leberzellkarzinomproben ein LOH in dem Locus von CDH13 aufweisen und eine hohe Korrelation zwischen diesen

Ergebnissen und den durchgeführten Expressionsanalysen von CDH13 besteht. Sie schließen daraus, dass der Allelverlust von CDH13 ein kritischer Mechanismus in der Runterregulation von CDH13 in Leberkarzinomen ist (Chan et al., 2008).

Die Expressionsanalysen in dieser Dissertation zeigen, dass Cdh13 signifikant in der Retinaentwicklung der Maus reguliert ist und in allen Retinoblastomzelllinien stark runterreguliert ist. Im Gegensatz dazu demonstrieren Marchong et al. (2004) eindrucksvoll, dass trotz einer LOH-Rate von ca. 39% im Marker von CDH13 (D16S422) sowohl die Expression von CDH13 bzw. Cdh13 mRNA (Standard-PCR) und Protein (Immunoblot) in humanen Retinoblastomen und Retinoblastomzelllinien sowie humaner gesunder Retina als auch in Mäuseretinoblastomen und adulter Mausretina einheitlich exprimiert sind. Die Autoren schließen daraus, dass CDH13 weder in humanen noch Cdh13 im murinen Retinoblastom involviert sind (Marchong et al., 2004). Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation auf Grundlage der qPCR-Analyse von fünf verschiedenen Retinoblastomzelllinien, von denen nur Y79, WERI-Rb1 und RBL 247C3 in der Veröffentlichung von Marchong et al. verwendet wurden, zeigen sowohl im Vergleich untereinander als auch im Vergleich mit einer gesunden humanen Retinaprobe, dass CDH13 signifikant unterschiedlich exprimiert wird. Des Weiteren ist CDH13 in den Zelllinien im Vergleich zur humanen Probe mindestens um das 60-fache runterreguliert. Zusätzlich zeigt die Probe Retinoblastom 1 eine signifikant niedrigere Expression von CDH13 als die humane Probe. Diese Probe ist aber im Vergleich zu den Retinoblastomzelllinien um mehr als 40-fach höher exprimiert. Des Weiteren konnte in eigenen Vorstudien gezeigt werden, dass innerhalb der Mausretina offenbar verschiedene Varianten des Cdh13 Proteins existieren, die während der Mausretinaentwicklung jeweils unterschiedlich in den verschiedenen Stadien exprimiert werden. Diese Varianten entsprechen 4 sichtbaren Banden (130 kDA, 110 kDA, 95 kDA und 55 kDA) im Immunoblot. Je nach Literatur werden Western-Banden für CDH13 auf der Höhe von 130 kDA und 105 kDA (Niermann et al., 2000; Philippova et al., 2006; Riou et al., 2006) sowie 120 kDA, 100 kDA und 95 kDA (Ranscht und Dours-Zimmermann, 1991; Vestal und Ranscht, 1992) beschrieben. Die Höhe der Banden von CDH13 in der Publikation von Marchong et al. können nicht benannt und dem Immunoblot nicht eindeutig entnommen werden, da zum einen die

Banden des mitgeführten Standards nicht vollständig beschriftet sind und in einem Fall CDH11, CDH13 und β -Tubulin auf einem Immunoblot mit Antikörpern zusammen nachgewiesen wurden. Im Falle der mRNA sind nur die PCR-Agarosegele der murinen Retinoblastome mit einer adulten Mausretina- und Mausgehirnprobe gezeigt. Die Intensität der PCR-Bande der adulten Retinaprobe ist um ein Vielfaches niedriger als die Banden von den murinen Retinablastomen und der Gehirprobe. Im Falle des Verhältnisses der Expression von Cdh13 zwischen muriner Gehirprobe und der adulten murinen Retinaprobe entspricht dieses Ergebnis den Ergebnissen aus der qPCR Analyse der vorliegenden Dissertation. Aus der qPCR Analyse geht hervor, dass der Expressionsunterschied von Cdh13 zwischen einer adulten murinen Retinaprobe und einer adulten murinen Gehirprobe mehr als das 10-fache beträgt. Dieser Expressionsunterschied von Cdh13 wäre demnach auch zwischen den murinen Retinoblastomproben und der adulten murinen Retinaprobe in der Publikation von Marchong et al. gegeben, wodurch er im Widerspruch mit der in Marchong et al. getätigten Aussage steht, dass alle humanen und murinen Retinoblastome sowie Retinoblastomzelllinien ein normales Level der Expression von CDH13 bzw. Cdh13 aufweisen (Marchong et al., 2004).

Die mögliche Rolle von CDH13 bei der Progression des Retinoblastoms kann durch die in dieser Doktorarbeit erzielten Ergebnisse gefestigt werden. Es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob eine teilweise oder vollständige Runterregulation zur Glaskörperaussaat führt. In der Literatur sind allerdings Fälle mit anderen Tumorentitäten beschrieben, in denen eine Runterregulation von CDH13 zur verstärkten Metastasierung bzw. Invasivität führte bzw. eine Überexpression diese abschwächte, wenn nicht sogar unterband. Schon 1996 konnte Lee zeigen, dass eine Transfektion von humanen Brustkrebszellen, die CDH13 nicht konstitutionell exprimieren, mit einem CDH13 Expressionsvektor zur Abnahme der Invasivität der Zellen *in vitro* (Lee, 1996) führten. In einer zwei Jahre später veröffentlichten Studie von Lee et al. (1998) führte die subkutane Transplantation von Brustkrebszellen, die mit CDH13 transfiziert worden waren, in Nacktmäusen zu einer verminderten Tumorbildung (Lee et al., 1998). Eine erhöhte Invasivität von Hypophysenadenomen konnte bei einer reduzierten Expression von CDH13 beobachtet werden (Qian et al., 2007). Hebbard et al. (2008) zeigten mittels einer Cdh13 Knockout-Maus, dass ein Verlust von Cdh13 zwar die Tumorbildung und

das Tumorwachstum reduziert, aber zu einer Zunahme an Metastasen führt (Hebbard et al., 2008). Des Weiteren demonstrierte eine kürzlich veröffentlichte Studie, dass der Knockdown von CDH13 mittels siRNA die Invasivität von Melanozyten signifikant erhöht, wohingegen eine Überexpression von H-Cadherin die Migration und Invasivität dieser Zellen herabsetzt und das Tumorwachstum vermindert (Kuphal et al., 2009). Unabhängig vom Zellmodell stellten Chan et al. und Huang et al. fest, dass durch Wiederaufnahme der Expression von CDH13 die Zellbewegung eingeschränkt wird und zu einem G2/M Zellzyklusarrest führt (Chan et al., 2008; Huang et al., 2003).

Es spricht vieles dafür, dass CDH13 eine Schlüsselrolle in der Progression von Tumoren hat. Inwieweit dies für das Retinoblastom gilt und inwieweit CDH13 an der Entstehung von Metastasen oder bei einer erhöhten Invasivität beteiligt ist, können nur weitere Studien in diesem Forschungsfeld klären. Diese Dissertation verdeutlicht, dass Cadherin 13 während der Retinaentwicklung der Maus signifikant reguliert ist. Des Weiteren ist es eins von 26 möglichen Kandidatengenen, die in einer Region liegen, die in einer Vielzahl von Tumoren identifiziert worden und im Falle des Retinoblastoms stark mit einer Glaskörperaussaat korreliert ist.

4.3 COX4NB, COX4I1, KIAA0513, KIAA1607, SLC7A5 und ZDHHC7

Keines der weiteren sechs Gene (COX4NB, COX4I1, KIAA0513, KIAA1607, SLC7A5 und ZDHHC7), deren relative Expression aus den Mikroarraydaten der vorliegenden Doktorarbeit mit denen der qPCR Analyse auf ihrer Richtigkeit hin überprüft worden ist, scheint unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur bei Tumorentstehung und Tumorprogression eine so große Rolle zu spielen wie Cadherin 13. Slc7a5 ist zwar im Zusammenhang bei der Invasivität von Tumoren involviert, zeigt dort aber nicht die zu erwartende Herunterregulation wie man es für ein Kandidatengen mit Tumorsuppressorgeneigenschaften in einer LOH-Region erwarten würde. SLC7A5, häufig in der Literatur als LAT1 bezeichnet, kodiert für ein Protein, das als Transporter für große neutrale Aminosäuren wie z. B. Tyrosin oder Phenylalanin dient. In einem Großteil der humanen Tumore ist die erhöhte Expression des Gens mit einer hohen Invasivität und Metastasenbildung korreliert (Kaira et al., 2008; Kobayashi et al., 2008; Tamai et al., 2001). Aus diesem Grund fungiert das Proteinprodukt von SLC7A5 als

Marker für z. B. hochgradig bösartigen Prostatakrebs (Sakata et al., 2009) oder Urothelkarzinom (Eltz et al., 2008). Die Korrelation der hohen Expression in Zusammenhang mit einer hohen Invasivität steht im Widerspruch mit den in dieser Doktorarbeit gezeigten Runterregulationen sowohl in Retinoblastomen mit als auch ohne LOH bezogen auf die Expression der humanen Retinaprobe. Derselbe Widerspruch ergibt sich für COX411, das in der einzigen Publikation, bei der es im Zusammenhang mit Plattenepithelkarzinom steht, überexprimiert ist (Dang et al., 2006). Über den Expressionsstatus der vier Gene COX4NB, KIAA0513, KIAA1607 und ZDHHC7 ist im Zusammenhang mit Tumoren in der aktuellen Literatur nichts bekannt.

Aufgrund dieser fehlenden Literaturbelege für einen niedrigen Expressionsstatus während der Progression von Tumoren sowie der falsch positiven Ergebnisse in der *Comparison* Analyse und dem abweichenden zeitlichen Verlauf der relativen Expressionswerte in der Mikroarrayanalyse, bezogen auf die sensitivere qPCR Analyse, standen die Gene COX4NB, COX411, KIAA1607, SLC7A5 und ZDHHC7 nicht im Mittelpunkt der Untersuchungen dieser Doktorarbeit. Im Gegensatz dazu stimmen die Ergebnisse der *Comparison* Analyse, qPCR und Mikroarrayanalyse bei den Genen KIAA0513 und CDH13 überein. Ziel zukünftiger Forschungsvorhaben wird die Charakterisierung von KIAA0513 und Cadherin 13 im Zusammenhang mit der Progression bei Retinoblastomen mit Schwerpunkt auf Metastasierung und Invasivität sein. Dabei wird das besondere Augenmerk zunächst auf der Rolle von Cadherin 13 für die Progression des Retinoblastoms liegen.

