

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Direktor: Prof. Dr. med. Eberhard Lignitz

Mitochondriale und nukleäre Mikrosatelliteninstabilität in Kopf- und Halstumoren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktor der Medizin
der medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald

vorgelegt von
Astrid Petersmann
geboren am 16.04.1973 in Langenhagen

2005

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Eberhard Lignitz

Zweitgutachter: Prof. Dr. St. Pollak

Tag der Disputation: 20.12.2005

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AIF	Apoptose induzierender Faktor
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAX	BCL2-associated X protein
bp	Basenpaare
C	Cytidin
CD	Common Deletion
CE	Kapillarelektrophorese
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleotidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
D-Loop	Displacement Loop
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESCC	Esophageal squamous cell carcinoma
FAM	6-Carboxyfluorescein
G	Guanosin
HCC	Hepatocellular carcinoma
hMLH1	human <i>mutL</i> homologue 1
hMSH2	human <i>mutS</i> homologue 2
hMSH3	human <i>mutS</i> homologue 3
hMSH6	human <i>mutS</i> homologue 6
HNH	Hepatocellular nodular hyperplasia

HNSCC	Head and neck squamous cell carcinom
hPMS1	Human postmeiotic segregation increased 1
hPMS2	Human postmeiotic segregation increased 2
H-Strang	Heavy-Strang
IGFIIR	Insulinlike growth factor II receptor
JOE	2',7'-Dimethoxy-4',5'-dichlor-6'-carboxyfluorescein
kb	Kilobasen
LOH	Loss of heterozygosity
L-Strang	Light-Strang
MMR	Mismatch repair system
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSI-H	Mikrosatelliteninstabilität high
MSI-L	Mikrosatelliteninstabilität low
mtDNA	Mitochondriale desoxyribonucleic acid
ND1	NADH-Dehydrogenaseuntereinheit 1
ND5	NADH-Dehydrogenaseuntereinheit 5
nDNA	Nukleäre desoxyribonucleic acid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS-Puffer	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlsg.)
PCR	Polymerase chain reaction
POP-4	Performance optimized polymer- 4
pV	partieller Verlust eines Allels
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROS	Reactive oxygen species
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
S	Allelverschiebung

STR	Short tandem repeat
T	Thymin
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAMRA	N,N,N',N'-Tetramethyl-6-carboxyrhodamin
TGFβRII	Transforming growth factor beta receptor type II
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
V	Verlust eines Allels
xg	x-fache der Erdbeschleunigung
Z	Zugewinn eines Allels

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Zielsetzung	5
2	Material und Methode	6
2.1	Patienten und Tumore	6
2.2	DNA-Isolation	6
2.2.1	DNA-Isolation aus Paraffinschnitten	6
2.2.2	DNA-Isolation aus peripherem Blut	9
2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	10
2.3.1	Amplifizierung definierter Regionen der mtDNA	13
2.3.2	Detektion der $\Delta 4977$ bp Deletion	16
2.3.3	Amplifizierung von nukleären Mononukleotidrepeats	18
2.3.4	Amplifizierung von nukleären Dinukleotidrepeats	19
2.3.5	Amplifizierung von nukleären Tetranukleotidrepeats	21
2.4	Elektrophoresen und Färbungen	24
2.4.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Silberfärbung	25
2.4.1.1	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) von PCR-Produkten	28
2.4.1.2	Native PAGE zur Detektion der $\Delta 4977$ bp Deletion	29
2.4.1.3	Denaturierende Harnstoff PAGE zur Vorauslese instabiler nukleärer Dinukleotidrepeats	29
2.4.2	Kapillarelektrophorese (CE) und Fluoreszenzmarkierungen	30
2.4.2.1	Kapillarelektrophorese nukleärer Dinukleotidrepeats mit Fluoreszenz-markierten Primern	32
2.4.2.2	Kapillarelektrophorese nukleärer Tetranukleotidrepeats mit Fluoreszenz-markierten Primern	32
2.5	Sequenzierung	33
2.5.1	Sequenzierung der mtDNA Regionen mit der Kapillarelektrophorese	35
2.5.2	Sequenzierung nukleärer Mononukleotidmarker	37
2.5.3	Auswertung der Sequenzierungsdaten	37
2.6	Statistik	38

3	Ergebnisse	39
3.1	Veränderungen in der mitochondrialen DNA	40
3.1.1	Untersuchung definierter Regionen der mtDNA	40
3.1.2	Δ 4977 bp Deletionen	43
3.2	Veränderungen in der nukleären DNA	44
3.2.1	Mononukleotidrepeats	44
3.2.2	Dinukleotidrepeats	46
3.2.3	Tetranukleotidrepeats	49
3.3	Korrelationen der Veränderungen untereinander	52
3.3.1	Primärtumore	52
3.3.2	Metastasen	54
3.3.3	Primärtumore und Metastasen	55
4	Diskussion	57
4.1	Veränderungen in der mitochondrialen DNA	58
4.1.1	Punktmutationen und mitochondriale Mikrosatelliteninstabilität	58
4.1.2	Δ 4977Deletion	65
4.2	Nukleäre Veränderungen: Mikrosatelliteninstabilität	68
4.2.1	Mononukleotidrepeats	68
4.2.2	Dinukleotidrepeats	70
4.2.3	Tetranukleotidrepeats	71
4.3	Ausblick	75
5	Zusammenfassung	76
6	Literatur	77
7	Anhang	92
7.1	Übersicht der Tumordaten	92
7.2	Grading von Plattenepithelkarzinomen an Kopf- und Hals	95
7.3	Staging von Plattenepithelkarzinomen an Kopf- und Hals	96
	Danksagung	
	Eidesstattliche Erklärung	
	Lebenslauf	

Diese Arbeit widme ich

**meinem Mann
und meinen Kindern Phil, Anna und Ron.**

1 Einleitung

Plattenepithelkarzinome gehören zu den häufigsten malignen Tumoren der Kopf und Halsregion (Engl.: head and neck squamous cell carcinoma; abgekürzt: HNSCC). HNSCC machen in Europa nahezu 5 % aller malignen Tumorerkrankungen aus (Sasiadek et al., 2001).

Das Plattenepithelkarzinom ist ein maligner epithelialer (invasiver) Tumor mit Differenzierungszeichen des Plattenepithels, wobei eine Verhornung und/oder Interzellularbrücken als variable Merkmale auftreten können (Shanmugaratnam 1991). Histologisch werden drei Differenzierungsgrade unterschieden (s. unten).

Plattenepithelkarzinome leiten sich vom bedeckenden Plattenepithel der Schleimhaut ab und entwickeln sich über definierte Vorstadien. Die präkanzerösen Läsionen des Plattenepithels sind durch zelluläre Atypien sowie einen Verlust der regulären Epithelreifung und -schichtung gekennzeichnet (Shanmugaratnam, 1991). Die geringe Dysplasie zeigt leichte nukleäre Atypien, die überwiegend im basalen Drittel des Epithels lokalisiert sind (Grading 1). Bei der mittelgradigen Dysplasie sind die nukleären Anomalien stärker als bei der geringen Dysplasie ausgeprägt und prominente Nukleolen können auftreten (Grading 2). Diese Veränderungen nehmen die unteren zwei Drittel des Epithels ein, aber Zellreifung und Stratifikation sind in den oberen Epithelschichten erhalten. An Intensität zunehmende nukleäre Atypien und ein Epithelreifungsverlust über zwei Drittel des Epithels hinaus sowie bis in die oberen Epithelschichten nachweisbare Mitosen (darunter atypische) charakterisieren die schwere Dysplasie (Grading 3). Ein Carcinoma in situ liegt vor, wenn die Läsionen in der gesamten Epithelbreite zelluläre Merkmale eines Karzinoms bieten, aber eine Invasion nicht nachgewiesen werden kann. Die pTNM-Klassifikation der drei untersuchten Lokalisationen Oropharynx, Hypopharynx und Larynx ist im Anhang aufgeführt.

Die meisten Plattenepithelkarzinome an Kopf und Hals kommen bei Männern über 50 vor. Die Ätiologie ist komplex. Als wichtige Risikofaktoren sind Tabakrauchen und Alkoholkonsum (Decker and Goldstein 1982; Winn et al., 1991; Falk et al., 1989; Nam et al., 1992) bekannt. In jüngerer Vergangenheit mehrten sich die Hinweise auf einen Zusammenhang mit einer Infektion durch Humanes Papillom-Virus (HPV-Infektion) bei Tonsillartumoren (Gillison 2004;

Hafkamp et al., 2004) sowie eine genetische Disposition (Wiseman et al., 2004). Zur Darstellung charakteristischer genetischer Veränderungen der HNSCC soll diese Arbeit einen Beitrag leisten.

Generell weisen neoplastische Läsionen ein großes Spektrum genetischer Veränderungen auf (Lengauer et al., 1998). Dazu gehören neben der Vervielfachung des Kerngenoms (Polyploidien) und großen Chromosomeninstabilitäten, die ganze Chromosomenabschnitte betreffen (Yin et al., 1988; Carey et al., 1989), auch Verluste in Mikrosatellitenmarkern (LOH, engl. für loss of heterozygosity; Koreth et al., 1996; Tomlinson et al., 2002) und Mutationen in Mikrosatellitenmarkern (Mikrosatelliteninstabilität – MSI; Sasiadek et al., 2001), wobei sich die beiden letzteren in kleineren Dimensionen, bis zu einigen Dutzend Basenpaare (bp), abspielen.

Mikrosatellitenmarker sind kurze Basenabfolgen, die sich direkt hintereinander wiederholen. Bei Mononukleotidrepeats wiederholt sich eine einzige Base. So steht z.B. bei dem Gen für IGF1R (insulin like growth factor II receptor) im Mononukleotidrepeat acht Mal die Base Guanodin (G_8) hintereinander. Diese sich wiederholenden Basenabfolgen, insbesondere Di-, Tetra- oder Pentarepeats, liegen jedoch nicht nur in kodierenden Regionen der DNA, sondern sie sind über das ganze eukaryotische Genom verteilt. Wiederholt sich eine Basenabfolge von drei Basen oder mehr, z.B. die Folge CGTA (Cytidin, Guanodin, Thymin, Adenosin), so spricht man von einem Short Tandem Repeat (STR), in diesem Falle ein Tetranukleotidrepeat. Die Allelbezeichnung definiert sich über die Anzahl der Repeats, d.h. findet man z.B. CGTACGTACGTACGTACGTA, also eine fünfmalige Wiederholung des STR-Motivs, würde man es als „Allel 5“ dieses STRs beschreiben. Durch Untersuchungen an einer repräsentativen Stichprobe einer Population wird die Zahl und die Art der vorkommenden Allele der STR Loci bestimmt. Die STRs haben sich als wichtiges Routine-Werkzeug unter anderem in der forensischen Abstammungsbegutachtung und Identifizierung etabliert. Das Prinzip der Vaterschaftsbestimmung mit Hilfe von STRs beruht darauf, dass ein Kind jeweils einen Chromosomensatz von seiner Mutter und einen von seinem Vater geerbt hat. Damit hat es auch in jedem STR ein Allel von seiner Mutter und eines von seinem Vater geerbt. Sind die mütterlichen Allele bekannt, kann das

vom Vater geerbte Allel genau bestimmt werden. Mono-, und Dinukleotidrepeats werden eher bei der Suche nach Tumorsuppressorgenen oder anderen krankheitsdeterminierenden Faktoren analysiert.

Bei Insertionen oder Deletionen in kodierenden Regionen der DNA entsteht ein Frameshift, d.h. das Leseraster wird verschoben. Dadurch kann ein nicht funktionstüchtiges Protein entstehen oder ein Kettenabbruch herbeigeführt werden, obwohl der genetische Code degenerativ ist, d.h. für die meisten der 21 Aminosäuren mehrere Basentriplets stehen können. Bei Punktmutationen, dem Austausch einer Base gegen eine andere, besteht hingegen eher die Chance, ein funktionstüchtiges oder gar ein unverändertes Protein zu erhalten.

Art und Ort der Mutation sind also von entscheidender Bedeutung für ihre Auswirkung. Mutationen sind nicht nur Quelle vieler Fehlfunktionen oder gar Krankheiten, sie stellen auch die Grundvoraussetzung für die Evolution dar. Bei der Replikation des Kerngenoms unterlaufen ständig Fehler, für deren Reparatur mehrere Mechanismen, wie z.B. die Exonukleasefunktion der Polymerase I und das Mismatch Repair System (MMR), zur Verfügung stehen. Dies reduziert die Fehlerrate bei der Replikation auf weniger als 10^{-8} im Kerngenom. Weitere innere und äußere Faktoren, die zu Mutationen führen können, sind z.B. intrazelluläre Stoffwechselprodukte oder von außen wirkende oder in den Körper aufgenommene mutagene Agenzien.

Neben nukleärer DNA (nDNA) findet sich in auch DNA in den Mitochondrien. Die mitochondriale DNA des Menschen umfasst 16569 Basenpaare (Anderson et al., 1981) und liegt zirkulär mit durchschnittlich 10 Kopien pro Organelle vor (Wallace et al., 1998). Die Zahl der Mitochondrien pro Zelle variiert zwischen 100 bis 500 in somatischen Zellen (Sato and Kuroiwa, 1991). Die Mutationsrate der DNA in Mitochondrien (mtDNA) ist etwa 10- bis 20-mal höher als im Kern (Brown and Wallace, 1994; Polyak et al., 1998; Wallace et al., 1998). Einige Besonderheiten der Mitochondrien werden dafür verantwortlich gemacht: Zum einen fehlen der mtDNA schützende Proteine, wie Histone, wodurch die mtDNA leicht angreifbar für chemische Karzinogene wird (Backer and Weinstein, 1980; Allen and Coombs, 1980). Zum anderen ist die mtDNA, durch die Atmungskette der inneren Mitochondrienmembran, stärker dem Einfluss reaktiver Sauerstoffmoleküle (reactive oxygen species= ROS) aus der oxidativen Phosphorylierung ausgesetzt (Richter et al.; 1995). In Mitochondrien werden

immerhin etwa 90 % des ATP einer Zelle (Wallace 1997) durch oxidative Phosphorylierung produziert. Dabei entstehen auf physiologischem Wege ROS (Richter et al.; 1995). Außerdem werden ineffizientere Reparaturmechanismen und die schlecht arbeitende Polymerase γ (Kunkel and Loeb, 1981) als Gründe für die erhöhte Mutationsrate genannt.

Ein Zusammenhang zwischen somatischen mtDNA Mutationen und Tumorerkrankungen wurde erstmals 1967 von Clayton und Vinograd in menschlichen Leukämie-Lymphozyten beschrieben. Seit dem sind fortlaufend weitere Veränderungen in vielen Loci und Genen der mtDNA beschrieben worden (MITOMAP).

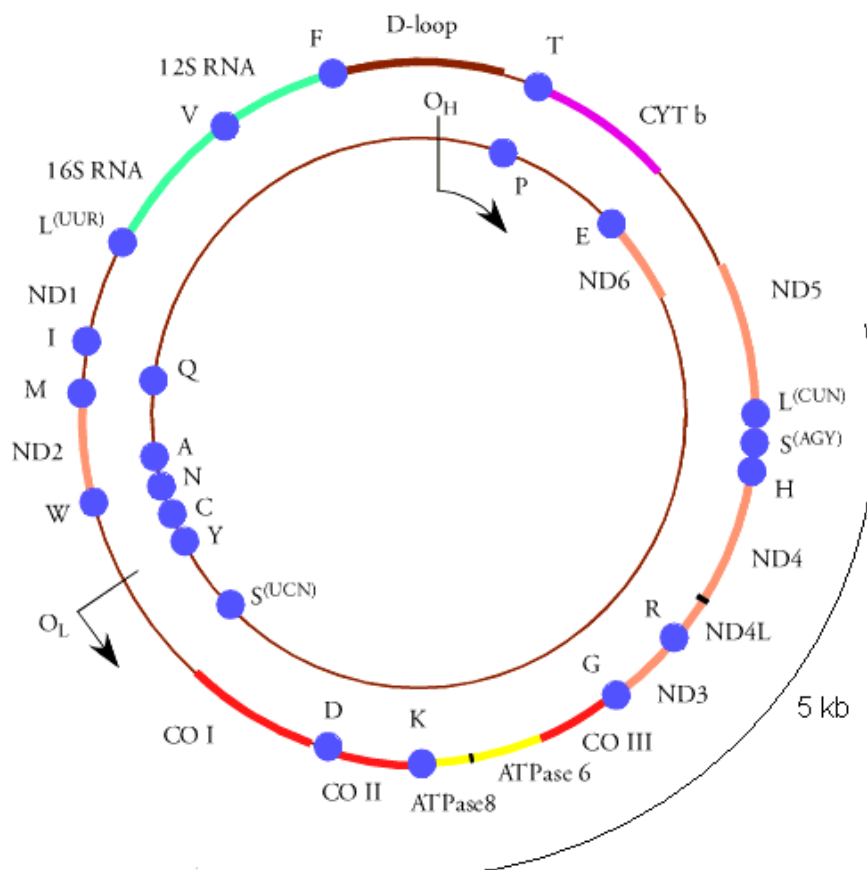


Abbildung 1-1: Das mitochondriale Genom - eine Übersicht. CO: Cytochrom Oxidase Untereinheiten; cyt b: Cytochrom b; ND: NADH-Dehydrogenase-Komplex I Untereinheiten; O_H : Replikationsursprung H-Strang; O_L : Replikationsursprung L-Strang; D-Loop: nicht kodierender Displacement-Loop oder Kontrollregion; Buchstaben: tRNAs für die den Buchstaben entsprechenden Aminosäuren; 5 kb: Bereich der $\Delta 4977$ bp Deletion.

In der mtDNA gibt es einen nicht-kodierenden Bereich, den Displacement-Loop (D-Loop). Er enthält den Replikationsursprung des H-Stranges (Attardi 1988;

Anderson et al., 1981) und weist einige hypervariable Regionen auf, in denen sich Loci für Mikrosatelliteninstabilitäten finden (MITOPMAP). Weiterhin sind für die mtDNA zahlreiche Deletionen beschrieben worden, von denen die Δ 4977 bp Deletion die größte und häufigste darstellt. Diese 5 kb große Deletion, auch common deletion (CD) genannt, betrifft mehrere Gene für Untereinheiten des ersten Atmungskettenkomplexes (Abbildung 1-1). Eine derart große Deletion kann nur dadurch toleriert werden, dass ein Mitochondrium durchschnittlich 1 bis 15 Kopien der mtDNA enthält (Sato and Kuroiwa, 1991) also polyhaploid ist. Für die Δ 4977 bp Deletion ist bereits eine Bedeutung bei der Apoptose (Mirabella et al., 2000) und verschiedenen Krankheiten beschrieben worden (Shoffner and Wallace 1992; Poulton 1992) und über einen Zusammenhang mit Tumoren spekuliert worden (Maximo et al., 2001).

1.1 Zielsetzung

In den letzten Jahren wurde vielfach über mitochondriale Veränderungen in verschiedenen Tumoren (Habano et al.; 1998, Sanchez-Cespedes et al., 2001; Maximo et al., 2001) und einen möglichen Zusammenhang mit genomischen Aberrationen berichtet. In dieser Arbeit sollten ausgewählte genetische Marker im Nukleus und im Mitochondrium auf mögliche Veränderungen in Plattenepithelkarzinomen aus der Kopf- und Halsregion hin analysiert und potentielle Korrelationen zwischen beiden Arten der Veränderungen untersucht werden.

Außerdem sollte überprüft werden, in wie weit sich Gewebe aus HNSCCs für eine Abstammungsbegutachtung in forensisch genutzten STRs eignet, im Hinblick auf eine möglicherweise gegenüber gesundem Gewebe erhöhte Mutationsrate.

2 Material und Methode

2.1 Patienten und Tumore

In dieser Studie wurden 67 Plattenepithelkarzinome an Kopf und Hals von 63 Patienten sowie von jedem Patienten gesundes Vergleichsgewebe oder peripheres Blut untersucht. Davon entfielen 21 Karzinome auf den Oropharynx, 8 auf den Hypopharynx und 38 auf den Larynx. Weiterhin wurden von 23 dieser Patienten insgesamt 40 Lymphknotenmetastasen untersucht. Bei den Plattenepithelkarzinomen handelte es sich um 51 mäßig differenzierte Karzinome (G 2-Stadien) und 16 undifferenzierte Karzinome (G 3-Stadien). Das Alter der Patienten reichte von 39 bis 85 Jahre und betrug im Mittel 59 Jahre. Eine Übersicht der Patienten und ihrer Tumoren befindet sich im Anhang (7.1).

2.2 DNA-Isolation

Die Isolation der DNA erfolgte im Rahmen dieser Arbeit aus Paraffinschnitten der Tumoren und Metastasen sowie aus Paraffinschnitten von gesundem Gewebe als Vergleichsgewebe. Bei manchen Probanden wurde zum Vergleich peripheres Blut verwendet.

2.2.1 DNA-Isolation aus Paraffinschnitten

Zunächst musste das Tumorgewebe gezielt aus der Probe entnommen werden (Poetsch et al. 2001), um dann einer Isolation zugeführt werden zu können.

Für die Gewinnung des Tumorgewebes wurden Dünnschnitte des Präparates hergestellt, auf Objektträger aufgebracht und mit Hämatoxylin Eosin gefärbt. Mit einem Mikroskop wurden die Präparate anschließend sorgfältig durchgemustert und mit Hilfe von optischen Messeinrichtungen des Mikroskops Gebiete identifiziert, die eine ausreichende Menge an Tumorgewebe, mindestens 3mm², enthielten. Dieses Gebiet konnte nun auf dem ungefärbten, 10 µm großen Gewebeblock ebenfalls identifiziert werden. Dann wurde unter mikroskopischer Kontrolle mit einer Injektionskanüle das Tumorgewebe vom gesunden Gewebe getrennt und in Schnitten auf Objektträger aufgebracht. Ausreichende Mengen

erhielt man durch Serienschnitte und mehrmalige Wiederholung der Prozedur. Anschließend erfolgte eine Paraffinentfernung für ca. 30 min in Xylol und eine Rehydrierung in absteigender Ethanolreihe (100%, 80 %, 60 % und 40 % Ethanol). Hiernach konnten die Schnitte kurze Zeit in Aqua bidest im Kühlschrank aufbewahrt werden, bevor die eigentliche DNA-Isolation begann.

Die DNA-Isolation aus dem so gewonnenen Material erfolgte mit dem *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) für die Isolierung hochmolekularer Nukleinsäuren mit 30 bis 50 kb. Das Gewebe wurde auf dem Objektträger mit Hilfe eines Skalpell's zerkleinert und in ein Eppendorfcap abgekratzt. Die Lyse der Zellen erfolgte im Lysepuffer des Kits mit dem Enzym Proteinase K über Nacht, einer Serin-Protease mit alkalischen Wirkoptimum (pH 7,4-11,5) und Temperaturstabilität bis 70 °C, welche die Zellyse durch Deprotonierung der Membranen unterstützt und DNA-degradierende Enzyme angreift (Ebeling et al., 1974). Zur Inaktivierung von Nukleasen wurde Guanidin-HCl verwendet. Das Isolationsprinzip beruht auf der selektiven Bindung der DNA an Glasfasersäulen, die in die Gefäße eingearbeitet sind. Die so gebundene DNA konnte durch Wasch-Zentrifugationsschritte von den übrigen Zellkomponenten getrennt und gereinigt werden. Nach dem Waschen konnte die DNA leicht mit einem niedrig konzentrierten Puffer eluiert werden. Im Kit enthalten waren die Pufferlösungen *Tissue Lysis Buffer* (Gewebe Lysis Puffer): 4 M Urea, 200 mM Tris, 20 mM NaCl, 200 mM EDTA, pH 7,4 bei 25 °C, *Binding Buffer* (Bindungspuffer): 6 M Guanidine-HCl, 10 mM Urea, 10 mM Tris-HCl, 20 % Triton X-100, pH 4,4 bei 25 °C, *Proteinase K* als Lyophilisat zum Auflösen in Bidest, für die Zellyse und zur Inaktivierung endogener DNasen, *Inhibitor Removal Buffer* (Inhibitor Entfernungspuffer): 5 M Guanidine-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6,6 bei 25 °C als Endkonzentrationen nach Zugabe von 20 ml absoluten Ethanol, *Wash Buffer* (Waschpuffer): 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5 bei 25 °C als Endkonzentrationen nach Zugabe von 80 ml absoluten Ethanol, *Elution Buffer* (Elutionspuffer): 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 bei 25 °C. Enthalten waren weiterhin *High Pure Filter Tubes* und *Collection Tubes*. Als weitere Reagenzien wurden benötigt: Xylol, Ethanol (100 %, 80 %, 60 % und 40 %) sowie Isopropanol. Die Zentrifugationsschritte erfolgten mit einer Biofuge der Firma Hereaus. Das Protokoll ist im Folgenden tabellarisch dargestellt (Tabelle 2-1).

Isolation von Nukleinsäuren aus Formaldehyd-fixierten und in Paraffin gebetteten Geweben	
Lyse und DNase-Deaktivierung	Zu 25-50 mg Gewebeprobe werden hinzugegeben: <ul style="list-style-type: none"> • 200 µl Gewebe Lysis Puffer • 40 µl Proteinase K (20 mg/ml) Die Probe unverzüglich mischen und über Nacht bei 55 °C inkubieren.
Lyse und DNase-Deaktivierung	20 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugeben und bei 55 °C für 1-2 h inkubieren Anmerkung: nach diesem Schritt sollten keine wesentlichen Gewebepartikel mehr sichtbar sein.
Binden der DNA an den Glasfaserfilter	Zugabe von 200 µl Bindungspuffer, gründlich durchmischen und inkubieren bei 72 °C für 10 min
Binden der DNA an den Glasfaserfilter	<ul style="list-style-type: none"> • 100 µl Isopropanol zugeben und mischen, mit einer automatischen Pipette einen Teil der Probe in eine 1 ml Spitze saugen. Anmerkung: Unlösliche Gewebekomponenten werden so in die Pipettenspitze gesogen und blockieren diese. <ul style="list-style-type: none"> • Pipettenspitze mit den unlöslichen Gewebeteilen entfernen und werfen. • Den verbleibenden Teil der flüssigen Probe in das obere Reservoir zweier ineinander gesteckter High Pure Filter Tube und Collection (Sammel-) Tube pipettieren und • Zentrifugieren für 1 min bei 8000 rpm
Binden der DNA an den Glasfaserfilter	<ul style="list-style-type: none"> • Durchfluss und Collection Tube werfen • Filter Tube auf neue Collection Tube aufsetzen • 500 µl Inhibitor Removal Puffer in das obere Reservoir geben • zentrifugieren für 1 min bei 8000 rpm
Waschen	<ul style="list-style-type: none"> • Durchfluss und Collection Tube werfen • Filter Tube auf neue Collection Tube aufsetzen • 500 µl Waschpuffer in das obere Reservoir geben • zentrifugieren für 1 min bei 8000 rpm
Waschen	Waschschritt wie oben wiederholen
Entfernen der Waschpufferreste	Durchfluss werfen und nur Filter Tube und Collection Tube noch einmal gemeinsam 10 sec. bei maximaler Geschwindigkeit (14000 rpm) zentrifugieren.
Eluieren der isolierten und gereinigten DNA	<ul style="list-style-type: none"> • Collection Tube werfen und Filter Tube in ein frisches 1,5 ml Reaction Tube stecken • 200 µl vorgewärmten Elutionspuffer (70 °C) in das Filter Tube geben • für 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren Anmerkung: Ein größeres Elutionsvolumen verbessert die DNA-Ausbeute, die DNA-Konzentration der Probe sinkt jedoch.

Tabelle 2-1: Isolation von DNA aus Paraffindünnschnitten mit dem *High Pure PCR Template Preparation Kit* ((Roche Applied Science, Mannheim).

2.2.2 DNA-Isolation aus peripherem Blut

Für diese Isolierung kann frisches oder gefrorenes Vollblut, unabhängig vom eingesetzten Stabilisator wie Citrat, Heparin oder EDTA, verwendet werden. Nukleäre DNA kann nur aus den kernhaltigen Leukozyten gewonnen werden. Das Hämoglobin der Erythrozyten wirkt inaktivierend auf die Polymerase (das Schlüsselenzym der PCR) und wird während der Isolation entfernt. Im Verlauf der Isolation werden die Zellen zunächst lysiert, dann wird die freigesetzte DNA über Ladungen - als Bindeglied zwischen negativer Säule und negativer DNA dient ein zweiwertiges Kation - an eine kleine Säule gebunden und in mehreren Zentrifugationsschritten gewaschen. Zuletzt wird die an die Säule gebundene DNA in ein Zentrifugengefäß eluiert.

Hier wurde der *Nucleo Spin Blood Kit* (Machery & Nagel) benutzt unter Zugabe von *Proteinase K* (Sigma, Deisenhof). Die Zentrifugationsschritte erfolgten mit einer Biofuge der Firma Hereaus. Das Protokoll ist in Tabelle 2-2 dargestellt.

DNA-Isolation aus Vollblut mit dem Nucleo Spin Blood Kit (Machery & Nagel)	
200 µl Vollblut in ein Eppendorfgesäß überführen, ggf mit PBS-Puffer auffüllen	
<ul style="list-style-type: none"> • 25 µl Proteinase K • 200 µl Puffer B3 zugeben und mischen (Vortex)	
Inkubation für 10 min bei 70 °C	
210 µl Ethanol zugeben und erneut mischen	
NucleoSpin-Röhrchen in ein 2 ml Auffanggefäß stellen und Lysat genau mittig auf die Säule geben -für 1 min bei 6000 xg zentrifugieren	
Filtrat verwerfen	
Bei frischem Blut weiter bei Spalte A, Bei (teilweise) geronnenem Blut weiter bei Spalte B	
A	B
	500 µl Puffer BW auf die Säule geben 1 min bei 6000 xg zentrifugieren
	Filtrat verwerfen 700 µl Puffer B5 auf die Säule geben 1 min bei 6000 xg zentrifugieren
	Filtrat verwerfen 300 µl Puffer B5 auf die Säule geben 2 min bei 8000 xg zentrifugieren
Säule in ein frisches 2 ml-Zentrifugengefäß stellen 100 µl des auf 70 °C vorgewärmten Elutionspuffer BE auf die Säule geben 1 min bei 6000 xg zentrifugieren	
Anmerkung: Um die Ausbeute zu erhöhen kann mit dem vorgewärmten Elutionspuffer eine Minute inkubiert werden, auch kann ein weiterer Elutionsschritt eingefügt werden, jedoch kann sich die DNA-Konzentration des Eluates erniedrigen.	

Tabelle 2-2: DNA-Isolation aus Vollblut mit dem Nucleo Spin Blood Kit (Machery & Nagel).

