

**Aus dem Institut für Pathologie  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Prof. Dr. Andreas Rosenwald**

**Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung zum Nachweis  
Sarkom-spezifischer genetischer Aberrationen  
in Formalin-fixiertem Paraffin-eingebetteten  
Gewebe**

**Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Jan Martin Allmanritter  
aus Würzburg**

**Würzburg, August 2011**

Referent: Prof. Dr. German Ott  
Korreferent: Prof. Dr. Thomas Haaf  
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 30.03.2012

Der Promovend ist Arzt

*„Nimm alle Dinge wichtig, aber keine völlig ernst.“*

*(Albert Einstein)*

## **Inhaltsverzeichnis**

### **1. Einleitung**

1.1.	Definition und Epidemiologie mesenchymaler Tumoren	1
1.1.1.	Synovial-Sarkom	2
1.1.2.	Alveoläres und Embryonales Rhabdomyosarkom	3
1.1.3.	Ewing-Sarkom	7
1.1.4.	Klarzell-Sarkom	9
1.1.5.	Liposarkom	11
1.1.6.	Keimzelltumoren	16
1.2.	Zielsetzung	18

### **2. Material und Methoden**

2.1.	Untersuchungsmaterial	20
2.2.	Chemikalien, Kits und Lösungen	20
2.3.	Sonden und Hybridisierungspuffer	21
2.4.	Puffer und Medien	22
2.5.	Laborgeräte	23
2.6.	Datenbanken und Software	24
2.7.	Anfertigung von Zellkulturen aus Frischmaterial	24
2.8.	Kulturabbruch zur Gewinnung von Meta- und Interphasenmaterial	25
2.9.	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH) zur Detektion Sarkom-spezifischer Alterationen	25
2.10.	Selektion der Klone	29
2.11.	Bakterienanzucht und Plasmidisolierung	30
2.12.	Markierung der BAC-DNA durch Nick-Translation	30
	a) Biotin-Markierung	30
	b) Digoxigenin-Markierung	31
	c) Ethanol-Fällung	31
2.13.	DNA-Sonden zur Detektion der spezifischen Alterationen	32
2.14.	Präparation der Objektträger und Hybridisierung	32
2.15.	Detektion	33
	a) Direkt gelabelte Sonden	33

b) Indirekt gelabelte Sonden	33
2.16. Fluoreszenz-Mikroskopie und Auswertung	34
2.17. Bestimmung der FISH-Effizienz	35
<b>3. Ergebnisse</b>	
<b>3.1. Herstellung und Validierung lokus-spezifischer DNA-Sonden</b>	
3.1.1. Herstellung von LSI-Sonden mittels Nick-Translation	36
3.1.2. Bindungsspezifität der LSI-Sonden für MDM2 (12q14.3)	36
3.1.3. Ermittlung der Schwellenwerte zum Nachweis von Bruchereignissen bei Sarkom-spezifischen Aberrationen	37
<b>3.2. Nachweis struktureller und numerischer Sarkom-spezifischer Alterationen an FFPE-Gewebe</b>	
3.2.1. Fallauswahl	38
3.2.2. Nachweis Sarkom-spezifischer Alterationen mittels FISH im retrospektiven Ansatz	39
3.2.3. Vergleich der Ergebnisse von FISH und RT-PCR	41
3.2.4. Sensitivität der Sarkom-spezifischen DNA-Sonden	42
3.2.5. Nachweis Sarkom-spezifischer Alterationen mittels FISH im prospektiven Ansatz	42
3.2.6. Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert und Effizienz Sarkom-spezifischer DNA-Sonden	44
3.2.7. Sensitivität, Spezifität, Vorhersagewerte und Effizienz der quantitativen RT-PCR zum Nachweis Sarkom-spezifischer Alterationen	46
<b>3.3. Nachweisbarkeit komplexer numerischer Alterationen im FFPE-Gewebe</b>	
3.3.1. Isochromosom 12p als charakteristische genetische Aberration in Keimzelltumoren	47
3.3.2. Sondendesign und –kombination zur Detektion des Auftretens eines Isochromosom 12p in FFPE-Geweben von Keimzelltumoren	48
3.3.3. Signalkonstellationen und -häufigkeiten bei der Hybridisierung von Keimzelltumoren	48

<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	
4.1.	Sarkom-spezifische chromosomale Aberrationen in der Routinediagnostik	51
4.2.	Häufigkeiten der spezifischen Aberrationen im Studienkollektiv	55
4.3.	Diskussion des mathematischen Cut off-Wertes	55
4.4.	Effizienz von FISH im Vergleich zu Ergebnissen anderer Arbeiten	56
4.5.	Effizienz der RT-PCR zur Detektion chromosomaler Aberrationen	57
4.6.	Vergleich zwischen FISH- und RT-PCR-Ergebnissen im Rahmen dieser Arbeit	58
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	60
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	61
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	69

## 1. Einleitung

### 1.1. Definition und Epidemiologie von Sarkomen

Allgemein werden alle malignen Tumoren als Sarkome bezeichnet, deren Ursprung das mesenchymale Gewebe ist, wobei zusätzlich zwischen Bindegewebs- und Weichteilsarkomen und solchen des Skelettsystems unterschieden wird.<sup>1,2</sup> Je nach dem Differenzierungsgrad erfolgt eine Einteilung in differenzierte und undifferenzierte Sarkome, wobei von Bedeutung ist, inwieweit die Zuordnung zu einem Muttergewebe gelingt. Bei differenzierten Sarkomen ist eine solche Zuordnung möglich, welche sich dann auch in ihrer Namensgebung wieder findet, wie z.B. bei Liposarkomen oder Myosarkomen. Hingegen werden Sarkome, denen eine solche Differenzierung fehlt, zu den undifferenzierten malignen mesenchymalen Neoplasien gezählt und auf Grundlage des vorherrschenden Zelltyps im Tumorgewebe benannt, u.a. als spindelzellige, rundzellige oder polymorphzellige Sarkome. Doch spielt diese Einteilung nicht nur eine diagnostische Rolle, sondern hängen auch die Prognose, Metastasierungstendenz und das Ansprechen auf Therapie mit diesen morphologischen Eigenschaften zusammen.<sup>1</sup> Insgesamt betrachtet sind Sarkome im Vergleich zu anderen Tumorentitäten recht selten. Die Weichteilsarkome machen 1 bis 3% der malignen Neoplasien aus, während die malignen Knochentumoren eine Häufigkeit zwischen 1 und 2% besitzen.<sup>2,3</sup>

Diese Arbeit beschäftigt sich nur mit einer Auswahl maligner mesenchymaler Tumoren, für die spezifische chromosomale Aberrationen (s.u.) bekannt sind. Diese wurden an Tumorgeweben von Synovialsarkomen, alveolären und embryonalen Rhabdomyosarkomen, Ewing-Sarkomen, Klarzell- und Liposarkomen mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung untersucht, um deren Einsatz in der Routinediagnostik zu etablieren.

Im Folgenden werden die untersuchten Entitäten und ihre charakteristischen chromosomalen Aberrationen näher beschrieben.

### 1.1.1. Synovial-Sarkom

Das Synovial-Sarkom (SS) stellt als gemischter epithelial-mesenchymaler oder rein mesenchymaler Spindelzell-Tumor mit variabler, u.a. drüsiger Differenzierung morphologisch, klinisch, und auch genetisch eine eigenständige Entität in der Gruppe der Weichteilsarkome dar. Unter diesen nimmt es einen Anteil von 5-10% ein, wobei jede Altersgruppe betroffen sein kann. Insgesamt betrachtet sind jedoch 90% der Betroffenen jünger als 50 Jahre. Es handelt sich also meist um eine Erkrankung junger Erwachsener zwischen dem 15. und 35. Lebensjahr. Dabei ist das männliche Geschlecht häufiger betroffen.<sup>4</sup>

Anders als es die Namensgebung annehmen lässt, entstammt das SS nicht aus Gewebe des Synoviums oder differenziert in diese Richtung, wie sowohl seine histologischen als auch (immun-)histochemischen Merkmale bestätigen. Tatsächlich entstehen weniger als 5% der SS innerhalb eines Gelenks oder Schleimbeutels, jedoch häufig in örtlicher Nähe. 80% betreffen das Weichteilgewebe der Extremitäten, 5% den Kopf- und Halsbereich, prinzipiell kann jedoch jede Körperregion Ort der Entstehung sein.<sup>4</sup>

Histopathologisch werden eine epitheliale und eine spindelzellige Komponente unterschieden, die in variablem Verhältnis vorliegen können, so dass das SS je nach Vorliegen einer oder beider Komponenten als monophasischer (rein spindelzelliger) oder biphasischer Tumor auftreten kann.<sup>4</sup>

Molekularpathologisch kennzeichnend für das SS ist die Translokation t(X;18) (p11.2;q11.2), die in über 90% aller SS in konventionellen zytogenetischen Bänderungsanalysen gefunden werden kann. Abweichend hiervon können auch aberrante und komplexe Translokationen auftreten. Bei einem Drittel der SS handelt es sich bei der t(X;18) um die alleinige chromosomale Aberration, bei den übrigen Fällen sind sekundäre chromosomale Veränderungen nachweisbar. Die durch die Translokation betroffenen Gene wurden kloniert und charakterisiert. Auf Chromosom 18 ist das SS18-Gen betroffen und auf dem X-Chromosom können die Gene SSX1, SSX2 und SSX4 beteiligt sein. Infolge der Translokation werden die acht c-terminalen Aminosäuren von SS18 mit den 78 n-terminalen Aminosäuren von SSX fusioniert. Von den drei möglichen Fusionsgenen kommt SS18/SSX1 mit ca. zwei Dritteln am häufigsten vor, gefolgt von SS18/SSX2 mit ca. einem Drittel. Ein Fusionsgen



SS18/SSX4 konnte bislang nur in Einzelfällen nachgewiesen werden.<sup>4</sup> In einigen Tumoren wurde eine Koexistenz von SS18/SSX1 und SS18/SSX2 beschrieben.<sup>5</sup>

Die Bedeutung der jeweiligen Fusionsgene in der Tumorgenese ist nicht vollständig geklärt. Es wurden jedoch bereits Alterationen der Zellzyklusregulation beschrieben.<sup>4</sup> So wurde u.a. gezeigt, dass es durch das Fusionsgenprodukt z.B. zu einer Stabilisierung des Zellzyklusregulators Cyclin D1 kommt, der im Komplex mit CDK4 einen Aktivator des Zellzyklus darstellt (s.Abb 1).<sup>6,7</sup> Zudem zeigt SS18/SSX einen steigernden Effekt auf die Aktivität der Ubiquitinligase MDM2, einem negativen Regulator des Tumorsuppressorgens p53. Die erhöhte MDM2-Aktivität führt zu einer vermehrten Degradierung des p53-Proteins. Die durch p53 initiierten Kontroll-Mechanismen des Zellzyklus (Arrest, Apoptose) werden gehemmt, was mit einer unkontrollierten Proliferation der Tumorzellen assoziiert ist (s. Abb 1).<sup>8</sup>

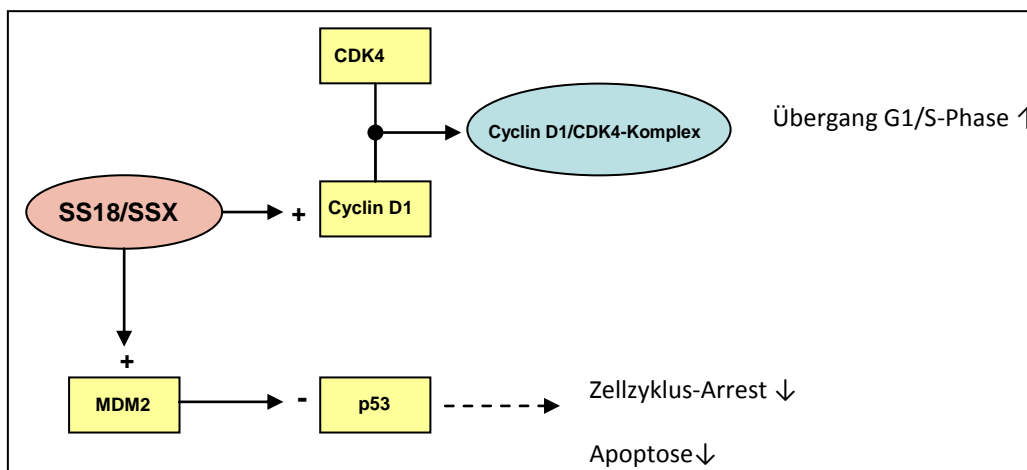


Abbildung 1: Effekte des SS18/SSX-Fusionsproteins

Des Weiteren wurden Interaktionen des Fusionsproteins mit dem Chromatinstoffwechsel<sup>9</sup>, beta-Catenin<sup>10</sup>, E-Cadherin<sup>11</sup> und der Expression verschiedener Zellzyklusproteine<sup>12</sup> beschrieben.

### 1.1.2. Alveoläres und embryonales Rhabdomyosarkom

Rhabdomyosarkome (RMS) sind hochmaligne Weichgewebstumoren, die sich aus undifferenzierten, pluripotenten Mesenchymzellen entwickeln. Sie weisen eine variable rhabdomyomatöse Differenzierung auf, die sich u.a. in ihren immunhistochemischen

Eigenschaften widerspiegelt.<sup>13,15</sup> Vor dem 15. Lebensjahr stellen sie die häufigste Unterform der Weichteilsarkome dar und machen über alle Altersgruppen hinweg insgesamt 15% aus.<sup>14</sup>

Histologisch werden die RMS in die Subtypen der embryonalen (ERMS), alveolären/juvenilen (ARMS), pleomorphen/adulten und die Mischform embryonal-alveoläres RMS unterteilt. Diese unterscheiden sich in der Häufigkeit ihres Auftretens, der Lokalisation, ihrer Genetik und Morphologie, aber auch in ihrem Prädilektionsalter. Dabei ist das rein embryonale RMS mit ca. 70% am häufigsten und kommt v.a. vor dem 5. Lebensjahr vor. Währenddessen ist das rein pleomorphe RMS mit unter 1% am seltensten und betrifft überwiegend Erwachsene jenseits des 25. Lebensjahrs.<sup>15,16,18</sup> Etwa 20% der RMS gehören dem rein alveolären Typ an und haben ihren Altersgipfel zwischen dem 10. und 15. Lebensjahr,<sup>15</sup> sind selten kongenital und zeigen keine geographische oder Geschlechtspräferenz.<sup>13</sup>

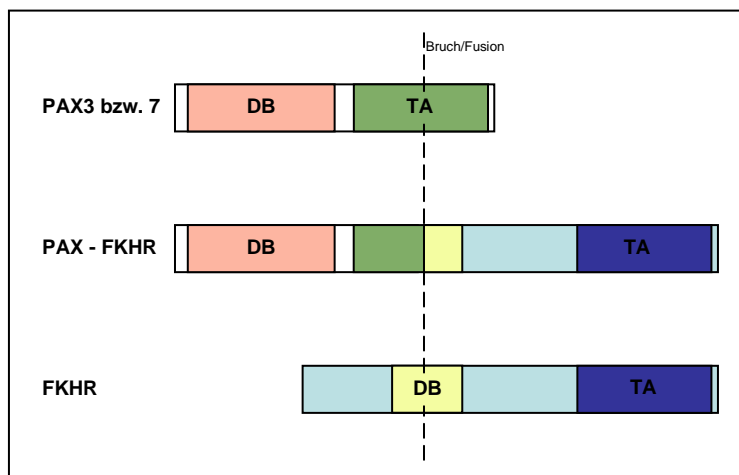
Zwar können RMS in jeglicher Lokalisation vorkommen, doch haben die verschiedenen Subtypen unterschiedliche Prädilektionsorte.<sup>17</sup> Während die embryonale Variante v.a. urogenital und in der Hals-Kopffregion diagnostiziert wird, entstehen sowohl das pleomorphe als auch das alveoläre RMS überwiegend im Bereich der Extremitäten. Die angesprochenen Mischtumoren, die neben embryonalen auch alveoläre Komponenten enthalten, entstehen üblicherweise an Orten, die typischer für das embryonale RMS sind.<sup>13</sup>

Morphologisch sind allen alveolären RMS runde, an Lymphomzellen erinnernde Tumorzellen gemeinsam, jedoch mit primitiver myoblastischer Differenzierung. Betrachtet man die Histopathologie genauer, lässt sich wiederum nach An- und Abwesenheit fibrovaskulären Stromas und der Ausbildung alveolärer Zellformationen eine typische von einer soliden Variante abgrenzen.<sup>13</sup>

In genetischer Hinsicht sind für das alveoläre RMS zwei spezifisch auftretende rekurrente Translokationen beschrieben, die in zytogenetischen Analysen in 70% der Fälle gefundene  $t(2;13)(q35;q14)$  und die in 10-15% nachweisbare  $t(1;13)(p36;q14)$ . Etwa 15-20% histologisch typische Tumoren sind negativ für diese Translokationen und zeigen eine heterogene Genetik.<sup>13,22</sup> Im Rahmen der Translokationen betroffen sind jeweils das PAX3-Gen auf Chromosom 2 sowie das PAX7-Gen auf Chromosom 1 bzw. das FKHR-Gen auf Chromosom 13.<sup>13</sup> Während die Genprodukte von PAX3 und PAX7

Subtypen der Familie der paired-box Transkriptionsfaktoren darstellen und in Struktur und Organisation nahezu identisch sind, kodiert das FKHR-Gen für einen Transkriptionsfaktor der fork-head Familie. PAX3 und PAX7 haben wie andere Mitglieder ihrer Familie eine Bedeutung in der Embryogenese, wobei sie u.a. an der Entwicklung von Progenitorzellen der Skelettmuskulatur beteiligt sind und in denjenigen Zellen exprimiert werden, die als Vorläuferzellen für das alveoläre RMS angenommen werden. Zwar spielt FKHR ebenfalls eine Rolle in der Kontrolle der embryonalen Entwicklung, jedoch scheint es auch in adulten Zellen in der gewebespezifischen Genexpression beteiligt zu sein. Des Weiteren besteht u.a ein Zusammenhang mit zellwachstumssteuernden und apoptoseeinleitenden Signalwegen.<sup>13,20</sup>

Die Translokationen führen zur Generierung chimärer Fusionsproteine, welche neben den DNA-Bindungsdomänen des PAX3- oder PAX7-Proteins auch die Transkriptionsaktivierende Domäne des FKHR-Proteins enthalten (s. Abb. 2) und damit potente Eigenschaften zur Transkriptionsaktivierung mit den im Anschluss beschriebenen Folgen für die Zellzyklus- und Apoptoseregulation besitzen.<sup>13,20</sup>



**Abbildung 2: Einfluss der Translokationen auf die DNA-bindenden (DB) und Transkriptionsaktivierenden (TA) Domänen (nach: WHO Classification of soft tissue tumours<sup>13</sup>).**

Zwar zeigt das unter der Kontrolle des PAX3-Promotors liegende Fusionsprotein PAX3/FKHR eine schwächere DNA-Bindungsfähigkeit als der Wildtyp, doch wurde festgestellt, dass es trotz dieser Tatsache einen stärkeren Transkriptionsfaktor darstellt

als PAX3 in seiner eigentlichen nicht-aberranten Form. Die erhaltene prolinreiche Region des FKHR-Proteins am C-Terminus scheint dabei ebenso eine Rolle zu spielen wie die Tatsache, dass die Tumorzellen in charakteristischer Weise höhere Mengen an Fusionsprotein aufweisen als die Zellen mit Wildtypproteinen.<sup>19,20</sup> Dies liegt u.a. auch an einer häufig nachweisbaren zusätzlichen Amplifikation der Fusionsgene, die v.a. in Fällen mit t(1;13), aber nur in einer vergleichsweise kleinen Zahl in Fällen mit t(2;13) nachweisbar ist.<sup>13</sup>

Dabei bedingt vermutlich der PAX-Anteil des Fusionsproteins die Bindungsspezifität, während die inkomplette fork-head-Domäne inaktiv scheint oder die DNA-Bindung allenfalls indirekt beeinflusst. Einige Promotoren verschiedener Gene werden sowohl von PAX3 als auch von PAX3/FKHR zum Teil mit gleichem Effekt beeinflusst, so zum Beispiel NF-1 oder BCL-XL mit dessen anti-apoptischen Wirkung.<sup>20,21</sup>