4.4 Etablierung und Eignung des CAM-Systems

In der vorliegenden Dissertation wurde ein *in ovo* und *ex ovo* CAM-Modell als *in vivo* Testsystem für die Invasivität von Retinoblastomzellen und die zukünftige Analyse von primären Retinoblastomen etabliert (Dohle et al., 2009, siehe CD 1). Die im Material und Methodenteil beschriebene und durch den Autor der Doktorarbeit im Labor etablierte *in ovo* Kultur, birgt durch das Aufsägen des Eies am stumpfen Ende nach ca. dreitägiger Bebrütung folgende Vorteile zu den in den Publikationen von z. B. Armstrong et al. 1982 oder Deryugina und Quigleyj 2008 beschriebenen Methode mit Hilfe eines Lochs bzw. Fensters: i) das Ei muss nicht wie bei länger bebrüteten Eiern, bei denen sich die CAM ausgebildet hat, durchleuchtet werden, wodurch für die Versuche auch braune Eier verwendet

werden können, ii) durch das Aufsägen am stumpfen Ende des Eies, an dem sich die Luftkammer des Eies befindet, wird die maximal mögliche Fläche innerhalb des Eies und somit zu der CAM für Manipulationen zugänglich gemacht, iii) das Gefäßsystem des Embryos ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht so verletzungsempfindlich wie ab Tag 4 oder später die entwickelte CAM, wodurch sich das Erstellen einer *in ovo* Kultur bei ausreichender Erfahrung auf 2 min bis 3 min pro Ei beschränkt, iv) die hohe Überlebensrate von über 99% lässt eine zuverlässige Planung eines Experimentes zu. Der Nachteil der *in ovo* Kultur ist, wie in Dohle et al. 2009 beschrieben, die schlechte Dokumentationsmöglichkeit, da es z. B. beim Ausleuchten eines transplantierten Tumors zu ungewollten Reflexionen kommt. Eine bessere Dokumentationsmöglichkeit von Versuchen bietet das *ex ovo* Modell. Zusätzlich ist die Fläche der CAM, die für Experimente zugänglich ist, im Vergleich zur oben genannten *in ovo* Kultur um mindestens das Vierfache erhöht. Allerdings ist die Überlebensrate mit 50% bis 70% (Dohle et al., 2009) der aufgeschlagenen Eier deutlich niedriger als bei der *in ovo* Kultur, wodurch bei der Planung eines Experiments die doppelte Menge an benötigten Eiern eingeplant werden sollte.

4.4.1 Inokulation von Allo- und Xenotransplantaten

Die Allo- und Xeno-Transplantationstechnik von Geweben auf die CAM wurden, wie von Bradley (1969) und Hall (1978) vorgeschlagen (Bradley, 1970; Hall, 1978), anhand von Extremitätenknospen von Hühner- und Mäuseembryonen erlernt und konnte auf die Kultivierung von Hühneraugen auf der CAM ausgeweitet werden. Die Entwicklung von 3-Tage-alten Augen von Hühnerembryonen auf der CAM konnte anhand der Größenzunahme und der Bildung des Pigmentepithels verfolgt werden. Wie die Bilder von einem HE-gefärbten histologischen Schnitt eines kultivierten Auges im Ergebnisteil der vorliegenden Dissertation zeigen, wächst und entwickelt sich das Auge morphologisch richtig. Entscheidender ist für die Thematik dieser Doktorarbeit, dass anhand der Schichtung der Retina die richtige Entwicklung der Retina dargelegt wird. Die Kultivierung von P2 Mausaugen auf der Retina ist diesbezüglich nicht gelungen. Zurzeit werden verschiedene Strategien ausgetestet, die zu einem positiven Ergebnis führen. Es wurde beobachtet, dass murine Augen im Gegensatz zu Tumoren mindestens 3 Tage benötigen, bis sie an das Gefäßsystem der CAM angeschlossen werden. Daher wird mit Hilfe von VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) versucht, den

Anschluss des transplantierten Mauseuges zu beschleunigen. Zum anderen wird der Ansatz verfolgt, Augen von embryonalen statt postnatalen Entwicklungsstadien über mehrere Generationen von *exo ovo* Kulturen zu kultivieren.

Wie in der vorliegenden Arbeit und in Dohle et al. 2009 dokumentiert, ist die Kultivierung von unterschiedlichen humanen Tumoren (Blasenkarzinom; Melanom) ebenfalls mit Erfolg durchgeführt worden. In Übereinstimmung mit der Arbeit von Kunzi-Rapp et al. (2001) erfolgte in den in dieser Doktorarbeit durchgeführten Experimenten der Anschluss der Tumorproben an das Blutgefäßsystem der CAM nach zwei Tagen, (Kunzi-Rapp et al., 2001), wodurch spätestens ab diesem Zeitpunkt eine Versorgung der Tumorprobe gesichert ist. Die Autoren konnten diese Tatsache nicht nur visuell und anhand von histologischen Schnitten der verwendeten Melanome zeigen, sondern sie konnten auch Erythrozyten des Hühnerembryos im Tumorgewebe nachweisen (Kunzi-Rapp et al., 2001). Des Weiteren stellten Kunzi-Rapp et al. (2001) nach drei Tagen Kultivierung der Melanome erste Tumorzellen im CAM-Gewebe sowie im Gefäßsystem der CAM in der Nähe des Tumors fest. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen, die Demir et al. (2008) bei durch Hypoxie induzierter höherer Invasivität von Kolonkarzinomen in die CAM feststellten. In dieser Studie konnte mit Hilfe von schrittweise induzierter Hypoxie eine höhere Invasivität von Tumoren erzielt werden, die diese unter normalen Sauerstoffbedingungen auf der CAM nicht aufwiesen (Demir et al., 2008). Shimada et al. (2009) konnten zudem kürzlich nachweisen, dass mit Hilfe von siRNA die Invasivität von Zellen einer Blasenkarzinomzelllinie in die CAM unterdrückt werden kann. Hierfür verwendeten sie GFP-markierte Zellen, die auf die CAM eines 11 Tage alten Hühnerembryos inokuliert und nach 24-stündiger Kultivierung mit der siRNA oder der Kontroll-siRNA behandelt wurden (Shimada et al., 2009). Die Ergebnisse dieser drei Studien sowie die der vorliegenden Doktorarbeit zeigen deutlich, dass i) die CAM als Kultursystem für Tumore verwendet, ii) die Invasivität von Tumoren untersucht sowie iii) die Funktion einzelner Gene bei der Invasivität von Tumoren anhand von Zelllinien untersucht werden kann.

Leider konnte die Methode der qPCR zum Nachweis von humaner Alu-DNA zur Quantifizierung der Invasivität von Tumorzellen in die CAM bislang nicht erfolgreich für Retinoblastomzellen angewandt werden. Bei der Durchführung der

qPCR für die Etablierung des Systems für Retinoblastomzellen zeigte sich, dass nach 30 Zyklen selbst in der Nullprobe jedes Mal Signale detektiert wurden. Die Signale in den Proben wurden auch detektiert, nachdem alle Lösungen und Chemikalien ausgetauscht wurden. Eine Verunreinigung durch Alu-DNA in der Luft kann ausgeschlossen werden, da alle Pipettierschritte des Real Time PCR Ansatzes in einer DNA/RNA-Biocap erfolgten. Zusätzlich wurden mehrere Produkte abhängig von der Konzentration der eingesetzten DNA gemessen. Das Hauptprodukt liegt bei ca. 300 bp im Gegensatz zum erwarteten Produkt von 224 bp. Zwar musste mit mehreren Produkten gerechnet werden, da die Primer für die Alu-qPCR aus Sequenzabschnitten stammen, die bei einem Großteil der Alu-Sequenzen konserviert ist. Allerdings wurde nicht mit einer so großen Variation der PCR-Produkte gerechnet, da in den Publikationen von Kim et al. (1998) und Mira et al. (2002) nur ein Produkt zu sehen ist. Wie in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigt bei Mira et al. (2002) eine Abbildung der Schmelzkurven unterschiedliche Höhepunkte sowie einen plateauförmigen Verlauf, was auf verschiedenartige PCR-Produkte schließen lässt. Allerdings muss dies nicht bedeuten, dass die Produkte einen entscheidenden Unterschied in ihrer Größe haben. In erster Linie muss davon ausgegangen werden, dass einzelne Punktmutationen zu unterschiedlichen Schmelzkurven durch Basenaustausch oder Verkürzung der Sequenz um wenige Basenpaare in den verschiedenen Alu-PCR Sequenzen führen. Als Konsequenz für die in der vorliegenden Dissertation erhaltenen Ergebnisse der Alu-qPCR sowie unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die verwendeten Alu-Primer auch Huhn-DNA nachweisen (Kim et al., 1998; Mira et al., 2002), wird nach einer alternativen Strategie für einen quantitativen Nachweis von Retinoblastomzellen, die auf die CAM inokuliert wurden, nachgedacht. Dabei werden zwei Strategien oder die Kombination aus beiden weiter verfolgt: i) die Verwendung eines Gens, das in allen Retinoblastomzelllinien möglichst hoch exprimiert ist und dessen Sequenz ein Primerdesign zulässt, bei dem kein Gen vom Huhn nachgewiesen wird oder ii) die Verwendung eines Gens, das in den Retinoblastomzelllinien exprimiert wird, aber keinen orthologen Gegenpart im Huhn aufweist.