2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die **Polymerase-Chain-Reaction** (PCR, Mullis et al., 1987; Saiki et al. 1988) zur Amplifizierung von DNA wurde 1986 von K.B. Mullis entwickelt und ist schnell zu einem wichtigem Grundwerkzeug der Molekularbiologie und anverwandter Fachrichtungen geworden.

Diese Methode macht sich das Enzym DNA-abhängige DNA-Polymerase zu nutze, das in der Zelle bei der semi-konservativen Replikation der DNA nach Entwindung und Trennung der DNA-Doppelhelix den Einzelstrang mit den jeweiligen komplementären Basen wieder zu einem Doppelstrang ergänzt. Bei der PCR läuft dieser Vorgang außerhalb von Zellen und sehr oft hintereinander ab, so dass es zu einer annähernd exponentiellen Vermehrung der DNA kommt.

Die PCR läuft in drei Phasen ab: in der ersten Phase wird die DNA denaturiert, d.h. die beiden Doppelstränge werden durch Erhitzen auf über 90 °C voneinander getrennt, so dass im Reaktionsgemisch anschließend nur Einzelstränge vorliegen.

In der zweiten Phase, dem sogenannten Annealing, können an diese Einzelstränge die ebenfalls im Reaktionsgemisch enthaltenen Oligonukleotide, sogenannte Primer, binden, indem sie sich an homologe Sequenzen anlagern. Das setzt voraus, dass man den Abschnitt der DNA, den man vervielfältigen möchte, zumindest an dieser Anfangs- oder Primersequenz kennt. Da es sich bei der DNA um zwei homologe Stränge handelt, die über die Basenpaarungen A-T und G-C zusammengehalten werden, braucht man zwei Primer, auf jedem Strang einen, jeweils an den 5'-Enden. Denn die Polymerase synthetisiert nur in 5'-3'-Richtung. Die Annealing-Temperatur ist abhängig von der Länge und Art (z.B. G-C-Gehalt) des Primers und liegt zwischen 40 und 60 °C. Die Länge der Annealingphase richtet sich nach der Länge des zu synthetisierenden PCR-Produktes. Sie liegt meist zwischen 20 sec und 4 min.

Die dritte Phase ist die Synthesephase, in der die Polymerase an den Komplex aus DNA-Einzelstrang mit angelagertem Primer bindet und in 5'-3'-Richtung die jeweils komplementären Basen durch Veresterung der Nukleotide an den Primer anfügt und so wieder einen Doppelstrang herstellt. Die Temperatur der Synthesephase richtet sich nach dem Temperaturoptimum der verwendeten Polymerase. Häufig verwendet wird die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, die ihr Optimum bei 72 °C besitzt und auch in der Denaturierungsphase bei 95°C nicht zerstört wird. Vielfach sind auch modifizierte Polymerasen im Handel erhältlich, die einige Vorteile gegenüber dem Wildtyp des Enzyms besitzen. Dazu gehören z.B. die *HotStartTaq DNA Polymerase* von Quiagen oder die *AmpliTaq DNA Polymerase, FS* von Applied Biosystems. Bei beiden handelt es sich um

Varianten der Taq-Polymerase, die ihrem Verwendungszweck entsprechend modifiziert wurden. Näheres zu den Modifikationen ist bei den jeweiligen Methoden ausgeführt.

Nach der Synthesephase folgt erneut eine Denaturierungsphase. Die in der Ausgangs-DNA vorhandenen und die neu gebildeten Doppelstränge werden wieder getrennt und erneut zu Doppelsträngen komplementiert, so dass nach zwei Zyklen bereits viermal (2^2) so viele DNA Moleküle vorliegen wie zu Beginn. Nach drei Zyklen sind es bereits 2^3 mal mehr usw. Die anfangs nahezu exponentielle Vermehrung verlangsamt sich nach zunehmendem Verbrauch der Reagenzien und geht in eine Plateauphase über, die PCR verliert an Effizienz. Daher wird eine PCR nach 30 bis 40 Zyklen beendet.

Zu Beginn der PCR und zum Abschluss werden gesonderte Reaktionsschritte durchgeführt. Zu Beginn wird für eine längere Zeit als im normalen Zyklus ein Denaturierungsschritt unternommen, um zu gewährleisten, dass alle Moleküle als Einzelstrang vorliegen. Ähnliches führt man zum Abschluss durch: um sicher zu gehen, dass alle begonnen Polymerisationen zu Ende geführt werden, wird für eine längere Zeit als im normalen Zyklus die optimale Arbeitstemperatur der Polymerase gehalten.

In einem Reaktionsansatz einer PCR müssen enthalten sein: alle vier Nukleotide dATP, dGTP, dCTP und dTTP in ausreichender Menge, sowie PCR-Puffer mit KCl, Tris-HCl, $MgCl_2$. Dabei dienen KCl und Tris-HCl zur Stabilhaltung des Milieus und des pH-Wertes, freies Mg^{2+} wird von der Polymerase benötigt. Des Weiteren müssen enthalten sein: zwei Primer, die die zu amplifizierende Sequenz flankieren, die zu vermehrende DNA selbst und natürlich eine thermostabile Polymerase. Typische Reaktionsvolumina reichen von 10 bis 100 μ l. Die Temperaturabläufe werden einem Automaten, dem Thermocycler, in Form eines Programms vorgegeben. So können viele Proben gleichzeitig bearbeitet werden.

Limitiert ist eine PCR in der Anzahl der Zyklen und somit auch in der Stärke der Amplifikation durch die endliche Menge der Nukleotide im Reaktionsgemisch, sowie in der Länge der zu vervielfältigenden Sequenzen durch die Polymerase, die bis zu 600 Basen zuverlässig schreibt, darüber hinaus aber keine guten Ergebnisse liefert. Allerdings gibt es inzwischen spezielle Protokolle für die

Amplifizierung von bis zu 40 kb-langen DNA-Fragmenten (Cheng et al., 1994), die sogenannte Long-Range-PCR.

Auch die gleichzeitige Amplifizierung mehrerer DNA-Regionen ist inzwischen mittels Multiplex-PCR (Wallin et al., 2002) möglich. Dabei werden die Primer der zu amplifizierenden Regionen mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und können so in dem Reaktionsgemisch mit Hilfe geeigneter Detektoren differenziert werden. Automatische Analyse-Geräte wie der hier verwendete *ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) trennen durch eine Kapillarelektrophorese die unterschiedlichen PCR-Produkte auf, regen am Ende der Kapillare mit einem Argonlaser die Fluoreszenzfarbstoffe an und können durch Auswertung der emittierten Fluoreszenz auf den Primer und somit auf die amplifizierte DNA-Region schließen. Die Auftrennung ist mit einer Trennschärfe von 1 bp wesentlich genauer als bei horizontalen Elektrophoresen, was besonders bei repetitiven Sequenzen aller Art von großem Nutzen ist, denn die von Mensch zu Mensch unterschiedlich großen Produkte einer repetitiven Sequenz können so genau quantifiziert, d.h. die Repeatanzahl an dem Locus kann genau ermittelt werden.

Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches sowie die Temperaturen und Zeiten der einzelnen Phasen können, je nach Verwendungszweck des PCR-Produktes und abhängig von der Template-DNA und den Primern, sehr verschieden sein. Oft müssen die optimalen Bedingungen empirisch ermittelt werden.

Die nachfolgenden Unterkapitel erläutern die Besonderheiten und genauen Protokolle der einzelnen Anwendungen der PCR in dieser Studie sowie ihre Einordnung in den Gesamtzusammenhang der vorgenommenen Untersuchung.

2.3.1 Amplifizierung definierter Regionen der mtDNA

Vier Regionen der mtDNA, zwei kodierende und zwei nicht kodierende, wurden auf Veränderungen hin analysiert. Die Regionen wurden mittels PCR amplifiziert und anschließend mit dem *Invisorb® Spin PCRapid Kit* (Invitex, Berlin) gereinigt. Im Anschluss an die Aufreinigung wurden die PCR-Produkte in beide Richtungen mit den schon vormals verwandten Primern sequenziert.

Untersucht wurden die Abschnitte auf dem Displacement-Loop Nukleotid-Nummer 453-637 D-Loop (1) und Nukleotid-Nummer 49-369 D-Loop (2) sowie die Gene für die NADH-Dehydrogenaseuntereinheiten 1 und 5 (ND1 und ND5). Die nachfolgende Tabelle zeigt die verwendeten Primer sowie die entsprechenden Annealingtemperaturen.

Gen	Region nt-Nr.	Primersequenz	Annealing- temperatur	Literaturquelle
ND1	3397- 3617	atacaactacgcaaaggcccca aataggaggcctaggtgaggt	58 °C	Maximo et al. 2001
ND5	12353- 12622	ctataaccaccctaaccctgac cgaacaatgctacagggatgaa	59 °C	Maximo et al. 2001
D-Loop (1)	453- 637	cctcccactcccataactactaa gtgatgtgagcccgtctaaaca	58 °C	Maximo et al. 2001
D-Loop (2)	49-369	ctcacgggagctctccatgc ctggtaggctggtgtagg	56 °C	Pfeiffer et al. 1999

Tabelle 2-3: Sequenzen und Annealingtemperaturen der Primer für die Analyse der Mikrosatelliteninstabilität (MSI) im Mitochondrom. ND1: NADH-Dehydrogenase 1; ND5: NADH-Dehydrogenase 5; D-Loop (1) und D-Loop (2): zwei Abschnitte innerhalb des nicht codierenden Displacement-Loops (D-Loop). Region beschreibt den Abschnitt auf der mtDNA nach der Nummerierung von Anderson et al. 1981 (nt-Nr.: Nukleotid-Nummer).

Die PCR umfasste jeweils ein Reaktionsvolumen von 25 µl. Eingesetzt wurden 10-20 ng DNA-Probe mit 200 µM der vier dNTPs, 2 mM MgCl₂, 15 mM Tris/HCl, 50 mM KCL, 0,3 nM der in Tabelle 2-3 aufgeführten Primer und 1 Einheit *HotStartTaq Polymerase* (Qiagen, Hilden). Die *HotStartTaq Polymerase* weist keine Exonucleaseaktivität in 5'-3'-, bzw. 3'-5'- Richtung auf und wird durch die Erhitzung auf 95 °C in der Initialphase aktiviert.

PCR-Bedingungen für die Amplifizierung der mtDNA-Regionen		
Initialphase		95 °C für 12 min
35 Zyklen	Schmelzen	95 °C für 1 min
	Annealing	Entsprechend dem Primerpaar siehe Tabelle 2-3
	Extension	72 °C für 2 min
Abschlussphase		72 °C für 10 min

Tabelle 2-4: PCR-Bedingungen für die Amplifizierung der mtDNA-Regionen.

Die Qualität und Quantität des PCR-Produktes wurde durch eine gelelektrophoretische Auftrennung mit anschließender Silberfärbung (2.4.1) bestimmt. Das Produkt der PCR muss für die Sequenzierung aufgereinigt werden. Dazu wurde das *Invisorb® Spin PCRapid Kit* (Invitek, Berlin) benutzt. Es eignet sich für DNA-Fragmente von 80 bp bis 30 kb und erzielt seine Reinigungswirkung durch die Bindung der DNA-Fragmente an die Oberfläche eines Filters, der in ein Eppendorfgefäß eingesetzt und mit ihm zentrifugiert werden kann. Anschließend werden die DNA-Fragmente mit einer schwachen Salzlösung eluiert.

Dieser Arbeitsschritt dauert ca. 10 min. Es gehen, abhängig von der Länge, 15-40 % der gewünschten DNA-Fragmente zugunsten sauberer DNA-Fragmente und einer niedrigeren Salzkonzentration verloren.

Es sind vier Schritte nötig für die Reinigung mit dem *Invisorb® Spin PCRapid Kit* (Invitek, Berlin): Zugabe des Puffers P zum PCR-Reaktionsgemisch, Binden der DNA-Fragmente an der Filter, Waschen der gebundenen DNA-Fragmente und Trocknung des Filters sowie die Elution der DNA-Fragmente.

Reinigung des PCR-Produktes (Probenvolumen bis 50 µl)
Filter in 2 ml Auffangependorfgefäß platzieren!
<ul style="list-style-type: none"> • 130 µl Puffer P direkt in das PCR-Reaktionsgefäß geben. • Die gesamte Suspension in den Filter überführen. • 1 min. inkubieren.
<ul style="list-style-type: none"> • Für 30 sec. bei 10000 rpm zentrifugieren
<ul style="list-style-type: none"> • 700 µl Waschpuffer auf den Filter geben und für 30 sec. bei 10000 rpm zentrifugieren.
<ul style="list-style-type: none"> • Das Filtrat verwerfen. • Die Ethanolreste des Waschpuffers durch Zentrifugieren bei Höchstgeschwindigkeit (12000-14000 rpm) entfernen
<ul style="list-style-type: none"> • Transferieren des Filters in ein neues 1,5 ml Auffanggefäß. • Wenigstens 20 µl Elutionspuffer direkt auf die Mitte des Filters geben. • Für 3 min bei Raumtemperatur inkubieren.
<ul style="list-style-type: none"> • Zentrifugieren für 1 min bei 10000 rpm.
<p>Anmerkung: Um die DNA-Ausbeute zu verbessern, wird die Verwendung eines größeren Volumens des Elutionspuffers empfohlen. Wichtig: dadurch erniedrigt sich die Endkonzentration der DNA! Eine längere Inkubationszeit mit dem Elutionspuffer (bis zu 10 min.) erhöht etwas die DNA-Ausbeute.</p>

Tabelle 2-5: Protokolle für die Reinigung von PCR-Produkten mit dem *Invisorb® Spin PCRapid Kit* (Invitex, Berlin).

Anschließend wurden die PCR-Produkte sequenziert (2.5.1).

2.3.2 Detektion der $\Delta 4977$ bp Deletion

Der Nachweis der $\Delta 4977$ bp mtDNA Deletion erfolgte mit den von Maximo et al. (1999) beschriebenen zwei Primerpaaren Mitin und Mitout (Tabelle 2-6) in einem PCR-Ansatz. Dabei liefert das Mitin-Primerpaar ein PCR-Produkt von 142 bp, wenn keine Deletion vorliegt. Das Mitout-Primerpaar hingegen zeigt nur ein PCR-Produkt mit einer Länge von 214 bp, wenn die Deletion vorhanden ist. Die Mitout-Primer, die außerhalb der $\Delta 4977$ bp mtDNA liegen, geben auf Grund der Länge der dazwischen liegenden $\Delta 4977$ bp-Region kein PCR-Produkt, wenn die Region

nicht deletiert ist. Da in jeder Zelle viele Mitochondrien vorliegen und sowohl innerhalb der Zelle als auch im Zellverband Mitochondrien mit und ohne Deletion vorkommen können, zeigt sich in Geweben mit der Deletion außer der 214 bp-Bande häufig auch die 142 bp-Bande der Mitin-Primer.

Untersucht wurden Tumor-DNA sowie gesundes Vergleichsgewebe oder Blut desselben Patienten.

Primer	Sequenz
Mitin-R	ggtgattgatactcctgatgcg
Mitin-F	ctgagcctttaccactccag
Mitout-R	ggctcaggcgtttgatgat
Mitout-F	cccaactaaatactaccgatgg

Tabelle 2-6: Primersequenzen nach Maximo et al. (1999) für die Primerpaare Mitin und Mitout zur Detektion der $\Delta 4977$ bp mtDNA Deletion.

Für die PCR wurde ein Reaktionsvolumen von 12,5 μ l mit 5-10 ng DNA-Probe, 200 μ M der vier dNTPs, 1,5 μ M MgCl₂, 15 mM Tris/HCl, 50 mM KCL, 0,3 nM der in Tabelle 2-6 aufgeführten Primer und 0,5 Einheiten *HotStartTaq Polymerase* (Qiagen, Hilden). Die *HotStartTaq Polymerase* weist keine Exonucleaseaktivität in 5'-3'-, bzw. 3'-5'- Richtung auf und wird durch die Erhitzung auf 95 °C in der Initialphase aktiviert.

PCR-Bedingungen für die Detektion der $\Delta 4977$ Deletion		
Initialphase		95 °C für 12 min
30 Zyklen	Schmelzen	95 °C für 1 min
	Annealing	58 °C für 1 min
	Extension	72 °C für 2 min
Abschlussphase		72 °C für 30 min

Tabelle 2-7: PCR-Bedingungen der Amplifizierung von DNA-Fragmenten mit den Primerpaaren Mitin und Mitout für die Detektion der $\Delta 4977$ bp Deletion (Maximo et al., 1999).

Zur Auswertung wurde das PCR-Produkt auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und silbergefärbt (2.4.1.2).

2.3.3 Amplifizierung von nukleären Mononukleotidrepeats

Die drei codierenden Mononukleotidrepeats IGFIIR(G)₈, hMSH3(A)₈ und hMSH6(C)₈ wurden auf Frameshiftmutationen hin untersucht (Catasus et al. 2000). Dazu wurden sie zunächst mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert.

Marker	Primersequenz
IGFIIR(G) ₈	5'GCAGGTCTCCTGACTCAGAA 5'GAAGAAGATGGCTGTGGAGC
hMSH3(A) ₈	5'AGATGTGAATCCCCTAATCAAGC 5'ACTCCCACAATGCCAATAAAAAT
hMSH6(C) ₈	5'GGGTGATGGTCCTATGTGTC 5'TTTGGTCCAGTAACAAGCACAC

Tabelle 2-8: Primersequenzen für die Amplifizierung der Mononukleotidrepeats IGFIIR(G)₈, hMSH3(A)₈ und hMSH6(C)₈.

Für die PCR wurde ein Reaktionsvolumen von 25 µl eingesetzt mit 10-20 ng DNA-Probe mit 200 µM der vier dNTPs, 2 mM MgCl₂, 15 mM Tris/HCl, 50 mM KCL, 0,3 nM der in Tabelle 2-8 aufgeführten Primer und 1 Einheit *HotStartTaq Polymerase* (Qiagen, Hilden).

PCR-Bedingungen zur Amplifizierung von nukleären Mononukleotidrepeats		
Initialphase		95 °C für 12 min
30 Zyklen	Schmelzen	95 °C für 1 min
	Annealing	55 °C für 1 min
	Extension	72 °C für 3 min
Abschlussphase		72 °C für 30 min

Tabelle 2-9: PCR-Bedingungen der Amplifizierung der Mononukleotidrepeats IGFIIR(G)₈, hMSH3(A)₈ und hMSH6(C)₈.

Für die anschließende Sequenzierung wurde dasselbe Auffreinungsverfahren mit dem *Invisorb® Spin PCRapid Kit* (Invitex, Berlin) angewandt wie für die PCR-Produkte der mtDNA in Kapitel 2.3.1.

2.3.4 Amplifizierung von nukleären Dinukleotidrepeats

Untersucht wurden fünf Dinukleotid-Mikrosatellitenmarker: D2S123 (Chromosom 2), D3S1611 (Chromosom 3), D5S107 (Chromosom 5), D17S787 (Chromosom 17) und D18S34 (Chromosom 18).

Die Mikrosatellitenmarker wurden zunächst einzeln mit einer PCR amplifiziert, dann mit einer denaturierenden Harnstoff-PAGE (2.4.1.3) aufgetrennt und anschließend mit Hilfe einer Silberfärbung (2.4.1) sichtbar gemacht. Bei der Auswertung wurden zwei Spuren pro Patient aufgetragen: eine Spur mit Tumor-DNA und eine Spur mit DNA aus gesundem Vergleichsgewebe. Wurden bei der Sichtprüfung der Gele allelische Ungleichgewichte in der Tumor-DNA vermutet, so wurden die Proben dieses Patienten einer zweifachen Analyse in einer Multiplex-PCR mit Fluoreszenz-markierten Primern (6-FAM, JOE oder TAMRA) sowie einem ROX-markierten internen Längenstandard im *ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) unterzogen (2.4.2.1).

Die nachstehende Tabelle zeigt die Primersequenzen für die fünf untersuchten Mikrosatellitenmarker.

Mikrosatellitenmarker	Primername (http://www.gdb.org)	Fluoreszenzfarbe	Primersequenz (http://www.gdb.org)
D2S123	AFM093xh3a AFM093xh3m	FAM	aaacaggatgcctgccttta ggactttccacctatgggac
D3S1611	D3S1611.PCR1.1 D3S1611.PCR1.2	JOE	ccccaaggctgcactt agctgagactacaggcatttg
D5S107	Mfd27CA Mfd27GT	TAMRA	gatccacttaacccaaatac ggcatcaactgaacagcat
D17S787	AFM095tc5a AFM095tc5m	JOE	tgggctcaactatatgaacc ttgataccttttgaagggg
D18S34	Mfd26CA Mfd26GT	FAM	cagaaaattctctctggcta ctcatgttcttggaagaat

Tabelle 2-10: Primersequenzen der untersuchten Mikrosatelliten D2S123, D3S1611, D5S107, D17S787 und D18S34 aus der Genome Data Base (www.gdb.org).

In einer PCR mit einem Reaktionsvolumen von 12,5 µl wurden die Mikrosatellitenmarker amplifiziert. Dazu wurden eingesetzt 5-10 ng DNA-Probe

mit 200 μM der vier dNTPs, 1,5 μM MgCl_2 , 15 mM Tris/HCl, 50 mM KCL, 5 %Formamid, 0,3 nM der Primer und 0,5 Einheiten *HotStartTaq Polymerase* (Qiagen, Hilden). Die PCR-Bedingungen sind der nachstehenden Tabelle 2-11 zu entnehmen.

PCR-Bedingungen zur Amplifizierung von nMSI-Markern		
Initialphase		95 °C für 12 min
30-35 Zyklen	Schmelzen	95 °C für 1 min
	Annealing	55 °C für 1 min
	Extension	72 °C für 3 min
Abschlussphase		72 °C für 30 min

Tabelle 2-11: Temperaturabfolge der PCR für die nMSI-Marker D2S123 (Chromosom 2), D3S1611 (Chromosom 3), D5S107 (Chromosom 5), D17S787 (Chromosom 17) und D18S34 (Chromosom 18).

Die Multiplex-PCR zur Überprüfung der Ergebnisse wurde mit denselben Chemikalien in denselben Mengen (Ausnahme: von den markierten Primern wurde nur 0,1 nM eingesetzt) unter denselben PCR-Bedingung durchgeführt.

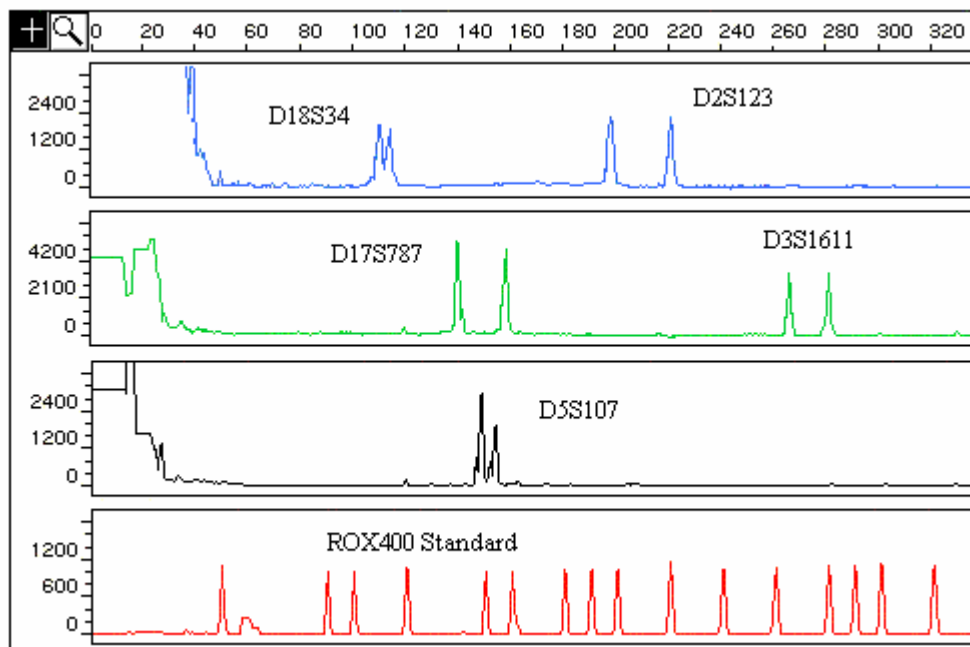


Abbildung 2-1: Darstellung der kapillarelektrophoretischen Auftrennung einer nMSI Multiplex-PCR.

2.3.5 Amplifizierung von nukleären Tetranukleotidrepeats

Verwendet wurde der *AmpFISTR® Profiler Plus™ PCR amplification kit* (Applied Biosystems), ein Multiplex-PCR Kit für die neun Tetranukleotidrepeats (short tandem repeats, STRs) D3S1358, VWA, FGA, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D7S820 und den Geschlechtsmarker Amelogenin.

Dieses Kit dient der routinemäßigen, zeitgleichen Analyse der genannten STR-Marker mittels Fluoreszenz-markierter Primer, wobei von jedem Primerpaar nur ein Primer markiert ist, um eine Zweifachdetektion durch Erfassen des komplementären Stranges auszuschließen. Das Kit umfasst das *AmpFISTR® Reaction Mix* mit MgCl₂, dNTPs, BSA, 0,05 % NaN₃ in Puffer und Salz; das *Profiler Plus™ Primer Set* mit 5-FAM, JOE und NED markierten sowie unmarkierten Primern für die oben aufgeführten Loci; die *AmpliTaQ Gold® DNA Polymerase* sowie *AmpFISTR® Blue Allelic Ladder* (5-FAM markierte Allele), *AmpFISTR® Green II Allelic Ladder* (JOE markierte Allele) und *AmpFISTR® Yellow Allelic Ladder* (NED markierte Allele). Eine Übersicht über die STR-Loci, ihre Allele und Fluoreszenzmarkierung im Kit sowie weitere bekannte, in der Leiter des Kits aber nicht vorhandene Allele gibt Tabelle 2-13.

Der PCR-Ansatz, mit einem Gesamtvolumen von 12,5 µl, enthielt 5,25 µl *AmpFISTR® Reaction Mix*, 2,25 µl *AmpFISTR™ Profiler Plus™ Primer Set*, 0,25 µl *AmpliTaQ Gold® DNA Polymerase* und 0,5-2 ng DNA. In einem *Perkin Elmer DNA thermal cycler 9600* bzw. *2700* wurde folgendes Temperaturprotokoll gefahren:

PCR-Bedingungen für die Amplifizierung von STRs mit dem <i>AmpFISTR® Profiler Plus™ PCR amplification kit</i>		
Initialphase		95 °C für 11 min
25 Zyklen	Schmelzen	94 °C für 1 min
	Annealing	59 °C für 1 min
	Extension	72 °C für 1 min
Abschlussphase		60 °C für 45 min

Tabelle 2-12: PCR-Bedingungen des *AmpFISTR™ Profiler Plus PCR amplification kit*.

Für die Analyse des Multiplexansatzes wurde das Reaktionsgemisch nach der Amplifizierung im *ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer* zusammen mit einem internen Längenstandard (GeneScan-500 [ROX]-markiert) aufgetrennt.

STR Locus	<i>AmpFISTR</i> [®] Allelic Ladder Allele	Fluoreszenzmarkierung			Weitere bekannte Allele
		5-FAM	JOE	NED	
D3S1358	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19				(9, 11, 15.2, 20) ^a
vWA	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21				(15.2, 22) ^a
FGA	18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30				(15, 16, 16.2, 17, 18.2, 19.2, 20.2, 21.2, 22.2, 23.2, 24.2, 25.2, 27.2, 28.2, 30.2, 34.2, 46.2) ^a
Amelogenin	X,Y				keine
D8S1179	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19				keine
D21S51	24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 38				(24.3, 25.3, 28.3, 29.1) ^b , (29.3, 30.1, 30.3, 31.1, 32.1, 33.1) ^a , (33.3, 34.1) ^b , 36.2 ^c
D18S51	9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26				9.2 ^d , 15.2 ^e , (17.2, 19.2) ^d
D5S818	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16				keine
D13S317	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15				5 ^a
D7S820	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15				6.3 ^a

Tabelle 2-13: STR-Loci des *AmpFISTR*[®] Profiler Plus[™] PCR amplification kit mit ihren im Kit berücksichtigten Allelen, ihrer Fluoreszenzmarkierung und weiteren bekannten Allelen. a: Perkin Elmer Applied Biosystems Human Identification Group; b: Advanced DNA Technologies Workshop, 1997; c: Zhou et al., 1997; d: Gill et al., 1996; e: Barber and Parkin, 1996.

2.4 Elektrophoresen und Färbungen

Elektrophorese

Ein Molekül, das eine Nettoladung besitzt, wandert im elektrischen Feld. Dies wird bei der Methode der elektrophoretischen Auftrennung ausgenutzt und findet in vielfacher Variation Anwendung zur Trennung von Proteinen oder anderen Makromolekülen, wie z.B. DNA oder RNA. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit (v) im elektrischen Feld direkt proportional zur elektrischen Feldstärke (E) und der Nettoladung des Moleküls (z) und umgekehrt proportional zum Reibungskoeffizienten (f). Die elektrische Kraft, die das geladene Molekül zur entgegengesetzt geladenen Elektrode treibt, muss dabei die entgegengesetzt wirkende Reibungskraft zwischen wanderndem Molekül und Medium überwinden. Zu beachten ist, dass der Reibungskoeffizient sowohl von der Masse als auch von der Gestalt des Moleküls abhängt und natürlich auch von der Viskosität des Mediums.

Elektrophoresen führt man zumeist in Gelen durch, da im Gegensatz zu wässrigen Lösungen die zu trennenden Moleküle besser in ihrer Position fixiert sind, also auch besser gehandhabt werden können. Bereits kleine Temperaturdifferenzen innerhalb der Elektrophoreseeinrichtung verursachen in Flüssigkeiten Konvektionsströme, die Verwirbelungen zur Folge haben und die Trennschärfe negativ beeinflussen. Gele hingegen verbessern die Trennschärfe zusätzlich, weil sie sich mit definierten Porengrößen herstellen lassen.