Zusätzlich führt die Beeinflussung der Expression und Lokalisation verschiedener zellulärer Signaltransduktionswege durch das Fusionsprodukt auf subzellulärer Ebene zum Anstieg seines Spiegels im Zellkern, was sein Wirkungspotential auf Proliferationskontrolle, Apoptose und Differenzierung zu steigern scheint.<sup>13</sup> So inhibiert das chimäre Protein u.a. die Apoptose und eine muskuläre Differenzierung und zeigt sich resistent gegenüber der Phosphorylierung durch AKT, welche eigentlich eine Sequestrierung von FKHR im Zytoplasma und Minderung seiner Transkriptionsaktivierenden Eigenschaften zur Folge hat.<sup>20,23</sup>

Neben den beschriebenen Translokationen wurden noch weitere sekundäre genetische Alterationen im alveolären RMS nachgewiesen, wobei es sich jeweils um Amplifikationen verschiedener Bereiche des Genoms handelt. Ein Drittel betrifft dabei die chromosomale Region 12q13-15, in der u.a. GLI, CDK4 und MDM2 lokalisiert sind, und 2p24, welche das MYCN-Onkogen beinhaltet. Seltener sind die Regionen 13q31, 2q34-qter, 15q24-26 und 1p36 betroffen.<sup>13</sup>

In molekulargenetischen Untersuchungen zeigten die embryonalen RMS im Vergleich zu den alveolären RMS keine spezifischen Translokationen. Jedoch wurden häufig Verluste der chromosomalen Region 11p15 nachgewiesen, welche u.a. die Gene IGF2, H19 und CDKN1C enthält. Verluste in den beschriebenen chromosomalen Regionen wurden in Genexpressionsstudien in Zusammenhang mit einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen gebracht. Außerdem sind erbliche Alterationen dieser

chromosomalen Region dafür bekannt, dass sie im Rahmen des Beckwith-Wiedemann-Syndroms das Risiko für die Entstehung verschiedener Neoplasien, u.a. embryonaler RMS, erhöhen.<sup>13</sup>

Darüber hinaus konnten in zytogenetischen Untersuchungen an embryonalen RMS zahlreiche komplexe strukturelle, aber auch numerische chromosomale Aberrationen nachgewiesen werden, dabei häufig mit einer Beteiligung der Chromosomen 2, 8 und 13. Auch Rearrangements der chromosomalen Regionen 1p11-q11 und 12q13 konnten in einer Untergruppe der embryonalen RMS gefunden werden, ebenso wie Veränderungen des gesamten Chromosomensatzes in anderen Untergruppen. Letztendlich zeigten sich in der Analyse bekannter Onkogene inaktivierende Mutationen von p53 und CDKN2A oder aktivierende Mutationen von Mitgliedern der RAS-Genfamilie.<sup>13</sup>

### **1.1.3. Ewing-Sarkom**

Das Ewing-Sarkom (ES) stellt als Mitglied der Ewing/PNET-Tumorfamilie mit 6-8% der malignen Knochentumoren das zweithäufigste Sarkom im Knochen- und Weichteilgewebe im Kindesalter dar. Insgesamt betrachtet sind männliche Individuen ein wenig häufiger betroffen als weibliche und ca. 80% der Diagnosen werden vor dem 20. Lebensjahr gestellt, 90% vor dem vollendeten 30. Lebensjahr. Das ES zeigt bestimmte Prädispositionsorte wie die Diaphysen der langen Röhrenknochen und deren metaphysär-diaphysären Übergänge, bevorzugt von Femur, Humerus und Tibia. Doch auch die Beckenknochen und Rippen sind regelmäßige Manifestationsorte. Hingegen selten sind Schädelknochen, Wirbel, Scapula oder Hand- und Fußknochen betroffen. Es gilt jedoch, dass das ES prinzipiell in jedem Knochen des menschlichen Körpers auftreten kann.<sup>24,25</sup>

Das ES stellt den klassischen Prototyp des klein-, rund- und blauzelligen Tumors („small round blue“) dar. Die Stellung der Diagnose kann relativ schwierig sein, da das ES einerseits in seinem klinischen Verlauf einer Osteomyelitis sehr ähnlich sein kann, es andererseits radiologisch andere Knochenläsionen imitieren kann.<sup>25</sup> So ist zur Diagnosestellung eine Biopsie unumgänglich.<sup>24,25</sup> Dabei präsentiert sich das ES morphologisch als rundzelliges Sarkom mit verschiedenen Typen. Meist stehen uniforme, kleine, runde schmalzytoplasmatische Tumorzellen mit runden Zellkernen

und feinem Chromatin im Vordergrund. Jedoch kommen vereinzelt Abweichungen von dieser Norm vor, so zum Beispiel Fälle, in denen große Tumorzellen mit prominenten Nukleolen und unregelmäßigen Konturen im Vordergrund stehen. Gemeinsam ist diesen Unterformen eine Expression von CD99 und Vimentin. Eine PAS-Positivität kommt vor. Weiterhin üblich sind großfleckige und bandförmige Nekroseareale mit Bereichen vitaler Zellen in perivaskulären Arealen.<sup>24,26</sup>

Molekularpathologisch lassen sich in der Mehrzahl der Fälle spezifische chromosomale Aberrationen nachweisen, die als kritisches onkogenes Ereignis gesehen werden und somit eine Schlüsselrolle in der Tumorgenese des ES einnehmen. In ca. 85% der Fälle handelt es sich dabei um die rekurrente chromosomale Translokation t(11;22)(q24;q12). Durch Klonierung des Genlocus wurde eine in-frame Fusion des 5'-Endes des EWS(EWSR1)-Genes (22q12), dem eine RNA-Kontrollfunktion zugeschrieben wird, mit dem 3'-Ende des FLI1-Genes (11q24) nachgewiesen, das zur ETS-Protoonkogenfamilie gezählt wird.<sup>24,26</sup> In über 50% der Fälle sind zusätzliche sekundäre Aberrationen in Form von Zugewinnen der Chromosomen 8 und 12 sowie des 1q-Armes nachweisbar. Bei 10-15% der ES wird hingegen die t(21;22)(q22;q12) gefunden, die das EWS-Gen mit ERG (21q22) fusioniert, das ebenfalls einen Transkriptionsfaktor der ETS-Familie darstellt.<sup>24</sup>

Zwar sind die Auswirkungen der angesprochenen Genfusionen noch nicht im Einzelnen geklärt, doch gibt es bereits einige Erkenntnisse über die Wechselwirkungen des EWS/FLI1-Genprodukts mit dem Zellzyklus, dessen Aktivität in Folge der Fusion gesteigert wird. Mechanismen des programmierten Zelltodes und der genetischen Stabilität werden hingegen negativ beeinflusst. Das resultierende chimäre Transkriptionsprodukt besteht aus der N-terminalen Transkriptions-aktivierenden Domäne von EWS und der C-terminalen DNA-bindenden Domäne des ETS-Proteins, das als aberranter Transkriptionsfaktor die ursprünglichen ETS-Zielgene binden und deren Expression beeinflussen kann. Dabei kommt es u.a. zu einer Repression des proapoptischen TGF- $\beta$ -TypII-Rezeptors (TGF $\beta$ R) sowie des Zellzyklusinhibitors CDKN2A, um häufigere Wirkungsmechanismen zu nennen.<sup>24</sup> Des Weiteren wird über die Suppression des p53-Proteins<sup>27</sup> und der Funktion des Retinoblastom-Proteins (RBP)<sup>28</sup> sowie eine gesteigerte Expression der Serin-/Threonin-Proteinkinasen Aurora

A und B<sup>29</sup> (Aur. A, B) und von GLI1, einem positiven Effektor des Hedgehog-Signalwegs<sup>30</sup>, berichtet (s. Abb. 3).

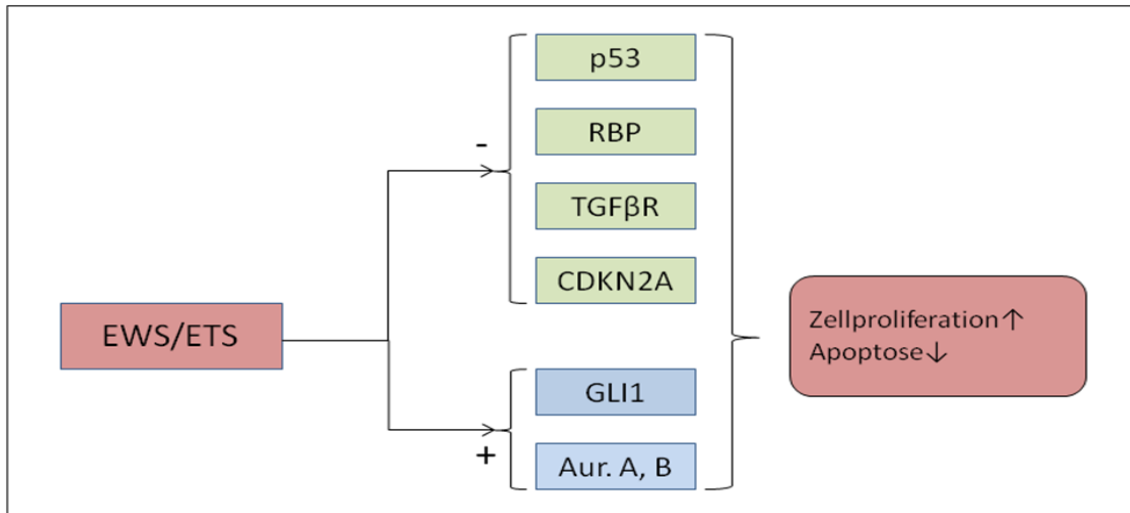


Abbildung 3: Auswirkungen einer Expression des EWS/ETS-Fusionsprodukts auf den Zellzyklus

#### 1.1.4. Klarzell-Sarkom

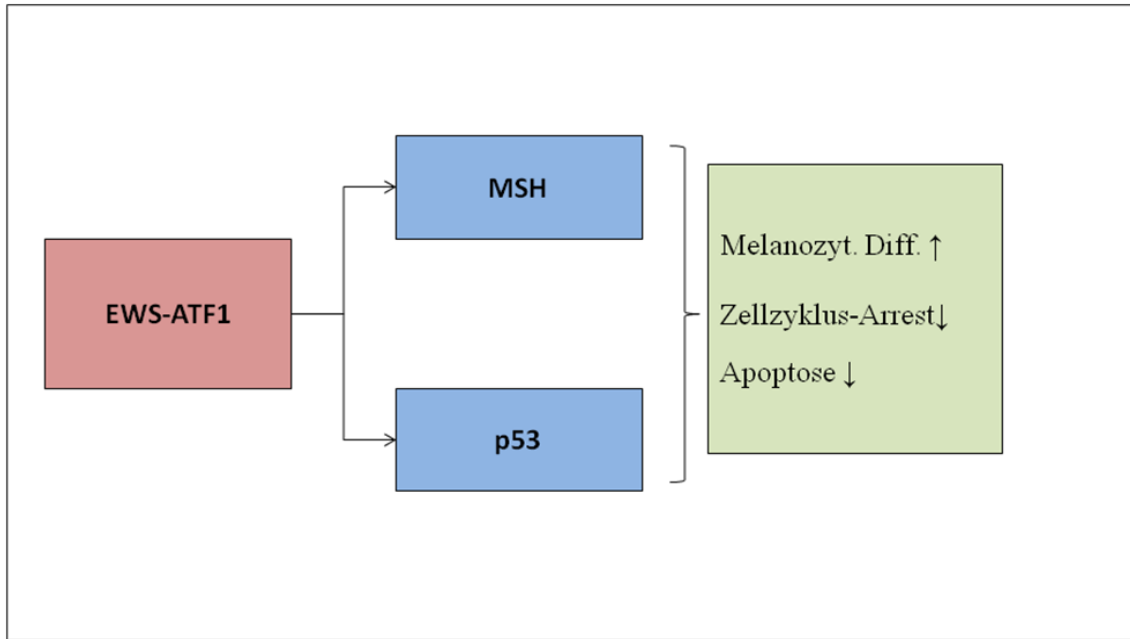
Das Klarzell-Sarkom (KZS) ist ein Melanin-produzierender maligner Tumor des Weichgewebes melanozytärer Differenzierung, der sich sowohl klinisch wie auch genetisch und biologisch klar vom kutanen malignen Melanom abgrenzen lässt, obwohl morphologische Gemeinsamkeiten bestehen.<sup>32</sup> Es entsteht zu 90-95% bevorzugt im Bereich der Extremitäten und deren Sehnen und Aponeurosen, wobei in ca. 40% der Fälle der Fuß oder das Sprunggelenk Manifestationsorte sind. Zu ca. 30% sind Knie, Oberschenkel oder Hand, selten Kopf, Hals oder Rumpf befallen.<sup>31,32</sup> Während das KZS selten vor dem 10. oder nach dem 50. Lebensjahr diagnostiziert wird, sind v.a. Erwachsene zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr betroffen, bei einer leichten Prädominanz für das weibliche Geschlecht.<sup>31</sup>

Klinisch stellt sich das KZS als langsam wachsende, gelegentlich schmerzhaft oder berührungsempfindliche Raumforderung dar, die in der Tiefe des Weichgewebes ihren Ursprung nimmt. Histologisch zeigt sich, dass zwar tiefere Hautschichten mitbeteiligt sein können, die Epidermis jedoch stets unbeteiligt bleibt.<sup>31</sup> Typisch sind dabei uniforme, nestartige und faszikuläre Wachstumsmuster polygonaler oder spindelförmiger Tumorzellen, unterteilt durch dünne fibröse Septen. Melanin ist bei

50% der KZS nachweisbar, doch meist in zu geringer Ausprägung, als dass es lichtmikroskopisch darzustellen wäre. Durch histochemische oder immunhistochemische Nachweismethoden ist es aber identifizierbar. Des Weiteren sind in nahezu allen Fällen das S100-Protein und die Antigene HMB45, Melan-A, Mel-CAM und MiTF, die mit der Melaninsynthese im Zusammenhang stehen, sowie NSE Leu-7 und LN3 exprimiert.<sup>32</sup>

Molekularpathologisch kennzeichnend für das KZS ist die in 90% der Fälle vorliegende reziproke  $t(12;22)(q13;q12)$ , die in noch keinem weiteren Malignom rekurrent dargestellt werden konnte und die als frühe Veränderung zu seiner Entstehung beitragen soll. Wie beim Ewing-Sarkom ist auch hier das EWS-Gen (22q12) von der Translokation betroffen, dessen C-terminales Ende durch die Fusion mit der DNA-bindenden Domäne des ATF1-Gens (12q13) ersetzt wird. ATF1 (activating transcription factor-1) ist ein Mitglied der Familie der CREB(cAMP-response-element-binding-protein)-Transkriptionsfaktoren. Es gibt verschiedene Varianten des entstehenden Fusionsproteins, meistens jedoch liegt der Typ 1 mit einer in-frame Fusion von EWS-Exon 8 mit ATF1-Exon 4 vor.<sup>31,32,35</sup> Dabei wird ATF1 zu einem konstitutiven Transaktivator umgewandelt und imitiert u.a. die Aktivität des MSH (Melanozytenstimulierendes Hormon), wobei es an den MiTF (melanocyte master transcription factor)-Promotor bindet und diesen aktiviert.<sup>33</sup> Dieses Ereignis wird als entscheidender Vorgang in der Genese des KZS gesehen. Infolgedessen wird die Melaninproduktion stimuliert, was mit der Induktion des Tumorwachstums assoziiert zu sein scheint.<sup>32,34</sup> Außerdem besteht möglicherweise ein Zusammenhang zwischen einer Fusion von EWS-ATF1 und einer Repression der p53-Funktion, die in einigen KZS beschrieben wurde (s. Abb. 4).<sup>36</sup>





**Abbildung 4: Auswirkungen der Bildung des EWS-ATF1-Proteins auf den Zellzyklus**

Meist bestehen zu den bereits beschriebenen Alterationen zusätzliche sekundäre chromosomale Aberrationen, welche die Chromosomen 8, 7 und 22 betreffen.<sup>31</sup>

### 1.1.5. Liposarkom

Liposarkome (LS) sind eine heterogene Gruppe von Weichteiltumoren unterschiedlicher Malignitätsgrade, die sowohl histologisch, biologisch, zytogenetisch als auch durch eine unterschiedliche Prognose und Metastasierungsrate in vier Subtypen unterteilt wird. Sie treten v.a. bei Patienten im späten Erwachsenenalter bei annähernd gleicher Geschlechtsverteilung auf.<sup>37</sup> LS machen ca. 16% aller malignen Weichgewebstumoren aus.<sup>3</sup> Ihnen gemeinsam sind u.a. das überwiegende Auftreten im tiefen Weichgewebe der Extremitäten und des Retroperitoneums, die wohl entscheidende Rolle von Lipoblasten in der Tumorgenese, die allenfalls ergänzende Rolle der Immunhistochemie zur Stellung der Diagnose sowie verschiedene spezifische zytogenetisch feststellbare genetische Aberrationen, meist der Region 12q13-15.<sup>37,38,39</sup> Die Theorie, dass LS v.a. in entarteten Lipomen entstehen, gilt heute als obsolet.<sup>37</sup>

Mit 40-45% aller LS ist das atypische Lipom/hochdifferenzierte Liposarkom (ALS) der häufigste Subtyp, von dem ca. 10% zu einem dedifferenzierten LS (DLS)

transformieren. Während das myxoide/rundzellige LS (MRLS) mehr als ein Drittel aller LS ausmacht, stellt das pleomorphe LS (PLS) mit 5% die seltenste Untergruppe dar. Eine sehr seltene Variante des LS stellt das „mixed-type“ LS dar, das Eigenschaften der vier zuvor genannten Subtypen parallel vereinen kann und hier nur am Rande erwähnt werden soll.<sup>38</sup>

Das ALS besteht aus einer fettdichten Masse mit fibrösen und sklerotischen Arealen, wobei es in 75% der Fälle im tiefen Weichgewebe der Extremitäten, bevorzugt im Oberschenkel, und in 20% im Retroperitoneum neben selteneren Entstehungsorten wie der Leistenregion, dem Samenstrang oder sehr selten in der Haut und Subcutis entsteht. Dabei besteht ein Inzidenzmaximum zwischen der 6. und 7. Lebensdekade mit Symptomen einer schmerzlosen, über Jahre an Größe zunehmenden Masse, die, wenn überhaupt, allenfalls lokal bedingte Beschwerden macht.<sup>37</sup>

Das ALS lässt sich histologisch, nach ihrer absoluten Häufigkeit in absteigender Reihenfolge genannt, in drei Typen unterteilen: das adipozytäre/lipom-ähnliche LS, das sklerosierende LS und das inflammatorische ALS.<sup>37</sup> Ungewöhnliche Areale mit Differenzierungsmustern glatter Muskulatur kommen gelegentlich vor, auch Fälle mit einer dominierenden myxoiden Komponente sind beschrieben worden, wobei zu erwähnen ist, dass in diesen die für das MRLS typischen genetischen Aberrationen (s.u.) nicht anzutreffen waren.<sup>37</sup>

In der Regel nicht bzw. nur bei Transformation in ein höhergradiges Malignom metastasierend, ist das ALS v.a. ein lokal aggressiver Tumor, wobei Mortalität und Rezidivneigung entscheidend von der Lokalisation abhängen. Retroperitoneale ALS durchlaufen in 10-15% der Fälle über einen Zeitraum von meist 7-8 Jahren eine Entwicklung zum DLS, während es in den Extremitäten nur ca. 5% sind. Es bleibt zu erwähnen, dass diese Entwicklung unabhängig vom histologischen Typ des ALS beobachtet wird.<sup>37,38</sup> Diese Differenz lässt sich vermutlich durch die Tatsache erklären, dass sich retroperitoneale ALS nur selten vollständig resezierbar lassen. Auch aus diesem Grund haben sie eine schlechtere Prognose als die in Extremitäten entstandenen Tumoren.<sup>37</sup>