4.4.2 Invasivität von Retinoblastomzellen im Hühnerembryonen-Modell

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur Inokulation von PKH26-gefärbten Y79 Retinoblastomzellen auf die CAM zeigen, dass bei unverletzter CAM keine Invasion der Zellen in die CAM geschieht. Dies entspricht den Beobachtungen, die Armstrong et al. (1982) bei der Inokulierung verschiedener Tumorzelllinien unterschiedlicher Herkunft machte (Armstrong et al., 1982). Ebenso kann in dieser Doktorarbeit die Bildung von Mikrotumoren und deren Wachstum nachgewiesen werden. Allerdings werden die Mikrotumore nicht an das CAM-Gefäßsystem angeschlossen, wodurch ein Anwachsen der Zellen auf der CAM und eine nachträgliche Invasion ermöglicht würden, wie es im Falle der Inokulation von Tumoren auf die CAM geschieht.

Die Ergebnisse der Injektion von Y79 Zellen ins Auge von Hühnerembryonen entsprechen den Ergebnissen, die Gallie et al. (1977) bei der Injektion dieser Retinoblastomzelllinie in die vordere Augenkammer bei Nacktmäusen machte. Sie konnten zeigen, dass Y79 Zellen in das Auge eindringen, die Strukturen innerhalb des Auges vollständig zerstören und über den Sehnerv in das Gehirn vordringen. Die Tumore, die sich nach dem Eindringen der Y79 Zellen in das Augeninnere ausbildeten, entsprachen von der Morphologie den Flexner-Wintersteiner-Rosetten von humanen Retinoblastomen (Gallie et al., 1977). Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Die Ausbildung von Strukturen ähnlich der Flexner-Wintersteiner Rosetten kann nach vier Tagen nach der Injektion von Y79 Zellen ins Auge von Hühnerembryonen nachgewiesen werden. Del Cerro et al. (1993) konnten im immunsupprimierten Rattenmodell darlegen, dass subretinal gespritzte Y79 Zellen durch die Retina in den Glaskörper vordringen (del Cerro et al., 1993). Der Vergleich der Invasivität von Y79 und WERI-Rb1 Zellen, die in den Glaskörper von immundefizienten Mäusen injiziert wurden, zeigte, dass Y79 Zellen spezifische metastasierende Tumore bilden, während WERI-Rb1 Zellen eher ein Modell für nicht-metastasierende Retinoblastome darzustellen scheinen (Chávez-Barríos et al., 2000). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch McFall et al. (1977) die berichteten, dass nach Inokulation in die vordere Augenkammer von Kaninchen Y79 Zellen stark, WERI-Rb1 Retinoblastomzellen dagegen nur schwach tumorig seien (McFall et al., 1977). Dieser Unterschied zwischen WERI-Rb1 und Y79 Zellen deckt sich mit der

Beobachtung in dieser Doktorarbeit, dass bei der Injektion von WERI-Rb1 Zellen in den Glaskörper von Hühnerembryonen nach 4 Tagen keiner morphologischen Veränderung der Retina zu beobachten ist.

Anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen von Retinoblastomschnitten wurde von del Cerro et al. (1993) beschrieben, dass die Retinoblastomzellen auf ihrem Weg in den Glaskörper an den Fortsätzen von Müller-Glia Zellen, die die Retina in ihrer gesamten Breite durchspannen, entlang zu gleiten scheinen. Ob sie dabei von einem chemischen Gradienten geleitet werden, wurde bislang nicht untersucht. Da sowohl Müller-Glia Zellen als auch der Glaskörper selbst hohe Konzentrationen an Hyaluronsäure enthalten, ist jedoch vorstellbar, dass Hyaluronan (HA) als chemoattraktive Substanz dient.

In vielen malignen Tumoren wurde eine Akkumulation von HA gefunden und es gibt eine Vielzahl von Daten die eine HA-Ablagerung mit einer erhöhten Metastasierung und schlechter Prognose in Verbindung bringen (Anttila et al., 2000). Eine vermehrte Invasivität von Tumorzellen in Abhängigkeit von einem erhöhten HA-Level wird dabei auf die Tatsache zurückgeführt, dass das HA einen Migrationsweg bereitet, indem es vernetzte Proteine aus der Extrazellulärmatrix ausschließt und als Gitter für migrierende Zellen fungiert (Toole et al., 2002). Des weiteren wurde bereits beschrieben, dass HA die Chemotaxis von directional migrierenden humanen Brustkrebszellen mediiert (Tzircotis et al., 2005) und die HA-Expression und der HA-Signalweg über die Rezeptoren CD44 und RHAMM (*receptor for HA-mediated motility*) in vielen Tumoren erhöht ist (Toole, 2004). Die Interaktion von Gliomzellen mit der Extrazellulärmatrix, deren Bestandteil HA ist, erleichtert offenbar die Invasivität von Tumorzellen. Darüber produzieren Tumorzellen selbst HA sowie deren Rezeptoren und eine Vielzahl von Studien zeigte, dass diese HA-Rezeptoren das Invasivitätsverhalten zumindest von Gliomzellen beeinflusst (Akiyama et al., 2001): hochgradige Gliome exprimieren deutlich mehr RHAMM und CD44, wobei eine Antikörper oder siRNA mediierte Blockierung von RHAMM, nicht aber die von CD44 die Migration von Gliomzellen inhibiert (Akiyama et al., 2001). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen die Spaltung ihrer eigenen CD44 Rezeptoren verstärken und ihre Motilität erhöhen, indem sie HA-Fragmente generieren (Sugahara et al., 2006). In frisch isolierten Retinoblastomzellen wurde der HA-Rezeptor CD44 detektiert (Balla et al., 2009). Untersuchungen über die Expression von RHAMM oder HA

selbst in Retinoblastomen oder Retinoblastomzelllinien gibt es jedoch bislang nicht.

Vorläufige Real Time PCR Studien im Rahmen der Doktorarbeit wiesen darauf hin, dass der für die Motilität verantwortliche Hyaluronanrezeptor RHAMM von den Retinoblastomzelllinien WERI-RB1 und Y79 signifikant höher exprimiert wird als von Fibroblasten. Die Expression von RHAMM in Y79 Zellen ist dabei deutlich höher als die in WERI-RB1 Zellen. Da Hyaluronsäure, der bevorzugte Ligand von RHAMM, neben Wasser einer der Hauptbestandteile des Glaskörpers ist, wurde im Hinblick auf die oben beschriebenen Ergebnisse aus den Publikationen von Chévez-Barrios et al. (2000) und McFall et al. (1977) die Hypothese aufgestellt, dass die erhöhte Expression an RHAMM für die zielgerichtete Invasivität von Y79 Retinoblastomzellen in den Glaskörper verantwortlich ist. Aus diesem Grund wurden im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit erste *Boyden Chamber* Versuche zur Untersuchung der Rolle von Hyaluronan bei der Zellmigration von WERI-Rb1 Zellen und Y79 Zellen begonnen. Diese befinden sich zurzeit noch in der Etablierungsphase.

4.5 Fazit

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe einer Kombination von hochauflösender LOH-Analyse mittels SNP-Array und Expressionsanalyse zur Retinaentwicklung der Maus unter Verwendung von Expressionsmikroarrays mögliche Kandidatengene für die Progression des Retinoblastoms im besonderen Hinblick auf Metastasierung in den Glaskörper eingegrenzt werden konnten. Des Weiteren war es möglich, die potenziellen Kandidatengene mittels Expressionsdaten von Retinoblastomen mit und ohne LOH, die im Zuge einer Mikroarray Analyse gewonnen wurden, weiter einzugrenzen. Die Wahrscheinlichkeit, dass dies mit weiteren LOH-Analysen möglich gewesen wäre, ist sehr gering. Von anfänglich 250 Tumoren konnten nur effektiv 10 Tumore zur Eingrenzung der LOH-Region beitragen. Dieser Wert entspricht 4,4% bezogen auf die Gesamtzahl der Tumore. Für die letztendliche Eingrenzung der LOH-Region konnten nur 2 Tumore verwendet werden, folglich nur 0,8%. Die Möglichkeit, mit Hilfe eines weiteren Tumors die LOH-Region noch stärker einzugrenzen, tendiert somit gegen null. Eine höhere Effektivität kann mit Hilfe des in dieser Doktorarbeit etablierten, optimierten und erweiterten *ex ovo* Modells erreicht werden. Selbst beim Austesten aller 86 möglichen Gene

innerhalb der in der vorliegenden Dissertation eingrenzten LOH-Region, läge die Wahrscheinlichkeit, auf Anhieb das verantwortliche Gen für die Ausprägung des Retinoblastoms in Form der Glaskörperaussaat zu finden, bei über einem Prozent. Mittels der Eingrenzung der beiden verwendeten Expressionsarrays konnte die Wahrscheinlichkeit auf 3,8% erhöht werden. Die Ziele dieser Doktorarbeit, die LOH-Region mit Hilfe eines hochauflösenden SNP-Arrays einzugrenzen, um die in dieser Region befindlichen Gene mit einem Expressionsarray zu minimieren, konnten nicht nur erreicht werden, sondern es konnte eine effektivere Methode zur Eingrenzung von möglichen Kandidatengenen einer LOH-Region, die mit einer besonderen Ausprägung der Tumorprogression korreliert, in dem vorliegenden speziellen Fall die Glaskörperaussaat beim Retinoblastom, aufgezeigt werden. Zudem wurde mit dem *ex ovo* CAM-Modell ein *in vivo* Testsystem für die Untersuchung der 26 eingegrenzten Kandidatengene und speziell für Cadherin 13 etabliert sowie für zukünftige Untersuchungen an primären Retinoblastomen erweitert.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Dissertation war die Eingrenzung von Kandidatengenen, die zur Progression von Retinoblastomen mit einem Verlust von genomischem Material bzw. einem LOH auf Chromosom 16q und Metastasierung in den Glaskörper führen. Ein Teilaspekt dieser Zielsetzung war es, ein Testsystem zu etablieren, das zur Untersuchung der eingegrenzten Kandidatengene genutzt werden konnte.