Welches Trägermedium für den benötigten Zweck am besten geeignet ist, hängt u.a. von der Größe der zu trennenden Moleküle und vom benötigten Auflösungsvermögens ab. Polyacrylamidgele werden für bis ca. 1000 bp lange DNA-Fragmente verwendet und zeigen ein gutes Auflösungsvermögen. Agarosegele können weit größere Längenbereiche trennen und werden oft zur präparativen Isolierung von DNA eingesetzt. Je nach Agarosekonzentration - Agarose ist ein Polysaccharid aus roten Meeresalgen und geliert nach dem Aufkochen im Wasser - können lineare DNA-Fragmente von 0,1 bis 60 kp getrennt werden. Jedoch ist die Beweglichkeit der Moleküle ab ca. 20 kb eingeschränkt, spätestens aber ab 40 kb, so dass eine normale Elektrophorese keine Trennergebnisse mehr erzielt. Hier wird dann die Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE) eingesetzt, die DNA-Moleküle von einer Größe bis zu

6 Mb zu trennen vermag, was immerhin kleineren Chromosomen aus z.B. Hefen entspricht.

Eine weitere Variante ist die Kapillargelelektrophorese (CE). Sie unterscheidet sich von den bisher beschriebenen Elektrophoresen durch ein zwar gelartiges, jedoch flüssigeres Medium in einer Kapillare und durch ihren geringen Platzbedarf. Beide Faktoren sind entscheidend für eine Automatisierung, wie sie mit anderen Gelelektrophoreseverfahren nur sehr begrenzt, mit der CE jedoch gut möglich ist.

Färbungen

Um die Banden eines Gels sichtbar zu machen, kann man sich vielfältigster Methoden bedienen. Für Nukleinsäuren, die in Agarosegelen aufgetrennt wurden, werden in aller Regel interkalierende Farbstoffe wie Ethidiumbromid oder Acridinorange eingesetzt. Sie werden auf einem Transilluminator mit UV-Licht angeregt und emittieren dabei sichtbares Licht mit einer Detektionsgrenze von ca. 5 ng pro Bande. Für Polyacrylamidgele eignet sich die hier verwendete Silberfärbung am besten. Aber auch Fluoreszenzfarbstoffe oder radioaktive Nuklide sind in bestimmten Anwendungsbereichen zu finden. Fluoreszenzfarbstoffe wurden im Rahmen dieser Arbeit bei der Sequenzierung (Fluoreszenzmarkierung der ddNTPs) und Fragmentanalyse (Fluoreszenzmarkierung der Primer) mit dem *ABI PRISM® 310 Genetic Analyser* benutzt. Radioaktive Nuklide sind nur in besonderen Fällen heute noch einsetzbar, da sie einen hohen Sicherheitsaufwand bedeuten. Sie wurden hier nicht verwendet.

2.4.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Silberfärbung

Ein häufig verwendetes Trägermedium sind Polyacrylamidgele. Sie eignen sich gut, weil sie chemisch inert sind, also mit den zu trennenden Molekülen nicht reagieren. Außerdem kann durch die Relation von Acrylamid zu Quervernetzer, z.B. Bisacrylamid, die Porengröße der Gele gesteuert werden. Charakterisiert werden diese Gele durch Angabe von T-Wert [%] und C-Wert [%]. Der T-Wert gibt die Gesamtkonzentration von Acrylamid und Bisacrylamid an, der C-Wert bezeichnet den Anteil vom Quervernetzer (Crosslinking) Bisacrylamid am Gesamtacrylamid. Um die Polymerisation in Gang zu bringen, bedarf es eines

Donators freier Radikale. Dazu wird Ammoniumpersulfat (APS) verwendet, außerdem setzt man N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Beschleuniger und Katalysator der Reaktion ein.

Polyacrylamidgele zeichnen sich durch ein hohes Auflösungsvermögen aus. So setzt man Polyacrylamidgele für die Trennung von DNA-Fragmenten bis zu einer Länge von 1000 bp ein. Je nachdem, ob man doppel- oder einzelsträngige DNA elektrophoretisch auftrennen möchte, werden native bzw. denaturierende Polyacrylamidgele verwendet. Die nachstehenden Tabellen zeigen die Variationsbreite der Acrylamidkonzentration und den entsprechenden Trennbereich in nativen und in denaturierenden Polyacrylamidgelen. Zur Markierung der Lauffront wird zusammen mit der Probe Bromphenolblau aufgetragen.

Acrylamid-konzentration [%]	Kettenlänge [bp]	Bromphenolblau
3,5	1000-2000	460
5	80-500	260
8	60-400	160
12	40-200	70
15	25-150	60
20	6-100	45

Tabelle 2-14: Trennbereiche für DNA-Fragmente in nativen Polyacrylamidgelen. Die in der Spalte Bromphenolblau aufgeführten Zahlen geben in etwa die Größe [bp] der Fragmente doppelsträngiger DNA an, deren Wanderungsverhalten bei dieser Acrylamidkonzentration dem des angebenen Farbstoffs entspricht. (Nach Sambrook und Russel 2001.)

Acrylamidkonzentration [%]	separierte Fragmentgröße [b]	Bromphenolblau
4	100-500	ca. 50
5	70-300	35
6	45-70	26
8	35-45	19
10	25-35	12
20	8-25	8
30	2-8	6

Tabelle 2-15: Acrylamidkonzentrationen für eine optimale Auflösung von ssDNA-Fragmenten in denaturierenden Polyacrylamidgelen. Die in der Spalte Bromphenolblau aufgeführten Zahlen geben in etwa die Größe [b] der Fragmente einzelsträngiger DNA an, deren Wanderungsverhalten bei dieser Acrylamidkonzentration dem des angebenen Farbstoffs entspricht. (Nach Ellington und Pollard 1998.)

Silberfärbung

Eine empfindliche Methode zum Nachweis von DNA und Proteinen in Polyacrylamidgelen stellt die Silberfärbung dar. Ein Nachweis von 1 ng Protein bzw. 0,5 ng DNA pro Bande (Budowle et al., 1991) ist möglich. Die Silberfärbung bleibt am Licht, anders als eine Ethidiumbromidfärbung, lange erhalten und funktioniert nach dem Prinzip der Schwarz-Weiß-Fotographie. Durch Komplexbildung binden Silberionen bei einem pH über 10,5 an die Sulfhydryl- und Carboxylgruppen der Proteine bzw. an die Phosphorsäureester der DNA-Moleküle im Gel. Durch Reduzierung der komplexierten Silberionen zu elementarem Silber werden sie im Entwicklungsschritt braun gefärbt und somit sichtbar.

Die Silberfärbung wurde zunächst für Proteine entwickelt (Merril et al., 1981). Diese Methode stellt auch heute noch die empfindlichste Methode der Silberfärbung für Proteine dar, denn sie läuft zum Ende hin immer langsamer ab und kann leicht im genau richtigen Moment gestoppt werden. Jedoch ist sie mit Minimum 3-4 h sehr zeitaufwendig. Das Verfahren nach Ansorge (1985) ist bedeutend schneller und gut für die Färbung von Nukleinsäuren in dünnen Polyacrylamidgelen geeignet.

Die Silberfärbung eines Polyacrylamidgels nach Allen und Budowle (1989) enthält die für die Färbung typischen Schritte Fixieren, Färben, Entwickeln und Abstoppen. Verwendet wurden Chemikalien der Firma Sigma.

Die Fixierung erfolgte in 2 %iger Salpetersäure (HNO_3) für 10 Minuten, anschließend wurde für 30 sec. in Bidest gewaschen. Das Färben erfolgte für mindestens 20 min in 1 %iger Silbernitratlösung (AgNO_3), im Anschluss wurde wieder mit Bidest gewaschen. Die Entwicklung wurde mit einer Lösung aus 0,28 M Natriumcarbonat (NaCO_3) und 0,037 % Formaldehyd vorgenommen, bis der aufgetragene Längenstandard gut sichtbar war. Dann musste die Reaktion rasch in 10 %iger Essigsäure für wenigstens 3 min gestoppt werden. Vor dem Konservieren mit 5 % Glycerin für 5 min und anschließender Trocknung bei Raumtemperatur wurde das Gel für 2 min mit Bidest gespült.

2.4.1.1 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) von PCR-Produkten

Diese Gelelektrophorese diente der Überprüfung der PCR-Produkte aus 2.3.1 und 2.3.3 hinsichtlich der Qualität und Quantität, bevor sie der teureren und aufwändigeren Sequenzierung (2.5 und 2.5.1) zugeführt wurden. Da es sich um doppelsträngige DNA-Fragmente handelte, wurde eine native PAGE verwendet.

Für die Gelherstellung und den Gellauf wurden verwendet die Elektrophoreseeinrichtung und Zubehör *Pharmacia LKB Multiphor II* und das zugehörige Kühlaggregat *Pharmacia LKB Multi Temp II* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Als Trägerfolien für die horizontalen Gele wurden *GelBond® PAG Film* (BioZym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf)-Folien benutzt. Das Polyacrylamidgel aus 6,4% Acryl-Piperazindiacrylamid (PDA), 0,028M CHES, 0,081 M Tris-Formiat, APS und TEMED wurde nach Herstellerangaben unter Verwendung der original Glasplatten gegossen und auf einer Folie auspolymerisiert. Als Längenstandard diente eine 100 bp DNA-Leiter (Invitrogen, Karlsruhe). Pro PCR-Ansatz wurden je 5 μl PCR-Produkt zur Überprüfung auf das Gel aufgetragen. Die für die Dauer der Elektrophorese auf 10 °C gekühlten Gele liefen in TAE-Puffer zunächst 1,5 h bei 5 W, 40 mA, 1000 V, dann für 1 h bei 10 W, 40 mA, 1000V und schließlich bei 15 W, 40 mA, 1000V bis die blaue Bromphenollaufrönt die Anode erreicht hatte. Dabei war die fixierte Größe die Stromstärke (mA).

Es folgte eine Silberfärbung wie im letzten Absatz von 2.4.1 beschrieben. Entsprachen die PCR-Produkte hinsichtlich der Länge und der Quantität den Erwartungen, wurden sie der Sequenzierung (2.5 und 2.5.1) zugeführt.

2.4.1.2 Native PAGE zur Detektion der Δ 4977 bp Deletion

Die Durchführung der Gelherstellung entspricht der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen, jedoch als 6 % iges Polyacrylamidgel. Aufgetragen wurden 5 μ l Probe sowie eine 100 bp DNA-Leiter (Invitrogen, Karlsruhe) als Längenstandard. Der Gellauf entspricht ebenfalls dem in Abschnitt 2.4.1.1. Anschließend folgte eine Silberfärbung (2.4.1) und die direkte Auswertung. Zeigte eine Probe eine Bande bei 142 bp, so wurde dies als Mitin-Primer-Produkt und somit als Nicht-Deletion gewertet. Waren aber zwei Banden vorhanden, bei 142 bp und 214 bp, so wurde dies als Mitout-Primer-Produkt und somit als Deletion gewertet, da davon ausgegangen wurde, dass nicht alle Mitochondrien der Probe die Deletion aufweisen, also auch Mitin-Primer-Produkte nachweisbar sein müssten.

2.4.1.3 Denaturierende Harnstoff PAGE zur Vorauslese instabiler nukleärer Dinukleotidrepeats

Wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben wurden die Dinukleotid-Mikrosatellitenmarker D2S123 (Chromosom 2), D3S1611 (Chromosom 3), D5S107 (Chromosom 5), D17S787 (Chromosom 17) und D18S34 (Chromosom 18) amplifiziert. Die Auftrennung erfolgte mit einer denaturierenden Harnstoff-PAGE. Das Polyacrylamidgel aus 8,0 % Acryl-Piperazindiacrylamid (PDA), 0,028 M CHES, 0,081 M Tris-Formiat, 8 M Harnstoff, APS und TEMED wurde nach Herstellerangaben wie in Abschnitt 2.4.1.1 beschrieben gegossen, mit je 5 μ l der Proben, Tumor und gesundes Vergleichsgewebe, beladen und für 2 bis 6 h bei 200 V elektrophoretisch getrennt. Anschließend erfolgte eine Silberfärbung (2.4.1).

Die pro Patient aufgetragenen DNA-Proben von Tumor und Vergleichsgewebe wurden verglichen. Bei vermuteten allelischen Ungleichgewichten wurden die Proben dieses Patienten einer zweifachen Analyse mit Fluoreszenz-markierten Primern (6-FAM, JOE oder TAMRA; 2.4.2 und 2.4.2.1) in einer Multiplex-PCR mit ROX-markierten internen Längenstandard im *ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) unterzogen (2.4.2.1).

2.4.2 Kapillarelektrophorese (CE) und Fluoreszenzmarkierungen

Die Kapillarelektrophorese (CE) benutzt ein gelartiges, jedoch flüssigeres Medium als z.B. die PAGE. Die Trennung erfolgt in einer Kapillaren, statt in einem flächigen Gel. Durch ein günstigeres Oberflächen-Volumen-Verhältnis kann entstehende Wärme besser abgeleitet werden, es können so höhere Feldstärken verwendet werden, wodurch die Elektrophoresezeiten verkürzt werden. Mittels der CE werden PCR-Produkte, also DNA-Stränge, entsprechend ihrer Länge aufgetrennt. Eine hohe Spannung von 5000 V sorgt für ein ausreichend starkes elektrisches Feld, in dem kleinere Probenmengen aufgetrennt werden können als in herkömmlichen, flachen Gelen. In einer Kapillare befinden sich das Polymer und das PCR-Produkt, das analysiert werden soll. Dabei wandern kurze DNA-Fragmente schneller, längere DNA-Fragmente langsamer. Mit Hilfe einer Farbstoffmarkierung, die schon in der PCR eingebracht wird, sind die Fragmente identifizierbar. Gegen Ende der Kapillare befindet sich ein Laser, der vorbeiwandernde Moleküle an einer definierten Stelle erfasst, sein Licht regt die anhaftenden Farbstoffe zur Fluoreszenz an. Ein optisches System erfasst die Wellenlänge des ausgesendeten Lichts und speichert die Daten. Nach einem Lauf kann die Kapillare automatisch gespült und anschließend erneut befüllt werden. Anwendung findet dieses Prinzip vor allem in der Sequenzierung und der Fragmentanalyse nach Multiplex-PCR.

Fluoreszenzmarkierungen

Als Fluorophore werden verwendet die Fluorescein-Derivate 5-Carboxyfluorescein (FAM) und 2',7'-Dimethoxy-4',5'-dichlor-6'-carboxyfluorescein (JOE), sowie Rhodamin 110 (R110) und die Rhodamin-Derivate 6-Carboxyrhodamin (R6G), N,N,N',N'-Tetramethyl-6-carboxyrhodamin (TAMRA) und 6-Carboxy-X-Rhodamin (ROX). Die nachstehende Tabelle zeigt die Anregungs- und Emissionsmaxima einzelner Fluorophore.

Fluorophor	Anregungs- maximum	Emissions- maximum	Markierungs- methode
5-Carboxyfluorescein (FAM)	490-495 nm	515-525 nm	ETP-A; ETP-D
Rhodamin 110 (R110)	520-525 nm	540-545 nm	ETP-A
2',7'-Dimethoxy-4',5'-dichlor- 6'-carboxyfluorescein (JOE)	525-530 nm	550-555 nm	P;ETP-A; DT
6-Carboxyrhodamin (R6G)	525-530 nm	555-560 nm	P;ETP-A; DT
N,N,N',N'-Tetramethyl-6- carboxyrhodamin (TAMRA)	550-555 nm	580-585 nm	P;ETP-A; DT
6-Carboxy-X-Rhodamin (ROX)	580-585 nm	605-610 nm	P;ETP-A; DT

Tabelle 2-16: Beispiele für Fluorophore des *ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) und ihre Eigenschaften. Es entsprechen P: 5'-Markierung des Primers; ETP-A: Akzeptor-Fluorophor in Energie-Transfer-Primern; ETP-D: Donor-Fluorophor in Energie-Transfer-Primern; DT: Verwendung als Fluorophor markierter Terminator.

Wie die Tabelle 2-16 zeigt, können JOE, R6G, TAMRA und ROX zur 5'-Fluorophormarkierung des Primers benutzt werden. Der *ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) erlaubt auch den Einsatz von Energie-Transfer-Fluorophoren (Ju et al. 1995; Hung et al. 1997). Dabei werden an den Primer zwei Fluorophore gekoppelt: ein Donor-Fluorophor am 5'-Ende des Primers und ein Akzeptor-Fluorophor einige Nukleotide weiter Richtung 3'-Ende des Primers, wobei der ideale Abstand abhängig von den verwendeten Fluorophoren ist. Die Vorteile bestehen in einem stärkeren Fluoreszenzsignal bedingt durch den zwischengeschalteten Donor, sowie darin, dass verschiedene Akzeptoren im selben Ansatz verwendet werden können unter Beibehaltung eines Donors. Dadurch muss mit nur einer Wellenlänge angeregt werden. Welche Fluorophore als Donor und welche als Akzeptor verwendet werden können zeigt Tabelle 2-16.

Die Kopplung des Farbstoffs kann auch an die ddNTPs erfolgen (Prober et al. 1987; Lee et al. 1992) und wird als „dye terminator sequencing“ bezeichnet. Für Sequenzierungen werden Fluoreszenz-markierte ddNTPs verwendet, für Multiplex-PCRs an Primer gekoppelte Fluorophore (2.4.2.1 und 2.4.2.2.).

Für eine gleichmäßige Fluoreszenzintensität der einzelnen Farben und einen sparsamen Umgang mit den sehr kostenintensiven ddNTPs ist es nötig, eine Polymerase zu benutzen, die weniger stark gegen ddNTPs diskriminiert und

diese so effizienter einbaut. Beispiele für derartige Polymerasen sind *Sequenase*, *Thermo Sequenase*, *USB* und *AmpliTaq FS*, Applied Biosystems. Eine weitere Eigenschaft der hier verwendeten *AmpliTaq FS* (Applied Biosystems) ist die fast nicht mehr vorhandene 5'-3'-Nukleaseaktivität. Dies verbessert Qualität und Quantität der Sequenzierung.

2.4.2.1 Kapillarelektrophorese nukleärer Dinukleotidrepeats mit Fluoreszenz-markierten Primern

DNA-Proben, die in der denaturierenden Harnstoff-PAGE auffielen, wurden mittels der CE mit Fluoreszenz-markierten (2.3.4) Primern (6-FAM, JOE oder TAMRA) in einem Zweifachansatz unter Verwendung eines ROX-markierten internen Längenstandard im *ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) nochmals untersucht.

Für die Fragmentanalyse mit Hilfe der Kapillargelelektrophorese wurden jeweils 1µl PCR-Produkt aus der MSI-Multiplex-PCR (2.3.4) mit 12µl deionisiertem Formamid (Sigma, Deisenhofen) und 0,5 µl ROX400 Längenstandard (ABI) versetzt, 2 min auf 95°C erhitzt und auf Eis abgekühlt (denaturiert). Anschließend wurden die Proben im *ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) automatisch analysiert mit Hilfe einer 47cm langen Kapillare und POP-4-Polymer (beides ABI). Die Länge eines Laufes für eine Probe lag bei 20 min. Die Auswertung der Fragmente im Vergleich zum ROX400 Längenstandard (Ziegler et al. 1992) erfolgte mit dem Programm GeneScan 3.1.2. Die Fragmentgröße wurde mit der „local Southern method“, die in der GeneScan Software implementiert ist, bestimmt. Unterschiede zwischen gesundem Gewebe und Tumorgewebe wurden manuell bestimmt.

2.4.2.2 Kapillarelektrophorese nukleärer Tetranukleotidrepeats mit Fluoreszenz-markierten Primern

Die Amplifizierung wurde bereits in 2.3.5 beschrieben. Die automatische Auftrennung und Auswertung erfolgte wie die der Multiplex-PCR mit den nukleären Dinukleotidrepeats (2.4.2.1), allerdings wurde als Längenstandard ROX-500 (ABI) eingesetzt. Unterschiede zwischen gesundem Gewebe und Tumorgewebe wurden manuell am Computer bestimmt.

2.5 Sequenzierung

Um die Basensequenz von DNA zu ermitteln, entwickelten A.M. Maxam und W. Gilbert das erste routinemäßig einsetzbare Verfahren (Maxam und Gilbert 1977, 1980). Im Vergleich zu moderneren Methoden mussten noch verhältnismäßig große Mengen an DNA (>100 µg) eingesetzt werden. Vor allem aber erfolgte die Detektion über radioaktive Markierung der Basen mittels ^{32}P . Die aufwändige Durchführung und die hohen sicherheitstechnischen Anforderungen an Labors, die mit radioaktiven Materialien umgehen, sowie die Begrenzung auf ca. 400 Nukleotide umfassende DNA-Abschnitte führten dazu, dass sich das DNA-Sequenzierungsverfahren nach F. Sanger (Sanger et al. 1977) durchsetzte und dass das Sequenzierungsverfahren nach Maxam und Gilbert heute nur noch in Ausnahmefällen benutzt wird.

Bei dem DNA-Sequenzierungsverfahren nach Sanger (auch als Didesoxy- oder Kettenabbruchverfahren bezeichnet) handelt es sich um ein enzymatisches Verfahren. Die zu sequenzierende DNA wird zunächst, z.B. durch Erhitzen, in Einzelstränge überführt, dann wird diese als Vorlage dienende DNA mit einem Primer hybridisiert. Man beachte: zur Sequenzierung eines DNA-Abschnittes muss man die Basensequenz vor dem zu analysierenden Abschnitt kennen! Der Primer entscheidet auch darüber, welcher der beiden Einzelstränge sequenziert wird. Vom Primer aus wird, analog der PCR, der komplementäre Strang von einer Polymerase ergänzt. Der entscheidende Unterschied zur PCR liegt darin, dass zusätzlich zu den vier 2'-Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTP) dATP, dGTP, dCTP und dTTP pro Ansatz der vier Ansätze umfassenden Sequenzierung jeweils ein Nukleotid in geringen Mengen auch als 2',3'-Didesoxynukleotidtriphosphat (ddNTP) vorliegt. Wird ein solches ddNTP statt eines normalen dNTPs eingebaut, so kommt es zum Kettenabbruch, da die Kettenverlängerung über die OH-Gruppe des 3'-C-Atoms der Ribose erfolgt. Da das Enzym Polymerase dNTPs und ddNTPs als gleichwertig akzeptiert, wird die Synthese des Komplementärstranges an einer zufälligen Stelle abgebrochen, es entstehen unterschiedlich lange Fragmente, die entsprechend ihrer Länge im Polyacrylamidgel getrennt werden können. Dabei wird jeder der vier Ansätze auf eine andere Gelspur aufgetragen. Der Ansatz, der außer den vier dNTPs auch noch ddATP enthält, weist nur Kettenabbrüche nach der Base „A“ auf, der Ansatz, der außer den vier intakten dNTPs auch noch ddGTP enthält, weist nur

Kettenabbrüche nach der Base „G“ auf, usw. Bei der elektrophoretischen Auftrennung auf einem Polyacrylamidgel würden also die vier nebeneinander aufgetragenen Ansätze A, G, C und T nach adäquater Detektion, also z.B. Fluoreszenzscanner bei Fluoreszenzmarkierung der ddNTPs, eine direkte Ablesung der Sequenz ermöglichen. Das am kürzesten gelaufene Fragment nahe den Geltaschen entspricht dabei dem längsten Fragment. Befindet sich dieses z.B. in der Spur „G“, so endet die Sequenz mit „G“. das am zweitkürzesten gelaufene Fragment befinde sich z.B. in der Gelspur mit dem Ansatz „A“, der Kettenabbruch erfolgte also beim Einbau von ddATP, die Sequenz lautet also, von hinten gelesen bisher GA. So rückt man beim Lesen des Gels immer um das nächst weiter gelaufene Fragment vor und liest ab, in welcher Gelspur es sich befindet, bis man das Gelende erreicht hat. Dies zeigt auch die nachstehende Abbildung.

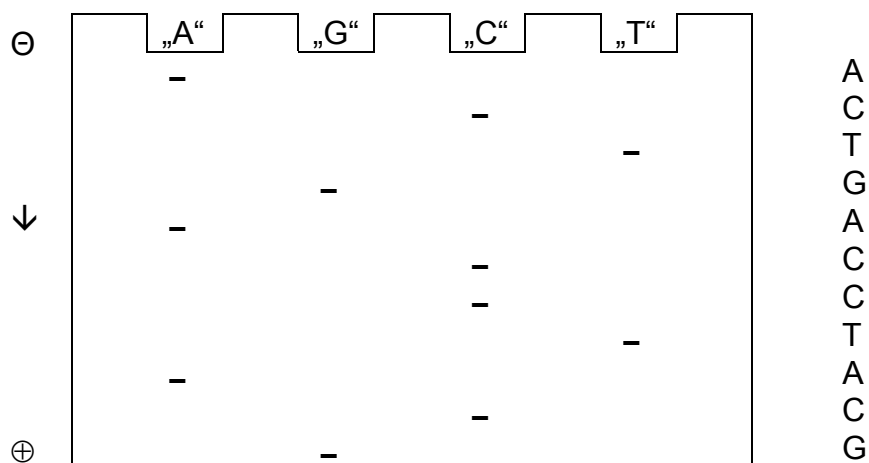


Abbildung 2-2: Beispiel für die Auswertung einer Sequenzierung nach Sanger im Polyacrylamidgel. In die Tasche „A“ wurde der Sequenzierungsansatz mit allen vier dNTPs und ddATP pipettiert, so dass es zum Kettenabbruch bei A kommt, für „G“, „C“ und „T“ gilt respektive dasselbe mit dem jeweiligen ddNTP. ⊖, ↓ und ⊕ beschreiben die Laufrichtung der negativ geladenen DNA-Fragmente vom Minuspol zum Pluspol. Die rechts neben dem Gel stehende Buchstabenfolge zeigt den abzulesenden Code.

Neuere Methoden mit Fluoreszenz-markierten ddNTPs erlauben es, die vier Ansätze zu einem zu vereinen und mittels Kapillarelektrophorese gleichzeitig zu sequenzieren.

Der ABI310 DNA Genetic Analyzer von Applied Biosystems analysiert mit Hilfe der Kapillarelektrophorese die Produkte eines Sanger-Sequenzierungsansatzes (Sanger et al.; 1977). Es arbeitet nach dem „four-label“-Prinzip, bei dem jedes ddNTP mit einem eigenem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, auch bezeichnet als

„single-lane approach“ (Smith et al. 1986; Prober et al. 1987), weil anstatt der ehemals vier Laufspuren nur noch eine benötigt wird, da die verschiedenen ddNTPs anhand ihrer Fluoreszenzfarbe unterschieden werden können.

Der Argon-Laser verfügt über zwei Wellenlängen (488 nm und 514 nm) zur Anregung der Fluorophore. Als Fluorophore werden verwendet das Fluorescein-Derivate 5-Carboxyfluorescein (FAM) sowie Rhodamin 110 (R110) und die Rhodamin-Derivate 6-Carboxyrhodamin (R6G) und N,N,N',N'-Tetramethyl-6-carboxyrhodamin (TAMRA).

2.5.1 Sequenzierung der mtDNA Regionen mit der Kapillarelektrophorese

Die aufgereinigten (2.3.1) PCR-Produkte wurden mit den schon zuvor verwendeten Primern mit dem *ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems, Weiterstadt), in zwei verschiedenen Ansätzen in beiden Richtungen sequenziert.

Die Reagenzien und Materialien des verwendeten *ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems, Weiterstadt) umfassten:

- *Terminator Ready Reaction Mix* mit : *A-Dye Terminator* markiert mit Dichloro[R6G], *C-Dye Terminator* markiert mit Dichloro[ROX], *G-Dye Terminator* markiert mit Dichloro[R110], *T-Dye Terminator* markiert mit Dichloro[TAMRA], *AmpliTaQ DNA Polymerase*, FS, MgCl₂, Tris-HCl Puffer, pH 9]
- *Thermal Cycler*
- *Thermal cycling tubes*.

Für den Ansatz des Reaktionsgemisches wurden *Terminator Ready Reaction Mix*, Template-DNA, Primer und Bidest zusammengegeben. Das Gesamtvolumen wurde immer auf 10 µl eingestellt, so dass die einzelnen Komponenten für jeden Ansatz, je nach den Gegebenheiten, neu berechnet werden mussten. Ein allgemeines Protokoll zeigt Tabelle 2-17.

	Arbeitsschritte	Mengen	
1.	Für jede Sequenzierung werden in den eigens dafür vorgesehenen Gefäßen die folgenden Bestandteile zusammengegeben:		
	„Terminator Ready Reaction Mix“	2,0 µl	
	Template-DNA je nach Länge des PCR-Produktes:	0,5-5 µl Volumen richtet sich nach der Konzentration der DNA im PCR-Produkt	
	100-200 bp		1-3 ng
	200-500 bp (für diese Arbeit relevanter Größenbereich)		3-10 ng
	500-1000 bp		5-20 ng
	1000-2000 bp		10-40 ng
	>2000 bp		40-100 ng
	Primer	3,2 pmol 1-2 µl Volumen kann durch entsprechend geringere Verdünnungen variiert werden, um das Endvolumen einzustellen.	
	Bidest	dient zum Auffüllen falls notwendig	
	Gesamtvolumen	10 µl	
2.	Gut durchmischen und kurz anzentrifugieren.		

Tabelle 2-17: Allgemeines Protokoll für die Herstellung des Reaktionsgemisches der zyklischen Sequenzierung mit dem *ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* und dem *ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

Das Reaktionsgemisch durchlief 25 Zyklen mit 95 °C für 30 s und 60 °C für 4 min, wurde anschließend mit dem *Edge Gel Filtration Kit* (Mo Bi Tec GmbH, Göttingen) gereinigt, um hinterher im *ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) automatisch analysiert werden zu können. Die Reinigung umfasste die Entfernung von nicht eingebauten Fluoreszenz-markierten ddNTPs und nicht markierten dNTPs, Primern, kleiner DNA-Fragmente bis 15 bp Länge und Pufferbestandteilen. Hierzu diente eine Säule des *Gel Filtration Systems* (Mo Bi Tec, Göttingen), an deren Matrix die unerwünschten Bestandteile quantitativ

gebunden wurden. Nur längere DNA-Fragmente werden wieder aus der Säule eluiert und stehen gereinigt für die Sequenzierung zur Verfügung.

Um die Säulen vorzubereiten, wurden sie für 2 min bei 750 xg zentrifugiert. Dieser Zentrifugationsschritt wurde nach Zugabe von 1 ml Bidest auf die Gel Filtration Cartridges wiederholt und die Cartridges wurden anschließend in ein frisches Eppendorfcap gesteckt. Erst dann konnte die Probe vorsichtig auf die Säule aufgetragen werden. Es wurde erneut bei 750 xg zentrifugiert. Im Eluat befand sich das gereinigte Produkt, das direkt in die Kapillarelektrophorese eingesetzt werden konnte. Dabei wurden verwendet: Kapillare 5-47 cm, Durchmesser 50 µm (ABI), POP-4-Polymer (ABI) und Sequenzierungspuffer mit EDTA 10x (ABI).

Die Ausgabe der Rohdaten erfolgte durch den *ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) entsprechend der folgenden Übersicht:

Terminator	Fluorophor	Farbe im Elektropherogramm
A	dR6G	grün
T	dTAMRA	rot
C	dROX	blau
G	dR110	schwarz

Tabelle 2-18: Die Fluorophoren in der Sequenzierung und ihre Darstellung in den Rohdaten.