Zytogenetisch charakterisierend für das ALS ist das teilweise solitäre, aber auch in Verbindung mit anderen strukturellen Alterationen vorkommende Auftreten von Riesen- und Ringchromosomen, die amplifizierte Gensequenzen der Region 12q13-15

beeinhalten. Konstant betroffen ist das MDM2 (mouse double minute 2)-Gen, während andere, wie das GLI-, das CDK4-, das SAS- oder das HMGIC-Gen häufig amplifiziert sind.<sup>37,41</sup> Auch Amplifikationen der Regionen 12q21-22 und 1q21-25 wurden beschrieben.<sup>38</sup> Die resultierende Überexpression von MDM2 und CDK4 lässt sich immunhistochemisch darstellen, was u.a. in der Differentialdiagnose zu benignen Läsionen (v.a. Lipomen) von Nutzen sein kann. Die MDM2-vermittelte Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 scheint in der Tumorentstehung eine entscheidende Rolle zu spielen.<sup>37</sup> So gilt MDM2 als ein mit p53 in gegenseitiger Wechselwirkung inhibierend wirkendes Protein, indem es p53 durch seine E3-Ligaseaktivität ubiquitiniert und somit für seinen Abbau im Proteasom markiert, während p53 wiederum MDM2 auf Transkriptionsebene herunterreguliert.<sup>40</sup> Doch gibt es auch Erkenntnisse darüber, dass p53 bereits auf Transkriptionsebene durch MDM2 negativ beeinflusst wird.<sup>42</sup> Wie bereits im Abschnitt 1.1.1 erwähnt, führt eine erhöhte MDM2-Aktivität dazu, dass die durch p53 initiierten Mechanismen des Zellzyklus-Arrests und der Apoptose gehemmt werden (s. Abb. 1). Auch eine Wechselwirkung von MDM2 mit dem Retinoblastom-Protein wurde beschrieben.<sup>43</sup>

Wie bereits angedeutet, entsteht ein DLS primär durch die „Transformation“ eines hoch differenzierten ALS in einen Tumor mit nicht-lipogener Morphologie. Dies geschieht in 90% der Fälle in einem Primärtumor, aber auch zu 10% in Rezidiven, wobei das Risiko einer Dedifferenzierung umso höher zu sein scheint, je tiefer im Weichgewebe das ALS lokalisiert ist. So wird das DLS im Gegensatz zum ALS deutlich häufiger im Retroperitoneum als in den Extremitäten diagnostiziert, tatsächlich in einem Verhältnis von 3:1. Auch der Samenstrang, die Kopf- und Halsregion, der Rumpf und die Subkutis können seltene Orte der Entstehung sein. Die Patientenpopulation entspricht weitgehend derjenigen des ALS. Doch im Gegensatz zum ALS metastasiert das DLS in ca. 17% der Fälle.<sup>38</sup>

Die dedifferenzierten Areale des DLS zeigen sich histologisch variabel. Eine Unterteilung in einen niedrig dedifferenzierten und einen - deutlich häufigeren - hochgradig dedifferenzierten Typ wird vorgenommen. In 5-10% der Fälle wurden heterologe Differenzierungen, meist myogener, osteochondromatöser und angiosarkomatöser Art beschrieben, aber auch neurogene Differenzierungen kommen vor. Auch zytogenetisch zeigt das DLS einige Gemeinsamkeiten zum ALS, so sind wie

bei diesem die Riesen- und Ringchromosomen mit Amplifikationen der Region 12q13-21 nachweisbar<sup>38</sup>

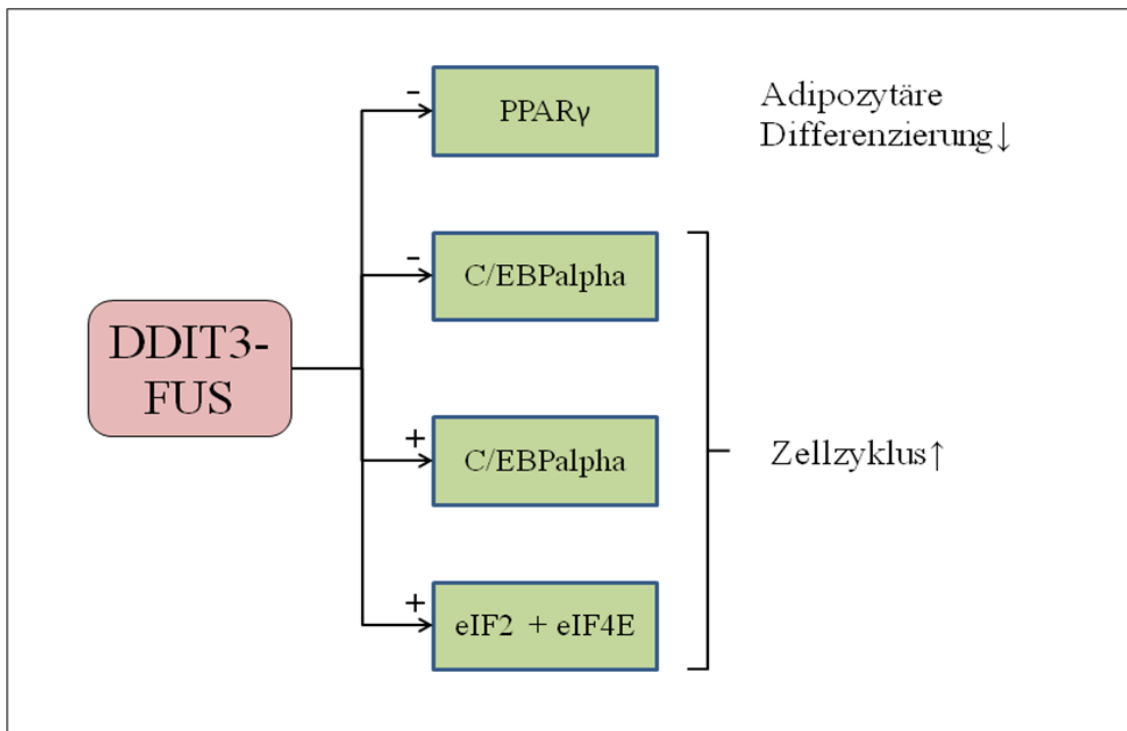
Die unter der Bezeichnung MRLS zusammengefassten Malignome umfassen ein morphologisches Kontinuum zwischen hochdifferenzierten myxoiden Tumoren mit weitreichender lipoblastischer Differenzierung bis zu gering differenzierten Rundzelltumoren, denen die lipoblastische Differenzierung weitgehend fehlt. Da sich jedoch beide Extreme und vorkommende Übergangsformen mit überlappender Histologie sowohl in der Lokalisation, den betroffenen Altersgruppen und in den nachweisbaren zytogenetischen Abnormalitäten gleichen, werden diese insgesamt in eine Kategorie eingeordnet.<sup>37</sup>

Im Gegensatz zu den anderen Formen des LS ist die betroffene Patientengruppe mit diagnostiziertem MRLS jünger, bei einem Inzidenzgipfel zwischen der 4. und 5. Lebensdekade. Das MRLS macht mehr als ein Drittel aller LS aus und ist somit der zweithäufigste Subtyp, der in 75% der Fälle die untere Extremität, und dabei v.a. die Oberschenkel- und Poplitealregion, seltener das Retroperitoneum oder das subkutane Gewebe betrifft.<sup>37,38</sup> Das MRLS neigt zu Rezidiven; unabhängig vom histologischen Grad kommt es bei ca. einem Drittel der Patienten zu syn- oder metachronen Metastasen, v.a. in das Retroperitoneum, aber auch in die Extremitäten u.a. der anderen Körperhälfte, in die Axilla und in die Knochen, v.a. der Wirbelsäule.<sup>38</sup>

Histologisch stellt sich das myxoide LS als ein aus rund bis ovulär geformten nicht-lipogenen Mesenchymzellen und einer variablen Anzahl von kleinen siegelringartigen Lipoblasten geformter Tumor mit einem charakteristischen hyaluronsäurehaltigen Stroma und einem darin ausgeprägt verzweigten Kapillarnetz dar. Mit Verlust der Differenzierung kann es mit der Zeit eine vorwiegend rundzellige Erscheinungsform (rundzelliges LS) mit deutlich höherer Zelldichte annehmen, die allgemein betrachtet eine schlechtere Prognose mit sich bringt. Fokal können knorpelige, leiomyomatöse oder ossäre Differenzierungen aufzufinden sein.<sup>37,38</sup> Auch beim MRLS spielt die Immunhistochemie zur Stellung der Diagnose eine nachrangige Rolle, wobei die diffuse Anfärbbarkeit des S100-Proteins in rundzelligem LS in der Differentialdiagnose von Nutzen sein kann.<sup>38</sup>

In allen Varianten des MRLS ist in über 90% der Fälle die spezifische reziproke  $t(12;16)(q13;p11)$  nachweisbar, wobei das für den Transaktivator DDIT3 (DNA-damage-

inducible transcript 3, bzw. CHOP) kodierende Gen (12q13) mit dem FUS (TLS)-Gen (16p11) fusioniert, das wiederum die Information für ein RNA-bindendes Protein mit hoher Affinität zu Steroidhormon-, Schilddrüsenhormon- und Retinoid-Rezeptoren trägt. Das entstandene Fusionsprodukt liegt in drei verschiedenen Varianten vor, die sich in den Bruchstellen im FUS-Gen unterscheiden, welche jeweils mit dem Intron 2 des DDIT3-Gens verschmelzen.<sup>37,38</sup> Die Fusion der entsprechenden Genabschnitte scheint zur Folge zu haben, dass die Tumorzellen den Mechanismus der Kontaktinhibition genauso verlieren wie die physiologische Reaktion auf adipogene Stimuli und Genwirkungen.<sup>38</sup>



**Abbildung 5: Auswirkungen des DDIT3-FUS-Fusionsproteins auf Zellzyklus und Differenzierung**

Die zugrunde liegenden Mechanismen und genauen Auswirkungen des entstandenen Fusionsproteins wurden bislang nicht vollständig aufgeschlüsselt. Doch scheint u.a. die Repression von PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) und C/EBPalpha, einem Transkriptionsfaktor, der physiologisch die Kinasen CDK2 und CDK4 inhibiert, genauso eine Rolle zu spielen wie die Induktion translationsinitiiender Faktoren wie eIF2 und eIF4E. Es gibt ebenfalls Hinweise dafür,

daß NF-kappaB und dessen Zielgene durch das chimäre Protein beeinflusst werden. Somit kommt es u.a. zur Blockierung einer adipozytären Differenzierung, aber auch zur Steigerung des Zellzyklus (s. Abb. 5), um hier einzelne Beispiele hervorzuheben.<sup>45,46</sup> In seltenen Fällen wurde auch eine alternative t(12;22)(q13;q12) beschrieben, bei der es zu einer Beteiligung des EWS-Gens kommt.<sup>38,44</sup> Außerdem sind im Gegensatz zu den ALS in MRLS bei ca. 30% der Fälle Mutationen des p53-Gens nachweisbar, mit entsprechenden Auswirkungen auf den Zellzyklus.<sup>38</sup>

Das PLS stellt als seltenstes und noch am wenigsten beschriebenes LS einen Subtyp dar, der meist Patienten im späten Erwachsenenalter jenseits des 50. Lebensjahrs betrifft, wobei Retroperitoneum und Extremitäten gleichhäufig betroffen sind neben selteneren Lokalisationen in Haut, Subcutis, paratestikulärem Gewebe, Orbita, Bauch- und Beckenregion, Mediastinum und der Kopfschwarte. Klinisch zeigt es eine rasche Progression mit einer Metastasierungsrate von 30-50% und einer Mortalität von bis zu 50% der Fälle. Histologisch stellt das PLS ein pleomorphes high-grade Sarkom mit variabler Anzahl pleomorpher Lipoblasten dar. Allen PLS gemeinsam ist außerdem ein ungeordnetes Wachstumsmuster mit hohem Grad zellulärer Atypien und bizarren Riesenzellen. Doch lässt sich je nach dominierendem Muster eine eher hochanaplastische von einer rundzelligen Form unterscheiden. Trotz einiger histologischer Gemeinsamkeiten zum DLS stellt das PLS jedoch zytogenetisch eine eigene Subform dar. So lassen sich in PLS zahlreiche komplexe, jedoch interzellulär verschiedene, also nicht-klonale Rearrangements und Alterationen finden, die zwar ähnliche Gene betreffen, wie es bei den anderen bereits beschriebenen LS der Fall ist, doch liegt eine MDM2-Amplifikation wohl nur inkonstant in ca. einem Drittel der Fälle vor. Auch Fälle mit p53-Mutationen sind beschrieben worden.<sup>37,38</sup>

### **1.1.6. Keimzelltumoren**

Unter dem Begriff Keimzelltumoren (KZT) wird eine Reihe von heterogenen Neoplasien zusammengefasst, deren Ursprung meist Keimzellen der Gonaden darstellen, und die ca. 90-95% der testikulären Malignome ausmachen.<sup>47,48,49</sup> Selten finden sie sich auch primär extragonadal und manifestieren sich dann für gewöhnlich entlang der embryonalen Migrationsroute der primordialen Keimzellen. Die testikulären KZT repräsentieren ca. 1% der Malignome des Mannes insgesamt, stellen jedoch im

Alter zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr die häufigste bösartige Tumorgruppe mit einem großen Manifestationsgipfel zwischen dem 25. und 35. und einem kleineren nach dem 80. Lebensjahr dar. Die KZT von Jugendlichen und jungen Erwachsenen werden nach klinischen Belangen in zwei Unterformen eingeteilt.<sup>47</sup> Dabei entspricht mit 40% die Gruppe der Seminome histologisch einheitlichen Malignomen mit Eigenschaften, die denen der Keimzellen sehr ähnlich sind.<sup>47,49</sup> Gegenübergestellt wird die heterogene Gruppe der Nichtseminome, welche sich in verschiedenste Gewebe der Embryogenese differenzieren können, wobei sich das embryonale Karzinom noch weitestgehend undifferenziert manifestiert. Die Nichtseminome können jedoch auch zu Chorionkarzinomen, Dottersacktumoren, Teratokarzinomen und reifen oder unreifen Teratomen differenzieren.<sup>47,49</sup> Des Weiteren existieren Mischtumoren, die einen Anteil von ca. 15% einnehmen.<sup>49</sup>

Allen KZT gemeinsam ist, dass sie sich durch zahlreiche genetische Veränderungen auszeichnen, die sich einerseits in ihrer schon früh im Stadium der testikulären intraepithelialen Neoplasie (TIN) feststellbaren Aneuploidie bzw. Polyploidie und andererseits in verschiedenen chromosomalen Aberrationen niederschlagen, die bei allen invasiven KZT festzustellen sind.<sup>47,50</sup> Dabei handelt es sich vor allem um die Überrepräsentation von Abschnitten des kurzen Arms von Chromosom 12, welche sich in verschiedenen Formen bei allen invasiven KZT finden lässt. In 80-90% der Fälle handelt es sich hierbei um eine oder mehrere Kopien eines Isochromosoms 12p,<sup>47,48,50</sup> wobei die Anzahl der Kopien in Nichtseminomen höher als in Seminomen scheint.<sup>51</sup> Wie bereits erwähnt, scheint die Polyploidie der KZT der Entstehung des Isochromosoms vorauszugehen.<sup>50</sup> Die verbliebenen 10-20% sind charakterisiert durch die Amplifikation bestimmter Abschnitte des Chromosoms 12p.<sup>47</sup> Zu diesen Abschnitten werden z.B. die Region 12p11.2-12.1, welche u.a. die Gene SOX5, JAW1 und K-RAS beinhaltet, oder die Region 12p13, die für Cyclin D2 kodiert, gezählt. Auch über Verluste von verschiedenen Tumorsuppressorgenen wie z.B. RB1, WT1 oder APC wurde berichtet.<sup>50</sup> Über die erwähnten genetischen Aberrationen hinaus wird dem Zugewinn bzw. dem Verlust verschiedener Chromosomen in der Onkogenese der KZT ebenfalls eine Bedeutung zugeschrieben. So fanden *van Echten et al. (1995)* in zytogenetischen Analysen an testikulären KZT regelmäßig Zugewinne der Chromosomen 7, 8, 21 und X sowie Verluste der Chromosomen 11, 13, 18 und Y.<sup>51</sup>

### 1.2. Zielsetzung

Das Wissen über die molekularen Veränderungen in humanen Tumoren und die genetischen Ursachen der malignen Transformation hat in den letzten zwei Jahrzehnten deutlich zugenommen. Zahlreiche technologische Errungenschaften haben dazu beigetragen, dass sowohl in der Forschung, aber auch in der Diagnostik, diese veränderten molekularen Eigenschaften umfassender charakterisiert werden konnten. Tumoren des Weichgewebes zeigen häufig spezifische chromosomale Aberrationen, v.a. Translokationen, mit entstehenden chimären Fusionsproteinen, aber auch chromosomale Zugewinne und Verluste. Neben der klassischen Chromosomenbänderung und der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird gerade auch die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) zur Detektion dieser Aberrationen genutzt. Sie stellen diagnostische Werkzeuge dar, die gerade in der Routinediagnostik von enormer Bedeutung sein können, besonders wenn sich histopathologische und klinische Eigenschaften eines Tumors sehr ähneln, wie zum Beispiel in der Gruppe der klein-, rund- und blauzelligen Tumoren. So sind in solchen Fällen weitere diagnostische Methoden notwendig, um die endgültige Diagnose zu sichern.

Die angesprochenen spezifischen genetischen Aberrationen bei Sarkomen und die betroffenen chromosomalen Regionen sind mittlerweile gut charakterisiert. Zur Detektion der jeweiligen Translokationen stehen bereits kommerzielle Sonden zur Verfügung. Die Anwendbarkeit der FISH in der Sarkomdiagnostik wurde in den Pathologischen Instituten der Universität Würzburg und des Robert-Bosch-Krankenhauses in Stuttgart bislang nicht überprüft. Entsprechende molekular-diagnostische Untersuchungen erfolgten bisher mittels quantitativer real-time PCR zum Nachweis der genetischen Aberrationen auf RNA-Ebene.

Oftmals steht für molekular-diagnostische Analysen jedoch nur Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes (FFPE) Gewebe zur Verfügung. Der Nachweis von translokationsbedingten Fusionsprodukten auf RNA-Ebene wird durch die verminderte RNA-Qualität aus FFPE-Material aber deutlich erschwert. Die FISH hingegen kann nahezu problemlos und mit hoher Sensitivität auch an FFPE-Gewebe durchgeführt werden, was für Lymphom-spezifische Aberrationen bereits gezeigt werden konnte. Die PCR hingegen ist gerade im Vergleich zur FISH die zeitaufwendigere molekular-diagnostische Methode, da zunächst sowohl die RNA-Extraktion, die cDNA-



Synthese als auch die PCR-Amplifikation erfolgen muss, was unter Umständen mehrere Tage in Anspruch nehmen kann. Letztendlich kann mittels FISH sogar zwischen Tumor- und reaktiven Parenchymzellen unterschieden werden.

Es wurde allerdings bislang keine größere Untersuchung durchgeführt, die die Spezifität und Sensitivität der Sonden untersuchte und dargelegt hat, ob in allen Fällen auswertbare Ergebnisse erzielt werden konnten.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich deshalb mit der Etablierung der Sarkom-spezifischen FISH an FFPE aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg und des Robert-Bosch-Krankenhauses in Stuttgart und ging der Frage nach, ob die Diagnosestellung bei Sarkom-Subtypen durch Verwendung eines Entitäts-spezifischen FISH-Sonden-Sets in der Routinediagnostik zu vereinfachen bzw. zu komplettieren ist. Dabei wurden die jeweiligen Sonden sowohl auf ihre Spezifität und Sensitivität als auch auf ihre positiven und negativen Vorhersagewerte in Bezug auf die Sarkom-spezifischen Aberrationen in einem retrospektiven und einem prospektiven Ansatz untersucht. Neben den strukturellen Alterationen der Sarkome, wie z.B. der t(X;18) beim Synovial-Sarkom, wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Nachweisbarkeit numerischer genetischer Aberrationen im FFPE-Material untersucht. Dies erfolgte exemplarisch bei Fällen hochdifferenzierter Liposarkome und deren charakteristischer MDM2-Amplifikation.

Die FISH-Ergebnisse wurden mit in einem Teil der Fälle verfügbaren Ergebnissen der quantitativen PCR abgeglichen, um die Frage zu beantworten, welche der beiden Methoden besser für die Aufgaben in der Routinediagnostik geeignet ist. Neben strukturellen und einfachen numerischen Aberrationen am Beispiel von Sarkomgewebe wurde auch die Möglichkeit untersucht, komplexe numerische Aberrationen zu detektieren. Dies erfolgte am Beispiel des für Keimzelltumoren typischen Isochromosoms 12p.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Untersuchungsmaterial

In der vorliegenden Studie wurde FFPE-Material verschiedener Sarkomsubtypen und Keimzelltumoren untersucht. Das Gewebematerial stammte aus dem Institut der Pathologie der Universität Würzburg, dem Institut für Pathologie des Robert-Bosch-Krankenhauses in Stuttgart und dem L'Ospedale San Raffaele in Mailand. Die jeweiligen Diagnosen wurden histologisch gesichert, wobei die Klassifikation nach den Kriterien der WHO<sup>4,13,24,31,38</sup> erfolgte.