Zur Einengung der Kandidatengene wurden die in einer Vorstudie (Gratias et al., 2007) definierten LOH-Bereiche mit Hilfe einer hochauflösenden SNP-Array-Analyse weiter eingegrenzt. Die eingegrenzte LOH-Region hatte eine Größe von ungefähr 6,6 MB, beinhaltet 86 Gene und erstreckte sich innerhalb des Chromosoms 16q von 81,4 Mb bis 88,0 Mb. Unter Verwendung eines eigenständig geschriebenen Programms konnte innerhalb des gesamten Genoms zwei partielle LOHs in 8 von 8 Tumoren im kodierenden Bereich von Cadherin 13 definiert werden. Bei einer Expressionsstudie zur Retinaentwicklung der Maus mittels Expressionsmikroarrays konnte gezeigt werden, dass über die Hälfte von ca. 45000 Genen signifikant reguliert sind. Eine Korrelation der Ergebnisse der SNP-Array und der Mikroarrayanalyse identifizierte 35 Gene, die innerhalb der 6,6 Mb großen LOH-Region liegen und deren orthologe Gegenparts in der Maus signifikant in der Retinaentwicklung reguliert sind. Eine weitere Eingrenzung mit Hilfe von Mikroarraydaten von Retinoblastomen mit und ohne 16q LOH konnte die zuvor identifizierten Gene auf 26 Gene eingrenzen, unter denen sich das Gen Cadherin 13 befand. Zusätzliche Studien mittels qPCR zeigten, dass Cadherin 13 im Vergleich zur humanen gesunden Retina in Retinoblastomzelllinien über das 60-fach herunterreguliert ist. Im Kontext der aktuellen Literatur lassen die in der vorliegenden Dissertation erzielten Ergebnisse den Schluss zu, dass Cadherin 13 eine Schlüsselrolle in der Progression von Retinoblastomen mit Metastasierung in den Glaskörpern zukommt.

Mit dem *ex ovo* CAM-Modell wurde zudem ein *in vivo* Testsystem für die Untersuchung der 26 eingegrenzten Kandidatengene und speziell für Cadherin 13 etabliert sowie für zukünftige Untersuchungen an primären Retinoblastomen erweitert.

6 Literaturverzeichnis

Affymetrix Developer Network (©2009), 'Affymetrix® Data File Formats – Introduction'.

<http://www.affymetrix.com/support/developer/powertools/changelog/gcos-agcc/>

Affymetrix, Inc. (©2001-2007), 'Array Design for the GeneChip® Human Genome U133 Set (P/N 701133 Rev. 2)', Technical Note.

Affymetrix, Inc. (©2002-2004), *GeneChip® Expression Analysis – Data Analysis Fundamentals (P/N 701190 Rev. 4)*.

Affymetrix, Inc. (©2002a), 'Affymetrix® Microarray Suite Version 5.0 (P/N 701127 Rev 1)', Software Solutions.

Affymetrix, Inc. (©2002b), 'Statistical algorithms description document (p/n 701137 rev 3)', Software Solutions.

Affymetrix, Inc. (©2003), 'Array Design and Performance of the GeneChip® Mouse Expression Set 430 (P/N 701405 Rev. 1)', Technical Note.

Affymetrix, Inc. (©2003-2004), 'GeneChip® Human Genome Arrays (P/N 701484 Rev. 4)', Data Sheet.

Affymetrix, Inc. (©2003-2005a), 'Affymetrix GeneChip® Operating Software (GCOS) (P/N 701462 Rev. 2)', Data Sheet.

Affymetrix, Inc. (©2003-2005b), *Affymetrix® GeneChip® Operating Software With AutoLoader, Version 1.4 (P/N 701439 Rev. 5)*.

Affymetrix, Inc. (©2004a), *GeneChip® Mapping 100K Assay Manual (P/N 701684 Rev. 3)*.

Affymetrix, Inc. (©2004b), 'GeneChip® Mouse Genome Arrays (P/N 701525 Rev. 4)', Data Sheet.

Affymetrix, Inc. (©2005), 'GeneChip® Scanner 3000 7G (P/N 701944 Rev. 2)', Data Sheet.

Affymetrix, Inc. (©2005-2006a), 'Affymetrix GeneChip® Genotyping Analysis Software (GTYPE) Version 4.1 (P/N 702115 Rev. 3)', Data Sheet.

Affymetrix, Inc. (©2005-2006b), *GeneChip® Mapping 500K Assay Manual (P/N 702419 Rev 2)*.

- Affymetrix, Inc. (©2005-2009), *GeneChip® Expression Analysis Technical Manual (P/N 702232 Rev. 3)*.
- Affymetrix, Inc. (©2006), *Affymetrix GeneChip® Genotyping Analysis Software Version 4.1 – User's Guide (P/N 702083 Rev. 2)*.
- Akiyama, Y., Jung, S., Salhia, B., Lee, S., Hubbard, S., Taylor, M., Mainprize, T., Akaishi, K., van Furth, W. und Rutka, J. T. (2001), 'Hyaluronate receptors mediating glioma cell migration and proliferation.', *J Neurooncol* **53**(2), 115–127.
- Alter, O., Brown, P. O. und Botstein, D. (2000), 'Singular value decomposition for genome-wide expression data processing and modeling.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(18), 10101–10106.
- Ambion, Inc. (©2008), *MessageAmp™ II-Biotin Enhanced Kit (P/N 1791M Rev. B)*.
- Anttila, M. A., Tammi, R. H., Tammi, M. I., Syrjänen, K. J., Saarikoski, S. V. und Kosma, V. M. (2000), 'High levels of stromal hyaluronan predict poor disease outcome in epithelial ovarian cancer.', *Cancer Res* **60**(1), 150–155.
- Armstrong, P. B., Quigley, J. P. und Sidebottom, E. (1982), 'Transepithelial invasion and intramesenchymal infiltration of the chick embryo chorioallantois by tumor cell lines.', *Cancer Res* **42**(5), 1826–1837.
- Balla, M. M. S., Vemuganti, G. K., Kannabiran, C., Honavar, S. G. und Murthy, R. (2009), 'Phenotypic characterization of retinoblastoma for the presence of putative cancer stem-like cell markers by flow cytometry.', *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**(4), 1506–1514.
- Benito, M., Parker, J., Du, Q., Wu, J., Xiang, D., Perou, C. M. und Marron, J. S. (2004), 'Adjustment of systematic microarray data biases.', *Bioinformatics* **20**(1), 105–114.
- BioMart Projekt (Homepage). <http://www.biomart.org/index.html>
- Bradley, S. J. (1970), 'An analysis of self-differentiation of chick limb buds in chorio-allantoic grafts.', *J Anat* **107**(Pt 3), 479–490.
- Bremner, R., Chen, D., Pacal, M., Livne-Bar, I. und Agochiya, M. (2004), 'The rb protein family in retinal development and retinoblastoma: new insights from new mouse models.', *Dev Neurosci* **26**(5-6), 417–434.

- Cepko, C. L., Austin, C. P., Yang, X., Alexiades, M. und Ezzeddine, D. (1996), 'Cell fate determination in the vertebrate retina.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(2), 589–595.
- Chan, D. W., Lee, J. M. F., Chan, P. C. Y. und Ng, I. O. L. (2008), 'Genetic and epigenetic inactivation of t-cadherin in human hepatocellular carcinoma cells.', *Int J Cancer* **123**(5), 1043–1052.
- Chee, M., Yang, R., Hubbell, E., Berno, A., Huang, X. C., Stern, D., Winkler, J., Lockhart, D. J., Morris, M. S. und Fodor, S. P. (1996), 'Accessing genetic information with high-density dna arrays.', *Science* **274**(5287), 610–614.
- Chen, D., Livne-bar, I., Vanderluit, J. L., Slack, R. S., Agochiya, M. und Bremner, R. (2004), 'Cell-specific effects of rb or rb/p107 loss on retinal development implicate an intrinsically death-resistant cell-of-origin in retinoblastoma.', *Cancer Cell* **5**(6), 539–551.
- Chen, D., Pajovic, S., Duckett, A., Brown, V. D., Squire, J. A. und Gallie, B. L. (2002), 'Genomic amplification in retinoblastoma narrowed to 0.6 megabase on chromosome 6p containing a kinesin-like gene, rbkin.', *Cancer Res* **62**(4), 967–971.
- Chávez-Barrios, P., Hurwitz, M. Y., Louie, K., Marcus, K. T., Holcombe, V. N., Schafer, P., Aguilar-Cordova, C. E. und Hurwitz, R. L. (2000), 'Metastatic and nonmetastatic models of retinoblastoma.', *Am J Pathol* **157**(4), 1405–1412.
- CNAG manuals (online). <http://www.genome.umin.jp/CNAG2%200%20Manual.pdf>
<http://www.genome.umin.jp/CNAG%20User%20Manual%20ver1.1.pdf>
- Cobrinik, D. (2005), 'Pocket proteins and cell cycle control.', *Oncogene* **24**(17), 2796–2809.
- Corson, T. W., Huang, A., Tsao, M.-S. und Gallie, B. L. (2005), 'Kif14 is a candidate oncogene in the 1q minimal region of genomic gain in multiple cancers.', *Oncogene* **24**(30), 4741–4753.
- Dang, C., Gottschling, M., Manning, K., O'Curraín, E., Schneider, S., Sterry, W., Stockfleth, E. und Nindl, I. (2006), 'Identification of dysregulated genes in cutaneous squamous cell carcinoma.', *Oncol Rep* **16**(3), 513–519.
- del Cerro, M., Seigel, G. M., Lazar, E., Grover, D., del Cerro, C., Brooks, D. H., DiLoreto, D. und Chader, G. (1993), 'Transplantation of y79 cells into rat