2.5.2 Sequenzierung nukleärer Mononukleotidmarker

Ebenso wie bei der Sequenzierung der mtDNA-Regionen (2.5.1) wurden auch hier die aufgereinigten PCR-Produkte (2.3.3) mit den schon zuvor verwendeten Primern mit dem *ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems, Weiterstadt) in beide Richtungen sequenziert.

2.5.3 Auswertung der Sequenzierungsdaten

Die Sequenzdaten der automatischen Sequenzierung wurden mit publizierten Sequenzen verglichen. Für die mtDNA wurde die Anderson Sequenz (Anderson et al., 1981) als Referenz zu Grunde gelegt. Alle Sequenzen wurden dabei manuell im Doppelblindverfahren von zwei Wissenschaftlern ausgewertet,

Veränderungen im Tumorgewebe wurden im Vergleich zu gesundem Gewebe desselben Patienten ermittelt. Für die IgFIIR, hMSH3 und hMSH6 wurde nur der jeweilige Repeat im Vergleich zwischen gesundem und Tumorgewebe ausgewertet.

2.6 Statistik

Die Korrelationsanalysen wurden mittels der Internetprogramme „GraphPad Quickcalcs“ (<http://www.graphpad.com>) sowie „Web Chi Square Calculator“ (http://www.georgetown.edu/faculty/ballc/webtools/web_chi.html) berechnet. Ein p-Wert von 0,05 oder kleiner wurde als statistisch signifikant angesehen. Die übrige Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel XP.

3 Ergebnisse

In dieser Studie wurden insgesamt 107 Gewebeproben von 67 Primärtumoren und 40 Metastasen von 63 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen aus der Kopf- und Halsregion auf das Auftreten der $\Delta 4977$ bp Deletion der mtDNA (170 Duplex-PCRs), auf Alterationen in vier Regionen der mtDNA (884 PCRs und 680 Sequenzierungen), auf Mikrosatelliteninstabilität in drei genomischen Mononukleotidmarkern (590 PCRs und 510 Sequenzierungen), in fünf Dinukleotidmarkern auf fünf verschiedenen Chromosomen (978 Singleplex-PCRs und 67 Multiplex-PCRs) und auf Veränderungen in neun, in der forensischen Routine genutzten, STRs hin untersucht (200 Multiplex-PCRs).

Alle diese Analysen konnten an allen Gewebeproben erfolgreich durchgeführt werden, bei circa 15-30% der Amplifikationen für eine Sequenzierung, bei ca. 15% der Singleplex-PCRs zur Analyse der Dinukleotidrepeats und bei ca. 18% der Multiplexreaktionen für die STRs war eine Reamplifizierung notwendig.

Eine Aufstellung sämtlicher Einzelergebnisse findet sich im Zusammenhang mit histologischen Daten der Tumoren und klinischen Daten der Patienten im Anhang.

Gegenüber ihrem gesunden Vergleichsgewebe zeigten nur 18 % der Primärtumore keine Veränderungen. Von den Metastasen wiesen alle mindestens eine der insgesamt sechs oben aufgeführten Veränderungen auf. In den einzelnen Aberrationskategorien schwankten die Häufigkeiten der betroffenen Tumore zwischen 19 % bei den mt Punktmutationen (18 % Primärtumore, 20 % Metastasen) bzw. Frameshiftmutationen der Mononukleotidrepeats (19 % Primärtumore, 18 % Metastasen) und bis zu 63 % bei den Dinukleotidrepeats (46 % Primärtumore, 92 % Metastasen) (Tabelle 3-1).

	mitochondriale DNA			nukleäre DNA		
	Δ4977 Deletion	mtMSI	Punktmutation mitochondriale DNA	Frameshift Mononukleotid-repeats	Aberrationen Dinukleotid-repeats	Aberrationen Tetranukleotid-repeats (STR)
alle Tumore	35 %	40 %	19 %	19 %	63 %	43 %
Primärtumore	31 %	43 %	18 %	19 %	46 %	30 %
Metastasen	40 %	35 %	20 %	18 %	92 %	65 %

Tabelle 3-1: Frequenz der Aberrationskategorien.

Mitochondriale Veränderungen fanden sich in 65 % aller Tumoren, nukleäre Veränderungen in 74 %. Nukleäre und mitochondriale Veränderungen traten in 50 % (42 % Primärtumore, 65 % Metastasen) aller Tumoren gemeinsam auf.

Lokalisation der Primärtumoren und Grading

Von den 67 Primärtumoren befanden sich 38 im Larynx (57 %), 21 im Oropharynx (31 %) und 8 im Hypopharynx (12 %). Eine signifikante Verteilung zwischen Lokalisation und Grading ($p=0,2360$) ließ sich ebenso wie zwischen Lokalisation und dem Auftreten nukleärer, mitochondrialer oder beider Veränderungen ($p=07631$) nicht zeigen.

51 der 67 Primärtumore wurden mit Grading 2, 16 mit dem Grading 3 eingestuft. Grading 3 Tumore sind deutlich häufiger von Veränderungen betroffen: 81 % zeigen nukleäre Veränderungen, 69 % mitochondriale, beide Veränderungen 50 % und nur 6 % zeigen keine der untersuchten Veränderungen. Grading 2 Tumore zeigen in 53 % nukleäre, in 63 % mitochondriale, in 37 % beide und in 22 % keine Veränderungen.

3.1 Veränderungen in der mitochondrialen DNA

3.1.1 Untersuchung definierter Regionen der mtDNA

Von den untersuchten Regionen auf dem nicht kodierenden Displacement-Loop nt453-nt637 (D-Loop) und nt49-nt369 (D-Loop: hypervariable Region II; HV II) sowie den Genen für die NADH-Dehydrogenase 1 nt3397-nt3617 (ND1) und NADH-Dehydrogenase 5 nt12353-nt12622 (ND5), konnten nur Veränderungen in der HV II-Region nachgewiesen werden.

Dabei handelt es sich auf der einen Seite um Punktmutationen, auf der anderen Seite konnten Deletionen bzw. Insertionen am homopolymeren C-Stretch (nt 303-nt 309) (mitochondriale Mikrosatelliteninstabilität, mtMSI) beschrieben werden. In 54 der untersuchten 107 Tumoren konnten keine Veränderungen in der mtDNA gefunden werden (50%). 20 Tumore zeigten Punktmutationen (19 %) und 43 mtMSI (40 %). Weder das Auftreten von mtPunktmutationen ($p=0,7885$) noch von mtMSI ($p=0,3978$) wies signifikante Unterschiede zwischen Primärtumoren und Metastasen auf.

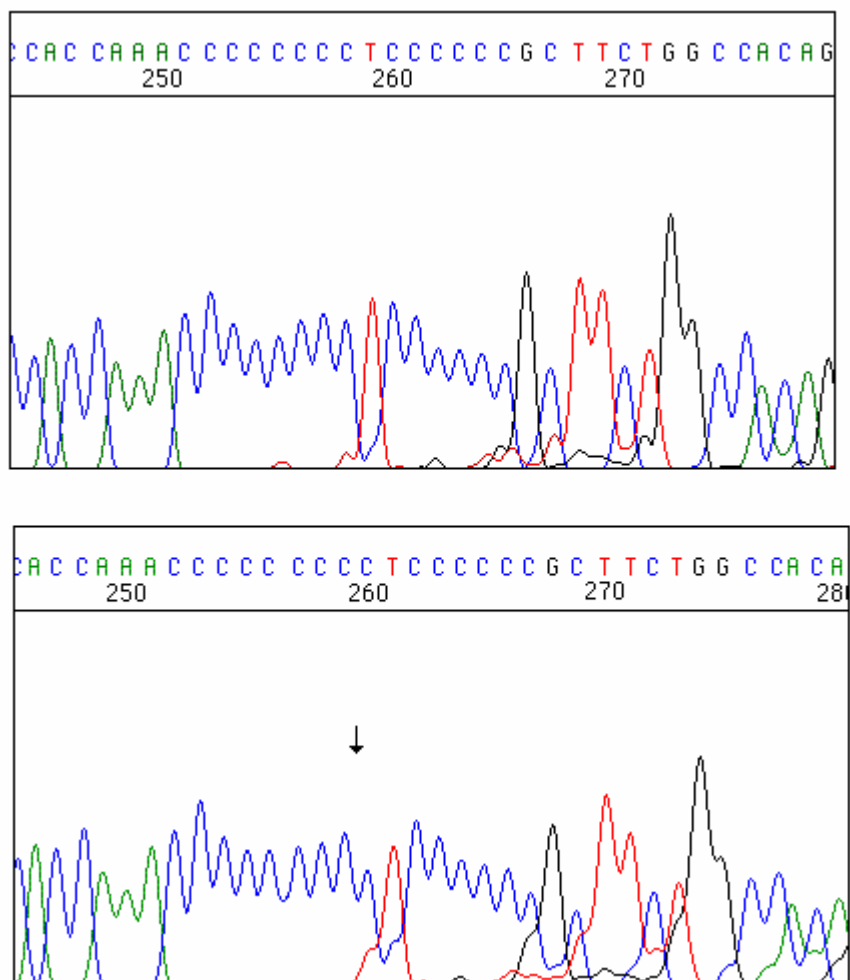


Abbildung 3-1: Beispiel einer mtMSI: im Normalgewebe (oben) zeigten sich acht Cytidine (blau), im Tumorgewebe (unten) derselben Patienten jedoch neun Cytidine (Insertion).

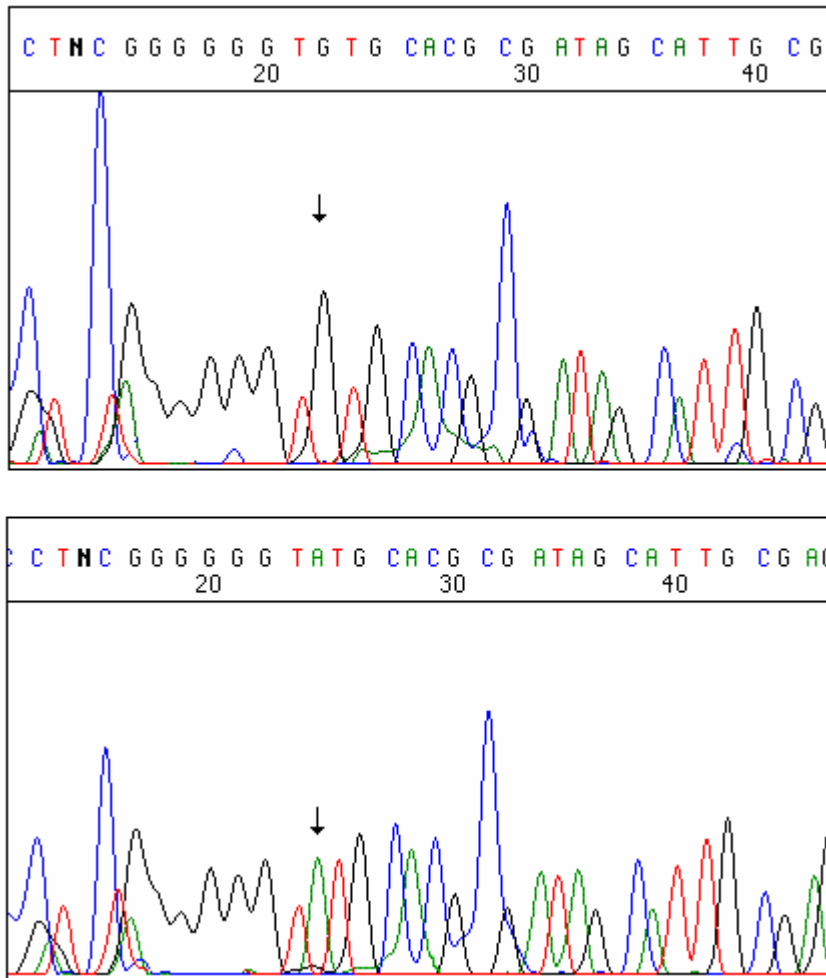


Abbildung 3-2: Beispiel einer Punktmutation: an Position 73 befand sich im Normalgewebe (oben) ein Guanosin, im Tumorgewebe deselben Patienten konnte an Position 73 ein Adenosin nachgewiesen werden.

Grading

Eine Korrelation der mtMSI mit dem Differenzierungsgrad (Grading) der Primärtumore konnte nicht gefunden werden ($p=0,5925$). 45 % (23 von 51) der mäßig differenzierten und 37,5 % (6 von 16) der undifferenzierten Primärtumore wiesen mtMSI auf.

Die Punktmutationen traten signifikant häufiger in Grading 3 Tumoren auf ($p=0,0192$): 12 % (6 von 51) der mäßig differenzierten und 37,5 % (6 von 16) der undifferenzierten Primärtumore wiesen die Punktmutation auf.

3.1.2 $\Delta 4977$ bp Deletionen

37 der 107 Tumore (35 %) wiesen eine de novo $\Delta 4977$ bp Deletion auf, wie sie in Abbildung 3-3 durch das Produkt von Mitout (2.3.2) mit Hilfe der Banden bei 214 bp und 142 bp nachgewiesen wurden. Die $\Delta 4977$ bp Deletion trat in 40 % (16 von 40) Metastasen und 31 % (21 von 67) der Primärtumoren auf. Diese Verteilung ist nicht signifikant ($p=0,3624$). Bei 15 Metastasen (38 %) von acht Patienten ging die Deletion wieder verloren.

19 der 63 Patienten (30 %) besaßen die $\Delta 4977$ bp Deletion bereits im gesunden Gewebe und in jedem neoplastischem Gewebe. Ein Verlust der Mitochondrien mit Deletion von nicht-neoplastischem Gewebe zum Primärtumor konnte nicht nachgewiesen werden.

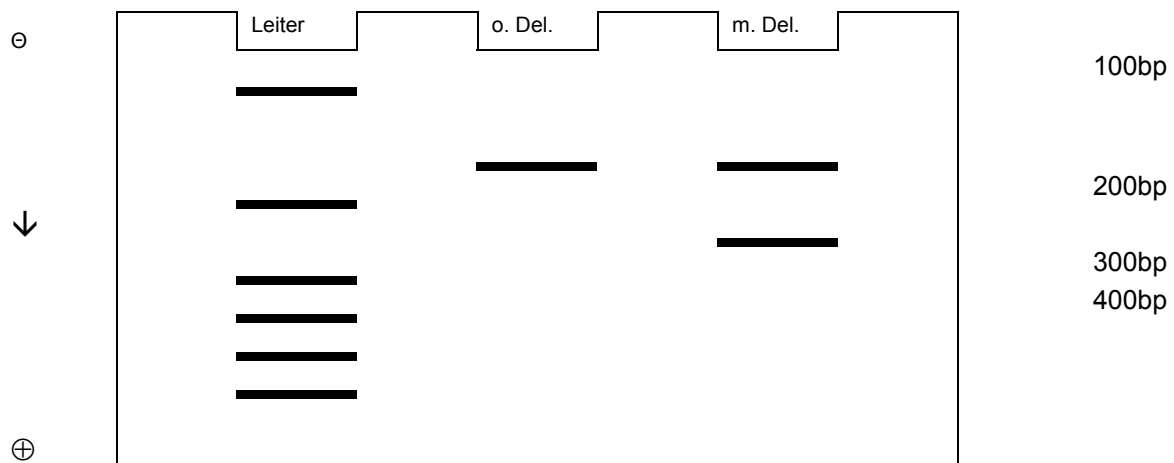


Abbildung 3-3: Schematische Darstellung der Gele zur Detektion der $\Delta 4977$ Deletion. Ganz links wurde der Längenstand mit der ersten Bande bei 100 bp und der zweiten Bande bei 200 bp aufgetragen. In der mittleren Spur eine Probe ohne Deletion. Nur das Produkt der Mitin-Primer bei 142bp erschien als Bande. In der ganz rechten Spur ein Beispiel für eine Probe mit $\Delta 4977$ Deletion: es zeigten sich zwei Banden, eine bei 214 bp als Produkt der Mitout-Primer (untere Bande) und einmal die Bande bei 142 bp, da die Proben immer auch Mitochondrien ohne Deletion enthielten.

Grading

Eine Korrelation zwischen Differenzierungsgrad des Tumors und der $\Delta 4977$ bp Deletion konnte nicht gezeigt werden ($p=0,5429$): 29 % (15 von 51) der mäßig differenzierten sowie 37,5 % (6 von 16) der undifferenzierten Primärtumore wiesen die $\Delta 4977$ bp Deletion auf.

Alter der Patienten

Einen Hinweis auf ein vermehrtes oder vermindertes Auftreten der $\Delta 4977$ bp Deletion in höheren Altersklassen konnte nicht gefunden werden: Der Mittelwert des Alters der 19 Patienten mit Deletion bereits im gesunden Gewebe betrug

ebenso wie das Gesamtdurchschnittsalter der Probandengruppe 59 Jahre. Dieses Durchschnittsalter traf auch zu für Patienten, die im Tumorgewebe eine Deletion aufwiesen. Das Durchschnittsalter ohne Deletion im Tumorgewebe betrug 58 Jahre. Für die Untersuchung einer Alterskorrelation der $\Delta 4977$ bp Deletion würden mehr Daten besonders von älteren Patienten benötigt.

3.2 Veränderungen in der nukleären DNA

3.2.1 Mononukleotidrepeats

Frameshiftmutationen in den drei codierenden Mononukleotidmarkern IGF1R(G)₈, hMSH3(A)₈ und hMSH6(C)₈ wurden in insgesamt 23 Analysen festgestellt, wobei es sich grundsätzlich um eine 1bp-Deletion handelte. Nur in einem Tumor und einer Metastase konnten mehr als eine dieser Frameshiftmutationen nachgewiesen werden, so dass 13 Tumore und 7 Metastasen diese Art der Veränderungen zeigten. Beispiele zeigen Abbildung 3-4 und Abbildung 3-5. Dreimal wurde der Verlust eines Nukleotids in IGF1R(G)₈ gefunden (2x Primärtumor, 1x Metastase), achtmal in hMSH3(A)₈ (7x Primärtumor, 1x Metastase) und zwölfmal in hMSH6(C)₈ (6x Primärtumor, 6x Metastase). Mutationen in hMSH6(C)₈ traten mit 15 % zwar häufiger in Metastasen als in Primärtumoren (9 %) auf, dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant ($p=0,3377$). Auch zwischen der Gesamtheit der Frameshiftmutationen in Mononukleotidrepeats und dem Auftreten in Primärtumoren oder Metastasen ließ sich kein Zusammenhang zeigen ($p=0,7711$).

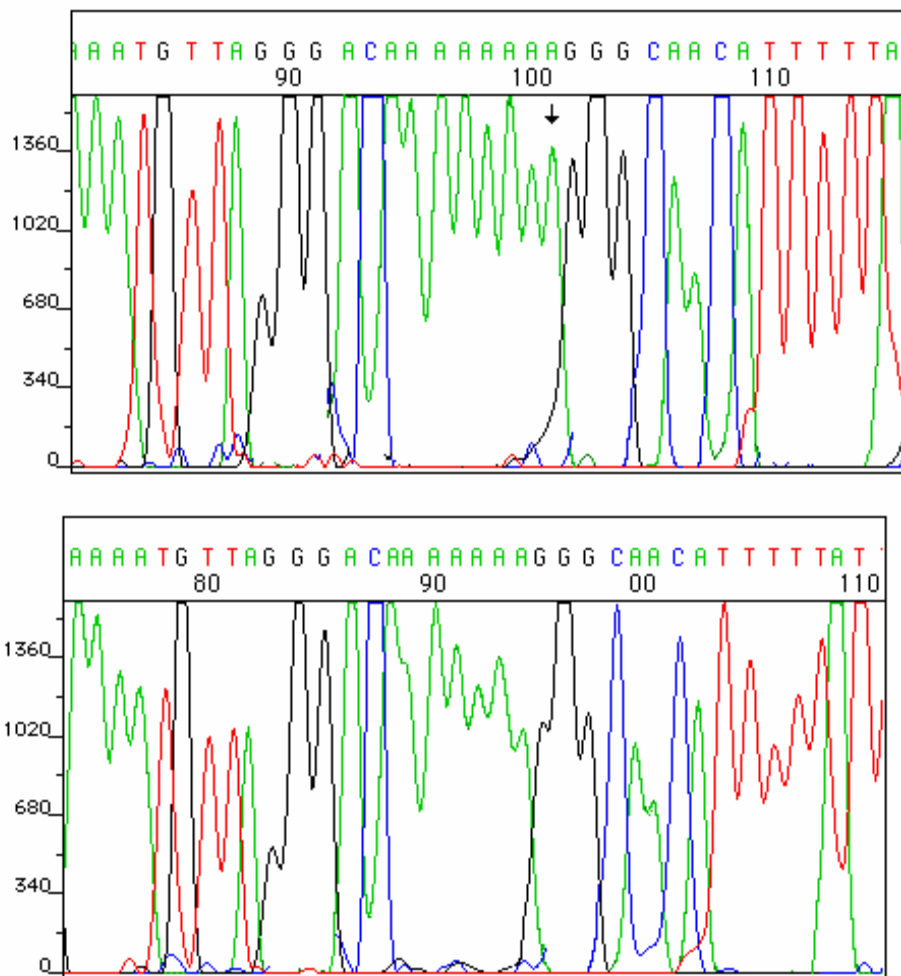


Abbildung 3-4: Beispiel einer Frameshiftmutation in hMSH3: Im Normalgewebe (oben) fanden sich acht Adenosine (grün) und im Tumorgewebe (unten) des Patienten nur noch sieben Adenosine.

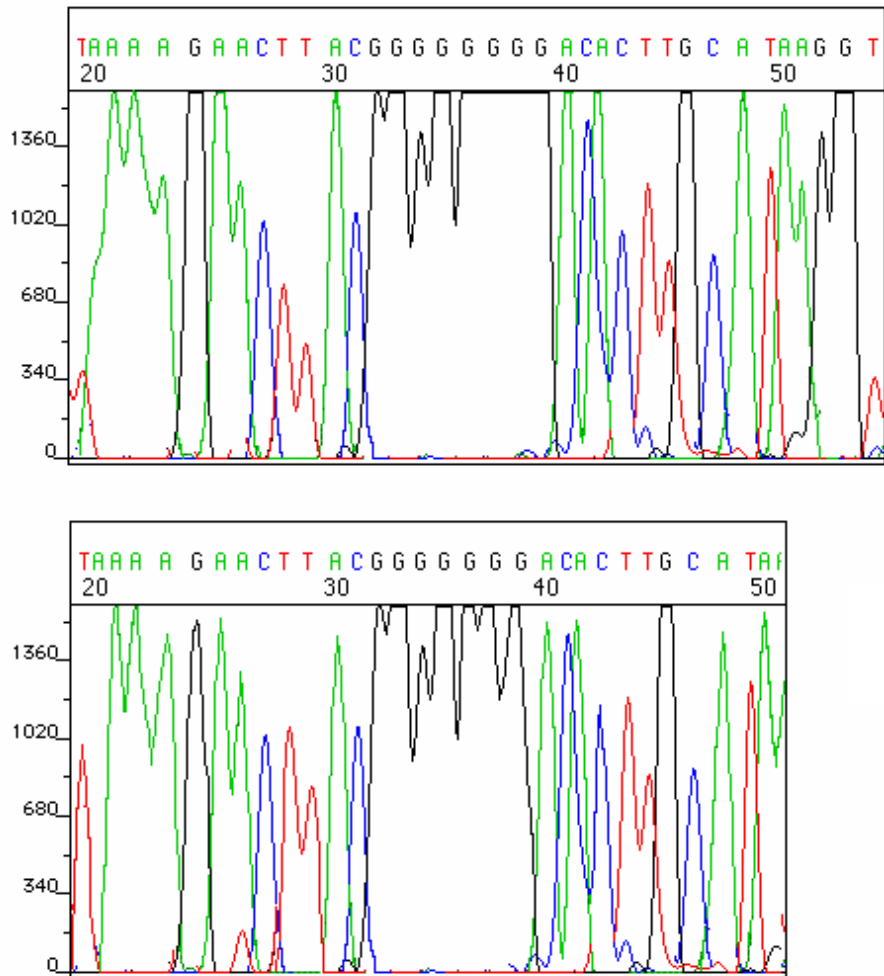


Abbildung 3-5: Beispiel einer Frameshiftmutation in IGFIIR: Im Normalgewebe (oben) fanden sich acht Guanosine (schwarz) und im Tumorgewebe (unten) des Patienten fand sich nur noch sieben Guanosine.

Grading

Eine Korrelation von Grading und Frameshiftmutationen in Mononukleotidrepeats fand sich nicht ($p=0,6891$).

3.2.2 Dinukleotidrepeats

Aberrationen in den fünf Dinukleotidmarkern D2S123, D3S1611, D5S107, D17S787 und D18S34 konnten insgesamt 140 Mal nachgewiesen werden. Davon entfielen 63 (45 %) auf die Primärtumoren und 77 (55 %) auf die Metastasen. Eine Übersicht über die Verteilung auf die einzelnen Marker zeigt Tabelle 3-2. Beispiele sind in Abbildung 3-6 und Abbildung 3-7 dargestellt.

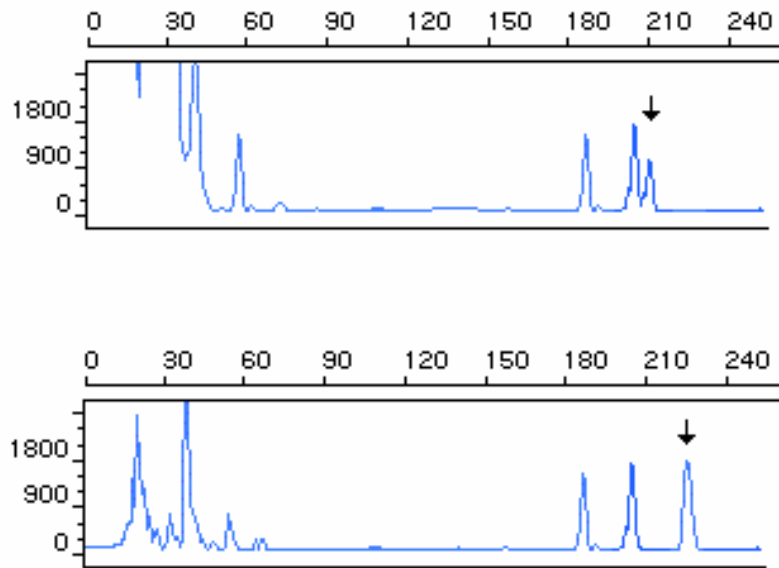


Abbildung 3-6: Beispiel einer Mutation in D2S123: Der mit einem Pfeil markierte Peak im Normalgeweben (oben) zeigte im Tumorgeweiben (unten) eine deutlich veränderte Position und Höhe.

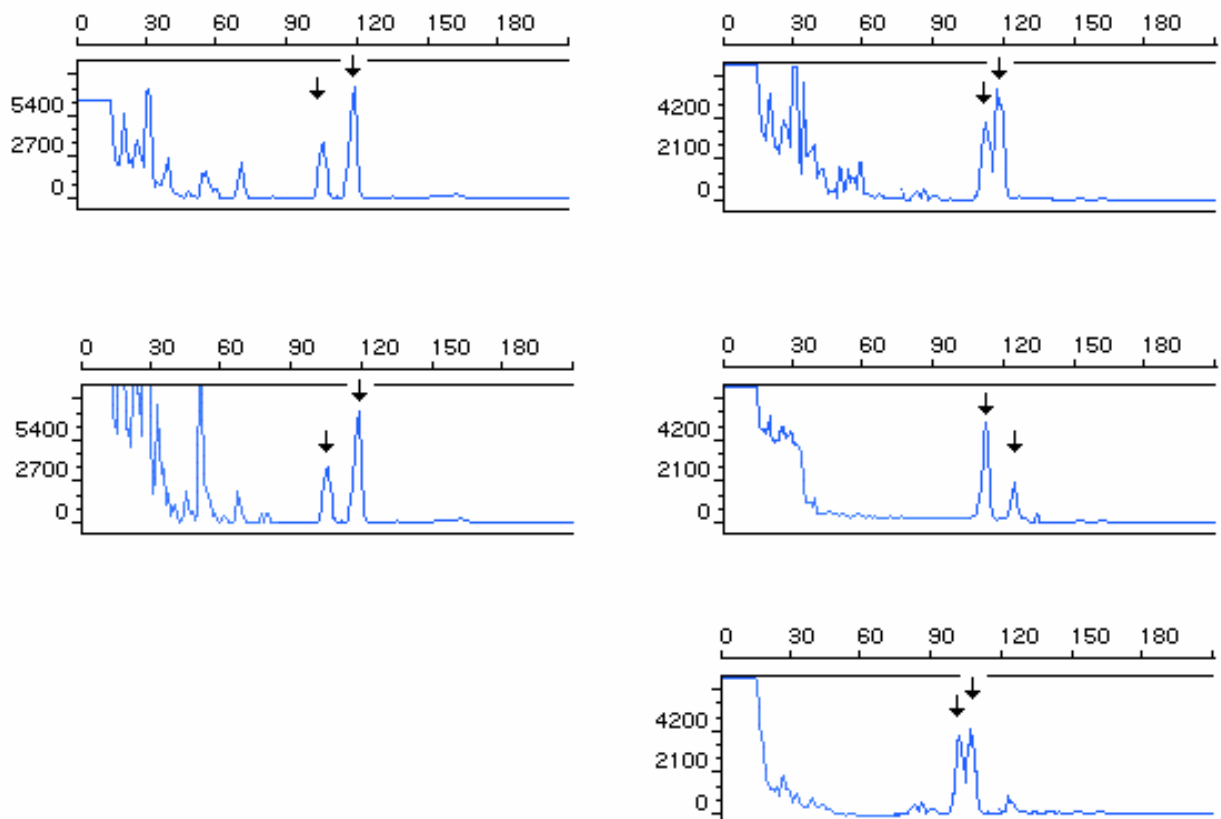


Abbildung 3-7: Gefundene Veränderungen in D18S34: links oben ist das Normalgewebe, darunter der unveränderte Primärtumor abgebildet. Rechts sind drei Metastasen des Primärtumors zu sehen. Jede Metastase zeigte ein vom Primärtumor deutlich abweichendes Peakmuster.

	D2S123	D3S1611	D5S107	D17S787	D18S34	Summe
Primärtumore	11 (16 %)	14 (21 %)	15 (22 %)	9 (13 %)	14 (21 %)	63
Metastasen	9 (21 %)	18 (46 %)	12 (31 %)	18 (46 %)	20 (51 %)	77
alle Tumore	20 (17 %)	32 (30 %)	27 (25 %)	27 (25 %)	34 (32 %)	140

Tabelle 3-2: Absolute und relative Anzahl der Tumore mit Aberrationen in Dinukleotidrepeats.