Insgesamt wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit 71 Fälle aus den Jahren 2002 bis 2008 untersucht: 15 Sarkome der Ewing/PNET-Gruppe, 4 Klarzellsarkome, 9 Synovial-Sarkome, 4 alveoläre und 7 embryonale Rhabdomyosarkome, 8 atypische Lipome/hochdifferenzierte Liposarkome, 3 dedifferenzierte und 4 pleomorphe Liposarkome und 10 myxoide Liposarkome. Zusätzlich lagen 7 Keimzelltumoren zur Untersuchung vor, darunter 5 klassische Seminome, 1 embryonales Karzinom und 1 gemischter Keimzelltumor (70% embryonales Karzinom, 30% klassisches Seminom). Letztendlich wurden die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Cut off-Werte an den Geweben von fünf bzw. sieben tumorfreien, reaktiven Lymphknoten bestimmt.

Zu 20 der untersuchten Fälle lagen zusätzlich Ergebnisse einer quantitativen RT-PCR Analyse vor, die im Rahmen molekular diagnostischer Routineuntersuchungen aus Frischmaterial erhoben wurden und im Rahmen dieser Arbeit berücksichtigt werden konnten.

### 2.2. Chemikalien, Kits und Lösungen

bacterial artificial chromosome (BAC)-Klone	imaGenes, Berlin
BioNick™ Labeling System (#18247015)	Invitrogen, Karlsruhe
Biotin-16-dUTP	Roche, Mannheim
Blocking Reagent	Roche, Mannheim
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cot Human DNA	Roche, Mannheim
DAPI, 4',6-Diamidino-2-phenylindol	Roche, Mannheim
DNA Größenstandard 100bp	MBI-Fermentas, St. Leon-Roth

DNA Größenstandard 1kb	MBI-Fermentas, St. Leon-Roth
DNA Low Mass Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP-Mix	MBI-Fermentas, St. Leon-Roth
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure	AppliChem, Darmstadt
Ethanol	AppliChem, Darmstadt
FixoGum Rubber Cement	Marabuwerke, Tamm
LB Medium, LB Agar	Roche, Mannheim
Loading Dye Solution	MBI-Fermentas, St. Leon-Roth
Magnesiumchlorid 25mM	MBI-Fermentas, St. Leon-Roth
Mouse Monoclonal Anti-Digoxigenin Clone DI-2	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NP40, Igepol CA-630	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pepsin Kristallin	Sigma-Aldrich, Steinheim
RNase From Bovine Pancreas	Roche, Mannheim
RPMI-1640 (L-Glutamin/HEPES)	PAA, Cölbe (Kulturmedium für LK)
Salzsäure Maßlösung (1M)	AppliChem, Darmstadt
Texas Red Streptavidin	Axxora, Lörrach
TRIS, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	AppliChem, Darmstadt
Vectashield Mounting Medium USA	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Xylol Isomerengemisch	Jäckle, Nürnberg

Weitere handelsübliche Verbrauchsmaterialien von den Firmen Sarstedt und Roth wurden verwendet.

### **2.3. Sonden und Hybridisierungspuffer**

Vysis LSI® EWSR1 Dual Color Break Apart DNA Probe	Abbott, Wiesbaden
Vysis LSI® FKHR Dual Color Break Apart DNA Probe	Abbott, Wiesbaden
Vysis LSI® SYT Dual Color Break Apart DNA Probe	Abbott, Wiesbaden

Vysis LSI® CHOP Dual Color  
Break Apart DNAProbe Abbott, Wiesbaden

Vysis LSI® Myc (8q24) Spektrum Orange™  
DNA Probe Abbott, Wiesbaden

Vysis LSI® 12p Telomersonde  
spectrum green Abbott, Wiesbaden

Vysis LSI/WCP® Hybridization Buffer Abbott, Wiesbaden

#### 2.4. Puffer und Medien

Sörensen-Puffer:  
3,6g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
4,14g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
ad 2000ml  $\text{H}_2\text{O}$

10 x Puffer für Nick-Translation:  
500mM Tris-HCl pH 7.2  
100mM  $\text{MgSO}_4$   
1mM DTT

Hybridisierungsmix:  
50% Formamid  
10% Dextransulfat  
2x SSC

1% Paraformaldehyd:  
10ml 10% Paraformaldehyd  
8ml 1x PBS  
5ml 1 M  $\text{MgCl}_2$

SSC 20x  
ad 1L  $\text{H}_2\text{O}$   
88,20g Natriumacetat  
175,30g Natriumchlorid

10x PBS  
14,40g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
2,00g KCl  
2,00g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
80,00g NaCl

TNB Blocking Puffer:  
0,5g Blocking Reagent (Roche)  
10ml 10x TN Puffer  
ad 100ml  $\text{H}_2\text{O}$

10x TN Puffer:	1M Tris-HCl (pH 7,5) 1,5M NaCl
LB-Medium	25g Trockenmedium in 1l H <sub>2</sub> O 20min bei 121°C und 103kPa autoklavieren
LB-Agar	40g LB-Agar in 1l H <sub>2</sub> O 20min bei 121°C und 103kPa autoklavieren. Nach Abkühlung bis auf ca. 60°C wurde Chloramphenicol zum flüssigen Agar hinzugegeben. Anschließend wurde der Agar auf Kulturschalen verteilt; nach dem Erstarren bei RT wurden die Kulturschalen bei 4°C gelagert

## 2.5. Laborgeräte

Fluoreszenz-Mikroskop, ebq100 Geldokumentation	Carl Zeiss, Oberkochen Herolab UVT-28 SE Mitsubishi P91
Heizblock, Model 12895 Heizblock/Thermomixer	Medax Nagel, Kiel HLC Haep Labor Consult HBT 130 Eppendorf Thermomixer comfort
Kühlzentrifugen	Eppendorf 5417R Heraeus Sepatech Biofuge 15R
pH-Meter, pH 330	WTW, Weilheim
Pipetten (0,1-2,5µl, 0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Präzisionswaage, Adventurer, Typ ARRW60	Ohaus Corporation, Pine Brook, USA
Präzisionswaage, Adventurer, Typ AR1530	Ohaus Corporation, Pine Brook, USA

Trockenschrank, Typ UT 6060	Heraeus, Hanau
Wasserbad 37°C, Typ 3047	Köttermann Labortechnik, Uetze- Hämigen
Wasserbad 73°C, Typ FRG WB14	Memmert, Schwabach
Wasserbad 100°C, Typ 1002	GFL, Burgwedel
Vortex, Genie 2	Scientific Laboratories Inc., Bohemia, USA
Zentrifuge, Typ 5415D	Eppendorf, Hamburg

## 2.6. Datenbanken und Software

BAC-Klone	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/clone/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ projects/genome/clone/</a>
NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
Isis 4-Farb-Fluoreszenzbildsystem	MetaSystems, Altlußheim, Deutschland

## 2.7. Anfertigung von Zellkulturen aus Frischmaterial

Zur Inkulturnahme von Lymphozyten wurde ein Lymphknoten in einem sterilen Netz in eine Petrischale gegeben und abhängig von der Größe mit 10-20ml Kulturmedium (RPMI-1640) versetzt. Durch mechanisches Zerkleinern des Lymphknotens mit einer sterilen Pinzette konnten Lymphozyten aus dem Zellverband gelöst werden, während größere Bestandteile im Netz zurückblieben. Anschließend wurde das Kulturmedium in ein 10ml-Röhrchen überführt und bei RT 10min bei 1500rpm zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand komplett abgenommen und die viablen Zellen abhängig von der Größe des Zellpellets in 5-10ml Kulturmedium resuspendiert. Zum Auszählen der Zellen wurden 20µl der Zellsuspension mit 180µl Trypanblau versetzt, durch Vortexen gemischt und in der Zählkammer ausgewertet. Abhängig von der Diagnose erfolgte die Zugabe der erforderlichen Stimulantien und Inkubation der Kultur bei 37°C.

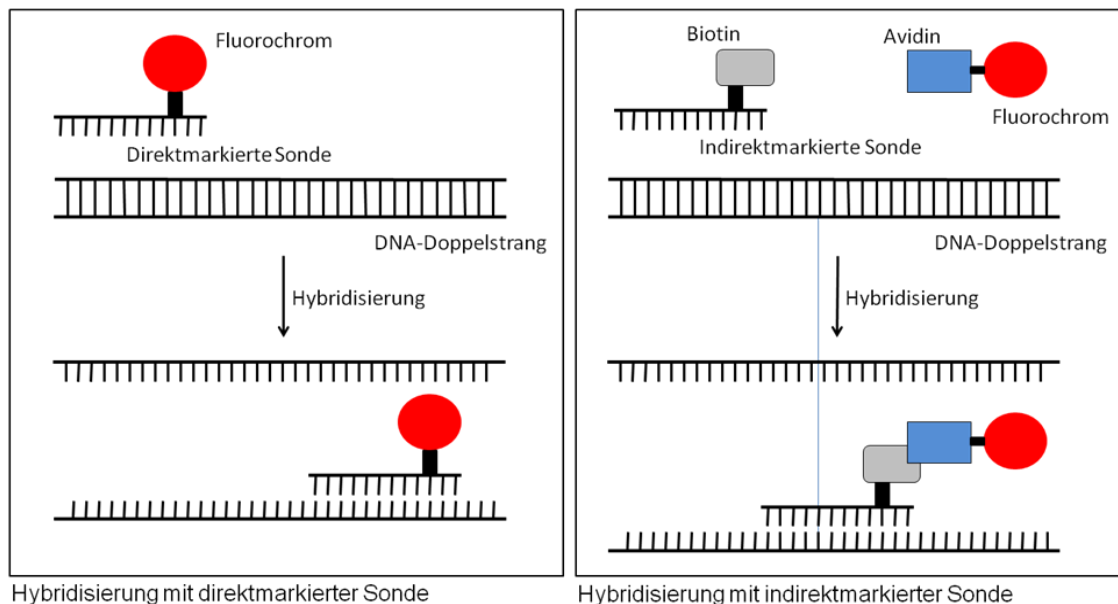
## **2.8. Kulturabbruch zur Gewinnung von Meta- und Interphasenmaterial**

Der Abbruch der Zellkultur erfolgte durch die Zugabe von 100µl Colcemid und anschließendem Inkubieren bei 37°C. Nach 30-minütiger Inkubationszeit wurde die Zellkultur in ein 10ml-Kulturröhrchen überführt und bei RT 10min bei 1000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zum unteren Markierungsrand abgenommen und verworfen, das Pellet in 0,075M KCl resuspendiert und für 20min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei 1000rpm. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden dann unter Vortexen tropfenweise mit einem eisgekühlten Methanol-Essigsäure-Gemisch (3:1) fixiert und erneut bei RT 10min bei 1000rpm zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstands wurde der Fixierungsschritt wiederholt, bis der Überstand klar war. Für die nachfolgende FISH wurden 20 bis 100µl der fixierten Zellsuspension auf Objektträger ausgetropft und getrocknet.

## **2.9. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) zur Detektion sarkom-spezifischer Chromosomen-Aberrationen**

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) ist eine zytogenetische Methode, die es ermöglicht, numerische und strukturelle Aberrationen wie Deletionen, Inversionen, Translokationen, Duplikationen oder Amplifikationen genetischen Materials nachzuweisen.<sup>52,56</sup> Sie beruht dabei auf dem Prinzip der Bindung einzelsträngiger DNA an komplementäre Zielsequenzen in Zell- oder Gewebepräparaten.<sup>53</sup> Ende der 60er Jahre wurden dazu bereits radioaktiv markierte Sonden (RISH = radioaktive-*in-situ*-Hybridisierung) verwendet,<sup>54,55</sup> welche im Vergleich zu den in den frühen 80er Jahren entwickelten nicht-isotopisch markierten Nukleotiden einige Nachteile aufwiesen. So sind neuere Sonden, die zur Detektion v.a. mit Fluorochromen, aber auch mit Enzymen oder metallischen Verbindungen gekoppelt sind, länger haltbar und besitzen eine höhere Signalauflösung und Sensitivität, sodass diesen heutzutage der Vorzug gegeben wird.<sup>56</sup> Die FISH findet dabei u.a. Anwendung in den Bereichen der pränatalen und Tumordiagnostik (Tumorzytogenetik), in der Bestimmung von Geschlechtschromosomen, der Genkartierung und der Lokalisation von Integrationsorten viralen Erbmaterials.<sup>57,58,59,60,61</sup>

Als Sonde werden bei der FISH DNA-Fragmente einer Länge von 200-400bp verwendet, die einen Kompromiss zwischen der Erzielung einer maximalen Hybridisierungsspezifität und einer geringen Hintergrundfärbung darstellt. Dabei können diese direkt oder indirekt Fluorochrom-markiert sein (s. Abb. 6). Dies bedeutet, dass spezielle Fluorochrome entweder direkt an die Nukleotide der Probe konjugiert sind oder dies durch Haptene erfolgt ist, die in weiteren Schritten durch fluorochromtragende, bindende Detektoren markiert werden. Häufig handelt es sich im letzteren Fall um Biotin als Konjugat (auch Digoxigenin, DNP und AAF werden verwendet), das mittels Avidin oder Anti-Biotin-Antikörpern (Anti-Konjugat-Antikörper), welche wiederum fluorochromgekoppelt sind, gebunden und nachweisbar wird.



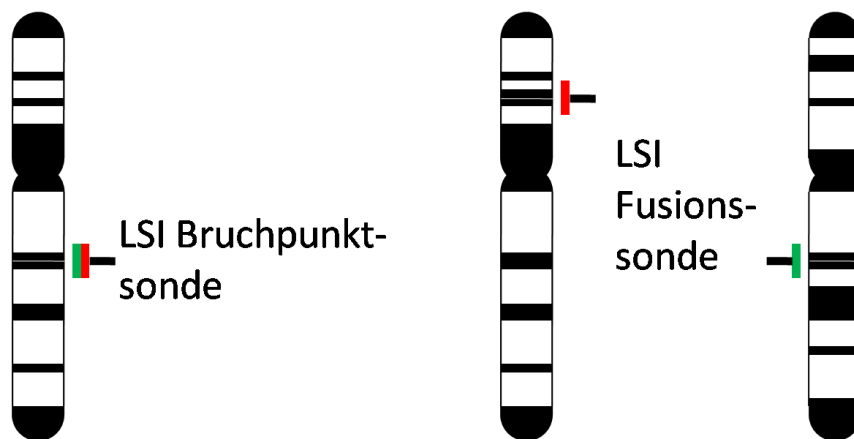
**Abbildung 6: Hybridisierung mit direkt und indirekt markierten Sonden**

Die Herstellung der jeweiligen Sonden kann dabei mittels „Nick-Translation“ oder „Random-Priming“ erfolgen. Wenn das zu untersuchende Präparat im Fluoreszenzmikroskop mit einer entsprechenden Wellenlänge beleuchtet und das Emissionsspektrum beurteilbar wird, erscheinen sowohl die direkt als auch die indirekt markierten Sonden im Sichtfeld als gut abgrenzbare, runde Lichtsignale verschiedener Farben, entsprechend der Auswahl der Fluorochrome und der Filter des Mikroskops.



Häufig verwendet werden dabei die fluoreszierenden Farbstoffe Fluorescein-Isothiocyanat/FITC (= grün), Texas Red (= rot), Rhodamine (=rot) und AMCA (=blau), welche in sogenannten Dual-Colour- bzw. Multi-Colour-Analysen gleichzeitig in einem Zellkern dargestellt werden können und zum Teil unter Verwendung spezieller Filter auch gleichzeitig sichtbar sind.<sup>57</sup>

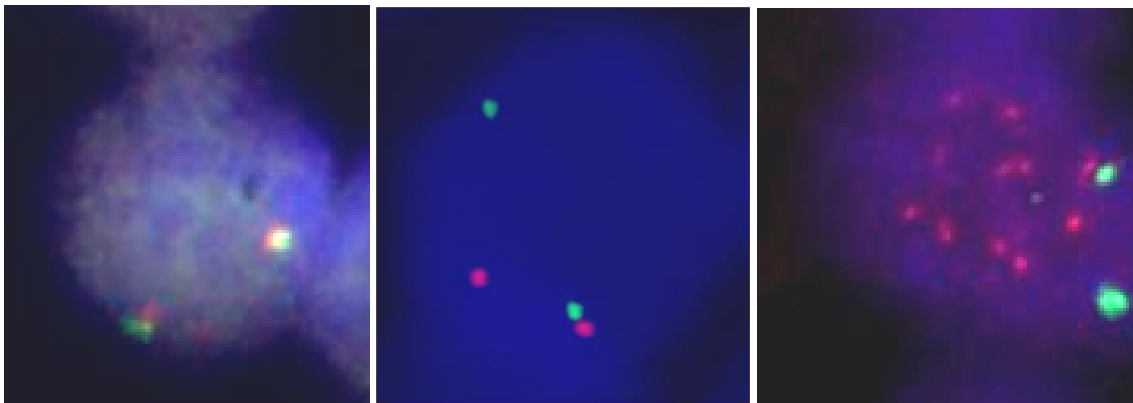
Grundsätzlich können die FISH-Sonden in drei Gruppen eingeteilt werden. Sonden, die gegen repetitive, zentromerische Sequenzen gerichtet sind, dienen u.a. dem Nachweis numerischer Aberrationen und werden als CEPs (chromosome enumeration probes) bezeichnet. Bei WCPs (whole chromosome paints) handelt es sich um Sonden, die gesamte Chromosomen färben und z.B. in der Detektion von Markerchromosomen eine Rolle spielen. Letztendlich binden LSIs (locus-specific identifiers) an ganz spezifische Loci chromosomaler DNA.<sup>62</sup> Letztere werden auch zur Analyse von chromosomalen Aberrationen (Translokationen, Amplifikationen, Deletionen) verwendet. Zur Translokationsdetektion gibt es zwei grundlegend verschiedene Sondentypen, die sowohl in ihrem Informationsgehalt und der Sensitivität als auch in der Einfachheit der Interpretation differieren.<sup>62</sup>



**Abbildung 7: schematische Darstellung der LSI Bruchpunkt- und LSI Fusionssonde**

Beide Sonden enthalten zwei DNA-Fragmente unterschiedlicher Farbe (meist rot und grün), binden jedoch in verschiedenen Lokalisationen. Fusions-Sonden markieren jeweils an zwei (oder mehr) Chromosomen eine Sequenz nah an den Bruchstellen der Translokation (s. Abb.7), so dass durch das Translokationsereignis das rote und das

grüne Fluoreszenzsignal zusammengeführt werden. Bruchpunkt-überspannende (break-apart-) Sonden flankieren am nicht translozierten Chromosom die Bruchstelle (s. Abb.7), so dass die Signale durch die Translokation räumlich getrennt werden. Der Nachteil ist daher, dass nur ein Translokationspartner der Aberration markiert wird; der Vorteil der Fusions-Sonden liegt also darin, dass die Wahrscheinlichkeit einer durch Zufall entstandenen positiven Signalkonstellation und somit die Rate falsch-positiver Ergebnisse geringer ist. Sie sind damit sensitiver als die Bruchpunkt-Sonden, die durch räumliche Struktur und Lokalisation der DNA im jeweiligen Zellkern eventuell getrennte Signale vortäuschen können. Gerade, um das zu vermeiden, ist es von enormer Wichtigkeit, in Relation zur Signalgröße einen Signalabstand sorgfältig zu definieren, der, wenn er überschritten wird, als positives Ergebnis zu werten ist. Bruchpunkt-Sonden sind jedoch auf der anderen Seite leichter auswertbar und decken eventuell verschiedene Translokations-Varianten ab, bei denen sich der Fusionspartner, jedoch nicht das markierte Chromosom, unterscheidet (s. Tab. 1). Doch wird dabei nicht der Translokationspartner definiert und auch kleinere Veränderungen wie Insertionen im flankierten DNA-Bereich können eventuell übersehen werden.<sup>53</sup>



**Abbildung 8: Charakteristische Signalkonstellationen in der FISH**

Links: Normale Signalverteilung einer LSI-Bruchpunktssonde mit zwei Fusionssignalen.

Mitte: Aberrante Signalkonstellation einer LSI-Bruchpunktssonde mit zwei getrennten Einzelsignalen und einem Fusionssignal.