- eyes: an in vivo model of human retinoblastomas.’, *Invest Ophthalmol Vis Sci* **34**(12), 3336–3346.
- Demir, R., Naschberger, L., Demir, I., Melling, N., Dimmler, A., Papadopoulus, T., Sturzl, M., Klein, P. und Hohenberger, W. (2008), ‘Hypoxia generates a more invasive phenotype of tumour cells: An in vivo experimental setup based on the chorioallantoic membrane.’, *Pathol Oncol Res* .
- Deryugina, E. I. und Quigley, J. P. (2008), ‘Chapter 2. chick embryo chorioallantoic membrane models to quantify angiogenesis induced by inflammatory and tumor cells or purified effector molecules.’, *Methods Enzymol* **444**, 21–41.
- Dohle, D. S., Pasa, S. D., Gustmann, S., Laub, M., Wissler, J. H., Jennissen, H. P. und Dünker, N. (2009), ‘Chick ex ovo culture and ex ovo CAM assay: How it really works’, *Journal of Visualized Experiments (accepted)*, pii: 1620. <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=1620>
- Durinck, S., Moreau, Y., Kasprzyk, A., Davis, S., Moor, B. D., Brazma, A. und Huber, W. (2005), ‘Biomart and bioconductor: a powerful link between biological databases and microarray data analysis.’, *Bioinformatics* **21**(16), 3439–3440. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bti525>
- Dyer, M. A. und Bremner, R. (2005), ‘The search for the retinoblastoma cell of origin.’, *Nat Rev Cancer* **5**(2), 91–101.
- Eltz, S., Comperat, E., Cussenot, O. und Rouprêt, M. (2008), ‘Molecular and histological markers in urothelial carcinomas of the upper urinary tract.’, *BJU Int* **102**(5), 532–535. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1464-410X.2008.07659.x>
- Ensembl release 52 (Dec 2008), ‘Archive EnsEMBL’. <http://dec2008.archive.ensembl.org/index.html>
- Fare, T. L., Coffey, E. M., Dai, H., He, Y. D., Kessler, D. A., Killian, K. A., Koch, J. E., LeProust, E., Marton, M. J., Meyer, M. R., Stoughton, R. B., Tokiwa, G. Y. und Wang, Y. (2003), ‘Effects of atmospheric ozone on microarray data quality.’, *Anal Chem* **75**(17), 4672–4675.
- Fischer, C. J., ed. (1993), *Chick Embryos in Shell-less Culture*.
- Fodor, S. P., Read, J. L., Pirrung, M. C., Stryer, L., Lu, A. T. und Solas, D. (1991), ‘Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis.’, *Science* **251**(4995), 767–773.

- Fodor, S. P., Rava, R. P., Huang, X. C., Pease, A. C., Holmes, C. P. und Adams, C. L. (1993), 'Multiplexed biochemical assays with biological chips.', *Nature* **364**(6437), 555–556.
- Frade, J. M. und Barde, Y. A. (1999), 'Genetic evidence for cell death mediated by nerve growth factor and the neurotrophin receptor p75 in the developing mouse retina and spinal cord.', *Development* **126**(4), 683–690.
- Fredette, B. J., Miller, J. und Ranscht, B. (1996), 'Inhibition of motor axon growth by t-cadherin substrata.', *Development* **122**(10), 3163–3171.
- Friend, S. H., Bernard, R., Rogelj, S., Weinberg, R. A., Rapaport, J. M., Albert, D. M. und Dryja, T. P. (1986), 'A human dna segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma.', *Nature* **323**(6089), 643–646.
- Gallie, B. L., Albert, D. M., Wong, J. J., Buyukmihci, N. und Pullafito, C. A. (1977), 'Heterotransplantation of retinoblastoma into the athymic "nude" mouse.', *Invest Ophthalmol Vis Sci* **16**(3), 256–259.
- Gautier, L., Cope, L., Bolstad, B. M. und Irizarry, R. A. (2004), 'affy—analysis of affymetrix genechip data at the probe level.', *Bioinformatics* **20**(3), 307–315.
- Gautier, L., Irizarry, R., Cope, L. und Bolstad, B. (2009), 'Description of affy', vignette.
<http://bioconductor.org/packages/2.3/bioc/vignettes/affy/inst/doc/affy.pdf>
- Gentleman, R. C., Carey, V. J., Bates, D. M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., Hornik, K., Hothorn, T., Huber, W., Iacus, S., Irizarry, R., Leisch, F., Li, C., Maechler, M., Rossini, A. J., Sawitzki, G., Smith, C., Smyth, G., Tierney, L., Yang, J. Y. H. und Zhang, J. (2004), 'Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics.', *Genome Biol* **5**(10), R80.
- Ginzinger, D. G., Godfrey, T. E., Nigro, J., Moore, D. H., Suzuki, S., Pallavicini, M. G., Gray, J. W. und Jensen, R. H. (2000), 'Measurement of dna copy number at microsatellite loci using quantitative pcr analysis.', *Cancer Res* **60**(19), 5405–5409.
- Gorringe, K. L., Ramakrishna, M., Williams, L. H., Sridhar, A., Boyle, S. E., Bearfoot, J. L., Li, J., Anglesio, M. S. und Campbell, I. G. (2009), 'Are there any more ovarian tumor suppressor genes? a new perspective using ultra

- high-resolution copy number and loss of heterozygosity analysis.', *Genes Chromosomes Cancer* **48**(10), 931–942.
- Grasemann, C., Gratias, S., Stephan, H., Schüler, A., Schramm, A., Klein-Hitpass, L., Rieder, H., Schneider, S., Kappes, F., Eggert, A. und Lohmann, D. R. (2005), 'Gains and overexpression identify *dek* and *e2f3* as targets of chromosome 6p gains in retinoblastoma.', *Oncogene* **24**(42), 6441–6449.
- Gratias, S., Schüler, A., Hitpass, L. K., Stephan, H., Rieder, H., Schneider, S., Horsthemke, B. und Lohmann, D. R. (2005), 'Genomic gains on chromosome 1q in retinoblastoma: consequences on gene expression and association with clinical manifestation.', *Int J Cancer* **116**(4), 555–563.
- Gratias, S., Rieder, H., Ullmann, R., Klein-Hitpass, L., Schneider, S., Bölöni, R., Kappler, M. und Lohmann, D. R. (2007), 'Allelic loss in a minimal region on chromosome 16q24 is associated with vitreous seeding of retinoblastoma.', *Cancer Res* **67**(1), 408–416.
- Gunderson, K. L., Huang, X. C., Morris, M. S., Lipshutz, R. J., Lockhart, D. J. und Chee, M. S. (1998), 'Mutation detection by ligation to complete n-mer dna arrays.', *Genome Res* **8**(11), 1142–1153.
- Haider, S., Ballester, B., Smedley, D., Zhang, J., Rice, P. und Kasprzyk, A. (2009), 'Biomart central portal—unified access to biological data.', *Nucleic Acids Res* **37**(Web Server issue), W23–W27.
- Hall, B. K. (1978), 'Grafting of organs and tissues of the chorio-allantonic membrane of the embryonic chick.', *TCA Manual* **4** **3**, 881–883.
- Hartemink, A. J., Gifford, D. K., Jaakkola, T. S. und Young, R. A. (2001), Maximum likelihood estimation of optimal scaling factors for expression array normalizations, *in* M. L. Bittner, Y. Chen, A. N. Dorsel und E. R. Dougherty, eds, 'Microarrays: Optical Technologies and Informatics', Vol. 4266, SPIE Bios, pp. 132–140.
- Hebbard, L. W., Garlatti, M., Young, L. J. T., Cardiff, R. D., Oshima, R. G. und Ranscht, B. (2008), 'T-cadherin supports angiogenesis and adiponectin association with the vasculature in a mouse mammary tumor model.', *Cancer Res* **68**(5), 1407–1416.

- Huang, Z., Wu, Y., Hedrick, N. und Gutmann, D. H. (2003), 'T-cadherin-mediated cell growth regulation involves g2 phase arrest and requires p21(cip1/waf1) expression.', *Mol Cell Biol* **23**(2), 566–578.
- Irizarry, R. A., Gautier, L., Bolstad, B. M., Miller, C., with contributions from, Astrand, M., Cope, L. M., Gentleman, R., Jeff Gentry, C. H., Huber, W., MacDonald, J., Rubinstein, B. I. P., Workman, C. und Zhang, J. (2009), *affy*. <http://bioconductor.org/packages/2.3/bioc/manuals/affy/man/affy.pdf>
- Ivanov, D. B., Philippova, M. P. und Tkachuk, V. A. (2001), 'Structure and functions of classical cadherins.', *Biochemistry (Mosc)* **66**(10), 1174–1186.
- Johnson, C., Setterquist, R., Moturi, S., Agarwal, S. und Whitley, P. (2005), Increase signal and detect more genes on affymetrix® arrays, TechNotes 12(4), Ambion, Inc.. <http://www4.appliedbiosystems.com/techlib/tn/124/>
- Johnson, W. E., Li, C. und Rabinovic, A. (2007), 'Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical bayes methods.', *Biostatistics* **8**(1), 118–127.
- Kaira, K., Oriuchi, N., Imai, H., Shimizu, K., Yanagitani, N., Sunaga, N., Hisada, T., Tanaka, S., Ishizuka, T., Kanai, Y., Endou, H., Nakajima, T. und Mori, M. (2008), 'l-type amino acid transporter 1 and cd98 expression in primary and metastatic sites of human neoplasms.', *Cancer Sci* **99**(12), 2380–2386. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00969.x>
- Kawakami, M., Staub, J., Cliby, W., Hartmann, L., Smith, D. I. und Shridhar, V. (1999), 'Involvement of h-cadherin (cdh13) on 16q in the region of frequent deletion in ovarian cancer.', *Int J Oncol* **15**(4), 715–720.
- Kim, J., Yu, W., Kovalski, K. und Ossowski, L. (1998), 'Requirement for specific proteases in cancer cell intravasation as revealed by a novel semiquantitative pcr-based assay.', *Cell* **94**(3), 353–362.
- Knudson, A. G. (1971), 'Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**(4), 820–823.
- Kobayashi, K., Ohnishi, A., Promsuk, J., Shimizu, S., Kanai, Y., Shiokawa, Y. und Nagane, M. (2008), 'Enhanced tumor growth elicited by l-type amino acid transporter 1 in human malignant glioma cells.', *Neurosurgery* **62**(2), 493–503; discussion 503–4. <http://dx.doi.org/10.1227/01.neu.0000316018.51292.19>