Dabei sind die Metastasen (92 %) signifikant häufiger betroffen als die Primärtumore (46 %) ($p=0,0001$), insbesondere zeigt sich dies bei den Markern D3S1611 ($p=0,0084$), D17S787 ($p=0,0003$) und D18S34 ($p=0,0084$) (fett markiert in Tabelle 3-2). Die Marker D2S123 ($p=0,4349$) und D5S107 ($p=0,3805$) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Primärtumoren und Metastasen.

Mehrfachtreffer

Die Metastasen und Primärtumore unterschieden sich ebenfalls in der Anzahl veränderter Dinukleotidrepeats pro Tumor. Die Metastasen waren in allen Kategorien (Einfach-, Zweifach-, Dreifach- oder Vierfachtreffer) stärker als die Primärtumoren von Veränderungen betroffen (Tabelle 3-3). Ein- und Zweifachtreffer zeigten einen Trend zum signifikant häufigeren Auftreten bei Metastasen ($p=0,0806$ bzw. $p=0,0922$). Lediglich Alterationen in allen fünf untersuchten Dinukleotidrepeats kamen weder bei Primärtumoren noch bei Metastasen vor.

	1x	2x	3x	4x	5x	gesamt
Primärtumore	8 (12 %)	15 (22 %)	7 (10 %)	1 (1 %)	0 (0 %)	31 (46 %)
Metastasen	10 (26 %)	15 (38 %)	8 (21 %)	3 (8 %)	0 (0 %)	36 (92 %)
alle Tumore	18 (17 %)	30 (28 %)	15 (14 %)	4 (4 %)	0 (0 %)	67 (63 %)

Tabelle 3-3: Anzahl der Dinukleotidrepeats pro Tumor.

Grading

Eine Korrelation zwischen dem Grading der Primärtumore und Veränderungen in den Dinukleotidmarkern konnte nicht beobachtet werden ($p=0,2480$).

3.2.3 Tetranukleotidrepeats

Bei 46 Tumoren (43 %) traten eine oder mehrere Aberrationen der acht untersuchten STRs; D3S1358, VWA, FGA, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317 und D7S820, auf. Die Metastasen waren mit 65 % (26 von 40) signifikant ($p=0,0004$) häufiger betroffen als die Primärtumoren mit 30 % (20 von 67).

Für die Auswertung wurden vier verschiedene Arten von Aberrationen definiert. Es wurde unterschieden zwischen partiellem Verlust eines Allels (pV), Verlust eines Allels (V), Zugewinn eines Allels (Z) und Allelverschiebung (S). Dabei bedeuten: pV, dass das Signal im Tumorgewebe gegenüber dem gesunden Gewebe deutlich erniedrigt ist, messbar durch eine geringere Peakhöhe (Abbildung 3-8); V, dass im Tumorgewebe ein Allel ganz ausbleibt, wie in Abbildung 3-9 gezeigt; Z, dass im Tumorgewebe zusätzlich zu den Allelen des gesunden Gewebes ein weiteres, evt. mit geringerer Peakhöhe (Abbildung 3-10), auftritt und S, dass ein weiteres, im gesunden Gewebe nicht vorhandenes Allel anstelle eines der beiden Allele des nicht-neoplastischen Gewebes im Tumorgewebe nachgewiesen werden kann (Abbildung 3-11).

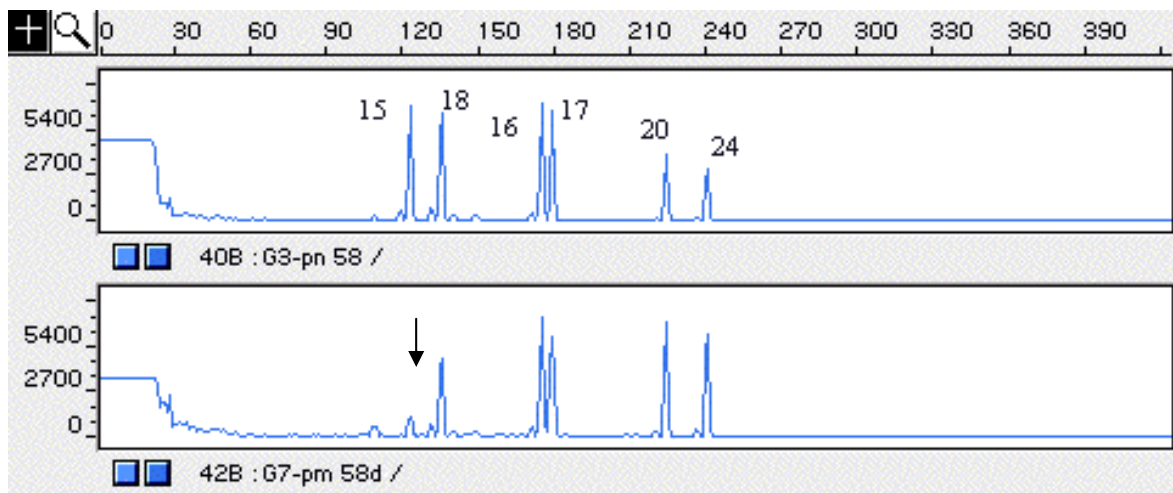


Abbildung 3-8: Partieller Verlust (pV) eines Allels in D3S1358. Die Grafik stellt die kapillarelektrophoretische Auftrennung der mit FAM-markierten STRs des AmpF/STRProfilerPlus Kits D3S1358, VWA und FGA (in dieser Reihenfolge) dar, oben Normalgewebe, unten Tumorgewebe. Die Peakhöhe des mit 15 bezeichneten Peaks (Allel 15) ist im Tumorgewebe deutlich vermindert.

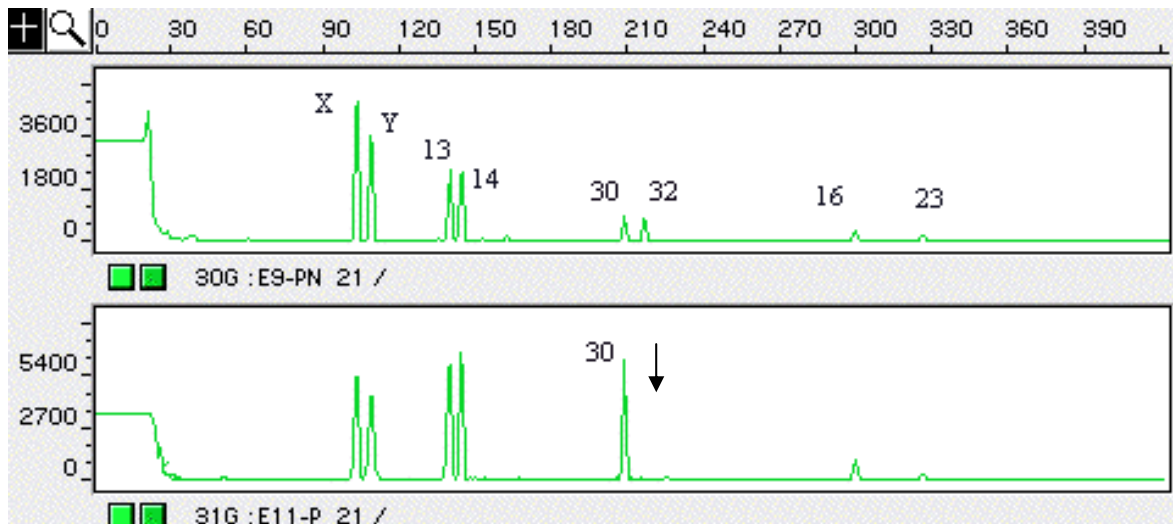


Abbildung 3-9 Verlust (V) eines Allels in D21S11. Die Grafik stellt die kapillarelektrophoretische Auftrennung der mit JOE-markierten STRs des AmpF/STRProfilerPlus Kits Amelogenin, D8S1179, D21S11 und D18S51 (in dieser Reihenfolge) dar, oben Normalgewebe, unten Tumorgewebe. Das Allel 32 ist im Tumorgewebe nicht mehr nachweisbar.

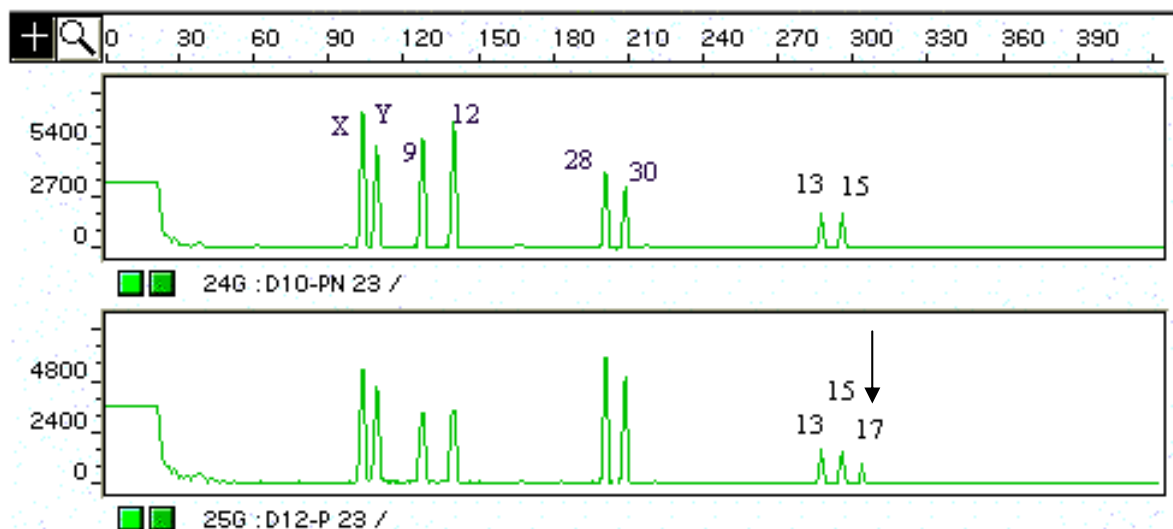


Abbildung 3-10: Zugewinn (Z) eines Allels in D18S51 Die Grafik stellt die kapillarelektrophoretische Auftrennung der mit JOE-markierten STRs des AmpF/STRProfilerPlus Kits Amelogenin, D8S1179, D21S11 und D18S51 (in dieser Reihenfolge) dar, oben Normalgewebe, unten Tumorgewebe. Im Tumorgewebe erscheint zusätzlich das Allel 17.

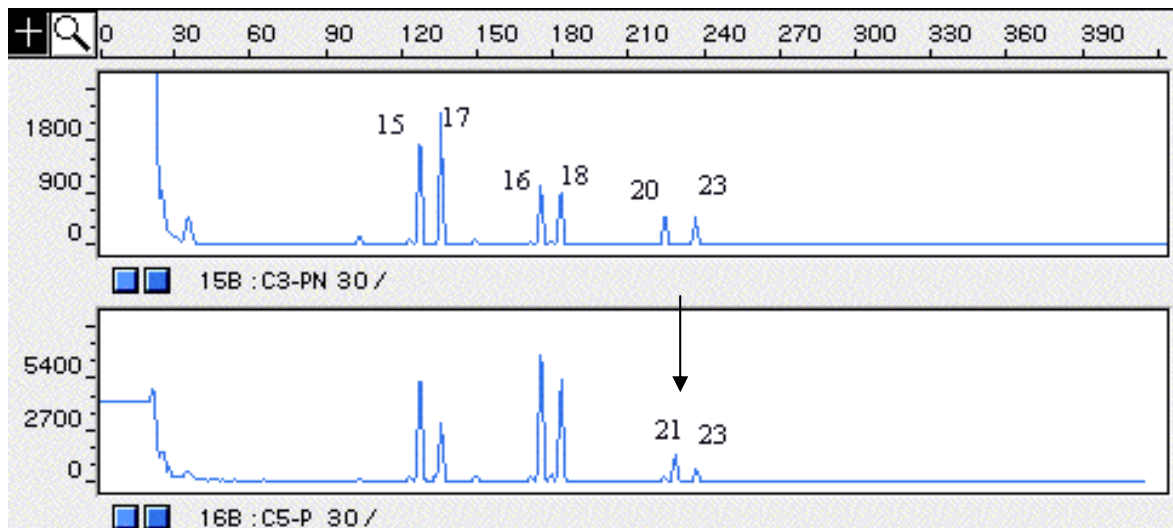


Abbildung 3-11: Allelverschiebung (S) in FGA. Die Grafik stellt die kapillarelektrophoretische Auftrennung der mit FAM-markierten STRs des AmpFSTRProfilerPlus Kits D3S1358, VWA und FGA (in dieser Reihenfolge) dar, oben Normalgewebe, unten Tumorgewebe. In FGA ist statt des Allels 20 nur das Allel 21 nachweisbar.

Die Verteilung der unterschiedlichen Aberrationen auf die Tumore zeigt die nachstehende Tabelle 3-4. Es traten insgesamt 68 Aberrationen in den untersuchten Tumoren auf. Dabei wurden in mehreren Tumoren zwei verschiedene Arten der Aberrationen, also pV, V, Z oder S, oder auch mehrere Veränderungen pro Aberrationsart detektiert. So ist in Tabelle 3-4 zu ersehen, dass 19 Tumore Veränderungen der Art pV aufweisen. Tabelle 3-5 weist in der Summe jedoch 24 pV auf, da bei einigen Tumoren mehr als ein STR von einem partiellem Verlust betroffen waren.

	pV	V	Z	S	alle STR
Primärtumore	8 (12 %)	7 (10 %)	4 (6 %)	3 (4 %)	20 (30 %)
Metastasen	11 (28 %)	10 (25 %)	5 (13 %)	7 (18 %)	26 (65 %)
alle Tumore	19 (18 %)	17 (16 %)	9 (8 %)	10 (9 %)	46 (43 %)

Tabelle 3-4: Aberrationen in nukleären Tetranukleotidrepeats untergliedert nach partiellem Verlust (pV), Verlust (V), Zugewinn (Z) und Allelverschiebung (S).

Jeder der untersuchten STRs war von mehreren oder sogar allen Ereignissen betroffen, wie die nachstehende Tabelle 3-5 zeigt:

	pV	V	pV+V	Z	S	Z+S	Summe
D3S1358	7	2	9	3	2	5	14
VWA	0	3	3	2	0	2	5
FGA	3	2	5	2	2	4	9
D8S1179	2	2	4	2	1	3	7
D21S11	4	4	8	0	1	1	9
D18S51	3	3	6	2	3	5	11
D5S818	3	3	6	0	0	0	6
D13S317	1	2	3	0	0	0	3
D7S820	1	2	3	0	1	1	4
Summe	24	23	47	11	10	21	68

Tabelle 3-5: Verteilung der Aberrationen auf die einzelnen STRs.

Partieller Verlust (24-mal) oder Verlust (23-mal) kamen doppelt so oft vor wie Zugewinn (11-mal) oder Verschiebung (10-mal).

Grading

Eine Korrelation zwischen dem Grading und dem Auftreten von Veränderungen in STRs konnte nicht gezeigt werden.

3.3 Korrelationen der Veränderungen untereinander

3.3.1 Primärtumore

Die 67 Primärtumore zeigten im Vergleich der zwei übergeordneten Gruppen (nukleäre und mitochondriale Genomveränderungen) keine Korrelation (p -Wert= 0,2265). Nukleäre Veränderungen wiesen 60 % der Primärtumore auf und mitochondriale Veränderungen zeigten 64 % Primärtumore. Die Prüfung auf statistische Zusammenhänge zwischen einzelnen nukleären und mitochondrialen Veränderungen der Primärtumore ist in Tabelle 3-6 dargestellt. Aberrationspaare, zwischen denen sich eine signifikante Verteilung ergab ($p < 0,05$) sind fett markiert, während solche, die einen Trend zur signifikanten Verteilung aufwiesen, kursiv und fett dargestellt sind.

p-Wert (Chi-Quadrat)	Δ 4977 Deletion	mtMSI	Punktmutation Mitochondrien	Frameshift Mononukleotid- repeats	Aberrationen Dinukleotid- repeats	Aberrationen Tetranukleotid- repeats
Δ 4977 Deletion						
mtMSI	0,0377 (4,3203)					
Punktmutation Mitochondrien	0,8697 (0,0269)	0,9007 (0,0155)				
Frameshift Mononukleotid- repeats	0,0514 (3,7955)	0,3104 (1,0289)	0,2845 (1,1454)			
Aberrationen Dinukleotid- repeats	0,1173 (2,4524)	0,5705 (0,3219)	0,4184 (0,6549)	0,0190 (5,4977)		
Aberrationen Tetranukleotid- repeats	0,4653 (0,5330)	0,2067 (1,5942)	0,0923 (2,8342)	0,4498 (0,5711)	0,0174 (5,6514)	

Tabelle 3-6: p-Werte einzelner untersuchter Veränderungen untereinander nur für Primärtumore. Der erste Wert entspricht dem p-Wert, der Wert in Klammern ist der Chi-Quadrat-Wert, aus dessen Basis der p-Wert ermittelt wurde. Bei p-Werten kleiner als 0,05 (fett gedruckt) wurde die Korrelation zweier Beobachtungen als signifikant gewertet. Kursiv und fett gedruckt sind p-Werte zwischen 0,1 und 0,05.

Bei den Paaren mit einem p-Wert kleiner 0,05 ließen sich die folgenden Sachverhalte beobachten: Die Δ 4977 Deletion trat in 62 % ihres Gesamtvorkommens gemeinsam mit mtMSI auf ($p=0,0377$). 76 % aller Frameshiftmutationen in Mononukleotidrepeats kamen in Tumoren vor, die auch Veränderungen in Dinukleotidrepeats aufwiesen ($p=0,0190$). 70 % der Aberrationen in Tetranukleotidrepeats traten ebenfalls nur in Neoplasien mit Veränderungen in Dinukleotidrepeats auf ($p=0,0174$). Darüber hinaus zeigte sich, dass 62 % aller Δ 4977 Deletionen gemeinsam mit Aberrationen in Dinukleotidrepeats auftraten, eine Korrelation aber nicht gezeigt werden konnte ($p=0,1173$). Die Δ 4977 Deletionen traten vornehmlich auf, wenn keine Frameshiftmutationen der Mononukleotidrepeats vorlagen, was sich im Trend zur Korrelation ausdrückte ($p=0,0514$). Veränderungen in Tetranukleotidrepeats

traten vornehmlich ($p=0,0923$) auf, wenn keine mt-Punktmutationen vorhanden waren.

3.3.2 Metastasen

Innerhalb der Metastasen waren keine Korrelationen nachweisbar, weder in den übergeordneten Gruppen mitochondrialer und nukleärer Veränderungen ($p=0,4822$) noch zwischen einzelnen Aberrationsarten. 97,5 % der Metastasen wiesen nukleäre und 67,5 % mitochondriale Veränderungen auf.

p-Wert (Chi-Quadrat)	$\Delta 4977$ Deletion	mtMSI	Punktmutation Mitochondrien	Frameshift Mononukleotid- repeats	Aberrationen Dinukleotid- repeats	Aberrationen Tetranukleotid- repeats
$\Delta 4977$ Deletion						
mtMSI	0,7866 (0,0733)					
Punktmutation Mitochondrien	0,8718 (0,0260)	0,0683 (3,3242)				
Frameshift Mononukleotid- repeats	0,8651 (0,0289)	0,6946 (0,1541)	0,1453 (2,1212)			
Aberrationen Dinukleotid- repeats	0,6670 (0,1852)	0,1219 (2,931)	0,1138 (2,500)	0,6773 (0,1732)		
Aberrationen Tetranukleotid- repeats	0,2790 (1,1722)	0,1867 (1,7438)	0,8684 (0,0275)	0,1763 (1,8285)	0,5073 (0,4396)	

Tabelle 3-7: p-Werte einzelner untersuchter Veränderungen untereinander nur für Metastasen. Der erste Wert entspricht dem p-Wert, der Wert in Klammern ist der Chi-Quadrat-Wert, aus dessen Basis der p-Wert ermittelt wurde. Bei p-Werten kleiner als 0,05 (fett gedruckt) wurde die Korrelation zweier Beobachtungen als signifikant gewertet. Kursiv und fett gedruckt hinterlegt sind p-Werte zwischen 0,1 und 0,05.

Zwischen den zwei mitochondrialen Veränderungen mtMSI und Punktmutationen war ein Korrelationstrend ($p=0,0683$) hinsichtlich eines Auftretens ohne die jeweils andere Aberration zu beobachten. Die $\Delta 4977$ Deletion trat oft auf, wenn weder mt-Punktmutation oder Frameshiftmutationen der Mononukleotidrepeats

vorlagen, jedoch wurden 87,5 % aller $\Delta 4977$ Deletionen gemeinsam mit Veränderungen in Dinukleotidrepeats und 75 % zusammen mit Aberrationen in Tetranukleotidrepeats gefunden. 100 % aller mtMSI traten in Metastasen auf, die auch Veränderungen in Dinukleotidrepeats besaßen. Diese Zusammenhänge konnten auf Grund geringer Fallzahlen nicht statistisch belegt werden.

3.3.3 Primärtumore und Metastasen

In der gemeinsamen Auswertung der Primärtumoren und Metastasen, insgesamt 107 Tumore, gab es zwischen den übergeordneten Gruppen nukleäre (74 %) und mitochondriale (65 %) Veränderungen keine Korrelation ($p=0,2838$).

p-Wert (Chi-Quadrat)	$\Delta 4977$ Deletion	mtMSI	Punktmutation Mitochondrien	Frameshift Mononukleotid- repeats	Aberrationen Dinukleotid- repeats	Aberrationen Tetranukleotid- repeats
$\Delta 4977$ Deletion						
mtMSI	0,0868 (2,9327)					
Punktmutation Mitochondrien	0,9650 (0,0019)	0,3209 (0,9854)				
Frameshift Mononukleotid- repeats	0,1078 (2,5856)	0,3028 (1,0619)	0,0815 (3,0340)			
Aberrationen Dinukleotid- repeats	0,1410 (2,1673)	0,4931 (0,4698)	0,8813 (0,0222)	0,0901 (2,8731)		
Aberrationen Tetranukleotid- repeats	0,6535 (0,2015)	0,1616 (1,9589)	0,2289 (1,4474)	0,7645 (0,0898)	0,004 (12,6510)	

Tabelle 3-8: p-Werte einzelner untersuchter Veränderungen untereinander für Primärtumore und Metastasen gemeinsam. Der erste Wert entspricht dem p-Wert, der Wert in Klammern ist der Chi-Quadrat-Wert, aus dessen Basis der p-Wert ermittelt wurde. Bei p-Werten kleiner als 0,05 (fett gedruckt) wurde die Korrelation zweier Beobachtungen als signifikant gewertet. Kursiv und fett gedruckt hinterlegt sind p-Werte zwischen 0,1 und 0,05.

67 % der $\Delta 4977$ Deletionen traten in Tumoren auf, die gleichzeitig eine mtMSI aufwiesen ($p=0,0868$). 80 % der Frameshiftmutationen in Mononukleotidrepeats

fanden sich in Tumoren mit Veränderungen in Dinukleotidrepeats ($p=0,0901$). Aberrationen in Tetranukleotidrepeats trafen fast ausschließlich (83 % aller Tumore mit Veränderungen in Tetranukleotidrepeats) solche Tumore, die ebenfalls Veränderungen in Dinukleotidrepeats zeigten. Diese Korrelation war als einzige signifikant ($p=0,004$) in der gemeinsamen Betrachtung von Primärtumoren und Metastasen. Weiterhin ließen sich beschreiben aber nicht statistisch belegen, dass die $\Delta 4977$ Deletion in 67 % ihres Vorkommens, mtMSI in 67 % ihres Auftretens und mt-Punktmutationen in 65 % ihrer Gesamtzahl gleichzeitig mit Veränderungen in Dinukleotidrepeats nachgewiesen wurden.

4 Diskussion

Gegenwärtig geht man davon aus, dass den meisten Tumorerkrankungen molekulargenetische Veränderungen zugrunde liegen. Inzwischen sind viele unspezifische Aberrationen aber auch viele typische Alterationen bekannt. Zu den bei bestimmten Tumoren immer wieder auftretenden Alterationen gehören z.B. das 1960 entdeckte „Philadelphia-Chromosom“ bei chronisch-myeloischer Leukämie (Nowell und Hungerford, 1960), das später als Translokation t(9;22) identifiziert wurde, sowie die Translokation t(14;18) bei folliculären Lymphomen oder die Trisomie 12 bei der akuten lymphatischen Leukämie. Bei soliden Tumoren hat man weniger häufig charakteristische Veränderungen gefunden. Dennoch ist auch hier der Verlust bestimmter chromosomaler Regionen für einige Tumoren typisch, so z.B. die Deletion in 1p36.3 beim malignen Melanom der Haut (Dracopoli et al. 1989, Poetsch et al, 1998 und 1999), Allelverlust in 17q21 (BRCA=breast-cancer-gene) bei Brustkrebs (Smith et al., 1992) oder im kurzen Arm des Chromosom 3 in den in dieser Studie untersuchten Plattenepithelkarzinomen an Kopf und Hals (Ogasawara et al., 1995). Inzwischen richtet sich das Interesse jedoch auch auf weitere molekulargenetische Veränderungen wie z.B. die Mikrosatelliteninstabilität (MSI). Diese wurde zuerst in HNPCC (hereditary non-polyposis colorectal cancer) sowie in sporadischen kolorektalen Tumoren beschrieben (Ionov et al., 1993). Inzwischen sind eine Reihe solcher MSI für verschiedene Tumorarten bekannt. In jüngerer Zeit ist auch über Veränderungen in der mitochondrialen DNA berichtet worden, die z.T. regelmäßig in bestimmten Mustern bei einzelnen Tumorarten vorkommen (Penta et al., 2001) und möglicherweise eine Relevanz in der Pathogenese solider Tumoren haben könnten (Wallace et al., 1999).

In dieser Studie wurden in 67 Plattenepithelkarzinomen mit 40 Metastasen sowohl nukleäre Genomveränderungen als auch Veränderungen in der mitochondrialen DNA untersucht. Desweiteren wurde geprüft, ob einzelne Veränderungen bevorzugt miteinander kombiniert auftreten.

4.1 Veränderungen in der mitochondrialen DNA

Die mitochondriale DNA der Tumoren aus dieser Studie wurde auf drei verschiedene Arten von Veränderungen hin untersucht. Es wurde zum Einen nach Punktmutationen in zwei Regionen auf dem D-Loop und in den Untereinheiten ND1 und ND5 der NADH-Dehydrogenase 1 gesucht, in denen bereits für andere Tumorarten häufig Veränderungen beschrieben wurden (Habano et al., 1999; Maximo et al., 2001). Daneben wurden die beiden Regionen auf dem D-Loop auch auf die mitochondriale Mikrosatelliteninstabilität (mtMSI) hin analysiert. Unter mtMSI versteht man Insertionen oder Deletionen von einer oder wenigen Basen in Repeatregionen, z.B. den CA-Repeat bei 514 bp und den homopolymorphen C-Stretch bei 303 bp (D310). Ebenfalls untersucht wurde die als „common deletion“ bezeichnete Deletion eines 4977 bp langen mtDNA-Abschnittes (Shenkar et al., 1996).

4.1.1 Punktmutationen und mitochondriale Mikrosatelliteninstabilität

Die Mutationsrate des Mitochondriengenoms ist deutlich höher als die des Kerngenoms. Sie wird als etwa 10-fach höher angegeben (Brown and Wallace, 1994; Polyak et al., 1998; Wallace et al., 1998). Dabei kommen unterschiedliche Mechanismen zum Tragen. Zunächst besitzt die Polymerase γ der Mitochondrien eine schlechtere Korrekturlesefunktion im Vergleich zu Kern-Polymerasen (Kunkel und Loeb 1981, Pinz et al., 1995), was zu deutlich mehr Replikationsfehlern führt. Insbesondere weist sie eine hohe Rate an Replikationsfehlern in langen homopolymorphen Nukleotidabschnitten auf (Longley et al., 2001), wodurch die Entstehung von mtMSI begünstigt wird. Für Punktmutationen des Mitochondriengenoms wird vorwiegend oxidativer Stress durch reaktive Sauerstoffradikale (ROS) aus der Atmungskette verantwortlich gemacht (Maximo et al., 2001; Adelman et al., 1988; Ames et al., 1993; Polyak et al., 1998).

Darüber hinaus ist die Entstehung von Mutationen jedoch als multifaktorielles Geschehen anzusehen, bei dem neben den oben genannten Hauptakteuren noch weitere Faktoren eine Rolle spielen. So fanden Mambo et al. (2003), dass die Reparaturrate des nicht-kodierenden D-Loops verglichen mit kodierenden Bereichen der mtDNA geringer ist und speziell die D310 Region langsamer

repariert wurde als andere Bereiche des D-Loops. Es ist möglich, dass die Nähe zur inneren Mitochondrienmembran die Schädigung begünstigt. Der D-Loop ist der Anheftungspunkt der mtDNA an die innere Mitochondrienmembran und daher stark dem Einfluß von Lipidperoxiden ausgesetzt. Desweiteren hat der D-Loop durch Synthese eines kurzen Stückes des H-Stranges eine Triple-Strang-Struktur, die auf Grund der Einzelstrangkonfiguration sehr anfällig für oxidativen Stress ist (Bianchi et al., 2001) und durch sterische Behinderung für Reparaturmechanismen schlecht erreichbar ist. So fanden Bendall et al. (1996) für HVI eine Mutationsrate, die 100 bis 200 mal größer ist als die des Kerngenoms. In vitro Untersuchungen von Jackson et al. (1998) und Zienoldiny et al. (2000) zeigten, dass ROS an repetitiven Sequenzen besonders häufig zu Mutationen führt.

Punktmutationen

Mt-Punktmutationen wurden hier in 19 % der Fälle gefunden. Maximo et al. (2001) fanden bei Magentumoren (n=32) 31 % mt-Punktmutationen. Dort waren auch die kodierende Bereiche ND1 und ND5 betroffen, die in dieser Studie zwar ebenfalls untersucht wurden, aber keine Veränderungen aufwiesen. Liu et al. (2003) fanden 14 % mt-Punktmutationen bei Endometriumtumoren (n=50).

Bei den hier gefundenen mt-Punktmutationen handelte es sich ausschließlich um bekannte Polymorphismen. Trotzdem könnte ihr Neuauftreten in den Tumoren auf eine allgemeine Instabilität der Tumor-mtDNA hinweisen. Da nur ausgewählte Regionen der mtDNA untersucht wurden, kann die tatsächliche Rate der mt-Punktmutationen höher als 19 % liegen. Hier, wie auch in anderen Studien, wurden einzelne Abschnitte ausgewählt, von denen bekannt ist, dass sie häufig Punktmutationen aufweisen. Jedoch wird diese Auswahl noch nicht ganz einheitlich gehandhabt, so dass dies beim Vergleich einzelner Studienergebnisse zu berücksichtigen ist. Auch können außerhalb der dafür besonders bekannten Regionen Punktmutationen auftreten, die undetektiert bleiben. Die tatsächliche Rate der mt-Punktmutationen ist also wahrscheinlich höher als die gefundenen 19 % zu erwarten.