Rechts: Zwei grüne Einzelsignale und eine Signal“wolke“ (rot) durch Amplifikation

Amplifikationen können mittels LSIs der entsprechenden Lokalisationen detektiert werden, wobei es zu einer enormen Zunahme der Signalhäufigkeit in betroffenen Zellen kommt. Um einen Zugewinn des gesamten Chromosoms auszuschließen, werden gleichzeitig CEPs verwendet. Eine aberrante Zelle weist somit mit entsprechender

Amplifikation und normalem Chromosomensatz zwei Signale der CEPs und viele Signale der LSIs auf (s. Abb. 8).<sup>53</sup>

Viele der angesprochenen Sonden sind bereits kommerziell erhältlich und können in verschiedenen FISH-Protokollen, v.a. auch an Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebettetem (FFPE) Gewebe, angewendet werden. Allen diesen Protokollen sind folgende Schritte gemeinsam: nachdem das Gewebe entwacht und entwässert wurde, folgt die thermische oder chemische Demaskierung der DNA, um diese für die Sonden zugänglich zu machen. Meist schließen sich proteolytische Schritte an, die die Hintergrundfärbung reduzieren und die Signalstärke erhöhen sollen. Nach Zugabe der Sonden wird bei einer Temperatur zwischen 70-90°C die genomische DNA denaturiert, um über Nacht die Hybridisierung bei 37-45°C erfolgen zu lassen. Als Kompromiss zwischen artifiziellem Signalverlust durch zu dünne Gewebeschnitte und proportionaler Zunahme der Auswertungsschwierigkeit durch Kernüberlappungen mit der Gewebedicke werden allgemein 4-6µm dicke Schnitte präferiert. Um falsch-positive Beurteilungen zu vermeiden, wird für jede angewendete Sonde ein Schwellenwert bestimmt, bei dem die Zahl positiver Signalkonstellationen in gesundem Gewebe ermittelt wird. Dazu werden mindestens fünf Negativkontrollen, im Fall von Paraffin-fixiertem Gewebe häufig lymphatisches Gewebe wie Tonsillen, hybridisiert und der Anteil - zufällig - positiver Signalkonstellationen ermittelt. Der Durchschnitt der Anteile dieser Konstellationen in den Kontrollfällen und die dazu addierte dreifache Standardabweichung ergeben den sogenannten „Cut-off-Wert“ der Probe, über dem die untersuchte Aberration in einem untersuchten Gewebe als bestätigt gilt.<sup>53</sup>

Verglichen mit konventionellen zytogenetischen Methoden muss zur Durchführung der FISH keine Zellkultivierung erfolgen, die Diagnostik kann sowohl an Meta- aber auch an Interphasekernen verschiedenster Gewebe erfolgen. Ein wesentlicher Vorteil der FISH ist dabei die Anwendbarkeit der Methode an FFPE-Material.<sup>52</sup>

### **2.10. Selektion der Klone**

Zur Herstellung von DNA-Sonden werden spezifische in einen Vektor klonierte DNA-Sequenzen in Wirtszellen (*E.coli*) amplifiziert, um anschließend die gewünschte Plasmid-DNA zu isolieren und Hapten-tragende Nukleotide zur Detektierbarkeit einzubauen. Als solche Vektoren dienen dabei u.a. künstliche Bakterien- und

Phagenchromosome (BAC: „Bacterial Artificial Chromosome“; PAC: „Phage 1 Artificial Chromosome“), die in E.coli-Zellen exprimiert werden können.

Die verwendeten BAC-Klone RP11-775J10, RP111022D15, RZPDB737F092075D6, RZPDB737D052143D6 und RZPDB737D122198D6, die die chromosomale Region 12q14.3-q15 abdecken, in der sich das MDM2-Gen befindet, wurden aus der NCBI-Datenbank ausgewählt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/clone>). Die chloramphenicolresistenten Klone wurden aus der RP11-Bibliothek der Firma Imagenes (Berlin) bestellt. Als Kontrollsonde für 12q-Amplifikationen diente die zu Chromosom 17p13.3 komplementäre DNA-Sonde (BAC: RP11-431C14, *HIC1*).

### **2.11. Bakterienanzucht und Plasmidisolierung**

Die Bakterienklone für die Sondenherstellung zur Hybridisierung des MDM2-Gens wurde unter Antibiotika-(Chloramphenicol-)Selektion in Luria-Bertani (LB)-Medium angezogen, um diese anschließend in NaOH/SDS bei Gegenwart von RNase A<sup>63,64</sup> zu lysieren. Die Plasmid-DNA konnte dann, dem „Low Copy Plasmid Purification Protocol“ des verwendeten Isolations-Kits (Machery-Nagel) folgend, isoliert und aufgereinigt werden.

### **2.12. Markierung der BAC-DNA durch Nick-Translation**

Die Nick-Translation basiert auf einem Prinzip, bei dem die DNase Einzellstrangsnitte, sogenannte „nicks“, setzt und die Nukleotide des Strangs dazwischen komplementär durch die Polymerase I in einer Synthesereaktion durch neue markierte und nichtmarkierte Nukleotide ersetzt werden.<sup>65</sup> Dabei wurden Biotin- oder Digoxigenin-gekoppelte dUTPs verwendet, die in der späteren Hybridisierungsreaktion mittels Texas-Red-konjugiertem Avidin bzw. FITC-gekoppelten anti-Digoxigenin detektiert wurden.

#### **a) Biotin-Markierung**

Die Biotin-Markierung der DNA erfolgte mit einem Nick-Translations-Kit der Firma Invitrogen. Dabei wurden 1µg DNA 5µl 10x dNTP-Biotin-Mix, 5µl Enzym-Mix, 1µl Polymerase I (Promega) und 25µl dH<sub>2</sub>O zugegeben und der Ansatz für 50 Minuten bei 16°C inkubiert. Die DNA-Fragmentgröße wurde daraufhin durch eine DNA-

Gelelektrophorese kontrolliert, wobei eine Größe zwischen 250-500bp angestrebt wurde. Die Inkubationszeit konnte individuell verlängert oder die Reaktion durch Zugabe von 5µl Stop-Puffer beendet werden.

### **b) Digoxigenin-Markierung**

Zur Markierung der Sonden mit Digoxigenin-16-dUTP (Roche) wurde zunächst ein Nukleotid-Mix hergestellt, der aus je 0,25mM dATP, dCTP, dGTP, sowie 0,1mM dTTP und 0,1mM dig-16-dUTP bestand. 5µl des Nukleotid-Mix, 5 µl β-Mercaptoethanol, 5µl 10 x Puffer wurden mit 1µg DNA und 5µl Enzym-Mix (0,5U/µl DNA Polymerase I, 0,007U/µl DNase I) versetzt und auf 50µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Anschließend konnte die Probe bei 16°C für 40min inkubiert werden. Nach ausreichender Inkubationszeit und Kontroll-Gelelektrophorese wurde die Reaktion mit 2µl 0,2 M EDTA beendet.

### **c) Ethanol-Fällung**

Nach Zugabe von 2µl Sheared Salmon sperm DNA (10mg/ml, Eppendorf), 6µl Cot DNA (1µg/µl, Roche), 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat und dem 2,5-fachen Volumen 100% Ethanol wurde die markierte DNA für 30 Minuten bei -70°C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 14000rpm und 4°C und die anschließende Abnahme des Überstand. Nach Zugabe von 250µl 70% Ethanol wurde der Ansatz für 5 Minuten bei RT und 14000rpm abermals zentrifugiert, der Überstand entfernt und getrocknet. Dem DNA-Pellet wurden 40µl Hybridisierungsmix zugegeben. Die Resuspension erfolgte über Nacht im Thermo-Schüttler bei einer Umdrehung von 300rpm und 37°C.

### 2.13. DNA-Sonden zur Detektion der spezifischen Alterationen

Tabelle 1: verwendete DNA-Sonden zur Detektion spezifischer Alterationen

Sonde	Detektion	Entitäten
<b>LSI EWSR1 BAP</b>	t(11;22)(q24;q12) t(21;22)(q22;q12) t(12;22)(q13;q12)	Ewing-Sarkom Ewing-Sarkom Klarzell-Sarkom
<b>LSI CHOP BAP</b>	t(12;16)(q13;p11)	myxoides Liposarkom
<b>LSI SYT BAP</b>	t(X;18)(p11.2;q11.2)	Synovial-Sarkom
<b>LSI FKHR BAP</b>	t(2;13)(q35;q14) t(1;13)(p36;q14)	alveoläres Rhabdomyosarkom alveoläres Rhabdomyosarkom
<b>LSI RP11-775J10</b>	Amplifikation 12q14.3-q15	atypisches Liposarkom dedifferentiertes Liposarkom
<b>LSI RP11-431C14</b>	17p13.3 Chromosomensatz -Kontrolle	atypisches Liposarkom dedifferentiertes Liposarkom
<b>LSI 12p-Telomersonde</b>	12p-Zugewinn	Keimzelltumor
<b>LSI Myc</b>	8q24 Chromosomensatz -Kontrolle	Keimzelltumor

### 2.14. Präparation der Objektträger und Hybridisierung

Von den paraffinfixierten Geweben wurden 4µm-Schnitte angefertigt und diese auf silanisierte Objektträger (OT) übertragen. Zur Verflüssigung des Paraffinwachses wurden diese für mindestens eine Stunde bei 80°C auf eine Heizplatte gelegt, um ihn dann anschließend für 20min bei Raumtemperatur (RT) in Xylol zu lösen. Durch eine absteigende Alkoholreihe (100%/90%/70%) folgte die Wässerung der OT. Zur thermischen Demaskierung der DNA wurden die OT in Tris-EDTA-Puffer (50mM Tris, 2mM EDTA, pH 9.0) 10min in einem Wasserbad bei 100°C inkubiert, anschließend zur Abkühlung bei RT noch weitere 10min in dem Puffer stehen gelassen. Es folgte die proteolytische Behandlung der OT für 10min in Pepsinlösung (5mg Pepsin/100ml 0,01M HCl) bei 38°C im Wasserbad. Zur pH-Neutralisierung wurden die OT bei RT für weitere 10 Minuten in 1xPBS gewaschen. Durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%/90%/100%) folgte die Entwässerung der OT, um diese dann für 10 Minuten bei 37°C trocknen zu lassen. Nach Zugabe der DNA-Sonden wurden die OT mit Deckgläschen versehen, mit Fixogum abgedichtet und die DNA für 10min auf einer Heizplatte bei 80°C denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte anschließend über Nacht in einer feuchten Hybridisierungskammer bei 37°C.

## 2.15. Detektion

### a) Direkt gelabelte Sonden

Nach mindestens 12-stündiger Hybridisierung wurden die OT nach Entfernung der Deckgläschen für 3 Minuten in einer Waschlösung (20xSSC, ddH<sub>2</sub>O, NP-40) bei 70-73°C, pH 7,0-7,5, inkubiert, um nicht-gebundene Sonden-Überreste zu entfernen. Durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%/90%/100%) folgte die Entwässerung der OT, welche anschließend für 10min bei 37°C trockneten. Zur Kerngegenfärbung und Fluoreszenzverstärkung wurden auf jedes Gewebefeld ein bis zwei Tropfen eines Gemisches aus DAPI und Vectashield (Mounting Medium) gegeben. Die abgedunkelte Lagerung der hybridisierten OT erfolgte im Kühlschrank bei 4°C.

### b) Indirekt gelabelte Sonden

Nach mindestens 12-stündiger Hybridisierung wurden die OT nach Entfernung der Deckgläschen dreimal für jeweils 3min in einer Waschlösung (95ml dH<sub>2</sub>O, 2ml 20xSSC, 300µlNP-40) bei 72°C gewaschen. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper in den Folgeschritten zu vermeiden, wurden die OT für 45 min bei 37°C mit TNB-Puffer vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Zugabe der entsprechenden Antikörper und der assoziierten Fluorochrome. Dabei wurden die biotinylierten Sonden durch Texas Red-Streptavidin, biotinyliertes Goat-anti-Streptavidin und nochmals Texas Red-Streptavidin (Axxora) detektiert. Die Amplifikation der Digoxigenin-markierten Sonden erfolgte mit monoklonalem Mouse anti-Digoxigenin (Sigma), FITC-konjugiertem Rabbit-anti-Mouse Immunglobulin (Dako) und FITC-konjugiertem Goat-anti-Rabbit Immunglobulin (Axxora). Nach der Zugabe der Antikörper erfolgte jeweils eine Inkubation bei 37°C für 30 Minuten. Im Anschluss an die letzte Inkubationsphase wurden die OT zweimal in 1xTN-Puffer für jeweils 10 Minuten gewaschen. Durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%/90%/100%) folgte die Entwässerung der OT. Diese trockneten anschließend für 10 Minuten bei 37°C. Zur Kerngegenfärbung und Fluoreszenzverstärkung wurden auf jedes Gewebefeld ein bis zwei Tropfen DAPI + Vectashield (Mounting Medium) gegeben. Die abgedunkelte Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei 4°C.

## 2.16. Fluoreszenz-Mikroskopie und Auswertung

Das hybridisierte Material wurde mittels eines mit Texas Red-, FITC-, DAPI- und Triple-Filtern ausgestatteten Fluoreszenzmikroskop begutachtet. Dazu wurden Zellkerne und deren Signalkonstellationen über den gesamten Gewebeschnitt hinweg verteilt in vier Arealen beurteilt, um eventuelle Tumorsubklone nicht zu übersehen oder falsch zu beurteilen.

Wenn unter Verwendung der Bruchpunkt-Sonden zwei zugehörige Signale einen größeren Abstand als den zweifachen eigenen Durchmesser hatten, wurde dies als Bruch und somit der Zellkern als aberrant gewertet. Es wurden alle Zellkerne als negativ beurteilt, die zwei Fusionssignale aufwiesen. Als positiv gezählt wurden folgende Konstellationen: ein Fusionssignal mit zwei einzelnen Signalen und ein Fusionssignal mit nur einem weiteren Einzelsignal.

Zuvor wurden von allen verwendeten Bruchpunkt-Sonden an reaktiven lymphatischen Geweben Schwellenwerte (Cut off-Werte) erhoben. Dazu wurden von fünf nicht-neoplastischen lymphatischen Gewebeschnitten Hybridisierungen mit der jeweiligen Sonde durchgeführt und die Ergebnisse auf Signalkonstellationen, die Bruchereignisse beschreiben, untersucht. Der Durchschnitt positiver Zellkernanteile wurde mit der dreifachen Standardabweichung addiert und so der Cut off-Wert für die positive Signalkonstellation berechnet.

Zur ebenso notwendigen Erhebung eines Schwellenwertes, ab dem ein Gewebe als positiv für den Zugewinn eines chromosomalen Abschnitts zu bewerten ist, wurde entsprechend vorgegangen. Dabei wurde jeder Zellkern als verändert gewertet, der über die normalen zwei Einzelsignale hinaus zusätzliche Einzelsignale aufwies. Die nachfolgenden Hybridisierungen an Tumorgewebematerial wurden gleichermaßen ausgewertet. Um einen Zugewinn des gesamten Chromosomensatzes auszuschließen, wurden die Tumorgewebe gleichzeitig mit einer Kontrollsonde hybridisiert. Hierzu wurde eine aus dem BAC-Klon RP11-431C14 hergestellte und mit Digoxigenin konjugierte Sonde verwendet, die den Bereich 17p13.3 und das beinhaltete Gen HIC1 detektiert. Zur Detektion wurde das Fluorochrom FITC verwendet. Ein Zellkern wurde nur als positiv für den singulären Zugewinn auf 12q gewertet, wenn die Zahl der Zielsignale die der Kontrollsignale überschritt.



Die nachfolgenden Hybridisierungen an Tumorgewebematerial wurden ausgewertet, indem mindestens 100 Zellkerne in über den OT verteilten Arealen begutachtet wurden. Wenn der Anteil von Zellen mit positiven Signalkonstellationen über dem Cut off-Wert lag, galt der Tumor als rein mathematisch positiv für die Translokation bzw. die Amplifikation. Die Bilddokumentation erfolgte unter Verwendung der Isis-Software.

### **2.17. Bestimmung der FISH-Effizienz**

Aus den Ergebnissen der Hybridisierungen wurden die Werte für Sensitivität, Spezifität, Vorhersagewerte und der Effizienz berechnet. Dabei wurden folgende Berechnungen angestellt: Sensitivität = richtig-positive/(richtig-positive + falsch-negative) Fälle, Spezifität = richtig-negative/(richtig-negative + falsch-positive) Fälle, positiver Vorhersagewert = richtig-positive/(richtig-positive + falsch-positive) Fälle, negativer Vorhersagewert = richtig-negative/(richtig-negative + falsch-negative) Fälle und Effizienz = (richtig-positive + richtig-negative)/Gesamtzahl der Fälle. Die Beurteilung von richtig- und falsch-positiven bzw. -negativen Ergebnissen ergab sich aus der endgültigen pathologischen Diagnose als Goldstandard.

### 3. Ergebnisse

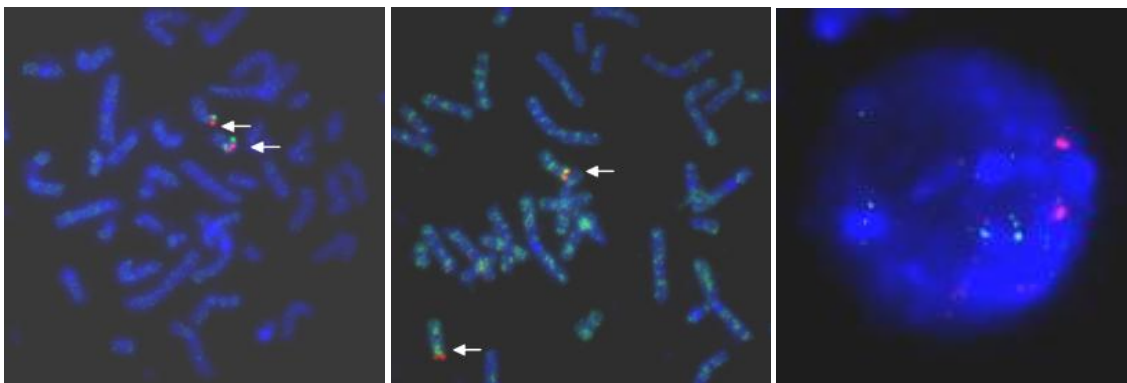
#### 3.1. Herstellung und Validierung Locus-spezifischer DNA-Sonden

##### 3.1.1. Herstellung von LSI-Sonden mittels Nick-Translation

Zur Detektion sarkomspezifischer chromosomaler Aberrationen stehen schon einige FISH-Sonden kommerziell zur Verfügung, doch gerade zum Nachweis numerischer Aberrationen noch nicht für alle chromosomalen Abschnitte. In diesem Zusammenhang konnte im Rahmen dieser Arbeit zum Nachweis von 12q-Amplifikationen eine MDM2-spezifische DNA-Sonde mittels Nick-Translation (s. Abschnitt 2) erfolgreich hergestellt werden, insbesondere zur Verwendung an FFPE-Geweben von hoch- und dedifferenzierten Liposarkomen.

##### 3.1.2. Bindungsspezifität der LSI-Sonden für MDM2 (12q14.3)

Zur Testung der Bindungsspezifität der eigens hergestellten DNA-Sonden zum Nachweis von 12q-Amplifikationen wurde eine in Carnoy (Methanol-Essigsäure 100%, 3:1) fixierte Suspension reaktiver Lymphknoten verwendet, welche sowohl Metaphasen als auch Interphasenkerne enthält. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden anschließend die Signalkonstellationen des Präparats beurteilt (s. Abb. 9).



**Abbildung 9: Testung an Metaphasechromosomen und Interphasezellkernen**

- Links: Spezifische Bindung der HIC1-Sonde (rot- und grün-markiert) in Chromosom 17p13.3 (s. Pfeil) im Metaphasen-Präparat
- Mitte: Spezifische Bindung der rot-markierten MDM2-Sonde an Chromosom 12q14 (s. Pfeil) und unspezifische Bindung der grün-markierten MDM2-Sonde an Metaphasechromosomen
- rechts: Spezifische Bindung der rot-markierten MDM2- und der grün-markierten HIC1-Sonde in Interphasezellkernen

Von den aus den in Abschnitt 2.10. aufgeführten BAC-Klonen hergestellten MDM2-Sonden zeigte nur die RP11-775J10-Sonde zwei Einzelsignale auf Chromosom 12q in der Metaphasenpräparation und ebenfalls zwei Signale in den Interphasekernen. Die anderen MDM2-Sonden zeigten unspezifische Signalkonstellationen und wurden daraufhin nicht weiter verwendet.