- Kunzi-Rapp, K., Kaskel, P., Steiner, R., Peter, R. U. und Krähn, G. (2001), 'Increased blood levels of human s100 in melanoma chick embryo xenografts' circulation.', *Pigment Cell Res* **14**(1), 9–13.
- Kuphal, S., Martyn, A. C., Pedley, J., Crowther, L. M., Bonazzi, V. F., Parsons, P. G., Bosserhoff, A. K., Hayward, N. K. und Boyle, G. M. (2009), 'H-cadherin expression reduces invasion of malignant melanoma.', *Pigment Cell Melanoma Res* **22**(3), 296–306.
- Lee, S. W. (1996), 'H-cadherin, a novel cadherin with growth inhibitory functions and diminished expression in human breast cancer.', *Nat Med* **2**(7), 776–782.
- Lee, S. W., Reimer, C. L., Campbell, D. B., Cheresch, P., Duda, R. B. und Kocher, O. (1998), 'H-cadherin expression inhibits in vitro invasiveness and tumor formation in vivo.', *Carcinogenesis* **19**(6), 1157–1159.
- Lindblad Toh, K., Tanenbaum, D. M., Daly, M. J., Winchester, E., Lui, W. O., Villapakkam, A., Stanton, S. E., Larsson, C., Hudson, T. J., Johnson, B. E., Lander, E. S. und Meyerson, M. (2000), 'Loss-of-heterozygosity analysis of small-cell lung carcinomas using single-nucleotide polymorphism arrays.', *Nat Biotechnol* **18**(9), 1001–1005.
- Lipshutz, R. J., Fodor, S. P., Gingeras, T. R. und Lockhart, D. J. (1999), 'High density synthetic oligonucleotide arrays.', *Nat Genet* **21**(1 Suppl), 20–24.
- Lockhart, D. J., Dong, H., Byrne, M. C., Follettie, M. T., Gallo, M. V., Chee, M. S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H. und Brown, E. L. (1996), 'Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays.', *Nat Biotechnol* **14**(13), 1675–1680.
- Lohmann, D. R. und Gallie, B. L. (2004), 'Retinoblastoma: revisiting the model prototype of inherited cancer.', *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **129C**(1), 23–28.
- Marchong, M. N., Chen, D., Corson, T. W., Lee, C., Harmandayan, M., Bowles, E., Chen, N. und Gallie, B. L. (2004), 'Minimal 16q genomic loss implicates cadherin-11 in retinoblastoma.', *Mol Cancer Res* **2**(9), 495–503.
- Martins, R. A. P. und Pearson, R. A. (2008), 'Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate retina.', *Brain Res* **1192**, 37–60.

- Matsuo, K., Kuroki, T., Kitaoka, F., Tajima, Y. und Kanematsu, T. (2002), 'Loss of heterozygosity of chromosome 16q in gallbladder carcinoma.', *J Surg Res* **102**(2), 133–136.
- McFall, R. C., Sery, T. W. und Makadon, M. (1977), 'Characterization of a new continuous cell line derived from a human retinoblastoma.', *Cancer Res* **37**(4), 1003–1010.
- Mei, R., Galipeau, P. C., Prass, C., Berno, A., Ghandour, G., Patil, N., Wolff, R. K., Chee, M. S., Reid, B. J. und Lockhart, D. J. (2000), 'Genome-wide detection of allelic imbalance using human SNPs and high-density DNA arrays.', *Genome Res* **10**(8), 1126–1137.
- Mietz, H., Hutton, W. L. und Font, R. L. (1997), 'Unilateral retinoblastoma in an adult: report of a case and review of the literature.', *Ophthalmology* **104**(1), 43–47.
- Mira, E., Lacalle, R. A., Gómez-Moutón, C., Leonardo, E. und Mañes, S. (2002), 'Quantitative determination of tumor cell intravasation in a real-time polymerase chain reaction-based assay.', *Clin Exp Metastasis* **19**(4), 313–318.
- Nannya, Y., Sanada, M., Nakazaki, K., Hosoya, N., Wang, L., Hangaishi, A., Kurokawa, M., Chiba, S., Bailey, D. K., Kennedy, G. C. und Ogawa, S. (2005), 'A robust algorithm for copy number detection using high-density oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays.', *Cancer Res* **65**(14), 6071–6079.
- Niermann, T., Kern, F., Erne, P. und Resink, T. (2000), 'The glycosyl phosphatidylinositol anchor of human t-cadherin binds lipoproteins.', *Biochem Biophys Res Commun* **276**(3), 1240–1247.
- Orlic, M., Spencer, C. E., Wang, L. und Gallie, B. L. (2006), 'Expression analysis of 6p22 genomic gain in retinoblastoma.', *Genes Chromosomes Cancer* **45**(1), 72–82.
- Ossowski, L. (1988), 'In vivo invasion of modified chorioallantoic membrane by tumor cells: the role of cell surface-bound urokinase.', *J Cell Biol* **107**(6 Pt 1), 2437–2445.

- Pease, A. C., Solas, D., Sullivan, E. J., Cronin, M. T., Holmes, C. P. und Fodor, S. P. (1994), 'Light-generated oligonucleotide arrays for rapid dna sequence analysis.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(11), 5022–5026.
- Petruzzelli, G. J., Snyderman, C. H., Johnson, J. T. und Myers, E. N. (1993), 'Angiogenesis induced by head and neck squamous cell carcinoma xenografts in the chick embryo chorioallantoic membrane model.', *Ann Otol Rhinol Laryngol* **102**(3 Pt 1), 215–221.
- Philippova, M., Banfi, A., Ivanov, D., Gianni-Barrera, R., Allenspach, R., Erne, P. und Resink, T. (2006), 'Atypical gpi-anchored t-cadherin stimulates angiogenesis in vitro and in vivo.', *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(10), 2222–2230.
- Péquignot, M. O., Provost, A. C., Sallé, S., Taupin, P., Sainton, K. M., Marchant, D., Martinou, J. C., Ameisen, J. C., Jais, J.-P. und Abitbol, M. (2003), 'Major role of bax in apoptosis during retinal development and in establishment of a functional postnatal retina.', *Dev Dyn* **228**(2), 231–238.
- Qian, Z. R., Sano, T., Yoshimoto, K., Asa, S. L., Yamada, S., Mizusawa, N. und Kudo, E. (2007), 'Tumor-specific downregulation and methylation of the cdh13 (h-cadherin) and cdh1 (e-cadherin) genes correlate with aggressiveness of human pituitary adenomas.', *Mod Pathol* **20**(12), 1269–1277.
- Ranscht, B. und Dours-Zimmermann, M. T. (1991), 'T-cadherin, a novel cadherin cell adhesion molecule in the nervous system lacks the conserved cytoplasmic region.', *Neuron* **7**(3), 391–402.
- Ribatti, D. (2008), 'Chick embryo chorioallantoic membrane as a useful tool to study angiogenesis.', *Int Rev Cell Mol Biol* **270**, 181–224.
- Richter, S., Vandezande, K., Chen, N., Zhang, K., Sutherland, J., Anderson, J., Han, L., Panton, R., Branco, P. und Gallie, B. (2003), 'Sensitive and efficient detection of rb1 gene mutations enhances care for families with retinoblastoma.', *Am J Hum Genet* **72**(2), 253–269.
- Riou, P., Saffroy, R., Chenailler, C., Franc, B., Gentile, C., Rubinstein, E., Resink, T., Debuire, B., Piatier-Tonneau, D. und Lemoine, A. (2006), 'Expression of t-cadherin in tumor cells influences invasive potential of human hepatocellular carcinoma.', *FASEB J* **20**(13), 2291–2301.

- Sakata, T., Ferdous, G., Tsuruta, T., Satoh, T., Baba, S., Muto, T., Ueno, A., Kanai, Y., Endou, H. und Okayasu, I. (2009), 'L-type amino-acid transporter 1 as a novel biomarker for high-grade malignancy in prostate cancer.', *Pathol Int* **59**(1), 7–18. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1827.2008.02319.x>
- Sato, M., Mori, Y., Sakurada, A., Fukushige, S., Ishikawa, Y., Tsuchiya, E., Saito, Y., Nukiwa, T., Fujimura, S. und Horii, A. (1998), 'Identification of a 910-kb region of common allelic loss in chromosome bands 16q24.1-q24.2 in human lung cancer.', *Genes Chromosomes Cancer* **22**(1), 1–8.
- Setterquist, R., M.Wilson, Johnson, C., Agarwal, S. und Moturi, S. (2005), Synthesize high yields of biotinylated arna, TechNotes 12(3), Ambion, Inc.. <http://www.ambion.com/techlib/tn/123/>
- Shimada, K., Nakamura, M., Anai, S., Velasco, M. D., Tanaka, M., Tsujikawa, K., Ouji, Y. und Konishi, N. (2009), 'A novel human alkb homologue, alkbh8, contributes to human bladder cancer progression.', *Cancer Res* **69**(7), 3157–3164.
- Sidman, R. L. (1957), 'The structure and concentration of solids in photoreceptor cells studied by refractometry and interference microscopy.', *J Biophys Biochem Cytol* **3**(1), 15–30.
- Skapek, S. X., Pan, Y.-R. und Lee, E. Y.-H. P. (2006), 'Regulation of cell lineage specification by the retinoblastoma tumor suppressor.', *Oncogene* **25**(38), 5268–5276.
- Smedley, D., Haider, S., Ballester, B., Holland, R., London, D., Thorisson, G. und Kasprzyk, A. (2009), 'Biomart–biological queries made easy.', *BMC Genomics* **10**, 22.
- Sugahara, K. N., Hirata, T., Hayasaka, H., Stern, R., Murai, T. und Miyasaka, M. (2006), 'Tumor cells enhance their own cd44 cleavage and motility by generating hyaluronan fragments.', *J Biol Chem* **281**(9), 5861–5868.
- Takeuchi, T., Masaki, A., Liang, S. B., Tachibana, A., Hayashi, N., Sonobe, H. und Ohtsuki, Y. (2000), 'Expression of t-cadherin (cdh13, h-cadherin) in human brain and its characteristics as a negative growth regulator of epidermal growth factor in neuroblastoma cells.', *J Neurochem* **74**(4), 1489–1497.
- Takeuchi, T. und Ohtsuki, Y. (2001), 'Recent progress in t-cadherin (cdh13, h-cadherin) research.', *Histol Histopathol* **16**(4), 1287–1293.