Mitochondriale Mikrosatelliteninstabilität (mtMSI)

Unter mtMSI werden Mutationen in repetitiven Sequenzen der mtDNA zusammengefasst. Die zwei häufigsten des D-Loops sind D310 und der CA-Repeat bei 514.

In dieser Studie fanden sich in 40 % der Proben mtMSI, die ausschließlich D310 betrafen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Untersuchungen. So fanden Sanchez-Cespedes et al. (2001) bei HNSCC (n=51) 37 % mtMSI und Tan et al. (2004) 44 % bei HNSCC (n=18). Dabei beschrieben Sanchez-Cespedes et al.(2001) D310 als Hot Spot für Mutationen in Lungentumoren und nutzen anschließend D310 für die Bestimmung der mtMSI in einer großen Anzahl von verschiedenen Tumoren (n=247). Dabei fallen unterschiedliche Frequenzen der mtMSI für verschiedene Tumorarten auf: 16 % mtMSI bei Lungentumoren (n=100), sowie 0 % bei Ovar- (n=15) und Prostatumoren (n=16). Bei Magentumoren reichen die Angaben der mtMSI von 15 % (n=105) in Japan (Hiyama et al., 2003) und 16 % (n=62) in Japan (Habano et al., 2000) über 22 % (n=32) in Portugal (Maximo et al., 2001) bis hin zu 38 % (n=68) in China (Ling et al., 2004). Wurden zunächst in den Studien noch mehrere mtMSI-Loci untersucht, so ist man inzwischen dazu übergegangen, nur noch D310 zu untersuchen.

Die großen Unterschiede der mtMSI Frequenz weisen darauf hin, dass diese Werte möglichst nur innerhalb einer Tumorart zu Vergleichen herangezogen werden sollten. Auch einzelne Populationen, in denen die Daten erhoben wurden, könnten Besonderheiten bezüglich der betroffenen Loci und der Frequenz aufweisen. So unterstützen zwar die hier gefundenen mtMSI ausschließlich in D310 das allgemeine Vorgehen, nur noch diesen einen Locus repräsentativ zu untersuchen, doch lässt sich von diesen Daten nicht auf andere Tumorarten oder andere Populationen schließen.

D310 zeigt eine polymorphe Längenvariation (C₇ bis C₉) zwischen Individuen (Anderson et al., 1981; Greenberg et al., 1983), sowie heteroplastische Variationen innerhalb von Individuen (Jazin et al., 1996; Marchington et al., 1997). Größere Mutationen in D310 könnten eine biologische Bedeutung besitzen, weil D310 im Conserved Sequence Block II (SCBII), 92 bp entfernt vom Replikationsursprung des H-Stranges liegt. CSBI bis III sind der an der mtDNA Replikation und Transkription beteiligt (Ghivizzani et al., 1994). So beschreiben

mehrere Autoren, dass große C-Stretch Mutationen die Initiation der mtDNA Replikation stören können (Xu and Clayton, 1996; Hauswirth and Clayton, 1985). Eine mögliche Bedeutung von mtMSI in der Tumorentwicklung zeigen die Ergebnisse von Ling et al. (2004): neben 38 % mtMSI bei 68 Patienten mit Magentumor wurden 13 % mtMSI bei 40 Patienten mit chronischer Gastritis, 20 % mtMSI bei 30 Patienten mit intestinaler Metaplasie und 25 % mtMSI bei 20 Patienten mit Dysplasie gefunden. Dies zeigt, dass mtMSI eine frühe Rolle in der Tumorentstehung bei Magenkarzinomen spielen könnte. Einen ähnlichen Hinweis gibt es für Tumore an Kopf und Hals: Sanchez-Cespedes et al. (2001) fanden bei zwei von 14 untersuchten hyperplastischen und dysplastischen Läsionen von zehn HNSCC-Patienten mtMSI und Poetsch et al. (nicht veröffentlichte Daten, persönliche Kommunikation) fanden in 4 von 26 Patienten mit oralen und laryngealen Dysplasien mtMSI in D310. Ob mtMSI zur Tumorentstehung beiträgt oder lediglich ein Gradmesser derselben ist, kann aus diesen Daten nicht geschlossen werden. Künstlich induzierte Mutationen an ARPE-19 Zellen betrafen deutlich häufiger D310 als kodierende Regionen der mtDNA, und zudem waren die Zellen sieben Tage nach Exposition zum größten Teil homoplastisch für diese Veränderung (Mambo et al., 2003). Polyak et al. (1998) fanden in kolorektalen Tumorzellen mtDNA Mutationen, wobei die meisten davon homoplastisch waren. Diese Ergebnisse wurden von Polyak et al. (1998) als Dominanz des mutierten DNA Genoms auf intrazellulärer und interzellulärer Ebene sowie als Einflußmöglichkeit auf die unnormale metabolischen und apoptotischen Prozesse bei Tumorerkrankungen gewertet. Auch Richard et al. (2000) beobachteten bei Brustkrebs, dass die meisten Tumorzellen homoplastisch für die gefundenen Veränderungen waren.

Die Tendenz zur Homoplastie wurde auch in dieser Studie gefunden. Die gefundenen mtMSI waren alle homoplastisch für diese Veränderung. Geringgradige Homoplastien, bei denen weniger als 30 % der Mitochondrien eine bestimmte Sequenz trugen, konnten mit der Analysemethode nicht detektiert werden. Wenigstens 70 % der Mitochondrien in den betroffenen Tumoren zeigten also die Veränderung.

Für die Dominanz homoplastischer Mutationen in Tumorzellen werden in der Literatur mehrere Theorien, Denkansätze und Ergebnisse beschrieben: Shay and Werbin (1987) postulieren, dass mtDNA Mutationen, die in einem

Selektionsvorteil münden, zu einer höheren Zellteilungsrate der mutierten Zellen führen können. Das betroffene Gewebe wird so homoplastisch. Sanchez-Céspedes et al. (2001) gehen vom Bottleneck-Modell aus, das die klonale Vermehrung nicht-funktionaler mtDNA zu erklären vermag. Während der Oozytenreifung ist die Gesamtzahl der Mitochondrien sehr gering (Flaschenhals), so dass jedes zufällige Mutationsereignis große Auswirkungen hat. Nur wenige Gründer-mtDNAs besiedeln den neuen Organismus, von denen eine das zufällige Mutationsereignis trägt. Ein ähnliches Ereignis wird in der Tumorgenese angenommen, bei dem dann die bereits vorhandene mtDNA Variante (mit Mutation) Homoplasmie im Tumorgewebe erreicht. Auch in normalem Gewebe könnten für diese Veränderung homoplastische Zellen auftreten, z.B. durch ungleiche Teilung von Mitochondrien während der Zellteilung. Solche Zellen, die homoplastisch für sonst im Individuum kaum vorkommende mtDNA Varianten sind, wurden in normalen epithelialen Geweben gefunden (Coller et al., 2001). Polyak et al. (1998) konnten in Zellfusionsexperimenten zeigen, dass bestimmte mtDNA Mutationen dominant sind, d.h. sie sind in der Lage, die Empfänger mtDNA zu ersetzen. Sanchez-Céspedes et al. (2001) beobachteten, dass nahezu alle Mutationen in kodierenden Bereichen den Komplex I betreffen. Sie postulierten, dass Mutationen weiter „Strom abwärts“ in den übrigen Komplexen zu einer verschlechterten Energieausbeute und somit zu einem bedeutendem Selektionsnachteil führen und die Konzentrierung im Komplex I auf eine funktionale Bedeutung dieser Mutationen hindeuten könnte. Zum Beispiel halten sie es für denkbar, dass die erhöhte Menge ROS, produziert von einem mutierten Komplex I, die Mutationsrate der mtDNA und vielleicht sogar der nDNA noch erhöht. Interessant sind in diesem Zusammenhang in vitro Untersuchungen, dass ROS insbesondere in repetitiven Sequenzen Veränderungen hervorruft (Jackson et al., 1998; Zienolddiny et al., 2000). Im Gegensatz dazu vermuteten Polyak et al. (1998), dass bei nicht zu starker Beeinträchtigung der Atmungskette als Kompensation die Anzahl der mtGenome erhöht wird und es so rasch zu einer Homoplastie kommen kann.

Größere Mutationen als die Normvarianten in D310 wurden nicht beobachtet. Dies könnte darauf hinweisen, dass es nicht unbedingt großer Mutationen in diesem Bereich bedarf, um die Tumorentstehung zu fördern. Denkbar wäre ein

Schwelleneffekt, wie er schon für mitochondriale degenerative Erkrankungen und Apoptose beschrieben worden ist (Wallace, 1995; Lightowlers et al., 1997). Die Höhe einer solchen Schwelle könnte durchaus gering, also unter 30 % sein, da hier keine Heteroplastien oberhalb von 30 % gefunden wurden. Unterhalb einer solchen Schwelle würde man viele verschiedengradige Heteroplastien erwarten, während oberhalb einer solchen Schwelle kaum Heteroplasmien auftreten dürften, da sich diese, entsprechend der Theorie, rasch zu Homoplastien weiterentwickeln. Die Kausalitäten liegen jedoch weiter im Dunkeln. Es muss auch in Erwägung gezogen werden, dass die Mutation nicht Ursache der Tumorentstehung ist, sondern nur eine ihrer Folgen.

Korrelation Punktmutation und mtMSI

Eine Korrelation der mtMSI mit dem Grading der Primärtumore konnte nicht nachgewiesen werden. Diese Beobachtung und die Tatsache, dass mtMSI zwar oft bei Tumoren vorkommt, jedoch nicht zwingend anzutreffen ist, zeigen die relative Bedeutung der mtMSI für die Tumorentstehung. MtMSI könnte einen alternativen Weg in der frühen Tumorentstehung darstellen, jedoch nicht isoliert, sondern in Verbindung mit Ereignissen der Tumorgenese im Kerngenom. Für eine umfangreichere Beteiligung der mtMSI bei einigen Tumoren an deren Genese spräche es, wenn diese mtMSI positiven Tumore Gemeinsamkeiten wie z.B. einen gleichen oder ähnlichen Malignitätsgrad aufweisen. Dies konnte hier nicht nachgewiesen werden. Derartige Gemeinsamkeiten wurden jedoch bei Magentumoren beschrieben. MtMSI positive Magentumore korrelieren mit dem intestinalen histologischen Typ und distaler Lokalisation (Ling et al., 2004). Dass nicht in allen Tumorarten und/oder allen Populationen mtMSI eine gleichbedeutende Rolle spielt, zeigen auch die deutlich unterschiedlichen mtMSI Frequenzen bei verschiedenen Tumorarten (Sanchez-Cespedes et al., 2001).

Eine Korrelation zwischen dem Auftreten von mt-Punktmutationen und mtMSI konnte nicht gezeigt werden ($p=0,3209$). Dies fanden auch Maximo et al. (2001) und stellten daraufhin die These auf, dass mt-Punktmutationen und mtMSI unterschiedliche Mechanismen der Entstehung haben. In dieser Studie waren deutlich mehr mtMSI (40 %) als mt-Punktmutationen (19 %) zu verzeichnen, während Maximo et al. (2001) bei Magentumoren ($n=32$) 31 % mt-Punktmutationen und 22 % mtMSI fanden. Für Endometriumtumore ($n=50$)

geben Liu et al. (2003) 14 % mt-Punktmutationen und 50 % mtMSI an, vergleichbar mit den hier für HNSCC vorgestellten Ergebnissen. Die unterschiedliche Gewichtung von mt-Punktmutationen und mtMSI in den einzelnen Tumorarten könnte darauf hinweisen, dass die Tumorentstehung unterschiedlichen Wegen folgt, je nach dem welches Gewebe betroffen ist. Dies wird umso deutlicher, wenn man die mt-Punktmutationen und mtMSI noch näher spezifiziert. In Brusttumoren fanden Richard et al. (2000) 43 % (n=40) CA-Repeat Instabilität, während Liu et al. (2003) in Endometriumtumoren (n=50) nur 2 % dieser Veränderung fanden und in dieser Untersuchung an HNSCC Tumoren keine dieser Veränderungen gefunden wurde, sondern für mtMSI ausschließlich Mutationen in D310. Letztere wiederum konnte weder in Ovarialtumoren (n=15) noch in Prostatatumoren (n=16) von Sanchez-Cespedes et al. (2001) nachgewiesen werden.

Liu et al. (2003) schlagen vor, dass das differenzierte Auftreten von mtDNA Mutationen zum Teil aus unterschiedlichen Reparaturmechanismen oder unterschiedlicher Reparaturaktivität in den verschiedenen Tumorarten resultiert, da Hinweise gefunden wurden, dass es Zell-spezifische Unterschiede bei der Reparatur von mtDNA Schäden gibt (LeDoux and Wilson, 2001).

Dazu könnten die oben schon erwähnte schlechte Funktion der Polymerase γ (Kunkel und Loeb, 1981) insbesondere an homopolymorphen mtDNA Abschnitten (Longley et al., 2001) beitragen. Aber auch ROS soll in vitro Untersuchungen zufolge an repetitiven Sequenzen besonders häufig zu Mutationen führen (Jackson et al., 1998; Zienolddiny et al., 2000), was durch eine fehlende Korrelation von mt-Punktmutationen und mtMSI nicht notwendiger Weise widerlegt wird. Es tragen immer mehrere Faktoren zur Entstehung der Mutationen bei, deren Bedeutung vom Gewebe abzuhängen scheint. Um die relevanten Faktoren und ihre relativen Bedeutungen für jede Tumorart zu ermitteln, bedarf es also eingehenderer Untersuchungen. In die Überlegungen für ein entsprechendes Studiendesign sollten mit einbezogen werden: Eigenschaften des Gewebes bezüglich der Stoffwechselaktivität, speziell der Entstehung von ROS, alternative Wege zur Entstehung von ROS, z.B. *Helicobacter pylori* im Magen, Einwirkungsmöglichkeiten anderer Gifte wie z.B. in der Leber, Mitoseaktivität des Gewebes, Besonderheiten der mtGenomreplikation wie R-Loop und Abhängigkeit vom Kerngenom für Replikations- und Reparaturenzyme.

4.1.2 Δ 4977 Deletion

Mehr als 100 verschiedene Deletionen in menschlicher mtDNA sind bisher beschrieben worden (MITOMAP). Darunter ist die Δ 4977, auch common deletion (CD) genannt, eine der längsten und häufigsten (Shenkar et al., 1996) Deletionen. Sie ist hinsichtlich ihrer diskutierten Korrelation mit dem Alter sowie einigen mitochondrialen Erkrankungen (Lee et al., 1994; Shoffner and Wallace, 1992) auch eine der bedeutendsten. Die Anfangs- und Endpunkte dieser Deletion sind, wie bei zwei Drittel aller mtDeletionen von kurzen short tandem repeats flankiert. Für Δ 4977 befinden sich Anfang- und Endpunkt an Position 8470 bzw. 13447. Man nimmt an, dass die Deletion nach von ROS verursachtem Einzelstrangbruch (Shoffner et al., 1989) durch intragenomische Rekombination zwischen den direkten Repeats (8470-8482 und 13447-13459) zustande kommt. Die hier gefundene Rate von 35 % im Tumorgewebe neu aufgetretener CD (common deletion) ist niedriger als die von Magentumoren mit 54 % (n=32; Maximo et al., 2001), von LSCC (laryngeal squamous cell cancer) (n=35; Han et al., 2004) mit 57 % oder von Hürthle Zell Tumoren mit 100 % (n=43; Maximo et al., 2002). Dies zeigt, dass wahrscheinlich ein Vergleich von Daten nur innerhalb gleicher Gewebe bzw. Tumorarten und gleicher Populationen sinnvoll ist. Eine Betrachtung getrennt nach Tumorart könnte Aufschluß geben über unterschiedliche Wege der Tumorgenese in den verschiedenen Geweben, deren Eigenschaften dazu genau gegenübergestellt werden müssen.

In der vorliegenden Studie wurde in mehr als $\frac{3}{4}$ der Fälle an den Tumorgrenzenden Gewebe als gesundes Vergleichsgewebe benutzt. In den restlichen Fällen diente peripheres Blut oder gesundes Lymphknotengewebe als nicht-neoplastisches Vergleichsgewebe. Dabei besaßen 19 Patienten die Deletion im gesunden Gewebe und im Tumor. Diese Zahl könnte noch etwas höher liegen, da Blut als gesundes Vergleichsgewebe evtl. nicht so gut geeignet ist wie unmittelbar an den Tumorgrenzenden Gewebe des gleichen Organs.

Einfluß verschieden sensitiver Methoden zur Detektion der Δ 4977 Deletion

Neuere Arbeiten, die eine gegenüber der hier eingesetzten PCR vielfach sensitivere Real Time PCR anwenden, fanden in ESCC (esophageal squamous cell carcinoma) (Abnet et al., 2004) in 95 % (n=21) Δ 4977 Deletionen, die zwar nicht im peripheren Blut nachweisbar waren, jedoch in unmittelbar an die

Tumoren grenzendem Gewebe. Shao et al. (2004) fanden eine Deletion von 4981 bp Länge in 85 % der HCC (hepatocellular carcinomas) bzw. 83 % der HNH (hepatocellular nodular hyperplasia), während nicht-canceröses Lebergewebe der entsprechenden Tumorpatienten in 57 % die Deletion aufwies. Mit Hilfe der Real Time PCR konnten Mohamed et al. (2004) je nach Zelltyp in 1 bis 2 Promille die $\Delta 4977$ Deletion im peripheren Blut gesunder Probanden (n=10) nachweisen. Ein altersabhängiges Auftreten der Deletion konnte dort nicht festgestellt werden. Diese sensitive Nachweismethode legt nahe, dass in vielen Geweben eine Heteroplasmie auf niedrigem Niveau für diese und vielleicht auch für andere Veränderungen vorliegt. Es ist also nicht unbedingt der qualitative Nachweis entscheidend für eine klinische Manifestation, sondern der Grad der Heteroplasmie in einem bestimmten Gewebe. Ebenso muss möglicherweise für eine Bedeutung der $\Delta 4977$ Deletion in der Tumorgenese ein bestimmter Schwellenwert an Mitochondrien mit dieser Veränderung im neoplastischen Gewebe erreicht werden.

Apoptose und die $\Delta 4977$ Deletion als Faktoren in der Tumorentstehung

Apoptose ist ein aktiver, ATP-verbrauchender Prozess, der wichtig für die Gewebeentwicklung und die Homöostase ist. Es müssen bestimmte Gene aktiviert werden, die zu einer Reihe spezifischer morphologischer und biochemischer Ereignisse führen. Dazu gehören die Aktivierung zelleigener Proteasen, eine mitochondriale Depolarisation, die Chromatinkondensation, eine oligonukleosomale DNA-Degradation und ein Volumenverlust der Zelle bzw. eine Fragmentation der Zelle, ohne dass es zu einer entzündlichen Reaktion kommt. Die Apoptose wurde in der Pathologie vieler Erkrankungen wie Autoimmunkrankheiten, neurogenerative Erkrankungen, Schlaganfall, Alzheimer und auch bei Neoplasmen beschrieben (Hetts 1998). Mitochondrien wird eine bedeutende Rolle bei der Auslösung und Vermittlung der Apoptose zugeschrieben. So wurde in in vitro Untersuchungen gezeigt, dass die Störung des transmembranen Potentials ($\Delta\psi$) und die Freisetzung einiger mitochondrialer Proteine wie Cytochrom C und AIF (Apoptose-induzierender-Faktor) in das Cytosol der Zelle zur Aktivierung verschiedener apoptotischer Stoffwechselwege in der Lage sind (Liu et al., 1996; Kroemer et al., 1997; Kluck et al. 1997, Zhivotosky et al., 1998). Auch kann die exzessive Produktion freier Radikale wie

ROS über Veränderungen der äußeren Mitochondrienmembran mit Freisetzung von Cytochrom C und AIF vermehrt zu Apoptose führen (Richter et al., 1995; Slater et al., 1995; Yoneda et al., 1995), ebenso wie ein Mangel an ATP (Richter et al., 1996; Leist et al., 1997). Untersuchungen an Muskelgewebe von Patienten mit Enzephalomyopathien zeigten, dass mtDNA Mutationen, die die mitochondriale Proteinsynthese betrafen, erst zur Apoptose führten, wenn ein bestimmter Mindestanteil der mtDNA mutiert war. Für Deletionen mussten mehr als 40 % der mtDNA betroffen sein und für Punktmutationen in tRNA-Genen 70 % (Mirabella et al., 2000).

Die Metastasen dieser Studie zeigten etwas häufiger die Deletion (40 %) als die Primärtumoren (31 %). In 38% der Metastasen, die einem Primärtumor mit Deletion zugeordnet wurden, ging die $\Delta 4977$ Deletion jedoch verloren. Dabei waren bei zwei Primärtumoren alle Metastasen (Anzahl 3 und 8) von dem Verlust betroffen. Bei vier Primärtumoren wiesen einige Metastasen (Anzahl 2, 3, 3 und 4) die Deletion auf, die anderen hatten die Deletion verloren. Diese hohe Rate an Verlusten der Deletion in den Metastasen, also eigentlich die hohe Rate wieder vollständiger Mitochondriengenome ist möglicherweise ein Hinweis auf die Rolle der Deletion in der Apoptose. Durch die 5 kb umfassende Deletion wird die Atmungskette eines Mitochondriums stark beeinträchtigt. Es kommt zur schlechteren Energieausbeute und zu einem erhöhten Anfall an ROS. Die Deletion erhöht also die Wahrscheinlichkeit des apoptotischen Zelltods für den Tumor. Da nie alle Mitochondrien die Deletion aufweisen, können beim Tumorwachstum sich entweder die Zellen mit besonders vielen intakten Mitochondrien besser vermehren oder Zellen mit zu vielen von der Deletion betroffenen Mitochondrien sterben schneller ab, bis die Mitochondrienzahl mit Deletion unter die Nachweisgrenze fällt.

Der Zeitpunkt des „Verlustes“ der Deletion zeigte sich hier variabel, da einige Primärtumore noch Metastasen mit Deletion aufwiesen, andere hingegen keine Metastasen mit Deletion mehr besaßen. So ist es denkbar, dass bereits kurz vor der Metastasierung einzelne Tumorzellen die Deletion „verlieren“ und so im Einzelfall vielleicht überhaupt erst die Fähigkeit zur Metastasierung erreichen, oder in den Metastasen selbst erst die Deletion wieder zurückgeführt wird. Unter den Primärtumoren, aus denen mehr als eine Metastase entstanden waren, wies keiner einen Satz von Metastasen auf, die alle die Deletion noch zeigten. Dies

kann als weiterer Hinweis darauf gewertet werden, dass die Deletion die Wahrscheinlichkeit der Apoptose erhöht.

Auftreten der Δ 4977 Deletion mit anderen Veränderungen

Bei den Primärtumoren tritt die Δ 4977 Deletion vermehrt in Tumoren auf, die auch mtMSI zeigen ($p=0,0377$). Bei den Metastasen ist keine signifikante Verteilung erkennbar. Das könnte darauf hindeuten, dass in Primärtumoren gegensätzliche Mechanismen für die Entstehung der CD und mtMSI wirksam werden oder die beiden Veränderungen unterschiedliche Anfangswege der Tumorgenese markieren, die in späteren Stufen, wie den Metastasen, in eine gemeinsame Endstrecke münden. Um auszuschließen, dass die Korrelation zufällig zustande gekommen ist, sollten Studien mit größeren Fallzahlen vorgenommen werden.

Ein altersabhängiges Auftreten der Δ 4977 Deletion, wie für Skelett- und Herzmuskel beschrieben, konnte hier nicht nachgewiesen werden. Auch war kein Dignitätsgrad signifikant stärker betroffen als der andere.

4.2 Nukleäre Veränderungen: Mikrosatelliteninstabilität

Unter nukleärer Mikrosatelliteninstabilität versteht man Mutationen in kurzen repetitiven Sequenzen des Kerngenoms, bei denen sich eine bis einige wenige Basenpaare wiederholen.

4.2.1 Mononukleotidrepeats

Mikrosatelliteninstabilität (MSI) wurde in vielen Tumoren beschrieben. Ihre Bedeutung für die Tumorgenese ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Zunächst wurde MSI in HNPCC (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) entdeckt und der Zusammenhang mit Mutationen in hMLH1 und hMSH2 gezeigt (Fishel et al., 1993 und 1994; Viel et al., 1998), beides Gene des Mismatch Repair Systems (MMR), für das bis heute mindestens sechs Komponenten bekannt sind. Dazu gehören, neben hMLH1 und hMSH2 auch hMSH3, hMSH6, hPMS1 und hPMS2 (Jiricny 1998; Umar and Kunkel, 1996). Bei bis zu 90 % der HNPCC führen Keimbahnmutationen in hMLH1 oder hMSH2 zu Funktionseinschränkungen im MMR, und die Patienten weisen eine hohe Rate

an MSI (MSI-H, mehr als 40 % der MSI-Loci betroffen) auf (Bronner et al., 1994; Fishel et al., 1993). Bei sporadisch auftretenden kolorektalen Tumoren wird hauptsächlich die somatische Methylierung der hMHL1-Promotorregion für eine Dysfunktion des MMR und nachfolgend MSI-H verantwortlich gemacht (Herman et al., 1998; Kane et al., 1997). Für einige weitere Tumore wurden MSI-H beschrieben, wie z.B. Tumore des Endometriums und des Magens. Für wieder andere Tumore wurde eine MSI-L, d.h. MSI in weniger als 40 % der Loci gefunden (Boland et al., 1998). Bezüglich der Rolle der MSI-L in der Tumorentstehung ist bisher kaum etwas bekannt.

In sporadischen kolorektalen Tumoren gibt es gute Hinweise darauf, dass Tumore mit defizienten MMR charakteristischen Wegen in der Tumorentwicklung folgen. Verglichen mit Mikrosatelliten-stabilen kolorektalen Tumoren zeigen MSI-H kolorektale Tumore zahlreiche typische genetische, histologische, morphologische und prognostische Eigenschaften. Insbesondere sind die Gene TGF β RII, BAX, IGFIIR, hMSH3 und hMSH6 im Verlauf der neoplastischen Progression betroffen (Kinzler und Vogelstein, 1996; Lengauer et al., 1997). Sie enthalten repetitive DNA-Sequenzen, die durch Frameshiftmutationen inaktiviert werden.

In dieser Studie konnten nur in 19 % der Tumore und Metastasen Frameshiftmutationen in Mononukleotidrepeats nachgewiesen werden. Ein Zusammenhang mit dem Grading ließ sich nicht zeigen ($p=0,6891$). Wang et al., (2001) konnten zwar eine MSI in zwei oder mehr Loci an 36 % bis 88 % der untersuchten HNSCC (n=57) zeigen, fanden jedoch keine Dysfunktion der MMR Gene hMLH1 und hMSH2. Hier wurde in drei Mononukleotidrepeats nach Frameshiftmutationen gesucht: insulinlike-growth faktor receptor (IGFIIR) sowie den homologen Genen des MMR in Bakterien hMSH3 und hMSH6, für die schon bei anderen Tumorarten Mutationen gefunden wurden (Fujiwara et al., 1998; Liu et al., 1995). Die Angaben der Frequenzen dieser Mutationen schwanken stark, je nach untersuchter Tumorart und Studie. Für HNPCC werden in hMSH3 50-52 % und in hMSH6 25-33 % angegeben. Für MSI-H in sporadischen kolorektalen Tumoren finden sich 6-9 % in IGFIIR, 29 % in hMSH3 und 16 % in hMSH6. Für MSI-H in sporadischen Magentumoren werden 8-33 % in IGFIIR, 4-64 % in hMSH3 und 4-52 % in hMSH6 beschrieben und für MSI-H in Endometriumtumoren werden 14 % in IGFIIR, 14 % in hMSH3 und 0 % in

hMSH6 angegeben (Catasus et al., 2000). Catasus et al. (2000) weisen darauf hin, dass in Endometriumtumoren die Mononukleotid-Frameshiftmutationen heterogen im Tumor verteilt sind. Mehrere Probennahmen an verschiedenen Stellen waren notwendig, bis ein Ergebnis erzielt wurde. Das könnte die stark variierenden Ergebnisse anderer Gruppen erklären und mahnt zur Vorsicht bei der Ergebnisinterpretation. Die tatsächlichen Frequenzen der Frameshiftmutationen in Mononukleotidrepeats in dieser Studie könnten bedeutend höher liegen. Catasus et al. (2000) vermuten, dass die heterogene Verteilung ein Hinweis auf eine Beteiligung dieser Mutationen an der späten Tumorprogression ist.

Es wurde vorgeschlagen, dass Frameshiftmutationen in IgFIIR erst in Folge von Veränderungen in hMSH3 und hMSH6 auftreten, weil bei Magentumoren Mutationen in IGFIIR nur in solchen Regionen eines Tumors gefunden wurden, die auch Mutationen in hMSH3 und hMSH6 zeigten (Chung et al., 1997). Dazu konnten hier keine Aussagen getroffen werden. Eine Frameshiftmutation in IgFIIR wurde hier nur dreimal gefunden, davon zweimal mit hMSH6 und einmal alleine. Für eine statistische Aussage ist diese Fallzahl zu gering.

4.2.2 Dinukleotidrepeats

Anders als bei den Mononukleotidrepeats hat sich bei den Dinukleotidrepeats noch kein Spektrum an Markern herauskristallisiert, das bevorzugt untersucht wird. Hier wurden fünf Dinukleotidrepeats untersucht, in denen für HNSCC und andere Tumore Veränderungen beschrieben wurden (Sasiadek et al., 2001; Shitoh et al., 1998; Naidoo et al., 2000) 63 % aller Tumore waren von Veränderungen in Dinukleotidrepeats betroffen, wobei die Metastasen mit 92 % deutlich häufiger Allelveränderungen hatten als die Primärtumoren mit 46 %. Keine andere Aberrationsart wies einen deutlicheren Unterschied zwischen Primärtumor und Metastasen auf. Dies offenbart sich auch in der Betrachtung von Ein- und Mehrfachtreffern. In jeder Kategorie waren die Metastasen deutlich stärker betroffen, zeigen also eine größere Instabilität als die Primärtumoren. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Dinukleotidmarkern und dem Grading konnte nicht ($p=0,2480$) ermittelt werden.