Als ebenso spezifisch wie die RP11-775J10-Sonde konnte die RP11-431C14-Sonde für 17p13.3 gewertet werden. Auch bei anschließender Hybridisierung der Sonden an FFPE-Gewebe reaktiver Lymphknoten zeigten sich für diese beiden Sonden ebenfalls jeweils zwei Einzelsignale pro Zellkern, so dass diese Sonden in den verschiedenen Ansätzen dieser Arbeit verwendet wurden.

### 3.1.3. Ermittlung der Schwellenwerte zum Nachweis von Bruchereignissen bei Sarkom-spezifischen Aberrationen

An fünf bzw. sieben Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten reaktiven lymphatischen Geweben tumorfreier Lymphknoten (LK1-LK7) wurden jeweils die Cut off-Werte für die einzelnen Sonden ermittelt.

**Tabelle 2: Hybridisierungsergebnisse der Negativkontrollen (LK1-LK7).**

	LSI CHOP	LSI EWSR1	LSI SYT	LSI FKHR	LSI-MDM2 (RP11-775J10)
<b>LK1</b>	11%	11%	3%	2%	9%
<b>LK2</b>	7%	7%	3%	2%	6%
<b>LK3</b>	7%	4%	2%	1%	9%
<b>LK4</b>	4%	5%	4%	1%	6%
<b>LK5</b>	6%	4%	6%	3%	6%
<b>LK6</b>	6%	3%	5%	0%	-
<b>LK7</b>	15%	3%	1%	4%	-

% = Anteil der ausgewerteten Zellkerne mit der für die jeweilige Aberration typischen Signalkonstellation

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Cut off-Fälle für die einzelnen Sonden gegenübergestellt. Die aus diesen Ergebnissen berechneten Cut-off-Werte lagen für die jeweiligen Sonden zwischen 6 und 20% (s. Tab. 3).

Tabelle 3: Cut-off-Werte der FISH-Sonden

LSI-Sonde	Cut-off-Wert (=MW + 3x STABW) positiv ab
LSI SYT-Bruchpunktsonde	9%
LSI EWSR1- Bruchpunktsonde	14%
LSI FKHR- Bruchpunktsonde	6%
LSI CHOP- Bruchpunktsonde	20%
LSI MDM2 (RP11-775J10)	13%
17p-Sonde (RP11-431C14)	13%
LSI C-myc (8q24)	9%

MW = Mittelwert, STABW = Standardabweichung

### 3.2. Nachweis struktureller und numerischer sarkom-spezifischer Alterationen an FFPE-Gewebe

#### 3.2.1. Fallauswahl

Um die Zuverlässigkeit der spezifischen FISH-Sonden zur Detektion von chromosomalen Aberrationen zu beschreiben, wurde zunächst eine Gruppe diagnostizierter Sarkomfälle mit den entsprechenden Bruchpunkt-Sonden bzw. der lokusspezifischen MDM2-Sonde analysiert.

In diesem - retrospektiven - Ansatz wurden 48 Fälle von myxoid/rundzelligen Liposarkomen (8/48), Ewing-Sarkomen (13/48), Klarzell-Sarkomen (4/48), alveolären (3/48) und embryonalen (5/48) Rhabdomyosarkomen und Synovial-Sarkomen (7/48) unter Verwendung der entsprechenden LSI CHOP-, LSI EWSR1-, LSI SYT-, LSI FKHR-Bruchpunkt-Sonden (Abbott) zur Detektion der jeweiligen Translokationen untersucht. Zur Detektion der Amplifikation des MDM2-Gens wurden atypische Lipome/hochdifferenzierte Liposarkome (6/48), ein dedifferenziertes (1/48) sowie ein pleomorphes (1/48) LS mittels einer Locus-spezifischen MDM2-Sonde untersucht.

### 3.2.2. Nachweis sarkom-spezifischer Aberrationen mittels FISH im retrospektiven Ansatz

Die Ergebnisse aller Hybridisierungen des retrospektiven Ansatzes sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

**Tabelle 4: Ergebnisse retrospektiver Ansatz**

Fall-Nr.	Histolog. Diagnose	LSI CHOP	LSI EWSR1	LSI SYT	LSI FKHR	LSI RP11-775J10	Q-PCR-Nachweis
R1	gut-diff./atyp. LS					86%	
R2	gut-diff./atyp. LS					71%	
R3	gut-diff./atyp. LS					84%	
R4	gut-diff./atyp. LS					78%	
R5	gut-diff./atyp. LS					72%	
R6	gut-diff./atyp. LS					8%	
R7	dediff. LS	14%				17%	
R8	myxoides LS	78%					
R9	myxoides LS	93%					
R10	myxoides LS	6%					
R11	myxoides LS	87%					
R12	myxoides LS	94%					t(12;16)
R13	myxoides LS	8%					t(12;16)
R14	myxoides LS	95%					
R15	myxoides LS	94%					t(12;16)
R16	pleomorphes LS	7%				4%	
R17	Ewing-Sarkom		96%				
R18	Ewing-Sarkom		87%				
R19	Ewing-Sarkom		93%				
R20	Ewing-Sarkom		76%				t(11;22)
R21	Ewing-Sarkom		87%				
R22	Ewing-Sarkom		72%				
R23	Ewing-Sarkom		75%				
R24	Ewing-Sarkom		92%				
R25	Ewing-Sarkom		85%				t(11;22)
R26	Ewing-Sarkom		69%				
R27	Ewing-Sarkom		89%				t(11;22)
R28	Ewing-Sarkom		84%				t(11;22)
R29	Ewing-Sarkom		78%				
R30	Klarzell-Sarkom		85%				

% = Anteil der ausgewerteten Zellkerne mit der für die jeweilige Aberration typischen Signalkonstellation

**Tabelle 4: Ergebnisse retrospektiver Ansatz (Fortsetzung)**

Fall-Nr.	Histolog. Diagnose	LSI CHOP	LSI EWSR1	LSI SYT	LSI FKHR	LSI RP11-775J10	Q-PCR- Nachweis
R31	Klarzell-Sarkom		89%				t(12;22)
R32	Klarzell-Sarkom		88%				t(12;22)
R33	Klarzell-Sarkom		94%				t(12;22)
R34	Synovial-Sarkom			7%			t(X;18)
R35	Synovial-Sarkom			95%			t(X;18)
R36	Synovial-Sarkom			96%			t(X;18)
R37	Synovial-Sarkom			94%			t(X;18)
R38	Synovial-Sarkom			91%			
R39	Synovial-Sarkom			99%			t(X;18)
R40	Synovial-Sarkom			87%			
R41	alveoläres RMS				75%		
R42	alveoläres RMS				47%		
R43	alveoläres RMS				70%		
R44	embryonales RMS				5%		
R45	embryonales RMS				4%		
R46	embryonales RMS				2%		
R47	embryonales RMS				4%		
R48	embryonales RMS				2%		

% = Anteil der ausgewerteten Zellkerne mit der für die jeweilige Aberration typischen Signalkonstellation

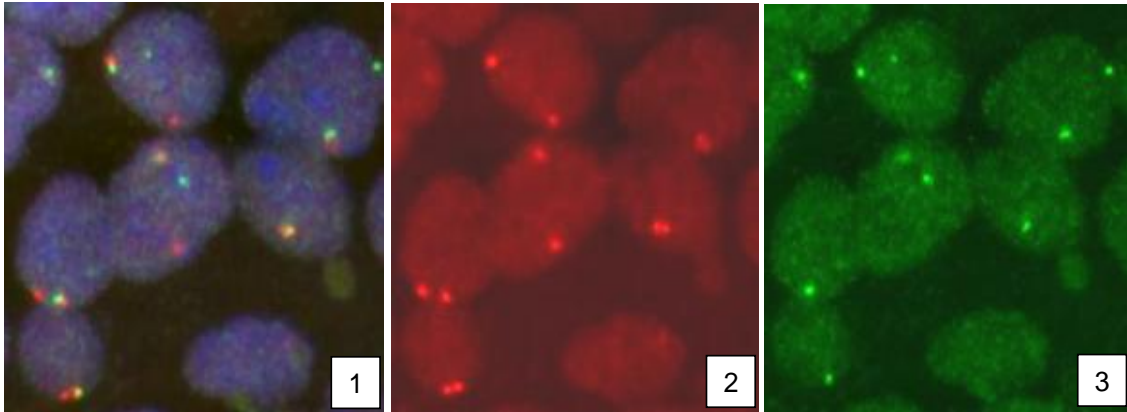
In sechs der acht MRLS (75%) konnte die CHOP-Translokation mittels der CHOP-Bruchpunkt-Sonde und einer jeweiligen Positivität zwischen 78% und 95% (Mittelwert, MW = 90%) nachgewiesen werden, die verbliebenen zwei Fälle zeigten eine normale Signalverteilung (s. Tab. 4).

Die für ES spezifischen EWSR1-Translokationen t(11;22) oder t(21;22) wurden in allen 13 untersuchten Tumorgeweben (100%) mittels der EWSR1-Bruchpunkt-Sonde nachgewiesen, wobei sich die Translokationen des EWSR1-Gens in einem Anteil von Zellkernen zwischen 69% und 96% (MW = 83%) zeigte (s. Tab. 4).

Die für KZS spezifische t(12;22) konnte ebenfalls in allen vier untersuchten Tumoren (100%) detektiert werden, wobei der Anteil positiver Signalkonstellationen bei wenigstens 85% und höchstens 95% (MW = 89%) der Zellkerne lag (s. Tab. 4).

Die Hybridisierung mittels der FKHR-Bruchpunkt-Sonde zur Detektion der für ARMS typischen t(2;13) erzielte in allen drei ARMS ein positives Ergebnis (100%). Die Translokation konnte in keinem ERMS nachgewiesen werden (s. Tab. 4). Der Anteil der

in den ARMS detektierten positiven Signalkonstellationen lag zwischen 47% und 75% (MW = 64%) der Zellkerne.



**Abbildung 10: Exemplarische Darstellung eines EWSR1-Bruchereignisses in einem Ewing-Sarkom.**

(1) Überlagerung des DAPI-, Texas Red- und FITC-Filter.

(2) Signalverteilung im Texas Red-Filter.

(3) Signalverteilung im FITC-Filter.

In sechs von sieben untersuchten SS (86%) wurde die t(X;18) in einem jeweiligen Anteil zwischen 87% und 99% (MW = 94%) der Zellkerne nachgewiesen, während ein Fall eine negative Signalkonstellation zeigte (1/7, 14%) (s. Tab. 4).

Die MDM2-Amplifikation konnte sowohl in fünf von sechs ALS (83%) wie auch in dem DLS (100%) nachgewiesen werden, wohingegen ein ALS keine Amplifikation von MDM2 aufwies (1/6, 17%) (s. Tab. 4). Der Anteil der positiven Signalkonstellationen lag hierbei in den positiven Fällen zwischen 17% und 86% (MW = 68%) der ausgewerteten Zellkerne. In den positiven Fällen wurden verschiedene Amplifikationsgrade gesehen, von 5-10 Einzelsignalen einerseits bis hin zu „Signalwolken“ andererseits.

### 3.2.3. Vergleich der Ergebnisse von FISH und RT-PCR

Bei 15 der 48 Fälle lagen Ergebnisse zur Detektion von sarkom-spezifischen Fusionsgenen mittels quantitativer RT-PCR vor. Diese Untersuchungen waren im Rahmen der routinediagnostischen Aufarbeitung der Sarkome bereits im Vorfeld der vorliegenden Arbeit durchgeführt worden. Übereinstimmende Ergebnisse von FISH und RT-PCR konnten hierbei in 13 der 15 Fälle (87%) gezeigt werden. Obwohl mittels RT-PCR die t(12;16) im myxoiden LS R13 und die t(X;18) im SS R34 nachweisbar war,

konnte ein entsprechendes Bruchereignis unter Verwendung der CHOP- bzw. SYT-Bruchpunktsonden mittels FISH in diesen Fällen nicht nachgewiesen werden.

### 3.2.4. Sensitivität der Sarkom-spezifischen DNA-Sonden

Zur Bestimmung der Sensitivität, des positiven Vorhersagewerts und der Effizienz der Sarkom-spezifischen DNA-Sonden im retrospektiven Ansatz wurde die nach WHO-Kriterien gestellte Diagnose der Tumoren als Goldstandard verwendet. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Sensitivität, die richtig- und falsch-positiven sowie die richtig- und falsch-negativen Ergebnisse.

**Tabelle 5: Sensitivität, positiver Vorhersagewert und Effizienz im retrospektiven Ansatz**

	<b>MRLS CHOP (n=8)</b>	<b>ES/KZS EWSR1 (n=13)</b>	<b>SS SYT (n=7)</b>	<b>ARMS FKHR (n=3)</b>	<b>ALS/DLS RCPI-11 775J10 (n=7)</b>	<b>PCR (n=15)</b>
<b>richtig-positiv</b>	6	13	6	3	6	15
<b>falsch-positiv</b>	0	0	0	0	0	0
<b>richtig-negativ</b>	0	0	0	0	0	0
<b>falsch-negativ</b>	2	0	1	0	1	0
<b>Sensitivität</b>	75%	100%	86%	100%	86%	100%
<b>Positiver Vorhersagewert</b>	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<b>Effizienz</b>	75%	100%	86%	100%	86%	100%

### 3.2.5. Nachweis sarkom-spezifischer Aberrationen mittels FISH im prospektiven Ansatz

Im prospektiven Ansatz wurden 16 Sarkome ohne Kenntnis der jeweiligen Diagnose mit allen zur Verfügung stehenden DNA-Sonden hybridisiert, um anschließend das FISH-Ergebnis mit der in der Routinediagnostik gesicherten Diagnose abzugleichen. Wie in Tabelle 6 dargestellt, wurden alle Fälle mit den entsprechenden Sonden zum Nachweis der Sarkom-spezifischen Alterationen untersucht.



**Tabelle 6: Ergebnisse im prospektiven Ansatz basierend auf molekularbiologischen Untersuchungen**

Fall-Nr.	LSI CHOP	LSI EWSR1	LSI SYT	LSI FKHR	MDM2	Q-PCR-Nachweis	Diagnose nach Zytogenetik
P1	11%	4%	10%	6%	87%		ALS/DLS
P2	6%	5%	7%	4%	71%		ALS/DLS
P3	12%	6%	4%	3%	77%		ALS/DLS
P4	4%	5%	5%	4%	53%		ALS/DLS
P5	91%	4%	10%	6%	11%		MRLS
P6	58%	6%	8%	7%	6%		MRLS
P7	8%	7%	3%	6%	1%		Unklar
P8	7%	5%	2%	7%	2%		Unklar
P9	7%	40%	5%	4%	1%		EWSR1 pos. Tumor
P10	5%	9%	4%	5%	5%		Unklar
P11	4%	55%	6%	5%	9%	t(21;22)	EWSR1 pos. Tumor
P12	4%	5%	95%	3%	3%	t(X;18)	SS
P13	4%	5%	72%	9%	7%	t(X;18)	SS
P14	5%	7%	9%	83%	8%	t(2;13)	ARMS
P15	4%	7%	3%	2%	4%		Unklar
P16	6%	6%	2%	4%	2%	X	Unklar

% = Anteil der ausgewerteten Zellkerne mit der für die jeweilige Aberration typischen Signalkonstellation

X = kein Nachweis sarkomspezifischer chromosomaler Aberrationen mittels RT-PCR

Wie in den Tabellen 4 und 6 dargestellt ist, liegen die jeweiligen richtig-positiven Ergebnisse der insgesamt 130 Hybridisierungen bei in der Regel mehr als 50%. Hierbei wurde bei den jeweiligen Fällen zur Detektion der Translokationen die zu erwartenden Signalkonstellationen (s. Abschnitt 2.16.) und zur Detektion der Amplifikationen alle Signalzugewinne als richtig-positiv gewertet. Bei letzterer waren hierbei vor allem sogenannte Signalwolken erkennbar. Bei sechs Fällen (P1, P5, P6, P7, P8, P13), die mittels der FKHR-Bruchpunkt-Sonde untersucht worden waren, ergaben sich jedoch mit Werten zwischen 6 und 9% Werte, die nur sehr knapp über dem Cut off-Wert (s. Tab. 3) lagen. Das Gleiche gilt für zwei mit der SYT-Bruchpunkt-Sonde hybridisierte Fälle (P1, P5), deren Ergebnisse bei einem Cut off-Wert von 10% jeweils genau diesem entsprachen. Formal betrachtet sind diese Fälle als falsch-positiv zu bewerten. Die Erfahrungen während dieser Arbeit zeigten jedoch, dass die Ergebnisse der richtig-

positiven Fälle deutlich über denen der angesprochenen Grenzfälle lagen. Aus diesem Grund wurden diese formal falsch-positiven Fälle als richtig-negativ gewertet.

Eine Gegenüberstellung der zytogenetischen Diagnose (ohne Berücksichtigung morphologischer und histologischer Parameter) und der „tatsächlichen“, anhand der Kriterien der WHO gestellten, histologischen Diagnosestellung findet sich in Tabelle 7. Allein aufgrund der FISH-Untersuchungen konnten also 10/16 (63%) Sarkome aufgrund ihrer genetischen Aberrationen eindeutig einer spezifischen Subgruppe bzw. Diagnose zugeordnet werden. Keine charakteristische chromosomale Alteration konnte in 5/16 (31%) Fällen nachgewiesen werden. Zumindest mittels alleiniger FISH konnten diese Fälle somit nicht klassifiziert werden. Ein falsch-negatives Ergebnis trat in einem Fall (P10) auf (1/16; 6%).

**Tabelle 7: Gegenüberstellung histologischer und zytogenetischer Diagnose**

Fall-Nr.	Tatsächliche Diagnose	Zytogenetische Diagnose
P1	ALS	ALS/DLS
P2	ALS	ALS/DLS
P3	ALS	ALS/DLS
P4	DLS	ALS/DLS
P5	MRLS	MRLS
P6	MRLS	MRLS
P7	PLS	Unklar
P8	PLS	Unklar
P9	PLS	EWSR1-positiver Tumor
P10	ES	Unklar
P11	ES	EWSR1-positiver Tumor
P12	SS	SS
P13	SS	SS
P14	ARMS	ARMS
P15	ERMS	Unklar
P16	ERMS	Unklar

### **3.2.6. Sensitivität, Spezifität, positiver bzw. negativer Vorhersagewert und Effizienz Sarkom-spezifischer DNA-Sonden**

Aus den Ergebnissen der Hybridisierungen im retro- und prospektiven Ansatz dieser Arbeit lassen sich die Werte für Sensitivität, Spezifität, positiven bzw. negativen Vorhersagewert und Effizienz der einzelnen Sonden bestimmen. Dabei wurden die in

Abschnitt 2.17. erklärten Berechnungen durchgeführt, deren Ergebnisse in den Tabellen 8, 9 und 10 aufgeführt sind.

Über alle Hybridisierungen hinweg betrachtet zeigte die FISH somit in Bezug auf die endgültige pathologische Diagnose als Goldstandard nur in einem (P9) der 64 Fälle ein falsch-positives und in fünf Fällen (R6, R10, R13, R34, P10) falsch-negative Ergebnisse. Demgegenüber lieferten 46 Hybridisierungen richtig-positive und 66 Hybridisierungen richtig-negative Ergebnisse.