- Tamai, S., Masuda, H., Ishii, Y., Suzuki, S., Kanai, Y. und Endou, H. (2001), 'Expression of I-type amino acid transporter 1 in a rat model of liver metastasis: positive correlation with tumor size.', *Cancer Detect Prev* **25**(5), 439–445.
- Toole, B. P. (2004), 'Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue.', *Nat Rev Cancer* **4**(7), 528–539.
- Toole, B. P., Wight, T. N. und Tammi, M. I. (2002), 'Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease.', *J Biol Chem* **277**(7), 4593–4596.
- Trepel, M. (2004), *Neuroanatomie. Struktur und Funktion.*, 3. auflage edn, Urban & Fischer.
- Tschentscher, F., Prescher, G., Zeschnigk, M., Horsthemke, B. und Lohmann, D. R. (2000), 'Identification of chromosomes 3, 6, and 8 aberrations in uveal melanoma by microsatellite analysis in comparison to comparative genomic hybridization.', *Cancer Genet Cytogenet* **122**(1), 13–17.
- Tufan, Adkdogan, A. (2004), 'Shell-less culture of the chick embryo as a model system in the study of developmental neurobiology', *Neuroanatomie* **3**, 8–11.
- Tzircotis, G., Thorne, R. F. und Isacke, C. M. (2005), 'Chemotaxis towards hyaluronan is dependent on cd44 expression and modulated by cell type variation in cd44-hyaluronan binding.', *J Cell Sci* **118**(Pt 21), 5119–5128.
- Vestal, D. J. und Ranscht, B. (1992), 'Glycosyl phosphatidylinositol–anchored t-cadherin mediates calcium-dependent, homophilic cell adhesion.', *J Cell Biol* **119**(2), 451–461.
- Walker, B. A., Leone, P. E., Jenner, M. W., Li, C., Gonzalez, D., Johnson, D. C., Ross, F. M., Davies, F. E. und Morgan, G. J. (2006), 'Integration of global snp-based mapping and expression arrays reveals key regions, mechanisms, and genes important in the pathogenesis of multiple myeloma.', *Blood* **108**(5), 1733–1743.
- Wang, D. G., Fan, J. B., Siao, C. J., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., Ghandour, G., Perkins, N., Winchester, E., Spencer, J., Kruglyak, L., Stein, L., Hsie, L., Topaloglou, T., Hubbell, E., Robinson, E., Mittmann, M., Morris, M. S., Shen, N., Kilburn, D., Rioux, J., Nusbaum, C., Rozen, S., Hudson, T. J., Lipshutz, R., Chee, M. und Lander, E. S. (1998), 'Large-scale

identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome.', *Science* **280**(5366), 1077–1082.

Wechsler-Reya, R. und Scott, M. P. (2001), 'The developmental biology of brain tumors.', *Annu Rev Neurosci* **24**, 385–428.

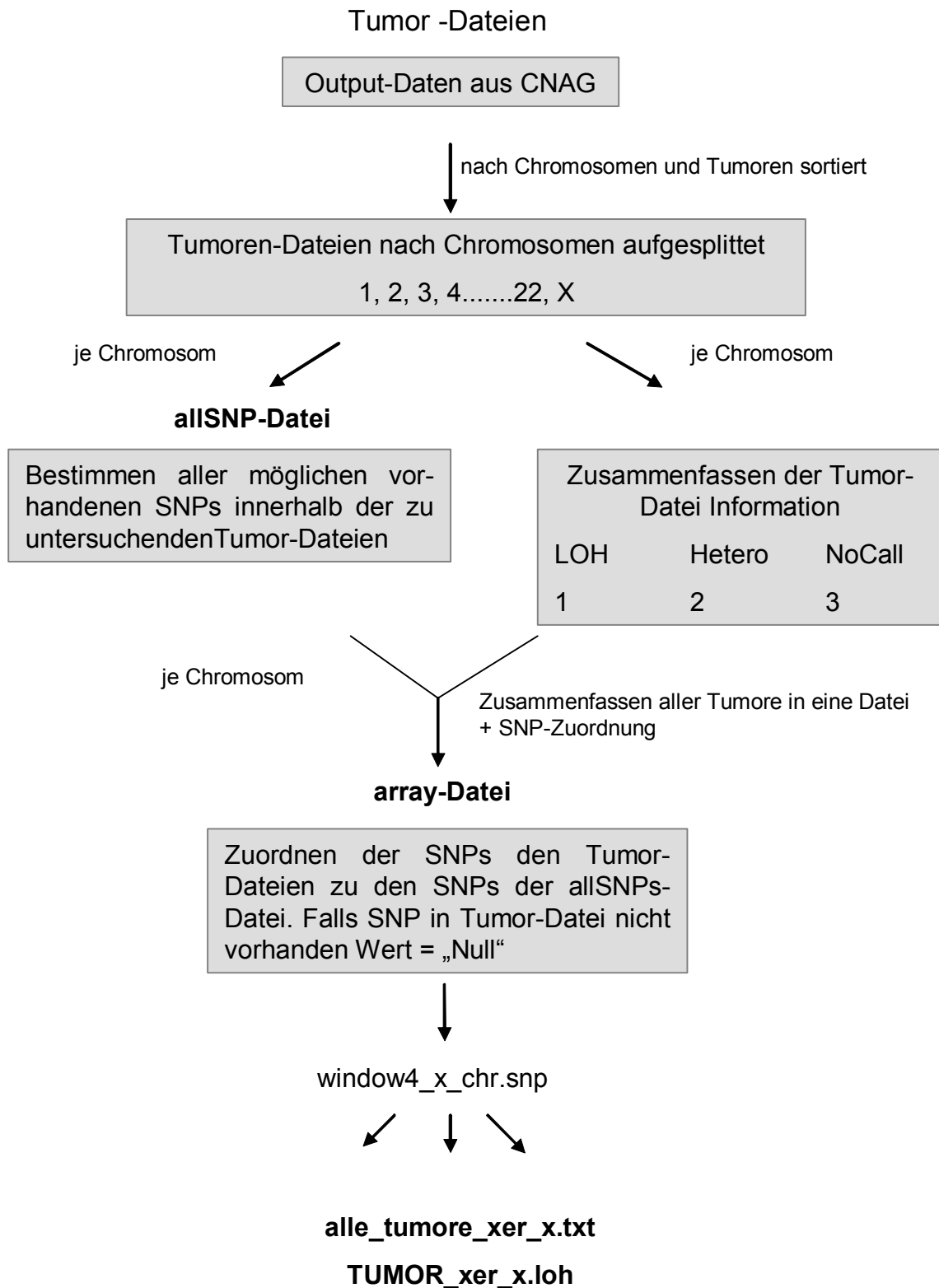
Weinberg, R. A. (1995), 'The retinoblastoma protein and cell cycle control.', *Cell* **81**(3), 323–330.

Wodicka, L., Dong, H., Mittmann, M., Ho, M. H. und Lockhart, D. J. (1997), 'Genome-wide expression monitoring in *saccharomyces cerevisiae*.', *Nat Biotechnol* **15**(13), 1359–1367.

Wu, Z., Irizarry, R. A., Gentleman, R., Murillo, F. M. und Spencer, F. (2004), 'A model based background adjustment for oligonucleotide expression arrays', *Journal of the American Statistical Association* **99**, 909–917.

7 Anhang

7.1 Flussdiagramm für scanprogramm_2008-01-14.sh



7.2 Abkürzungsverzeichnis

A	nicht detektierbar (<u>a</u> bsent)
Ad	<u>a</u> dultes Stadium
BRLMM	<u>B</u> ayesian <u>R</u> obust <u>L</u> inear With <u>M</u> ahalanobis
CAM	<u>C</u> horio <u>a</u> llantois <u>m</u> embran
CDF	<u>c</u> hip <u>d</u> efinition <u>f</u> ile
CGH	<u>c</u> omparative <u>g</u> enomic <u>h</u> ybridization
Ct	<u>t</u> hreshold <u>c</u> ycle
D	Abnahme (<u>D</u> ecrease)
dbSNP	SNP-Datenbank (<u>d</u> atabase of <u>S</u> ingle <u>N</u> ucleotide <u>P</u> olymorphism)
dcbSNP	<u>D</u> iscordant <u>c</u> all <u>b</u> ar <u>S</u> ingle <u>N</u> ucleotide <u>P</u> olymorphisms
DM	<u>D</u> ynamic <u>M</u> odel
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
DSMZ	<u>D</u> eutsche <u>S</u> ammlung von <u>M</u> ikroorganismen und <u>Z</u> ellkulturen, Braunschweig
E[Zahl]	<u>E</u> mbryonaltag [Zahl] (Maus und Huhn) oder Entwicklungstag [Zahl] (nur bei Huhn)
EGF	<u>E</u> pidermal <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
FACS	<u>f</u> luorescence <u>a</u> ctivated <u>c</u> ell <u>s</u> orting
GCL	Ganglienzellschicht (<u>g</u> anglion <u>c</u> ell <u>l</u> ayer)
GCOS	Affymetrix <u>G</u> ene <u>C</u> hip® <u>O</u> perating <u>S</u> oftware
GCRMA	<u>G</u> ene <u>C</u> hip RMA
GO	the <u>G</u> ene <u>O</u> ntology
hcbSNP	<u>H</u> etero <u>c</u> all <u>b</u> ar <u>S</u> ingle <u>N</u> ucleotide <u>P</u> olymorphisms
HE	<u>H</u> ämatoxylin- <u>E</u> osin
HMM	<u>H</u> idden <u>M</u> arkov <u>M</u> odel
I	Zunahme (<u>I</u> ncrease)
IM	<u>i</u> deal <u>m</u> ismatch
INbl	Neuroblastenschicht (<u>i</u> nn <u>e</u> r <u>n</u> euroblast <u>l</u> ayer)
INL	innere Körnerschicht (<u>i</u> nn <u>e</u> r <u>n</u> ucl <u>a</u> r <u>e</u> <u>l</u> ayer)
LB-Legehennen	<u>L</u> ohmann <u>B</u> rown Classic Legehennen
LOH	Verlust der Heterozygotie (<u>l</u> oss of <u>h</u> eterozygosity)
M	unsicher (<u>m</u> arginal)
MAGE-ML	<u>M</u> icro <u>A</u> rray <u>G</u> ene <u>E</u> xpression <u>M</u> arkup <u>L</u> anguage
maxLOH	größtmöglicher LOH-Bereich; Bereich zwischen dem proximalen und dem distalen hcbSNP vor bzw. nach einem minLOH-Bereich
MD	geringe Abnahme (<u>m</u> arginal <u>d</u> ecrease)
MI	geringe Zunahme (<u>m</u> arginal <u>i</u> ncrease)
minLOH	eindeutiger LOH-Bereich; Bereich mit überwiegend dcbSNPs
MM	<u>m</u> ismatch (probe set)
NC	keine Veränderung (<u>n</u> o <u>c</u> hange)
ncRNA	nicht codierende RNAs (<u>n</u> on <u>c</u> oding RNA)
ONL	äußere Körnerschicht (<u>o</u> uter <u>n</u> ucl <u>a</u> r <u>e</u> <u>l</u> ayer)
P	detektierbar (<u>p</u> resent)
P[Zahl]	Postnataltag [Zahl]