Betrachtet man nur die Primärtumore, so traten die Frameshiftmutationen der Mononukleotidrepeats signifikant oft zusammen mit Mutationen in

Dinukleotidrepeats auf ($p=0,0018$). Bezieht man die Metastasen mit in diese Rechnung ein, so stellt sich kein signifikanter Zusammenhang dar ($p=0,094$). Zunächst wurden die beiden genannten Veränderungen als MSI zusammengefaßt, was durch die positive Korrelation gerechtfertigt scheint. Es handelt sich jedoch bei den Frameshiftmutationen der Mononukleotidrepeats um kodierende Bereiche, deren Veränderung Strukturaberrationen im Protein auslöst. Allelverschiebungen in den Dinukleotidrepeats wurden zwar häufig beschrieben, eine eindeutige Zuordnung zu Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen ist bisher nicht oder nur selten gelungen. Ihre Relevanz für die Tumorgenese und Tumorprogression ist nicht eindeutig geklärt. Für die Reparatur der Frameshiftmutationen gibt es in einigen Tumorarten zuverlässige Hinweise auf das MMR (Bronner et al., 1994; Kinzler und Vogelstein, 1996), während die Reparaturmechanismen der Dinukleotidrepeats weitgehend unbekannt sind. Bacher et al. (2004) zeigten an kolorektalen Tumoren, dass unter 266 Mono-, Di-, Tetra- und Pentanukleotidmarkern die Mononukleotidmarker die größte Sensitivität und Spezifität für die Detektion von Tumoren mit MMR Defekten besitzen und für die Suche nach MSI-H Tumoren am besten geeignet sind. Dinukleotidrepeats hingegen erwiesen sich als weniger sensitiv und spezifisch für MMR Defekte. Vor diesem Hintergrund erscheint es sinnvoll, Mutationen in Dinukleotidrepeats als generellen Hinweis auf eine Instabilität des Kerngenoms zu werten, welche im Falle der HNSCC signifikant häufig in Verbindung mit MSI der Mononukleotidrepeats auftritt.

4.2.3 Tetranukleotidrepeats

Tetranukleotidrepeats, auch als STRs (short tandem repeats) bezeichnet, sind Längenpolymorphismen an spezifischen Loci im gesamten chromosomalen Genom von Eukaryonten. Ausgewählte STRs sind ein wichtiger Bestandteil der forensischen Routine bei Abstammungs- oder Spurenanalysen. Sie werden, insbesondere X- und Y-chromosomale STRs, auch bei populationsgenetischen Untersuchungen eingesetzt, und einige wenige spielen eine Rolle in der Diagnostik bestimmter Erkrankungen. Die Methoden der STR-Analyse sind für die verschiedenen Anwendungsgebiete standardisiert und weit verbreitet. Die

hier untersuchten Marker werden in der forensischen Routine in vielen Laboren verwendet.

Tumorgewebe wird normalerweise nicht in der Abstammungsbegutachtung oder in der Identifizierung eingesetzt. Dennoch gibt es zwei häufiger auftretende Einsatzmöglichkeiten: eine stetig steigende Zahl an Vaterschaftsgutachten nach dem Tod des potentiellen Vaters lässt auch die Zahl der Gutachten, in denen nur noch Tumorgewebe zur Verfügung steht, ansteigen. Ebenso ist es möglich, dass zur Identifikation unbekannter Toter nur noch – bei früheren Erkrankungen entnommenes - Tumorgewebe als Vergleichsprobe verwendet werden kann. Hier stellt sich dann allerdings die Frage, in wie weit die für viele Tumoren bekannte DNA-Instabilität sich auch auf forensisch relevante STRs erstreckt.

In dieser Studie zeigten 43 % aller HNSCC Veränderungen in den STRs. Wie schon bei den Dinukleotidrepeats waren die Metastasen (65 %) deutlich häufiger betroffen als die Primärtumoren (30 %). In gastrointestinalen Karzinomen beschrieben Vauhkonen et al. (2004) MSI in zwei Drittel der Fälle. Hoff-Olsen et al. (1998) fanden STR-Instabilität in 19 % kolorektaler Karzinome. Pai et al. (2002) zeigten eine MSI in 17 % bei oralen Tumoren. Andere Autoren fanden deutlich weniger bzw. keine Veränderungen: Bei Schwark et al. (2004) wies nur eines von 18 Adenokarzinomen des Pankreas STR-Veränderungen auf, und Orlandi et al. (2002) fanden keine Alterationen der STRs in Brustkarzinomen.

Vier verschiedene Arten der Veränderung wurden in dieser Studie für die STRs definiert: der partielle Verlust eines Allels, der komplette Verlust eines Allels, der Zugewinn eines Allels und eine Allelverschiebung. In der forensischen Routine haben zwei dieser Alterationen eine wesentlich größere Bedeutung als die beiden anderen: der komplette Allelverlust und die Allelverschiebung, d.h. ein Allel aus dem Normalgewebe wird im Tumorgewebe durch ein anderes ersetzt. In einer Abstammungsbegutachtung stellt sich nur die Frage, ob der Putativvater das nicht von der Mutter stammende Allel dem Kind vererbt haben könnte. Finden sich im Tumorgewebe des Putativvaters jetzt drei Allele (Allelzugewinn) und darunter ist das fragliche Allel, liegt hier kein Ausschluss vor. Auch wenn das fragliche Allel im Tumorgewebe des Putativvaters nur partiell verlorengegangen ist, wird kein Ausschluss festgestellt. Erscheint der STR allerdings als homozygot, weil das fragliche Allel im Tumorgewebe gar nicht mehr

amplifizierbar ist, wird dies als Ausschluss gewertet. Finden sich in einer definierten Putativvater-Kind Begutachtung aus Tumorgewebe einer oder mehrere solcher Ausschlüsse, bei denen der Putativvater als homozygot erscheint, sollte also immer an ein LOH-Ereignis im Tumor gedacht werden. Bei einer Identitätsüberprüfung fallen Allelverluste etwas weniger ins Gewicht. Wenn in einem konkreten Fall in einem oder mehreren STRs im Tumorgewebe eins der beiden Allele homozygot auftritt, das auch in der zu identifizierenden Leiche gefunden wurde, wird eine Identität nicht unbedingt sofort ausgeschlossen. Bei den HNSCC dieser Studie waren D21S11 und VWA, D18S51, D5S818 besonders häufig vom kompletten Verlust betroffen. Bei gastrointestinalen Tumoren fanden Vauhkonen et al. (2004) in D18S51 27 % LOH. Für D21S11 wurde, verglichen mit anderen STRs, wie D3S1358, VWA, FGA, D8S1179, D18S51, TH01, D2S1338, D16S539 und D19S433, die höchste Rate von Alleldropouts in HNSCCs gezeigt (Piccinic et al., 1998). In Kolonkarzinomen beschrieben Hoff-Olsen (1998) eine häufige Alteration von VWA. Von allen analysierten STRs besitzt D18S51 die längsten Allele (273-341 bp). Aus Paraffingewebe isolierte DNA ist meist degradiert, d.h. es können nur 300-600bp lange Fragmente gewonnen werden (je nach Art und Weise der Formalaldehydfixierung). Bei STRs mit besonders langen Allelen wie D18S51 kann so leicht ein Allelverlust auftreten, weil keines der isolierten DNA-Fragmente ein vollständiges, amplifizierbares Allel enthält.

Die zweite in der forensischen Routine relevante Veränderung, die Allelverschiebung, macht eine Abstammungsbegutachtung wesentlich schwieriger. Findet man im Vergleich zwischen dem Tumorgewebe des Putativvaters und den nicht-mütterlichen Allelen des Kindes in einem oder mehreren STRs keinerlei Übereinstimmung, so muss dies als klare Ausschlusskonstellation gewertet werden. Der einzige mögliche Hinweis auf DNA-Veränderungen im Tumor als Grund dieser Ausschlusskonstellation kann dann darin bestehen, dass das väterliche Allel im Tumorgewebe immer nur um einen Repeat von dem nicht-mütterlichen Allel des Kindes abweicht. In den HNSCC dieser Studie fand sich eine Allelverschiebung in 9%. Der Unterschied zwischen dem im Tumorgewebe neu entstandenen Allel und dem Allel, von dem es wahrscheinlich abstammt, war in 90% der betroffenen Karzinome nur vier Basenpaare (ein Repeat). Nur in einem Tumor konnte eine Verschiebung um

zwei Repeats in FGA gefunden werden. Diese Werte stehen in Einklang mit den Literaturdaten für kolorektale Karzinome (Hoff-Olsen et al. 1998; Vauhkonen et al., 2004).

Die STRs, die in dieser Studie untersucht wurden, zeigten große Unterschiede in der Zahl und Art und Weise der Veränderungen. Häufig betroffen waren D3S1358 und D18S51, sowie D21S11 und FGA, die in der Literatur ebenfalls als oft alteriert beschrieben werden. Vauhkonen et al. (2004) fanden in Magentumoren eine hohe Rate an Veränderungen in FGA und VWA, Pai et al. (2002) in FGA und Hoff-Olsen et al. (1998) in VWA. Diese häufig alterierten STRs haben eine hohe Anzahl von Allelen und/oder besitzen lange repetitive Regionen mit komplexen Sequenzmotiven. Ein Allelzugewinn bzw. eine Allelverschiebung im Tumorgewebe lässt sich wahrscheinlich über denselben Mechanismus erklären, den man auch für Mutationen zwischen Eltern und Kindern heranzieht. Dabei handelt es sich nach bisherigen Erkenntnissen um ein sogenanntes „slippage“ Ereignis des DNA-Replikationskomplexes während der DNA Synthese (Wolff et al 1989; Sturzeneker et al., 2000), was auch durch aktuelle Ergebnisse von Klitschar et al. (2004) unterstützt wird. Diese schlechte Funktion des DNA Mismatch-repair-systems führt so zu einer Akkumulation von slippage-assoziierten Mutationen des MSI-H-Phänotyps (de la Chapelle, 2003; Laurent-Puig et al., 1999). Wenn die Mutationsereignisse im Tumorgewebe und zwischen Eltern und Kindern nach demselben Mechanismus verlaufen, sollten auch die Mutationshäufigkeiten der einzelnen STRs ähnlich sein. Brinkmann et al. (1998) zeigten in folgenden STRs Mutationsraten zwischen Eltern und Kindern größer als 0,1 %: FGA mit 0,4 %, VWA mit 0,199 % und D21S11 mit 0,18 %, also in den auch im Tumorgewebe häufig von Veränderungen betroffenen STRs. Im Gegensatz dazu scheinen Marker mit homogenen Repeatabschnitten und Repeatzahlen kleiner zehn wie z.B. in D8S1179, D5S818, D13S317 und D7S820 eher selten zu mutieren. Dies könnte die geringere Rate an Veränderungen in diesen STRs im Tumorgewebe erklären.

Insgesamt muss die hohe Rate an STR-Veränderungen als Hinweis auf kerngenomische Instabilität in den HNSCC gedeutet werden. Die hier gefundene Korrelation zwischen Aberrationen in den Tetranukleotidrepeats und in den

Dinukleotidrepeats macht deutlich, dass insbesondere Tumorarten mit gesichertem MSI-H Status wie Magen-, Kolon- und Endometriumtumore in einem nicht zu unterschätzendem Anteil Allelverschiebungen in STRs aufweisen könnten. Gewebe von diesen Tumoren sollte, ebenso wie von HNSCC, mit besonderer Vorsicht bei Abstammungsuntersuchungen eingesetzt werden. Gewebe von Tumoren, bei denen keine oder eine nur sehr geringe Mikrosatelliteninstabilität nachgewiesen wurde, eignen sich eher für Abstammungsbegutachtungen und Identitätsüberprüfungen. Das zeigt sich am Beispiel der Melanome, die weder zur Mikrosatelliteninstabilität neigen (Richetta et al. 2001; Talwalkar et al 1998, Poetsch et al. 2002), noch Allelzugewinne oder -verschiebungen in STRs aufwiesen (Poetsch et al., 2004). Allerdings sollten auch Tumorentitäten, bei denen bisher keine hohen MSI beschrieben wurden, zurückhaltend zu Abstammungsgutachten herangezogen werden, da auch hier Veränderungen in STRs nicht ausgeschlossen sind.

Die höheren Raten von STR Veränderungen bei den Metastasen dieser Studie und die auch in der Literatur immer wieder beschriebene höhere genetische Instabilität von Lymphknoten- und Gewebemetastasen (Usmani 1993) geben einen deutlichen Hinweis darauf, dass Metastasen in der forensischen Routine nicht verwendet werden sollten.

4.3 Ausblick

Vor dem Hintergrund der hier gefundenen allgemeinen Instabilität des mitochondrialen Genoms erscheinen weitere Untersuchungen der mtDNA im Hinblick auf spezifische, die Tumorgenese beeinflussende Faktoren weniger lohnenswert.

Die deutlichen Unterschiede in den Primärtumoren und Metastasen zeigen, dass sie in künftigen Studien unabhängig voneinander analysiert werden sollten. Tumor-progressive Faktoren konnten nicht eindeutig identifiziert werden, eine weitere Suche erscheint jedoch ebenso sinnvoll wie die Analyse weiterer Mononukleotidmarker, um bessere Aussagen zur MSI treffen zu können.

5 Zusammenfassung

In dieser Studie wurden 67 Plattenepithelkarzinome der Kopf- und Halsregion (head and neck squamous cell carcinoma - HNSCC) (davon 51 mit dem Grading 2, 16 mit dem Grading 3) und 40 Metastasen mit Single- und Multiplex-PCR und Sequenzierung auf das Auftreten der mitochondrialen $\Delta 4977$ Deletion sowie Alterationen in vier Regionen der mitochondrialen DNA, auf Mikrosatelliteninstabilität in drei Mono- und fünf Dinukleotidmarkern, sowie auf Veränderungen in neun STRs des nukleären Genoms hin untersucht und deren statistische Korrelation untereinander geprüft.

Es fanden sich in 35 % aller Tumore eine $\Delta 4977$ Deletion, in 40 % mitochondriale Mikrosatelliteninstabilität (mtMSI) und in 19 % aller Tumore Punktmutationen der mitochondrialen DNA. Es zeigte sich eine geringe Beteiligung spezifischer Aberrationen der mtDNA an der Pathogenese von HNSCCs, vielmehr war eine generelle Instabilität des mitochondrialen Genoms in den Tumoren zu beobachten. Frameshiftmutationen in Mononukleotidrepeats des Kerngenoms wurden in 19 % nachgewiesen, Aberrationen in nukleären Dinukleotidrepeats in 63 % und Veränderungen in Tetranukleotidrepeats (STR - short tandem repeats) des Kerngenoms in 43 % aller Tumore. Besonders in den Dinukleotidrepeats und den STRs waren die Metastasen deutlich häufiger von Aberrationen betroffen.

In den STRs des Kerngenoms konnten in 16 % aller Tumore ein vollständiger Allelverlust und in 9 % eine Allelverschiebung nachgewiesen werden. In Abstammungsgutachten könnte dies zu falschen Resultaten führen. Ein kompletter Allelverlust bewirkt eine unechte Homozygotie und kann genauso wie eine Allelverschiebung zu einem falschen Ausschluss führen. Für Metastasen wurde eine höhere Rate von Allelverlusten (25 %) und Allelverschiebungen (18 %) gefunden als in den Primärtumoren, so dass die Gefahr eines falschen Ausschlusses hier noch größer ist.

Die Ergebnisse dieser Studie machen deutlich, dass Gewebe aus HNSCCs sich kaum für Abstammungsbegutachtungen oder Identifikationen eignet.

6 Literatur

- Abnet, C.C.; Huppi, K.; Carrera, A.; Armistead, D.;McKenney, K.; Nan Hu, K.; Tang, Z.-Z.; Taylor, P.R.; Dawsey, S.M.: Control region mutations and the „common deletion“ are frequent in the mitochondrial DNA of patients with the esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 4(1) (2004) 30.
- Adelmann, R.; Saul, R.L.; Ames, B.N.: Oxidative damage to DNA: relation to species metabolic rate and life span. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 2706-2708.
- Allen, J.A.; Coombs, M.M.: Covalent binding of polycyclic aromatic compounds to mitochondrial and nuclear DNA. *Nature* 287 (1980) 244-245.
- Allen, R.C.; Budowle, B.: Polymerase chain reaction amplification products separated by rehydratable polyacrylamide gels and stained with silver. *Bio Techniques* 7 (1989) 736-744.
- Ames, B.N.; Shigenaga, M.K.; Hagen, T.M.: Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 7915-7922.
- Anderson, S.; Bankier, A.T.; Barrell, B.G.; de Bruijn, M.H.L.;Coulson, A.R.; Drouin, J.; Eperon, I.C.; Nierlich, D.P.; Roe, B.A.; Sanger, F.; Schreier, P.H.; Smith, A.J.H.; Staden, R.; Young, I.G.: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290 (1981) 457-465.
- Ansorge, W.: Fast and sensitive detection of protein and DNA bands by treatment with potassium permanganate. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 11 (1985) 13-20.
- Attardi, G.; Schatz, G.: Biogenesis of mitochondria. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 4 (1988) 289-333.
- Bacher, J.W.; Flanagan, L.A.; Smalley, R.L.; Nassif, N.A.; Burgart, L.J.; Halberg, R.B.; Megid, W.M.; Thibodeau, S.N.: Development of a fluorescent multiplex assay for detection of MSI-High tumors. *Dis. Markers* 20 (2004) 237-250.
- Backer, J.M.; Weinstein, I.B.: Mitochondrial DNA is a major cellular target for a dihydrodiol-epoxide derivative of benzo[a]pyrene. *Science* 209 (1980) 297-299.

- Barber, M.D.; Parkin, B.H.: Sequence analysis and allelic designation fo the two short tandem repeat loci D18S51 and D8S1179. *Int. J. Legal Med.* 109 (1996) 62-65.
- Bendall, K.E.; Macaulay, V.A.; Baker, J.R.; Sykes, B.C.: Heteroplasmic point mutation in the human mtDNA control region. *Am. J. Hum. Genet.* 59 (1996) 1276-1287.
- Bianchi, N.O.; Bianchi, M.S.; Richard, S.M.: Mtiochondrial genome instability in human cancers. *Mut. Res.* 488 (2001) 9-23.
- Boland, R.C.; Thibodeau, S.N.; Hamilton, S.R.; Sidransky, D.; Eskleman, J.R.; Burt, R.W.; Meltzer, S.J.; Rodríguez-Vigas, M.A.; Fodde, R.; Ranzani, N.; Srivastava, S.A.: National Cancer Institute Workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 58 (1998) 5248-5257.
- Brinkmann, B.; Klintschar, M.; Neuhuber, F.; Hühne, J.; Rolf, B.: Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am. J. Hum. Genet.* 62 (1998) 1408-1415.
- Bronner, C.E.; Baker, S.M.; Morrison, P.T.; Warren, G.; Smith, L.G.; Lescoe, M.K.; Kane, M.; Earabino, C.; Lipford, J.; Lindblom, A.; et al.: Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis cancer. *Nature* 368 (1994) 258-261.
- Brown, M.D.; Wallace, D.C.: Molecular basis of mitochondrial DNA disease. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26 (1994) 273-289.
- Budowle, B.; Chakraborty, R.; Giusti, A.M.; Eisenberg, A.J.; Allen, R.C.: Analysis of the variable number of the tandem repeat locus D1S80 by the polymerase chain reaction followed by high resolution polyacrylamide gel electrophoresis. *Am. J. Hum. Genet.* 48 (1991) 137-144.
- Carey, T.E.; Van Dyke, D.L.; Worsham, M.J.; Bradford, C.R.; Babu, V.R.; Schwartz, D.R.; Hsu, S.; Baker, S.R.: Characterization of human laryngeal primary and metastatic squamous cell carcinoma cell lines UM-SCC-17A and UM-SCC-17B. *Cancer Res.* 49 (1989) 6098-6107.

- Catasus, L.; Xavier, M.G.; Machin, P.; Zannoni, G.F.; Scambia, G.; Benedetti-Panici, P.; Prat, J.: Frameshift mutation at coding mononucleotide repeat microsatellites in endometrial carcinoma with microsatellite instability. *Cancer* 88 (10) (2000) 2290-2297.
- Cheng, S.; Fockler, C.; Barnes, W.M.; Higuchi, R.: Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 5695-5699.
- Chung, Y.J.; Park, S.W.; Song, J.M.; Lee, K.Y.; Seo, E.J.; Choi, S.W.; Rhyu, M.G.: Evidence of genetic progression in human gastric carcinomas with microsatellite instability. *Oncogene* 15 (1997) 1719-1726.
- Clayton, D.A.; Vinograd, J.: Circular dimer and catenate forms of mitochondrial DNA in human leukaemic leucocytes. *Nature* 216 (1967) 652-657.
- Coller, H.A.; Khrapko, K.; Bodyak, N.D.; Nekhaeva, E.; Herrero-Jimenez, P.; Thilly, W.G.: High frequency of homoplasmic mitochondrial DNA mutations in human tumors can be explained without selection. *Nat. Genet.* 28 (2001) 147-150.
- De la Chapelle, A.: Microsatellite instability. *N. Engl. J. Med.* 349 (2003) 209-210.
- Decker, J.; Goldstein, J.C.: Risk factors in head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.* 306 (1982) 1151-1155.
- Dracopoli, N.C.; Harnett, P.; Bale, S.J.; Stanger, B.Z.; Tucker, M.A.; Housman, D.E.; Keffort, R.F.: Loss of alleles from the distal short arm of chromosome 1 occurs late in melanoma tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 4614-4618.
- Ebeling, W.; Hennrich, N.; Klockow, M.; Metz, H.; Orth, H.D.; Lang, H.: Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *Eur. J. Biochem.* 47 (1974) 91-97.
- Ellington, A.; Pollard, J.D.Jr. in: Purification of oligonucleotides using denaturing polyacrylamid gel electrophoresis. *Current Protocols in Molecular Biology.* (1998) John Wiley & Sons, New York.
- Falk, R.T.; Pickle, L.W.; Brown, L.M.; Mason T.J.; Buffler, P.A.; Fraumeni, J.F. Jr.: Effect of smoking and alcohol consumption on laryngeal cancer risk in coastal Texas. *Cancer Res.* 49 (1989) 4024-4029.

- Fishel, R.; Lescoe, M.K.; Rao, M.R.; Copeland, N.G.; Jenkins, N.A.; Garber, J.: The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75 (1993) 1027-1038. Published erratum: *Cell* 77 (1994) 167.
- Fujiwara, T.; Stolker, J.M.; Watanabe, T.; Rashid, A.; Longo, P.; Eshleman, J.R.; Booker, S.; Lynch, H.T.; Jass, J.R.; Green, J.S.; Kim, H.; Jen, J.; Vogelstein, B.; Hamilton, S.R.: Accumulated clonal genetic alterations in familial and sporadic colorectal carcinomas with widespread instability in microsatellite sequences. *Am. J. Pathol.* 153 (1998) 1063-1078.
- Ghivizzani, S.C.; Madsen, C.S.; Nelen, M.R.; Ammini, C.V.; Hauswirth, W.W.: An organello footprint analysis of human mitochondrial DNA: Human mitochondrial transcription factor A interactions at the origin of replication. *Mol. Cell. Bio.* 14 (1994) 7717-7730.
- Gill, P.; Urquart, A.; Millican, E.; Oldroyd, N.; Watson, S.; Sparkes, R.; Kimpton, C.P.: A new method of STR interpretation using inferential logic – development of a criminal intelligence database. *Int. J. Legal Med.* 109 (1996) 14-22.
- Gillison, M.L.: Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. *Senin. Oncol.* 31 (2004) 744-754.
- Greenberg, B.D.; Newbold, J.E.; Sugino, A.: Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA. *Gene* 21 (1983) 33-49.
- Habano, W.; Nakamura, S.; Sugai, T.: Microsatellite instability in the mitochondrial DNA of colorectal carcinomas: evidence for mismatch repair systems in mitochondrial genome. *Oncogene* 17 (1998) 1931-1937.
- Habano, W.; Sugai, T.; Yoshida, T.; Nakamura, S.: Mitochondrial gene mutation, but not large scale deletion, is a feature of colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Int. J. Cancer* 83 (1999) 625-629.
- Habano, W.; Sugai, T.; Nakamura, S-I.; Uesugi, N.; Yoshida, T.; Sasou, S.: Microsatellite instability and mutation of mitochondrial and nuclear DNA in gastric carcinoma. *Gastroenterology* 118 (2000) 835-841.

- Hafkamp, H.C.; Manni, J.J.; Speel, E.J.: Role of human papillomavirus in the development of head and neck squamous cell carcinomas. *Acta Otolaryngol.* 124 (2004) 520-526.
- Han, Y.C.; Kong, W.J.; Zhang, S.; Wang, Y.J.; Wang, Y.; Chen, X.: Mutation of mitochondrial DNA 4977 bp deletion in laryngeal squamous cell cancer. *Ai Zheng.* 11 (2004) 1297-301.
- Hauswirth, W.W.; Clayton, D.A.: Length heterogeneity of a conserved displacement-loop sequence in human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.* 13 (1985) 8093-8104.
- Herman, J.G.; Umar, A.; Polyak, K.; Graff, J.R.; Ahuja, N.; Issa, J.P.; Markowitz, S.; Willson, J.K.; Hamilton, S.R.; Kinzler, K.W.; Kane, M.F.; Kolodner, R.D.; Vogelstein, B.; Kunkel, T.A.; Baylin, S.B.: Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 6870-6875.
- Hetts, S.W.: To die or not to die. An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 279 (1998) 300-307.
- Hiyama, T.; Tanaka, S.; Shima, H.; Kose, K.; Tuncel, H.; Ito, M.; Kitadai, Y.; Sumii, M.; Yoshihara, M.; Shimamoto, F.; Haruma, K.; Chayama, K.: Somatic mutation in mitochondrial DNA and nuclear microsatellite instability in gastric cancer. *Oncol. Rep.* 10 (2003) 1837-1841.
- Hoff-Olsen, P.; Meling, G.I.; Allison, B.: Variation in mutation rate and direction between tetra-nucleotide STR loci in human colorectal carcinomas. *Ann. Hum. Genet.* 62 (1998) 1-7.
- Hung, S.C.; Mathies, R.A.; Glazer, A.N.: Optimization of spectroscopic and electrophoretic properties of energy transfer primers. *Anal. Biochem.* 252 (1997) 78-88.
- Ionov, Y.; Peinado, M.A.; Malkhosyan, S.; Shibata, D.; Perucho, M.: Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363 (1993) 558-561.
- Jackson, A.L.; Chen, R.; Loeb, L.A.: Induction of microsatellite instability by oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 12468-12473.

- Jazin, E.E.; Cavelier, L.; Eriksson, I.; Orelund, L.; Gyllensten, U.: Human brain contains high levels of heteroplasmy in the noncoding regions of mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 12382-12387.
- Jiricny, J.: Eukaryotic mismatch repair: an update. *Mutat. Res.* 409 (1998) 107-121.
- Ju, J.Y.; Ruan, C.C.; Fuller, C.W.; Glazer, A.N.; Mathies, R.A.: Fluorescence energy-transfer dye-labeled primers for DNA-sequencing and analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 4347-4351.
- Kane, M.F.; Loda, M.; Gaida, G.M.; Lipman, J.; Mishra, R.; Goldman, H.; Jessup, J.M.; Kolodner, R.: Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res.* 57 (1997) 808-811.
- Kinzler, K.W.; Vogelstein, B.: Lesions from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87 (1996) 159-170.
- Klintschar, M.; Dauber, E.M.; Ricci, U.; Cerri, N.; Immel, U.D.; Kleiber, M.; Mayr, W.R.: Haplotype studies support slippage as the mechanism of germline mutations in short tandem repeats. *Electrophoresis* 25 (2004) 3344-3348.
- Kluck, R.M.; Bossy-Wetzel, E.; Green, D.R.; Newmeyer, D.D.: The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275 (1997) 1132-1136.
- Koreth, J.; O'Leary, J.J.; O'D McGee, J.: Microsatellites and PCR genomic analysis. *J. Pathol.* 178 (1996) 239-248.
- Kroemer, G.; Zamzami, N.; Susin, S.A.: Mitochondrial control of apoptosis. *Imunol. Today* 18 (1997) 44-51.
- Kunkel, T.A.; Loeb, L.A.: Fidelity of mammalian DNA polymerase. *Science* 213 (1981) 765-767.
- Laurent-Puig, P.; Blons, H.; Cugnenc, P.H.: Sequence of molecular genetic events in colorectal tumorigenesis. *Eur. J. Cancer Prev. Suppl.* 1 (1999) 39-47.
- LeDoux, S.P.; Wilson, G.L.: Base excision repair of mitochondrial DNA damage in mammalian cells. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 68 (2001) 73-84.

- Lee, H.-C.; Pang, C.-Y.; Hsu, H.-S.; Wei, Y.-H.: Differential accumulations of 4977 bp deletion in mitochondrial DNA of various tissues in human aging. *Bioch. Biophys. Acta* 1226 (1994) 37-43.
- Lee, L.G.; Connell, C.R.; Woo, S.K.; Cheng, R.D.; McArdle, B.F.; Fuller, C.W.; Halloran, N.D.; Wilson, R.K.: DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7 DNA polymerase: effect of dyes and NTPs on incorporation of dye-terminators and probability analysis of termination fragments. *Nucleic Acid Res.* 20 (1992) 2471-2483.
- Leist, M.; Singel, B.; Castoldi, A.F.; Kühnle, S.; Nicotera, P.: Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J. Exp. Med.* 185 (1997) 1481-1486.
- Lengauer, C.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B.: Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 386 (1997) 623-627.
- Lengauer, C.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B.: Genetic instability in human cancers. *Nature* 396 (1998) 643-649.
- Lightowers, R.N.; Chinnery, P.F.; Turnbull, D.M.; Howell, N.: Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. *Trends Genet.* 13 (1997) 450-455.
- Ling, X.L.; Fang, D.C.; Wang, R.Q.; Yang, S.M.; Fang, L.: Mitochondrial microsatellite instability in gastric cancer and precancerous lesions. *World J. Gastroenterol.* 10 (2004) 800-803.
- Liu, B.; Nicolaides, N.C.; Markowitz, S.; Willson, J.K.; Parsons, R.E.; Jen, J.; Papadopolous, N.; Peltomaki, P.; de la Chapelle, A.; Hamilton, S.R.; et al.: Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancer with microsatellite instability. *Nat. Genet.* 9 (1995) 48-55.
- Liu, V.W.S.; Yang, H.J.; Wang, Y.; Tsang, P.C.K.; Cheung, A.N.Y.; Chiu, P.M.; Ng, T.Y.; Wong, L.C.; Nagley, P.; Ngan, H.Y.S.: High frequency of mitochondrial genome instability in human endometrial carcinomas. *Brit. J. Cancer* 89 (2003) 697-701.