**Tabelle 8: Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert und Effizienz im prospektiven Ansatz**

	<b>MRLS CHOP (n=16)</b>	<b>ES/KZS EWSR1 (n=16)</b>	<b>SS SYT (n=16)</b>	<b>RMS FKHR (n=16)</b>	<b>ALS/DLS RCPI-11 775J10 (n=16)</b>
<b>richtig-positiv</b>	2	1	2	1	4
<b>falsch-positiv</b>	0	1	0	0	0
<b>richtig-negativ</b>	14	13	14	15	12
<b>falsch-negativ</b>	0	1	0	0	0
<b>Sensitivität</b>	100%	50%	100%	100%	100%
<b>Spezifität</b>	100%	93%	100%	100%	100%
<b>positiver Vorhersagewert</b>	100%	50%	100%	100%	100%
<b>negativer Vorhersagewert</b>	100%	93%	100%	100%	100%
<b>Effizienz</b>	100%	88%	100%	100%	100%

n = Anzahl durchgeführter Hybridisierungen

**Tabelle 9: gemeinsame Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert und Effizienz in retro- und prospektivem Ansatz**

	<b>MRLS CHOP (n=28)</b>	<b>ES/KZS EWSR1 (n=36)</b>	<b>SS SYT (n=27)</b>	<b>RMS FKHR (n=33)</b>	<b>ALS/DLS RCPI-11 775J10 (n=24)</b>
<b>richtig-positiv</b>	8	18	8	4	10
<b>falsch-positiv</b>	0	1	0	0	0
<b>richtig-negativ</b>	18	16	18	29	13
<b>falsch-negativ</b>	2	1	1	0	1
<b>Sensitivität</b>	80%	95%	89%	100%	91%
<b>Spezifität</b>	100%	94%	100%	100%	100%
<b>positiver Vorhersagewert</b>	100%	95%	100%	100%	100%
<b>negativer Vorhersagewert</b>	90%	95%	95%	100%	93%
<b>Effizienz</b>	93%	94%	96%	100%	96%

n = Anzahl durchgeführter Hybridisierungen

Wie aus Tabelle 9 hervorgeht, zeigte die FKHR-Sonde eine Effizienz von 100%, während die CHOP-, SYT- und MDM2-Sonden einen positiven Vorhersagewert von 100% erzielten. Insgesamt betrachtet lagen nur die beiden Werte für die Sensitivität der CHOP- und der SYT-Sonde unter 90%, alle anderen Werte bei mindestens 90%.

### 3.2.7. Sensitivität, Spezifität, positiver bzw. negativer Vorhersagewert und Effizienz der quantitativen RT-PCR zum Nachweis sarkom-spezifischer Alterationen

Bei 20 Fällen lagen sowohl Ergebnisse der FISH als auch der quantitativen PCR, die bereits in der Routinediagnostik erhoben wurden, vor. In 18 Fällen stimmten diese überein und wurden letztendlich als richtig-positiv eingestuft. In allen diesen Fällen passte das Ergebnis der PCR zur pathologischen Diagnose. Jedoch zeigten zwei Fälle (R13, R34) trotz positivem und zur endgültigen Diagnose passendem PCR-Ergebnis in der FISH negative Resultate.

**Tabelle 10: Gegenüberstellung FISH und PCR**

	<b>FISH (n=148)</b>	<b>Q-PCR (n=20)</b>
<b>richtig-positiv</b>	48	19
<b>falsch-positiv</b>	1	0
<b>richtig-negativ</b>	94	1
<b>falsch-negativ</b>	5	0
<b>Sensitivität</b>	91%	100%
<b>Spezifität</b>	99%	100%
<b>positiver Vorhersagewert</b>	98%	100%
<b>negativer Vorhersagewert</b>	95%	100%
<b>Effizienz</b>	96%	100%

n = Anzahl durchgeführter Hybridisierungen

In Tabelle 10 sind die berechneten Werte für Sensitivität, Spezifität, positiven bzw. negativen Vorhersagewert und Effizienz der gesamten Hybridisierungen an Sarkom-Gewebe im Laufe dieser Arbeit den Werten der quantitativen PCR gegenübergestellt. Dabei zeigt sich, dass beide Methoden zur Detektion der untersuchten sarkomspezifischen chromosomalen Aberrationen ähnlich spezifisch sind. Zwar erzielte

die FISH keine hundertprozentigen Vorhersagewerte, jedoch insgesamt betrachtet eine hohe Effizienz.

### 3.3. Nachweisbarkeit komplexer numerischer Alterationen in FFPE-Gewebe

#### 3.3.1. Isochromosom 12p als charakteristische genetische Aberration in Keimzelltumoren

In diesem Teil der Arbeit erfolgte der Versuch, komplexere Aberrationen, wie z.B. Isochromosomen, mittels FISH in FFPE-Gewebe zu detektieren. Dies erfolgte am Beispiel des Nachweises des Isochromosoms für den kurzen Arm von Chromosom 12, das als genetisches Charakteristikum der Keimzelltumoren gilt.<sup>66</sup>

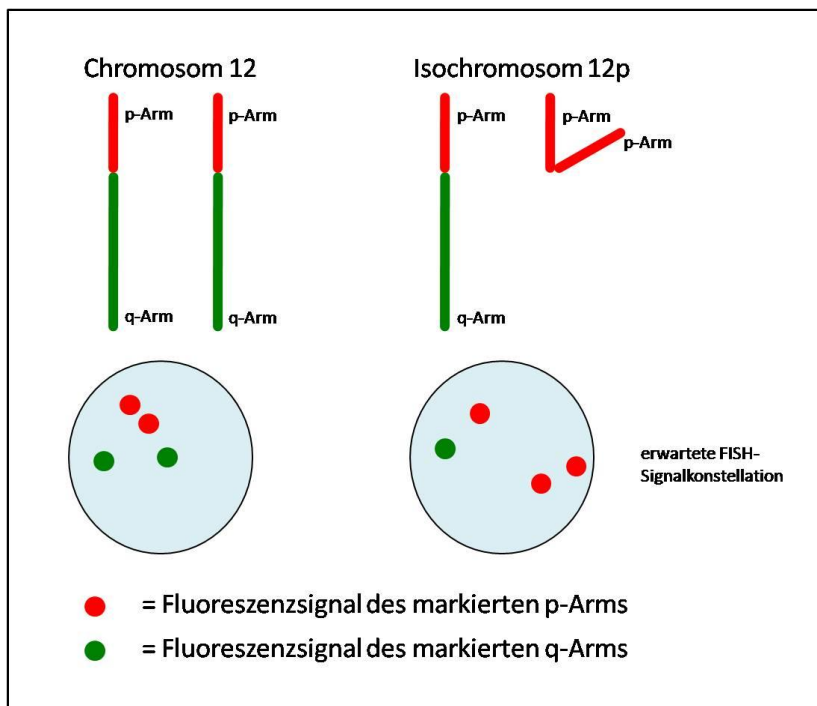


Abbildung 11: zu erwartende FISH-Signalkonstellation für ein singuläres Isochromosom 12p bei euploidem Chromosomensatz

In Abbildung 11 ist die zu erwartende Signalkonstellation eines singulären Isochromosom 12p bei euploidem Chromosomensatz nach Fluoreszenzmarkierung der p- und q-Arme des Chromosom 12 der Signalverteilung einer normalen Zelle gegenübergestellt. Einer für das Isochromosom 12p spezifischen Signalkonstellation entsprechen zunächst drei 12p-Signalen in Kombination mit einem 12q-Signal bei Verlust eines 12q-Signals. Es gilt jedoch zu berücksichtigen, dass, wie in Abschnitt

1.1.6. beschrieben, mehrere Kopien des Isochromosoms 12p in einer Zelle vorliegen können, welche weitere den markierten p-Arm entsprechende Fluoreszenzsignale hervorrufen können.

### **3.3.2. Sondendesign und -kombination zur Detektion des Auftretens eines Isochromosoms 12p in FFPE-Geweben von Keimzelltumoren**

Zur Detektion des Isochromosoms 12p wurden an sieben FFPE-Geweben aus fünf klassischen Seminomen, einem embryonalen Karzinom und einem gemischten Keimzelltumor zwei Hybridisierungen durchgeführt. Zunächst wurde die Kombination einer das Telomer von 12p markierenden Sonde (grün) mit der für 12q spezifischen RP11-775J10-Sonde (MDM2-Gen, 12q13.4) (rot) gewählt, welche schon zur Detektion der MDM2-Amplifikation in Liposarkomen verwendet wurde. Im Anschluss wurde die 12p-Sonde (grün) mit einer Sonde für 8q (LSI c-myc) (rot) gemeinsam verwendet, um die 12p-Signalhäufigkeit in Relation zum gesamten Chromosomensatz der Zellkerne zu stellen. Für das Isochromosom 12p wäre zu erwarten, dass die 12p-Signale durch deren Zugewinn in ihrer Anzahl stets über denen des gesamten Chromosomensatzes liegen.

### **3.3.3. Signalkonstellationen und -häufigkeiten bei der Untersuchung von Keimzelltumoren**

Wie im Abschnitt 3.3.2. beschrieben, wurden an den Geweben der Keimzelltumoren (K1-K7) zwei Hybridisierungsgänge durchgeführt und im Anschluss jeweils mindestens 100 Zellkerne fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die ermittelten 12p-, 12q- und 8q-Signale sind in Tabelle 11 gegenübergestellt. Den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass alle sieben Fälle Zugewinne für die Signale aller verwendeten Sonden verzeichneten. So sind sowohl die Fluoreszenzsignale für den p- als auch für den q-Arm des Chromosom 12 amplifiziert, jedoch auch die Signale der Kontrollsonde für den Chromosomensatz. Über diese Feststellung hinaus ist eine Korrelation der Signalhäufigkeiten nicht möglich gewesen. Es konnte weder eine signifikant größere Häufigkeit an 12p- gegenüber 12q-Signalen noch gegenüber 8q-Signalen gezeigt werden. Insbesondere die für das Isochromosom 12p zu erwartende Signalkonstellation konnte in keinem der sieben Fälle sicher erkannt werden, so dass dessen Detektion an FFPE-Gewebe mittels FISH nicht möglich war.

Tabelle 11 A-G: Signalverteilungen in den Fällen K1-K7

**A: Signalverteilung im Fall K1 (klassisches Seminom)**

Signale pro Zelle	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>1. Hybridisierung</b>								
12p	28	40	22	9	1	0	0	0
12q	15	33	32	10	8	0	0	0
<b>2. Hybridisierung</b>								
12p	5	40	18	19	12	5	0	0
8q	20	51	16	8	6	0	0	0

**B: Signalverteilung im Fall K2 (gemischter Keimzelltumor)**

Signale pro Zelle	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>1. Hybridisierung</b>								
12p	11	44	31	10	3	2	0	0
12q	27	41	14	4	0	0	0	0
<b>2. Hybridisierung</b>								
12p	11	24	13	29	8	2	0	0
8q	22	54	17	2	0	0	0	0

**C: Signalverteilung im Fall K3 (klassisches Seminom)**

Signale pro Zelle	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>1. Hybridisierung</b>								
12p	32	41	16	4	1	2	0	0
12q	32	48	15	4	1	0	0	0
<b>2. Hybridisierung</b>								
12p	5	16	8	15	11	27	12	6
8q	19	26	23	17	5	0	0	0

**D: Signalverteilung im Fall K4 (klassisches Seminom)**

Signale pro Zelle	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>1. Hybridisierung</b>								
12p	26	35	22	15	2	0	0	0
12q	21	34	29	16	0	0	0	0
<b>2. Hybridisierung</b>								
12p	4	45	21	18	12	0	1	0
8q	9	54	26	11	1	0	0	0

**E: Signalverteilung im Fall K5 (embryonales Karzinom)**

Signale pro Zelle	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>1. Hybridisierung</b>								
12p	32	47	23	3	1	0	0	0
12q	22	45	29	6	4	0	0	0
<b>2. Hybridisierung</b>								
12p	5	31	23	25	12	5	0	0
8q	25	37	19	9	11	0	0	0

**F: Signalverteilung im Fall K6 (klassisches Seminom)**

Signale pro Zelle	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>1. Hybridisierung</b>								
12p	0	15	17	30	23	16	0	0
12q	22	42	30	7	0	0	0	0
<b>2. Hybridisierung</b>								
12p	4	16	18	23	26	13	0	0
8q	6	28	39	26	1	0	0	0

**G: Signalverteilung im Fall K7 (klassisches Seminom)**

Signale pro Zelle	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>1. Hybridisierung</b>								
12p	6	14	23	27	23	7	0	0
12q	20	32	36	12	0	0	0	0
<b>2. Hybridisierung</b>								
12p	4	19	19	32	23	3	0	0
8q	6	24	38	20	11	1	0	0



## 4. Diskussion

### 4.1. Sarkom-spezifische chromosomale Aberrationen in der Routinediagnostik

Als eine recht heterogene Gruppe maligner Tumoren mesenchymalen Ursprungs sind Sarkome für das Vorkommen spezifischer chromosomaler Aberrationen bei zahlreichen Entitäten bekannt. So ist ein Drittel aller Weichteilsarkome durch spezifische rekurrente Translokationen charakterisiert,<sup>67</sup> welche in häufig für chimäre Transkriptionsfaktoren kodierenden Genfusionen resultieren. Oft sind diese Translokationen dann die einzige zytogenetische Aberration und von enormer Relevanz sowohl in der Tumorgenese, als auch in Diagnostik und gegebenenfalls für die Prognose. Demgegenüber sind zwei Drittel der Sarkome nicht durch eine spezifische Translokation, sondern durch zahlreiche genetische Aberrationen wie Verluste oder Zugewinne chromosomalen Materials charakterisiert, häufig unter Beteiligung der Genloci für p53 oder MDM2.<sup>67</sup> Allen Entitäten gemeinsam ist, dass die bekannten chromosomalen Veränderungen ein die Entität definierendes Ereignis darstellen, andererseits die diagnostischen Möglichkeiten erweitern. Insbesondere in Fällen überlappender Histologie, nicht eindeutig zielführender Immunhistochemie und erschwerter Differentialdiagnose spielt die Molekulargenetik in der Routinediagnostik zur Detektion chromosomaler Aberrationen eine wichtige und ergänzende Rolle. Dabei können Translokationen, Amplifikationen und Deletionen durch die klassische Chromosomenbänderung und die FISH detektiert werden, während Insertionen und Punktmutationen häufig die Anwendung molekulargenetischer Techniken wie der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfordern.<sup>67</sup>

Die klassische Chromosomenbänderung erfordert zwar nicht das genaue Wissen über eine zu erwartende genetische Veränderung, kann jedoch nur relativ große strukturelle chromosomale Veränderungen nachweisen. Außerdem ist sie zeitaufwendig und ihre erfolgreiche Nutzung hängt u.a. von der Verfügbarkeit frischen Tumorgewebes, der erfolgreichen Kultivierung der Tumorzellen und der Qualität der Metaphasenpräparationen ab.<sup>67</sup>

Die PCR stellt eine zuverlässige molekulargenetische Methode dar, die mit hoher Sensitivität chromosomale Aberrationen auf DNA- bzw. RNA-Ebene detektieren kann. Voraussetzung ist die Extraktion genetischen Materials aus dem zu untersuchenden

Gewebe. Bei Verfügbarkeit solchen Gewebes reicht durch die Vervielfältigung des genetischen Materials theoretisch eine einzige Tumorzelle aus, um eine genetische Aberration unter Verwendung entsprechender DNA- oder RNA-Primer nachzuweisen. Doch gilt hier zu berücksichtigen, dass eine einzelne Zelle eventuell nur einen Subklon des eigentlichen Tumors verkörpern kann. Es besteht also gemeinhin die Gefahr, durch Amplifikation einzelner Subklone falsch-positive und nicht repräsentative Ergebnisse zu erzielen. Außerdem liegt häufig das zu untersuchende Tumorgewebe nicht mehr als Frischpräparat, sondern als FFPE-Gewebe vor, welches eine zuverlässige Extraktion genetischen Materials stark erschwert, bisweilen nicht zulässt, da sowohl die RNA- wie auch die DNA-Extraktion aus FFPE-Gewebe aufwendig und die Qualität der extrahierten Erbsubstanz durch Degradierung der Nukleinsäuren infolge der Formalinfixierung eher schlecht ist. Insbesondere sind die gewonnenen RNA-Fragmente i.d.R. zu kurz, um für die PCR-Amplifikation von großen Fusionsprodukten tauglich zu sein. Gerade in retrospektiven Studien muss jedoch meist aufgrund der alleinigen Verfügbarkeit auf FFPE-Gewebe zurückgegriffen werden, so dass die PCR hier an ihre Grenzen stößt. Darüber hinaus gilt es zu beachten, dass bei der Analyse rekurrenter chromosomaler Aberrationen diese in einigen Entitäten verschiedene Fusionsgene (s. Tab. 1) zur Folge haben können. Daraus folgt, dass mehrere PCR-Durchgänge unter Verwendung der entsprechend unterschiedlichen Primer nötig sein können, um falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden.

Die Methode der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) kann u.a. zur Detektion numerischer chromosomaler Veränderungen, Amplifikationen, Deletionen und Translokationen verwendet werden. Einschränkend ist jedoch zu erwähnen, dass sie keinen globalen Überblick über die genetischen Veränderungen in Tumorgeweben ermöglicht, sondern nur die gezielte Suche nach spezifischen Veränderungen ermöglicht. Allerdings ist sie apparativ aufwendig und abhängig von der Qualität des Materials, dem Fixationszeitpunkt und der Fixationsdauer. Die Signalkonstellationen komplexer Aberrationen werden schnell unübersichtlich, die Interpretation schwierig und bislang stehen noch nicht für alle Fragestellungen die entsprechenden FISH-Sonden zur Verfügung. Demgegenüber bietet sie im Vergleich zur PCR jedoch eindeutige Vorteile. Die Zeitdauer von Biopsie bis zum Ergebnis der Untersuchung ist gegenüber der PCR durch Wegfallen der DNA- bzw. RNA-Extraktion deutlich kürzer; die

Ergebnisse können innerhalb von 24 Stunden vorliegen. Innerhalb eines Hybridisierungsganges können außerdem mehrere Objektträger ohne Weiteres parallel untersucht werden, so dass verschiedene FISH-Sonden ohne wesentlichen Zeitaufwand gleichzeitig untersucht werden können. Wie bereits erwähnt, können die verschiedenen Fusionsgen-Varianten in der PCR diagnostische Schwierigkeiten machen. Unter Verwendung von Bruchpunktsonden in der FISH kann jedoch diese Problematik deutlich an Bedeutung verlieren. Da diese nicht die Fusionsgene, sondern die Bruchstellen bzw. in der Regel zumindest eine Bruchstelle detektieren, kann ein einzelner Sondentyp mehrere verschiedene Translokationen nachweisen, ein Vorteil, der falsch-negative Ergebnisse weniger wahrscheinlich macht. Außerdem kann die Methode der FISH im Gegensatz zur klassischen Chromosomenbänderung problemlos an Interphasekernen durchgeführt werden, es sind hierzu bereits 100 Zellkerne ausreichend, um ein Ergebnis zu erzielen. Der wohl gerade im Vergleich zur PCR in der Fragestellung zur Detektion chromosomaler Aberrationen entscheidende Vorteil liegt jedoch in der Möglichkeit der relativ sicheren Untersuchung von FFPE-Gewebe, welche heutzutage durch den Einsatz gepufferten Formalins in der Handhabung erleichtert wird und welche unter Anwendung der PCR, wie bereits beschrieben, enorme Schwierigkeiten bereiten kann. Außerdem besteht mittels FISH grundlegend die Möglichkeit, zwischen einer Tumor- und Normalzelle zu unterscheiden, was unter Verwendung der PCR nur durch zeitaufwendige vorangegangene Mikrodissektion (Ausschneiden der Tumorzellen) gelingt.

Die beschriebenen Vorteile der FISH gegenüber den anderen beiden Methoden zeigen also, dass diese eine zumindest ebenbürtige Alternative in der Routinediagnostik darstellt.

Wie bereits beschrieben, beschäftigt sich diese Arbeit mit der Etablierung der FISH an FFPE-Geweben aus Sarkomen sowie der Vereinfachung der Diagnosestellung durch Verwendung eines Entitäts-spezifischen FISH-Sondensets am pathologischen Institut Würzburg und in der Abteilung für Pathologie des Robert-Bosch-Krankenhauses Stuttgart. Dabei wurden sowohl strukturelle als auch numerische Aberrationen berücksichtigt und im Anschluss die erzielten Ergebnisse mit bereits aus der Routinediagnostik vorliegenden Resultaten der RT-PCR verglichen.

#### 4.2. Häufigkeiten der spezifischen Aberrationen im Studienkollektiv

Eine Amplifikation von den das MDM2-Gen enthaltenden Sequenzen der Region 12q13-15 in ALS, welche in anderen Studien mittels FISH in einem Anteil von 95 bis 100% der Fälle nachzuweisen war,<sup>68,69</sup> konnte im Rahmen dieser Arbeit in 9 von 10 (90%) der ALS nachgewiesen werden. Dabei wurden die positiven Signalkonstellationen und hierbei vor allem sogenannte „Signalwolken“ im Durchschnitt bei 75% der Zellkerne gesehen, wobei der Wert von 53% insgesamt der niedrigste war.