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
PI	Peak <u>i</u> ntegral
PM	<u>p</u> erfekt <u>m</u> atch (probe set)
qPCR	<u>q</u> uantitative Polymerase-Kettenreaktion
refSNP	Referenz Einzelnukleotid-Polymorphismen (<u>R</u> eference <u>S</u> ingle <u>N</u> ucleotide <u>P</u> olymorphism)
RFLP	<u>R</u> estriction <u>F</u> ragment <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphism
RIN	<u>R</u> NA <u>I</u> ntegrity <u>N</u> umber
RMA	<u>r</u> obust <u>m</u> ulti- <u>a</u> rray analysis
RQ	<u>r</u> elative <u>q</u> uantification
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismen (<u>S</u> ingle <u>N</u> ucleotide <u>P</u> olymorphism)
STR	<u>s</u> hort <u>t</u> andem <u>r</u> epeat
TSV-Datei	Tabulator getrennte Textdatei (<u>t</u> ab- <u>s</u> eparated <u>v</u> alues)
UPD	<u>U</u> niparentale <u>D</u> isomie
VEGF	<u>V</u> ascular <u>E</u> ndothelial <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
ZTL	<u>Z</u> entrales <u>T</u> ier <u>l</u> aboratorium

7.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Nicole Dünker bedanken, die mir die Möglichkeit gab, an diesem hoch brisanten wissenschaftlichen Thema zu forschen. Frau Prof. Dünker gilt mein besonderer Dank, da sie mit ihrer wissenschaftlichen Betreuung den größten Anteil am Zustandekommen dieser Dissertation hat. Ohne ihre Anleitung, kurzfristigen Rückmeldungen und Geduld wäre eine so frühzeitige Fertigstellung der Dissertation nicht vorstellbar gewesen. Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Dietmar Lohmann als Zweitbetreuer dieser Dissertation für die vielfältigen Ideen und Ratschläge sowie die fachliche Bewertung dieser Arbeit. Frau Dr. Sandrine Gratijs sei ebenfalls ein Dank ausgesprochen, da mir die in ihrer Doktorarbeit zugrunde gelegten wissenschaftlichen Ergebnisse als Grundlage und Ausgangspunkt meiner Dissertation dienten. Bedanken möchte ich mich außerdem bei Herrn PD Dr. Ludgar Klein-Hitpass, dass er mir sein technisches Know-how zur Verfügung gestellt und bei der *Comparison Analyse* hilfreich zur Seite gestanden hat. Herrn Dr. Enrico Tiacci gilt mein Dank für die Überprüfung der RNA-Qualität für die Mikroarrayanalyse. Frau Saskia Seland bin ich zu Dank für die aktuelle STR-PCR Analyse samt Auswertung verpflichtet. Alle drei Personen haben einen entscheidenden Beitrag für die Vervollständigung dieser Dissertation geleistet.

Nicht unerwähnt bleiben darf außerdem Herr Dr. Harald Stephan von Klinik für Pädiatrische Nephrologie der Universitäts-Kinderklinik Essen, der dankenswerterweise zwei cDNA Proben von Retinoblastom Biopsien zur Verfügung gestellt hat. Die Biopsien von humanen Melanomen wurden dankenswerterweise von Herrn Prof. Dr. med. Dirk Schadendorf von der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Essen zur Verfügung gestellt. In diesem Zusammenhang möchte ich mich bei Frau Dr. med. Elisabeth Livingstone und Herrn Dr. med. Joachim Klode bedanken, die die Operationen durchführten. Für das Zystektomiematerial vom Blasenkarzinom zur Erprobung des *ex ovo* CAM-Modells möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. H. Rübben und Frau Jaqueline Wittschie aus der Klinik und Poliklinik für Urologie des Universitätsklinikums Essen bedanken.

Meinen speziellen Dank möchte ich zunächst meiner Arbeitsgruppe und besonders, Frau Ursula Gerster, Frau Dagmar Gioè, Frau Ulrike Laub und Herrn Dr. Andreas Weise aussprechen. Frau Gerster, Frau Laub und Herr Weise haben diese Dissertation mit der Vorbereitung der Exon-Analyse und der Unterweisung meiner Person in die Zellkulturen humaner Zellen unterstützt. Bei Frau Gioè bedanke ich mich für die unermüdliche Unterstützung in allen organisatorischen Belangen, welches gerade in der Endphase mir den Kopf für das Niederschreiben der Arbeit ließ. Außerdem gilt mein Dank der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Süleyman Ergün, insbesondere Frau Birthe Bongartz, Frau Jaqueline Klein, Herrn Jens Moser, Herrn Harrison Muturi, Herrn Dr. Bernhard Singer und Frau Dr. Inka Scheffrahn.

Beide Arbeitsgruppenteams haben mir mit ihrem Fachwissen, ihrer konstruktiven Kritik und ihren vielen Ideen immer wieder den nötigen Anstoß zum Andersdenken und Weitermachen gegeben.

Abschließend bedanke ich mich bei Herrn und Frau Frank für die moralische und am Ende verpflegende Unterstützung und bei meiner Freundin Angela Frank, die mir und der für Sie völlig fremden Thematik während der zweieinhalb Jahre überaus viel Verständnis, unermüdliche Geduld und seelischen Beistand entgegengebracht hat.

Lebenslauf

Personalien

Vor- und Zunahme
Anschrift Sebastian Gustmann
Katharinenstraße 15
53721 Siegburg
Tel:
E-Mail: sebastian.gustmann@uk-essen.de

Geburtsdatum und -ort 25.08.1980 in Bergisch Gladbach
Staatsangehörigkeit Deutsch
Eltern Harald Max Paul Gustmann,
Evi Maria Gustmann
Geschwister fünf jüngere Schwestern

Studium

März 2007 Beginn der Doktorarbeit „Genetische Mechanismen der Tumorprogression bei Retinoblastom“ am Institut für Anatomie, Abteilung für Neuroanatomie an der Universität Duisburg-Essen unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. N. Dünker und Herrn Prof. Dr. D. Lohmann (Institut für Humangenetik)

September 2006 Diplom (Gesamtnote: sehr gut)

November 2005 Beginn der Diplomarbeit „Organismische Stöchiometrie aus der Sicht des Transkriptoms“ in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. D. Tautz im Institut für Genetik an der Universität zu Köln unter der Betreuung von Herrn PD Dr. R. Wünschiers

Hauptstudiumsfächer: Genetik (Note: 1,7), Biochemie (Note: 1,3), Organische Chemie (mündliche Noten) (Note: 1,3)

Dezember 2003 Vordiplom (Gesamtnote: gut)

Oktober 2001 Beginn des Studiums (Biologie, Diplom) an der Universität zu Köln

Schulbildung

1996 bis 2000 Städtisches Gymnasium Hennef in Hennef (Sieg)
Abschluss: Allgemein Hochschulreife (Note: 2,2)

1991 bis 1996 Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium in Bergisch Gladbach

1987 bis 1991 Katholische Grundschule Gronau in Bergisch Gladbach

Praktische Erfahrung

April 2006 bis Juli 2006 Angestellt an der Philipps Universität Marburg zur Betreuung eines bioinformatischen Kurses unter der Leitung von Herrn PD Dr. R. Wünschiers

Juni 2004 bis September 2004 Experimentelle Arbeit „Vermeidung der Keimbildung in Feuchtmitteln“ im Auftrag der Firma Böttcher GmbH & Co. KG

Mai 2001 bis Juni 2001 Praktikum bei degussa. (Degussa AG, Werk Wesseling im Umweltschutzzlabor der Abteilung Sicherheit und Umweltschutz)

Juli 2000 bis
April 2001

Wehrdienst (Hilfsausbilder, vorzeitige Beförderung zum
Hauptgefreiten)

PC-Kenntnisse

sehr guter Umgang mit allen Windows-Versionen

weitreichende Kenntnisse in Word, Excel und Power Point

Grundkenntnisse in der Bedienung eines Macs

sehr guter Umgang mit Linux sowie fortgeschrittene Kenntnisse
in der Shell-Programmierung

fortgeschrittene Kenntnisse in der Programmiersprache AWK

erweiterte Kenntnisse in MySQL, R und LaTeX

Kenntnisse in PERL und HTML

Erfahrung in der Behebung von Hard- und Software-Problemen

Sprachkenntnisse

Englisch (Schulkenntnisse)

Latein (Schulkenntnisse)

Siegburg, 14.10.2009

Sebastian Gustmann

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema "Genetische Mechanismen der Tumorprogression bei Retinoblastom" zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Sebastian Gustmann befürworte.

Essen, den _____

Prof. Dr. rer. nat. Nicole Dünker

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

Sebastian Gustmann

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Sebastian Gustmann