- Liu, X.; Kim, C.N.; Yang, J.; Jemmerson, R.; Wang, X.: Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86 (1996) 147-157.
- Longley, M.J.; Nguyen, D.; Kunkel, T.A.; Copeland, W.C.: The fidelity of human DNA polymerase gamma with and without exonucleolytic proofreading and the p55 accessory subunit. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 38555-38562.
- Mambo, E.; Gao, X.; Cohen, Y.; Guo, Z.; Talalay, P.; Sidransky, D.: Electrophile and oxidant damage of mitochondrial DNA leading to rapid evolution of homoplasmic mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100 (4) (2003) 1838-1843.
- Marchington, D.R.; Hartshorne, G.M.; Barlow, D.; Poulton, J.: Homopolymeric tract heteroplasmy in mtDNA from tissues and single oocytes: support for a genetic bottleneck. *Am. J. Hum. Genet.* 60 (1997) 408-416.
- Maxam, A.M.; Gilbert, W.: A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74 (1977) 560-564.
- Maxam, A.M.; Gilbert, W.: Sequencing end-labeled DNA with base specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* 65 (1980) 499-560.
- Maximo, V.; Soares, P.; Seruca, R.; Sobrinho-Simoes, M.: Comments on: mutations in mitochondrial control region in gastric tumors of Japanese patients, Tamura, et al. *Eur. J. Cancer* 35 (1999) 316-319.
- Maximo, V.; Soares, P.; Seruca, T.; Rocha, A.S.; Castro, P.; Sobrinho-Simoes, M.: Microsatellite instability, mitochondrial DNA large deletions, and mitochondrial DNA mutations in gastric carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 32 (2001) 136-143.
- Maximo, V.; Soares, P.; Lima, J.; Cameselle-Teijeiro, J.; Sobrinho-Simoes, M.: Mitochondrial DNA somatic mutations (point mutations and large deletions) and mitochondrial DNA variants in human thyroid pathology: a study with emphasis on Hürthle cell tumors. *Am. J. Path.* 160 (2002) 1857-1865.
- Merril, C.R.; Dunau, M.L.; Goldmann, D.: A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 110 (1981) 201-207.

- Mirabella, M.; Giovanni, S.D.; Silvestri, G.; Tonali, P.; Servidei, S.: Apoptosis in mitochondrial DNA mutations: a potential pathogenic mechanism. *Brain* 123 (2000) 93-104.
- MITOMAP, <http://www.mitomap.org>
- Mohamed, S.A.; Wesch, D.; Blumenthal, A.; Bruse, P.; Windler, K.; Ernst, M.; Kabelitz, D.; Oehmichen, M.; Meissner, C.: Detection of the 4977 bp deletion of mitochondrial DNA in different human blood cells. *Exp. Gerontol.* 39 (2004) 181-188.
- Mullis, K.B.; Faloona, F.A.; Scharf, S.J.; Saiki, R.K.; Horn, G.; Ehrlich, H.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155 (1987) 335-350.
- Naidoo, R.; Tarin M.; Chetty, R.: A comparative microsatellite analysis of colorectal cancer in patients <35 years and >50 years of age. *Am. J. Gastroenterol.* 95 (2000) 3266-3275.
- Nam, J.; McLaughlin, J.K.; Blot, W.J.: Cigarette smoking, alcohol, and nasopharyngeal carcinoma: a case-control study among U.S. whites. *J. Natl. Cancer Inst.* 84 (1992) 619-622.
- Nowell, P.C.; Hungerford, D.A.: A minute chromosome in human chronic granulocytic □multiplex. *Science* 132 (1960) 1497.
- Ogasawara, S., Maesawa, C.; Tamura, G.; Satodate, R.: Frequent microsatellite alterations on chromosome 3p in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 55 (1995) 891-894
- Orlandi, F.; Barucca, A.; Biangini, G.; Pasqui, G.; Mottolese, M.; Botti, C.; Bracalenti, C.; Cardarelli, M.A.; Concetti, A.; Venanzi, F.M.: Molecular stability of DNA typing short tandem repeats in the mammary tree of patients with breast cancer. *Diagn. Mol. Pathol.* 11 (2002) 41-46.
- Pai, C.Y.; Hsieh, L.L.; Tsai, C.W.; Chiou, F.S.; Chou, S.L.; Hsu, B.D.: Allelic alterations at the STR markers in the buccal tissue cells of oral cancer patients and the oral epithelial cells of healthy betel squid-chewers- an evaluation of forensic applicability. *Forensic Sci. Int.* 129 (2002) 158-167.

- Penta, J.S.; Johnson, F.M.; Wachsman, J.T.; Copeland, W.C.: Mitochondrial DNA in human malignancy. *Mut. Res.* 488 (2001) 119-133.
- Pfeiffer, H.; Brinkmann, B.; Hühne, J.; Rolf, B.; Moris, A.A.; Steighner, R.; Holland, M.M.; Foster, P.: Expanding the forensic German mitochondrial DNA control region database: genetic diversity as a function of sample size and microgeography. *Int. J. Legal Med.* 112 (1999) 291-298.
- Piccinic, S.; Gasparotto, D.; Vukosavijevic, T.; Barzan, L.; Sufaro, S.; Maestro, R.; Boiocchi, M.: Microsatellite instability in squamous cell carcinomas of the head and neck related to field cancerization phenomena. *Br. J. Cancer* 78 (1998) 1147-1151.
- Pinz, K.G.; Shibutani, S.; Bodenhausen, D.F.: Action of mitochondrial DNA polymerase γ at sites of base loss or oxidative damage. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 9202-9206.
- Poetsch, M.; Woenckhaus; Dittberner, T.; Pambor, M.; Lorenz, G.; Herrmann, F.H.: Differences in chromosomal aberrations between nodular and superficial spreading malignant melanoma detected by interphase cytogenetics. *Lab. Invest.* 78 (1998) 883-888.
- Poetsch, M.; Woenckhaus; Dittberner, T.; Pambor, M.; Lorenz, G.; Herrmann, F.H.: Significance of the small subtelomeric area of chromosome 1 (1p36.3) in the progression of malignant melanoma: FISH deletion screening with YAC DNA probes. *Virch. Archiv* 435 (1999) 105-111.
- Poetsch, M.; Dittberner, T.; Woenckhaus, C.: *PTEN/MMAC1* in malignant melanoma and its importance for tumor progression. *Cancer Genet. Cytogenet.* 125 (2001) 21-26.
- Poetsch, M.; Dittberner, T.; Woenckhaus, C.: Frameshift mutations of RIZ, but no point mutations in RIZ1 exons in malignant melanoma with deletions in 1p36. *Oncogene*, 21 (2002) 3038-3042.
- Poetsch, M.; Petersmann, A.; Woenckhaus, C.; Protzel, C.; Dittberner, T.; Lignitz, E.; Kleist, B.: Evaluation of allelic loss in short tandem repeats in different kinds of solid tumors – possible pitfalls in forensic casework. *Forensic. Sci. Int.* 145 (2004) 1-6.

- Polyak, K.; Li, Y.; Zhu, H.; Lengauer, C.; Willson, J.K.; Markowitz, S.D.; Trush, M.A.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B.: Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumors. *Nat. Genet.* 20 (1998) 291-293.
- Poulton, J.: Mitochondrial DNA and genetic disease. *Bio-Essays* 14 (1992) 763-768.
- Prober, J.M.; Trainor, G.L.; Dam, R.J.; Hobbs, F.W.; Robertson, C.W.; Zagursky, R.J.; Cocuzza, A.J.; Jensen, M.A.; Baumeister, K.: A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 238 (1987) 336-341.
- Richard, S.M.; Bailliet, G.; Paez, G.L.; Bianchi, M.S.; Peltomaki, P.; Bianchi, N. O.: Nuclear and mitochondrial genome instability in human breast cancer. *Cancer Res.* 60 (2000) 4231-4237.
- Richetta, A.; Ottini, L.; Falchetti, M.; Innocenzi, D.; Bottoni, U.; Faiola, R.; Mariani-Costantini, R.; Calvieri, S.: Instability at sequence repeats in melanocytic tumours. *Melanoma Res.* 11 (2001) 283-289.
- Richter, C.; Gogvadze, V.; Laffranchi, R.; Schlapbach, R.; Schweizer, M.; Suter, M.; Walter, P.; Yaffee, M.: Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1271 (1995) 67-74.
- Richter, C.; Schweizer, M.; Cossarizza, A.; Franceschi, C.: Hypothesis. Control of apoptosis by the cellular ATP level. *FEBS Lett.* 378 (1996) 107-110.
- Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B.; Erlich, H.A.: Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (1988) 487-491.
- Sambrook, J.; Russel, D.W.: *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, (2001).
- Sanchez-Cespedes, M.; Parrella, P.; Nomoto, S.; Cohen, D.; Xiao, Y.; Esteller, M.; Jeronimo, C.; Jordan, R.C.K.; Nicol, T.; Koch, W.M.; Scheonberg, M.; Mazarrelli, P.; Fazio, V.M.; Sidransky, D.: Identification of a mononucleotide repeat as a major target for mitochondrial DNA alterations in human tumors. *Cancer Res.* 61 (2001) 7015-7019.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R.: DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 5463-5467.

- Sasiadek, M.; Stembalska-Kozłowska, A.; Smigiel, R.; Krecicki, T.; Blin, N.; Mirghomizadeh, F.: Microsatellite and chromosome instability in squamous cell laryngeal carcinoma. *Int. J. Oncol.* 19 (2001) 405-405.
- Satoh, M.; Kuroiwa, T.: Organisation of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Exp. Cell Res.* 196 (1991)137-140.
- Schwark, T.; Bachmann, C.; von Wurmb-Schwark, N.: STR typing of ductal adenocarcinomas of the pancreas and healthy control tissue in 18 individuals. *Leg. Med. (Tokyo)*. 6 (2004) 170-173.
- Shanmugaratnam K.: International Histological Classification of Tumours. Histological Typing of Tumours of the Upper Respiratory Tract and Ear. 2nd edn. Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1991).
- Shao, J.Y.; Gao, H.Y.; Li, Y.H.; Zhang, Y.; Lu, Y.Y.; Zeng, Y.X.: Quantitative detection of common deletion of mitochondrial DNA in hepatocellular carcinoma and hepatocellular nodular hyperplasia. *World J. Gastroenterol.* 10 (2004) 1560-1564.
- Shay, J.W.; Werbin, H.: Are mitochondrial DNA mutations involved in the carcinogenic process? *Mutat. Res.* 186 (1987) 149-160.
- Shenkar, R; Navidi, W.; Tavare, S.; Chomyn, A.; Attardi, G.; Cortopassi, G.; Arnheim, N.: The mutation rate of the human mtDNA 4977 deletion. *Am. J. Hum. Genet.* 59 (1996) 772-780.
- Shitoh, K.; Konishi, F.; Mascbuchi, S.; Senba, S.; Tsukamoto, T.; Kanazawaka, K.: Important microsatellite markers in the investigation of replication error (RER) in colorectal carcinomas. *Jap. J. Clin. Oncol.* (1998) 538-541.
- Shoffner, J.M.; Lott, M.T.; Voljavec, A.S.; Soueidan, S.A.; Costigan, D.A.; Wallace, D.C.: Spontaneous Deafness-Sayre/ chronic external ophtahmoplegie plus syndrome associated with a mitochondrial DNA deletion: a slip-replication model and metabolic therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 7952-7956.
- Shoffner, J.M.; Wallace, D.C.: Mitochondrial genetic: principles and practice. *Am.J. Hum. Genet.* 51 (1992) 1179-1186.

- Slater, A.F.; Nobel, C.S.; Orrenius, S.: The role of intracellular oxidants in apoptosis. *Biochem. Biophys. Acta* 1271 (1995) 59-62.
- Smith, L.M.; Sanders, J.Z.; Kaiser, R.J.; Hughes, P.; Dodd, D.; Connell, C.R.; Heiner, C.; Kent, S.B.; Hood, L.E.: Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321 (1986) 674-679.
- Smith, S.A.; Easton, D.F.; Evans, D.G.; Ponder, B.A.: Allele losses in the region 17q12-21 in familial breast and ovarian cancer involve the wild-type chromosome. *Nat. Genet.* 2 (1992) 128-131.
- Sturzeneker, R.; Bevilacqua, R.A.; Haddad, L.A.; Simpson, A.J.; Pena, S.D.: Microsatellite instability in tumors as a model to study the process of microsatellite mutations. *Hum. Mol. Genet.* 9 (2000) 347-352.
- Talwalkar, V.R.; Scheiner, M.; Hedges, L.K.; Butler, M.G.; Schwartz, H.S.: Microsatellite instability in malignant melanoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 104 (1998) 111-114.
- Tan, D.J.; Chang, J.; Chen, W.L.; Agress, L.J.; Yeh, K.T.; Wang, B.; Wong, L. J.: Somatic mitochondrial DNA mutations in oral cancer of betel quid chewers. *Ann. New York Acad. Sci.* 1011 (2004) 310-316.
- Tomlinson, I.; Lambros, M.; Roylace, R.: Loss of heterozygosity analysis: practically and conceptually flawed? *Genes Chromosom Cancer* 34 (2002) 349-353.
- Umar, A.; Kunkel, T.A.: DNA-replication fidelity, mismatch repair and genome instability in cancer cells. *Eur. J. Biochem.* 238 (1996) 297-307.
- Usmani, B.A.: Genomic instability and metastatic progression. *Pathobiol.* 61 (1993) 109-116.
- Vauhkonen, H.; Hedman, M.; Vauhkonen, M.; Kataja, M.; Sipponen, P.; Sajantlia, A.: Evaluation of gastrointestinal cancer tissues as a source of genetic information for forensic investigations by using STRs. *Forensic Sci. Int.* 139 (2004) 159-167.
- Viel, A.; Novella, E.; Genuardi, M.; Capozzi, E.; Fornasarig, M.; Pedroni, M.: Lack of PMS2 gene-function mutations in patients with hereditary colorectal cancer. *Int. J. Oncol.* 13 (1998) 565-569.

- Wallace, D.C.: 1994 William Allan Award Address. Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease, and aging. *Am. J. Hum. Genet.* 57 (1995) 201-223.
- Wallace, D.C.: Mitochondrial DNA in aging and disease. *Sci. Am.* 277 (1997) 40-47.
- Wallace, D.C.; Brown, M.D.; Melov, S.; Graham, B.; Lott, M.: Mitochondrial biology, degenerative diseases and aging. *Biofactors* 7 (1998) 187-190.
- Wallace, D.C.; Brown, M.D.; Lott, M.T.: Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene* 238 (1999) 211-230.
- Wallin, J.M., Holt, C.L.; Lazaruk, K.D.; Nguyen, T.H.; Walsh, P.S.: Constructing universal multiplex PCR systems for comparative genotyping. *J. Forensic Sci.* 47 (2002) 52-65.
- Wang, Y.; Irish, J.; MacMillan, C.; Brown, D.; Xuan, Y.; Boyington, C.; Gullane, P.; Kamel-Reid, S.: High frequency of microsatellite instability in young patients with head-and-neck squamous-cell carcinoma: lack of involvement of the mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2. *Int. J. Cancer* 93 (2001) 353-360.
- Winn, D.M.; Blot, W.J.; McLaughlin, J.K.; Austin, D.F.; Greenberg, R.S.; Preston-Martin, S.; Schoenberg, J.B.; Fraumeni, J.F. Jr.: Mouthwash use and oral conditions in the risk of oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 51 (1991) 3044-3047.
- Wiseman, S.M.; Stoler, D.L.; Anderson, G.R.: The role of genomic instability in the pathogenesis of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 13 (2004) 1-11.
- Wolff, R.K.; Plaetke, R.; Jeffreys, A.J.; White, R.: Unequal crossing over between homologous chromosomes is not the major mechanism involved in the generation of new alleles at VNTR loci. *Genomics* 5 (1989) 382-384.
- Xu, B.; Clayton, D.A.: RNA-DNA hybrid formation at the human mitochondrial heavy-strand origin ceases at replication start sites: an implication for RNA-DNA hybrids serving as primers. *EMBO J.* 15 (1996) 3135-3143.
- Yin, Y.S., Heim, S.; Mandahl, N.; Biorklund, A.; Wennerberg, J.; Mitelman, F.: Multiple apparently unrelated clonal chromosome abnormalities in a squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer Genet. Cytogenet.* 32 (1988) 93-100.

- Yoneda, M.; Katsumata, K.; Hayakawa, M.; Tanaka, M.; Ozawa, T.: Oxygen stress induces an apoptotic cell death associated with fragmentation of mitochondrial genome. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 209 (1995) 723-729.
- Zhivotovsky, B.; Orrenius, S.; Brustugun O.T.; Doskeland, S.O.: Injected cytochrome c induces apoptosis. *Nature* 391 (1998) 449-450.
- Zhou, H-G.; Sato, K.; Nishimaki, Y.; Fang, L.; Hasekura, H.: The HumD21S11 system of short tandem repeat DNA polymorphisms in Japanese and Chinese. *Forensic Sci. Int.* 86 (1997) 109-118.
- Ziegle, J.S.; Su, Y.; Corcoran, K.P.; Nie, L.; Mayrand, P.E.; Hoff, L.B.; McBride, L.J.; Kronick, M.N.; Diehl, S.R.: Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite loci. *Genomics.* 14 (1992) 1026-1031.
- Zienolddiny, S.; Ryberg, D.; Haugen, A.: Induction of microsatellite mutations by oxidative agents in human lung cancer cell lines. *Carcinogenesis* 21 (2000) 1521-1526.

7 Anhang

7.1 Übersicht der Tumordaten

Primärtumore

Fall No.	Grading	Alter	Lokalisation	TNM Status	m/w
P1	2	67	L	nicht beurteilbar ¹	m
P2 ²	2	67	L	nicht beurteilbar ¹	m
P3	2	67	O	T3N2bM0	m
P4	3	56	O	nicht beurteilbar ¹	m
P5	3	59	L	nicht beurteilbar ¹	m
P6 ²	3	56	O	T4N2M0	m
P7	2	62	O	nicht beurteilbar ¹	w
P9	2	43	O	T1N0M0	w
P11	2	50	L	T4N2M0	m
P12	2	61	L	T2N0M0	m
P13	2	58	L	T2N0M0	m
P14	2	85	O	T3N1M0	m
P15	2	63	L	T3N0M0	m
P16	2	60	L	T3N0M0	m
P17	2	53	L	T3N0M0	m
P18	3	63	L	T1N0M0	m
P20	2	67	L	T2N0M0	m
P21	2	57	L	T3N0M0	m
P22	2	71	L	T3N0M0	m
P23	3	56	L	T4N2bM0	m
P24	2	50	L	T3-4N0M0	m
P25	2	61	L	T2N0M0	m
P26	2	75	L	T2N0M0	m
P27	2	60	O	T2N0M0	m
P28	2	59	H	T3-4N0M0	m
P29	2	39	H	T2N0M0	m
P30	2	57	O	nicht beurteilbar ¹	w

P31	3	45	L	T4NxMx	m
P32	2	57	L	T4N2bM0	m
P33	2	59	L	T4N0M0	m
P34	3	67	O	T3N0M0	m
P35	2	83	L	T2N0M0	w
P36	3	73	L	T2N0M0	m
P37	2	46	O	T4N2cM0	m
P38	2	56	L	T4N2bM0	w
P39 ²	2	56	L	T4N2bM0	w
P40	2	39	L	T1N1M0	m
P41	2	54	H	T4N1M0	m
P42	2	63	L	T4N1M0	w
P43	2	53	H	T4N2bM0	m
P44	2	62	O	T4N1M0	m
P45	3	67	O	T3N0M0	m
P46	2	65	L	T4N1M0	m
P47	2	57	O	T4N2cM0	m
P48 ²	2	45	L	T3N2bM0	m
P49	2	40	H	T4N0M0	m
P50	3	57	O	nicht beurteilbar ¹	m
P51	2	50	O	T3-4N0M0	m
P52	2	43	H	T1N2M1	m
P53	3	59	L	T2N2M0	m
P54	2	67	O	T1N1M0	m
P55	3	73	L	T2N1M0	w
P56	2	54	H	T2N2bM0	m
P57	2	66	O	T3-4N2bM0	m
P58	3	51	L	T4N2cM0	m
P59	2	70	O	T3N1M0	m
P60	2	53	L	T4N2bM0	m
P61	2	43	O	nicht beurteilbar ¹	m
P62	2	61	L	T4N0M0	m
P63	3	58	L	T4N0M0	m
P64	3	50	O	T2N2M0	m

P65	2	65	L	T4N0M0	m
P67	2	58	L	T3N2M0	m
P69	3	48	L	T4N0M0	m
P71	2	67	O	T3N0M0	m
P73	2	56	H	T4N0M0	m
P74	2	53	L	T4N2bM0	w

Lymphknotenmetastasen

Fall No.	Alter	m/w
PM11	50	m
PM23	56	m
PM31	45	m
PM32	57	m
PM37	46	m
PM38	56	w
PM40	39	m
PM41	54	m
PM47	57	m
PM48	45	m
PM49	40	m
PM52a	43	m
PM52b	43	m
PM52c	43	m
PM52d	43	m
PM53a	59	m
PM53b	59	m
PM53c	59	m
PM54a	67	m
PM54b	67	m
PM55	73	w
PM56a	54	m
PM56b	54	m
PM56c	54	m
PM57a	66	m

PM57b	66	m
PM57c	66	m
PM58a	51	m
PM58b	51	m
PM58c	51	m
PM58d	51	m
PM58e	51	m
PM58f	51	m
PM58g	51	m
PM58h	51	m
PM59	70	m
PM60	53	m
PM64	50	m
PM65	65	m
PM67	58	m

¹= Material nicht beurteilbar, da Biopsie

P= Primärtumor

PM= Lymphknotenmetastase

²= Rezidiv

7.2 Grading von Plattenepithelkarzinomen an Kopf- und Hals

Grad 1: hochdifferenzierte Plattenepithelkarzinome mit konzentrischen Hornkugeln und wenig Mitosen.

Grad 2: wenigdifferenzierte Plattenepithelkarzinome weisen ein diffuses Wachstumsmuster auf, haben die Fähigkeit zur Hornbildung verloren, sind polymorph und mitosereich; das kreatinhaltige Zytoskelett zeigt sich in der immunohistochemischen Darstellung strähnig.

Grad 3: undifferenzierte Plattenepithelkarzinome zeigen eine hohe Mitoseaktivität und ein keratinhaltiges Zytoskelett.

7.3 Staging von Plattenepithelkarzinomen an Kopf- und Hals

T - Oropharynx

T1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T2	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T4a	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen, wie Larynx, äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hypoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), Lamina medialis des Processus pterygoideus, harten Gaumen und Unterkiefer
T4b	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen wie M. pterygoideus lateralis, Lamina lateralis des Processus pterygoideus, Schädelbasis oder umschließt die A. carotis interna

T - Hypopharynx

T1	Tumor auf einen Unterbezirk des Hypopharynx begrenzt und 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T2	Tumor infiltriert mehr als einen Unterbezirk des Hypopharynx oder einen benachbarten Bezirk oder misst mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor misst mehr als 4 cm in größter Ausdehnung oder Tumor mit Fixation des Hemilarynx
T4a	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen, z.B. Schild-/Ringknorpel, Zungenbein, Schilddrüse, Ösophagus, zentrale Weichteile des Halses
T4b	Tumor infiltriert prävertebrale Faszien, umschließt die A. carotis interna oder infiltriert Strukturen des Mediastinums

N - Regionale Lymphknoten (Oro- und Hypopharynx)

NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in solitären ipsilateralen Lymphknoten, 3 cm oder weniger in der Ausdehnung
N2	Metastase(n) in solitären ipsilateralen Lymphknoten, mehr als 3 cm, aber nicht mehr als 6 cm in größter Ausdehnung oder in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung oder in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N2a	Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, mehr als 3 cm, aber nicht mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größten Ausdehnung
N3	Metastase(n) in Lymphknoten, mehr als 6 cm in größter Ausdehnung

M –Fernmetastasen (Oro- und Hypopharynx)

MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Larynx (untergliedert in Supraglottis, Glottis und Subglottis)

T - Supraglottis

T1	Tumor auf einen Unterbezirk der Supraglottis begrenzt, mit normaler Stimmlippenbeweglichkeit
T2	Tumor infiltriert Schleimhaut von mehr als einem benachbarten Unterbezirk der Supraglottis oder Glottis oder eines Areals außerhalb der Supraglottis (z.B. Schleimhaut von Zungengrund, Vallecula, mediale Wand des Sinus piriformis), ohne Fixation des Larynx
T3	Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmlippenfixation, und/oder Tumor mit Infiltration des Postkridoidbezirks, des präepiglottischen Gewebes und/oder geringgradige Erosion des Schildknorpels (innerer Kortex)
T4a	Tumor infiltriert durch den Schildknorpel und/oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfes aus, z.B. Trachea, Weichteile des Halses eingeschlossen äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hypoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse, Ösophagus
T4b	Tumor infiltriert den Prävertebralraum, mediastinale Strukturen oder umschließt A. carotis interna

T - Glottis

T1	Tumor auf Stimmlippe(n) begrenzt (kann auch vordere oder hintere Kommissur befallen), mit normaler Beweglichkeit
T1a	Tumor auf eine Stimmlippe begrenzt
T1b	Tumorbefall beider Stimmlippen
T2	Tumor breitet sich auf Supraglottis und/oder Subglottis aus und/oder Tumor mit eingeschränkter Stimmlippenbeweglichkeit
T3	Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmlippenfixation, und/oder Invasion der Postkrioidgegend und/oder des präepiglottischen Gewebes und/oder des paraglottischen Raumes mit geringgradiger Erosion des Schildknorpels (innerer Kortex)
T4a	Tumor infiltriert durch den Schildknorpel und/oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfes aus, z.B. Trachea, Weichteile des Halses eingeschlossen äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hypoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse, Ösophagus
T4b	Tumor infiltriert den Prävertebralraum, mediastinale Strukturen oder umschließt A. carotis interna

T - Subglottis

T1	Tumor auf die Subglottis begrenzt
T2	Tumor breitet sich auf eine oder beide Stimmlippen aus, diese mit normaler oder eingeschränkter Beweglichkeit
T3	Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmlippenfixation
T4a	Tumor infiltriert durch den Schildknorpel und/oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfes aus, z.B. Trachea, Weichteile des Halses eingeschlossen äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hypoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse, Ösophagus
T4b	Tumor infiltriert den Prävertebralraum, mediastinale Strukturen oder umschließt A. carotis interna

N - Regionale Lymphknoten (Larynx)

NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in solitären ipsilateralen Lymphknoten, 3 cm oder weniger in der Ausdehnung
N2	Metastase(n) in solitären ipsilateralen Lymphknoten, mehr als 3 cm, aber nicht mehr als 6 cm in größter Ausdehnung oder in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung oder in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N2a	Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, mehr als 3 cm, aber nicht mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größten Ausdehnung
N3	Metastase(n) in Lymphknoten, mehr als 6 cm in größter Ausdehnung

M –Fernmetastasen (Larynx)

MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Danksagung

Für die Hilfe, die mir im Rahmen dieser Arbeit von vielen Seiten zuteil wurde, möchte ich mich sehr herzlich bedanken.

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. med. Eberhard Lignitz, dass er die Durchführung dieser Arbeit im Institut für Rechtsmedizin der Universität Greifswald ermöglichte.

Frau PD Dr. rer. nat. Micaela Poetsch danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und ihre unermüdliche und umfassende wissenschaftliche Betreuung.

Frau Dr. med. Britta Kleist danke ich für die Nachmusterung der HNSCC-Präparate und für ihre Hilfe bei histologischen Fragestellungen.

Frau Sabine Seefeld und Frau Marina Maschke danke ich für die Unterstützung bei der praktischen Arbeit.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Greifswald,

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Astrid Petersmann, geb. Niemeyer
Geburtsdatum und -ort	16.04.1973 in Langenhagen
Anschrift	Waldstr.11; 17498 Steffenshagen
Eltern	Christel Niemeyer, Floristmeisterin Hermann Niemeyer; Gärtnermeister
Nationalität	deutsch
Konfession	evangelisch-lutherisch
Familienstand	verheiratet mit Heiko Petersmann, drei Kinder Phil geb. 20.08.2000 Anna geb. 16.04.2002 Ron geb. 05.02.2004

Studium der Biologie

1993-2003	Biologiestudium an der Universität Hannover Thema der Diplomarbeit: Untersuchungen zur Struktur der mitochondrialen Präproteintranslokase in <i>Arabidopsis thaliana</i>
-----------	---

Studium der Humanmedizin

1998-2000	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Hochschule Hannover
2000-	Studium der Humanmedizin an der Ernst-Moritz- Arndt-Universität Greifswald
Seit Oktober 2004	Praktisches Jahr

Bundeswehr

1998	Militärische Grundausbildung, Bayreuth
Januar bis September	Offizierausbildung, Fürstenfeldbruck/München
Seit Oktober 1998	Studium der Humanmedizin
Jetziger Dienstgrad	Leutnant SanOA

Zusätzliche Qualifikationen

Schuljahr 1989/90	Besuch einer amerikanischen High-School in Kalifornien
1995	Studium an der University of California, Los Angeles für ein Trimesteräquivalent
2003	Teilnahme am Kurs „Molekularbiologische Arbeitsmethoden“, Forschungsverbund Mecklenburg-Vorpommern
2004	Diplom A der Akupunktur
2004	Teilnahme am Kurs „Proteomics“, Forschungsverbund Mecklenburg-Vorpommern

Literaturliste

Papenbrock, J.; Mishra, S.; Mock, H.P.; Kruse, E.; Schmidt, E.K.; Petersmann, A.; Braun, H.P.; Grimm, B.: Impaired expression of the plastidic ferrochelatase by antisense RNA synthesis leads to a necrotic phenotype of transformed tobacco plants. *Plant. J.* 28 (2001) 41-50.

Werhan, W.; Niemeyer, A.; Jansch, L.; Kruff, V.; Schmitz, U.K.; Braun, H.P.: Purification and characterization of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane from *Arabidopsis thaliana*. Identification of multiple forms of TOM20. *Plant Physiol.* 125 (2001) 934-954.

Poetsch, M.; Dittberner, T.; Petersmann, A.; Woenckhaus, C.: Mitochondrial DNA instability in malignant melanoma of the skin is mostly restricted to nodular and metastatic stages. *Melanoma Res.* 14 (2004) 501-8.

Poetsch, M.; Petersmann, A.; Lignitz, E.; Kleist, B.: Relationship between mitochondrial DNA instability, mitochondrial DNA large deletions, and nuclear microsatellite instability in head and neck squamous cell carcinomas. *Diagn. Mol. Pathol.* 13 (2004) 26-32.

Poetsch, M.; Petersmann, A.; Woenckhaus, C.; Protzel, C.; Dittberner, T.; Lignitz, E.; Kleist, B.: Evaluation of allelic loss in short tandem repeats in different kinds of solid tumors – possible pitfalls in forensic casework. *Forensic. Sci. Int.* 145 (2004) 1-6.