Die für MRLS spezifische reziproke Translokation  $t(12;16)(q13; p11)$  konnte in 8 von 10 Fällen nachgewiesen werden, das entspricht einer Häufigkeit von 80%. In zwei Fällen lag das FISH-Ergebnis unter dem Cut off-Wert. Der in der Literatur beschriebene und durch Methoden der klassischen Zytogenetik erhaltene Wert eines Translokationsnachweises in 90%<sup>38</sup> der untersuchten MRLS wurden im Rahmen dieser Arbeit somit nicht vollständig erreicht. Insofern alleine richtig-positive Ergebnisse betrachtet werden, lagen diese im Durchschnitt bei 86% der Zellen, in denen die Translokation nachweisbar war, der niedrigste Wert lag bei 58%.

Die bei über 90% der ES nachweisbaren Translokationen des EWSR1-Gens<sup>70</sup>, die zytogenetisch v.a. einer  $t(11;22)(q24;q12)$  oder einer  $t(21;22)(q22,q12)$  entsprechen, wurden in 15 von 16 Fällen nachgewiesen. Dies entspricht in diesem Studienkollektiv einer Häufigkeit von 94%. Dabei wurde jeweils ein Anteil von 39% der Zellkerne mit positiver Signalkonstellation bei einem durchschnittlichen Anteil von 79% überschritten.

Die molekulargenetisch für 90% der KZS kennzeichnende reziproke  $t(12;22)(q13;q12)$ <sup>31</sup> wurde in allen vier untersuchten Fällen (100%) nachgewiesen. Hierbei lag das Ergebnis der Hybridisierungen im Durchschnitt bei 89% und mindestens bei 85% von Zellkernen mit positiver Signalkonstellation.

Die für über 90% der SS spezifische  $t(X;18)(p11.2;q11.2)$ <sup>4</sup> wurde im Rahmen dieser Arbeit in 8 von 9 Fällen und damit einer Häufigkeit von 89% nachgewiesen. Dabei lag der Anteil von Zellkernen mit positiver Signalkonstellation mindestens bei 72%, im Durchschnitt bei 91%.

Eine Signalkonstellation, die auf eine in zytogenetischen Analysen im ARMS zu 70% als  $t(2;13)(q35;q14)$  und zu 10-15% als  $t(1;13)(p36;q14)$ <sup>13</sup> nachweisbare spezifische

chromosomale Aberration konnte in allen drei untersuchten Fällen (100%) gezeigt werden. Der durchschnittliche Anteil positiver Zellkerne lag bei 67% und mindestens bei 47%.

Wie bereits im Abschnitt 3.2.5. erwähnt, lagen bei Testung der FKHR-Sonde in sechs Fällen, darunter ein ALS (P1), zwei MRLS (P5 und P6), zwei PLS (P7 und P8) und ein SS (P13), Ergebnisse mit maximal 9% nur sehr knapp über dem Cut off-Wert, ab dem diese - rein rechnerisch - als positiv zu werten sind. Bei drei Fällen, die mit der SYT-Sonde untersucht wurden, darunter ein ALS (P1), ein MRLS (P5) und ein ARMS (P14), lagen die Ergebnisse ebenfalls nur knapp über dem Cut off-Wert.

### **4.3. Diskussion des mathematischen Cut off-Wertes**

Formal sind die angesprochenen Ergebnisse als falsch-positiv zu bewerten, wenn man die Ergebnisse der Hybridisierungen in Relation zum Ergebnis der Histopathologie setzt. Allerdings liegen die Ergebnisse aller Hybridisierungen bei richtig-positiven Konstellationen dieser Arbeit, insbesondere diejenigen, bei den ARMS und SS, mit mindestens 40% (i.d.R. >50%) der Zellkerne mit entsprechend positiver Signalkonstellation deutlich über den entsprechenden Hybridisierungsergebnissen der angesprochenen Fälle wie auch über dem rechnerisch ermittelten Cut off-Wert. Aus diesem Grund erscheint eine Wertung der acht angesprochenen Fälle als falsch-positive Ergebnisse nicht als sinnvoll. Diese liegen zwar über dem statistisch errechneten Cut off-Wert, sind jedoch unter Berücksichtigung der übrigen Hybridisierungsergebnisse wahrscheinlich nicht ausreichend, um ein falsch-positives Hybridisierungsergebnis zu bedeuten.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Cut off-Werte der Bruchpunktsonden lagen zwischen 6% für die LSI FKHR-BAP- und 20% für die LSI CHOP-BAP-Sonde, wobei für die LSI SYT-BAP-Sonde ein Wert von 9% und für die LSI-EWSR1-BAP-Sonde ein Wert von 14% ermittelt wurde (s. Tab. 3).

*Bridge et al.* (2006) verwendeten bereits zur Translokationsdetektion mittels FISH in Tumoren der ES-Familie Bruchpunktsonden, deren Cut off-Wert mit >15% sehr nahe am in dieser Arbeit verwendeten Wert lag.<sup>71</sup> Positive Signalkonstellationen für die entsprechenden Translokationen fanden sich in durchschnittlich 79% der Zellkerne, also deutlich über dem verwendeten Cut off-Wert.<sup>71</sup> Auch *Jambhekar et al.* (2006)

untersuchten Tumoren der Ewingfamilie unter Verwendung der FISH und Bruchpunktsonden auf chromosomale Aberrationen. Der verwendete Cut off-Wert lag dabei bei >5%, wobei die Anteile der Zellkerne mit positiver Signalkonstellation in ES Werte bis 95% erreichten.<sup>72</sup> *Munir et al.* (2010) untersuchten mittels FISH verschiedene mesenchymale Neoplasien auf die jeweiligen spezifischen chromosomalen Aberrationen, u.a. ES, SS, ARMS und MRLS. Für die verwendeten Bruchpunktsonden wurde dabei ein Cut off-Wert von  $\geq 10\%$  ermittelt.<sup>73</sup> *Willmore-Payne et al.* (2008) verwendeten zur Detektion chromosomaler Aberrationen in MRLS eine LSI CHOP-BAP-Sonde. Der hierbei genutzte Cut off-Wert lag ebenfalls bei  $\geq 10\%$ , wobei positive Signalkonstellationen der Zellkerne zumeist mit über 30% und bis zu 87% ebenfalls deutlich über dem Cut off-Wert lagen.<sup>74</sup>

Berücksichtigt man die verwendeten Werte im Rahmen dieser Arbeit und jene aus den angeführten Arbeiten, liegen also die Cut off-Werte zwischen 5% und 20%, die Ergebnisse der jeweiligen Hybridisierungen, wie zuvor beschrieben, zumeist deutlich darüber.

Es empfiehlt sich nach den Erfahrungen während dieser Arbeit also, den rechnerisch ermittelten Cut-off Wert durchaus kritisch zu sehen. Zu einem großen Anteil lagen die Ergebnisse sogar bei weit über 70%, so dass es sinnvoll erscheint, den verwendeten Cut off-Wert deutlich höher anzusetzen als errechnet. Aus diesen Gründen wurden die angesprochenen Fälle mit den den Cut off-Wert knapp überschreitenden Ergebnissen letztlich nicht als falsch-positiv, sondern als richtig-negativ gewertet.

#### **4.4. Effizienz von FISH im Vergleich zu Ergebnissen anderer Arbeiten**

In der vorgelegten Arbeit lagen Sensitivität, Spezifität negativer und positiver Vorhersagewert sowie Effizienz der FISH unter Verwendung der jeweiligen Bruchpunktsonden zumeist über 90%. Die FKHR-BAP-Sonde erreichte hierbei 100% für alle Werte, die CHOP- und die SYT-BAP-Sonden und die MDM2-LSI-Sonde erreichten 100% in den Werten für Spezifität und positiven Vorhersagewert. Die EWSR1-BAP-Sonde erreichte für alle Werte Ergebnisse von 94% und 95%. Nur für die CHOP-BAP-Sonde mit 80% und die SYT-BAP-Sonde mit 89% lag die jeweilige Sensitivität unter 90%. Insgesamt betrachtet lagen die im Rahmen dieser Arbeit

erzielten Werte für die Sensitivität zwischen 80% und 100%. Die Werte für Spezifität lagen allesamt mit Ausnahme der EWSR1-BAP-Sonde (94%) bei 100%.

Es gibt nur wenige veröffentlichte Zahlen zur Beurteilung der Sensitivität und Spezifität der FISH an FFPE-Gewebe. So erzielten *Machado et al.* (2009) mittels FISH zur Diagnostik von Tumoren der Ewing-Familie an FFPE-Gewebe eine Sensitivität und Spezifität von jeweils 96,3% und 95,2%.<sup>75</sup> *Sun et al.* (2008) konnten für die Sensitivität und Spezifität der Detektion des SYT-SSX-Fusionsgens in SS Werte von 96,7% und 100% ermitteln.<sup>76</sup> *Matsumura et al.* (2008) erzielten in der Detektion chromosomaler Aberrationen in RMS mittels FISH an FFPE-Gewebe eine Sensitivität von 92,3% und eine Spezifität von 100%.<sup>77</sup> *Downs-Kelly et al.* (2008) detektierten in MRLS mittels FISH an FFPE-Gewebe die typischen chromosomalen Aberrationen mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils 94,4 und 100%.<sup>78</sup> Letztendlich wurden auch für die Detektion der MDM2-Amplifikation in ALS durch *Sirvent et al.* (2007) hohe Werte für Sensitivität und Spezifität nachgewiesen.<sup>68</sup> Diese Zusammenschau zeigt, dass die Methode der FISH bereits in anderen Untersuchungen zur Detektion chromosomaler Aberrationen an FFPE-Gewebe hohe Werte für Sensitivität und Spezifität erreichte und im Rahmen dieser Arbeit ähnliche Werte erzielt werden konnten.

#### **4.5. Effizienz der RT-PCR zur Detektion chromosomaler Aberrationen**

Die Detektion chromosomaler Aberrationen mittels RT-PCR wurde in anderen Arbeiten bereits beschrieben. So erzielten *Machado et al.* (2009) bei Untersuchungen in FFPE-Geweben von Tumoren der Ewing-Sarkom-Familie zur Detektion chromosomaler Aberrationen eine Sensitivität von 97.5% und eine Spezifität von 92.9%.<sup>75</sup> *Bridge et al.* (2006) erreichten in FFPE-Geweben Werte von 54% Sensitivität und 85 % Spezifität.<sup>71</sup> *Ten Heuvel et al.* (2008) untersuchten FFPE-Gewebe aus SS mittels RT-PCR und erreichten eine Sensitivität von 94%.<sup>79</sup> *Athale et al.* (2001) beschrieben in Frischgeweben eine hohe Detektionsrate von 95% u.a. in ARMS und Tumoren der ES-Familie unter Verwendung der RT-PCR. Die Sensitivität in Primärtumoren lag dabei in ARMS bei 100% und bei 81% in ES-Familiëntumoren.<sup>80</sup> Durch *Hisaoka et al.* (1998) wurden in MRLS in 94% der untersuchten FFPE-Gewebeproben mittels RT-PCR das TLS/FUS-CHOP Fusionstranskript nachgewiesen.<sup>81</sup> Letztendlich erreichten *Sirvent et*

*al.* mittels RT-PCR zur Detektion der MDM2-Amplifikation in FFPE-Geweben aus Fettgewebstumoren 78% Sensitivität und 100% Spezifität.<sup>68</sup>

Diese Auswahl an Veröffentlichungen zeigt die hohe Effizienz der RT-PCR zur Detektion chromosomaler Aberrationen in den auch im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Entitäten. Es sei jedoch an dieser Stelle noch einmal darauf hingewiesen, dass die Anwendung der RT-PCR an FFPE-Gewebe enorme Schwierigkeiten bereitet.

#### **4.6. Vergleich zwischen FISH- und RT-PCR-Ergebnissen im Rahmen dieser Arbeit**

Betrachtet man die Ergebnisse aller Hybridisierungen dieser Arbeit über alle Entitäten hinweg, so liegen die Werte für Sensitivität, Spezifität, negativen bzw. positiven Vorhersagewert und Effizienz bei mindestens 96%, woraus eine hohe Eignung der FISH im untersuchten Aufgabenfeld zu folgern ist. Die Werte der RT-PCR, die aus den zu einigen Fällen vorliegenden Ergebnissen berechnet wurden, lagen im Durchschnitt höher als diejenigen der FISH (s. Tab. 10). Im Abschnitt 3.2.7. wurde jedoch bereits erwähnt, dass nur von 20 Fällen Ergebnisse der RT-PCR vorlagen, da das erforderliche Frischmaterial zumeist nicht zur Verfügung stand. So wurden also mittels PCR deutlich weniger Fälle untersucht als durch die FISH, weshalb schon alleine aus statistischen Gründen das Vorkommen falsch-negativer bzw. -positiver Ergebnisse unwahrscheinlicher ist. Jedoch gilt zu berücksichtigen, dass, wie bereits erwähnt, zur Untersuchung mittels PCR aufgrund ihrer sehr hohen Sensitivität theoretisch eine einzelne Tumorzelle ausreicht, jedoch mit der Gefahr falsch-positiver Ergebnisse durch Amplifikation nicht repräsentativer Gensequenzen. So wäre in diesem Fall nicht sicher, ob die einzelne Zelle oder wenige Zellen den entscheidenden Tumorzellklon repräsentieren. Unter diesen 20 in der RT-PCR untersuchten Fällen zeigte die FISH nur in 18 Fällen richtig-positive Ergebnisse, bei zwei Fällen konnte folglich trotz positivem PCR-Ergebnis keine entsprechende chromosomale Aberration nachgewiesen werden. Diese falsch-negativen FISH-Ergebnisse könnten u.a. durch niedrigen Tumorzellgehalt im untersuchten Gewebe zu erklären sein. Ebenfalls ist es möglich, dass das untersuchte Material einen Tumorsubklon repräsentiert, der die entsprechende Alteration jeweils nicht aufweist. Daraus folgt, dass es schon im Vorfeld erforderlich ist, das in der FISH untersuchte Gewebe mit den entsprechenden HE-Schnitten des Tumorgewebes abzugleichen, um den Tumorgehalt richtig einschätzen zu können.



Insgesamt zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit, dass die FISH eine Methode mit hoher Spezifität zum Nachweis sarkomspezifischer chromosomaler Aberrationen an FFPE-Gewebe darstellt. V.a. die CHOP-, SYT- und FKHR-Bruchpunktsonden sowie die MDM2-LSI-Sonde zeigten hervorragende positive Vorhersagewerte. Insgesamt lag nur ein falsch-positives Ergebnis in allen Hybridisierungen (Fall P9) vor. Zwar wurde die  $t(12;22)(q13;q12)$ , und somit die Translokation des EWSR1-Gens, bereits mit MRLS in Verbindung gebracht<sup>38,44</sup>, doch handelte es sich hier laut endgültiger pathologischer Diagnose um ein pleomorphes Liposarkom. In dieser Entität wurde eine EWSR1-Translokation bislang allerdings nicht beschrieben und aus diesem Grund im Rahmen dieser Arbeit als falsch-positives Ergebnis gewertet. Das PLS stellt eine eigenständige Subform in der Gruppe der Liposarkome mit schlechter Prognose und bislang noch unklarem biologischen Ursprung dar. Es lassen sich zwar in PLS zahlreiche komplexe jedoch interzellulär verschiedene, also nicht-klonale Rearrangements und Alterationen, finden, die ähnliche Gene betreffen, wie es bei anderen LS der Fall ist, doch zeigten die untersuchten PLS auch im Rahmen dieser Arbeit keine spezifischen Alterationen.

Die untersuchten DLS zeigten sämtlich eine Positivität für die Amplifikation der Gensequenzen, die mittels der verwendeten MDM2-LSI-Sonde detektierbar sind. Eine so nachweisbare Amplifikation der Region 12q13-21 wurde bereits in DLS beschrieben<sup>38</sup> und konnte somit bestätigt werden.

### 5. Zusammenfassung

Die Kenntnisse über die genetischen Veränderungen in mesenchymalen Tumoren sind von enormer Bedeutung einerseits in der Erforschung neuer Therapieansätze durch genaues Verständnis der molekulargenetischen Tumorgenese, zur Verbesserung der Therapieeffizienz und der jeweiligen Prognose, welche sie andererseits deutlich beeinflussen. So könnten in Zukunft noch häufiger die als Folge von rekurrenten chromosomalen Translokationen entstandenen Fusionsproteine als Angriffspunkte der gezielten pharmakologischen Therapie dienen, so wie es z.B. schon bei der Therapie der chronischen myeloischen Leukämie der Fall ist.<sup>82</sup>

Außerdem spielt das Wissen über die Genetik der jeweiligen Entitäten ebenso in ihrer pathologischen Klassifizierung eine wichtige Rolle wie im Verstehen und der Aufschlüsselung ihres biologischen Ursprungs. Insbesondere dienen die beschriebenen molekulargenetischen Untersuchungsmethoden der Unterstützung und Vereinfachung der Differentialdiagnose, auch in der Routinediagnostik. In diesem Zusammenhang stellt v.a. die FISH eine sehr geeignete Methode zur Detektion chromosomaler Aberrationen in der Routinediagnostik dar. Durch ihre Anwendbarkeit an FFPE-Gewebe und deutlich geringeren Zeitraum zwischen Gewebebiopsie und Untersuchungsergebnis ist sie gerade im Vergleich zur RT-PCR bei entsprechender apparativer Ausstattung eine auch in ihrer Effizienz ebenbürtige Alternative mit hohen Werten für Spezifität und positiven Vorhersagewerten. Zu berücksichtigen gilt jedoch, dass die FISH, wie auch die anderen molekulardiagnostischen Untersuchungen, die klinischen Daten, die Histologie, die Immunhistochemie und die pathologisch-anatomische Befundung zur Stellung der Diagnose nicht ersetzen kann. Vielmehr dient sie zur Erleichterung und Qualitätssicherung der endgültigen Diagnosestellung gerade bei Fällen mit schwieriger Differentialdiagnose. Die Nachweisbarkeit komplexer numerischer chromosomaler Aberrationen an FFPE-Gewebe mittels FISH zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit und den verwendeten FISH-Sonden am Beispiel des für Keimzelltumoren typischen Isochromosom 12p als derzeit noch nicht möglich. Durch optimierte Protokolle zur Aufarbeitung des Gewebes oder durch Verbesserung der Reagenzien könnte jedoch in Kürze ein Nachweis möglich sein, mit dem entscheidenden Vorteil, das FFPE-Gewebe immer eine wichtige Quelle für retrospektive Studien darstellt.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Badenhoop K et al. „Psyhyrembel – Klinisches Wörterbuch“  
de Gruyter, Berlin, S.1406, 258.Aufl. (1998)
2. Bühling KJ et al. „Intensivkurs – Allgemeine und spezielle Pathologie“  
Elsevier, München, S.113-116 u. S.446-447, 3.Aufl. (2004)
3. Internetquelle:  
<http://www.nci.edu/PathologyBook.htm>, Zugriff am 16.08.2011
4. Fletcher C et al. “Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone/WHO Classification of Tumours”  
IARC, Lyon, S.200-204, Chapter: Synovial sarcoma (2002)
5. Yang K et al. “Co-existence of SYT-SSX1 and SYT-SSX2 fusions in synovial sarcomas”  
Oncogene 21, S.4181-4190 (2002)
6. Riede UN et al. „Allgemeine und spezielle Pathologie“  
Thieme, Stuttgart, S.1175-1176, Kapitel: Synoviales Sarkom, 5. Aufl. (2004)
7. Xie Y et al. “The SYT-SSX1 fusion type of synovial sarcoma is associated with increased expression of cyclin A and D1. A link between t(X;18)(p11.2; q11.2) and the cell cycle machinery”  
Oncogene 21, S.5791-5796 (2006)
8. D'Arcy P et al. “The oncoprotein SS18-SSX1 promotes p53 ubiquitination and degradation by enhancing HDM2 stability”  
Mol. Cancer Research 6, S127-138 (2008)
9. de Bruijn D et al. “The Synovial Sarcoma–Associated SS18-SSX2 Fusion Protein Induces Epigenetic Gene (De)Regulation”  
Cancer Research 66, S.9474-9482 (2006)
10. Preto D et al. “The synovial sarcoma translocation protein SYT-SSX2 recruits beta-catenin to the nucleus and associates with it in an active complex”  
Oncogene 25, S.3661-3669 (2006)

11. Saito T et al. "SYT-SSX1 and SYT-SSX2 interfere with repression of E-cadherin by snail and slug: a potential mechanism for aberrant mesenchymal to epithelial transition in human synovial sarcoma"  
Cancer Research 66, S.6919-6927 (2006)
12. Ishida et al. "The SYT-SSX Fusion Protein Down-Regulates the Cell Proliferation Regulator COM1 in t(x;18) Synovial Sarcoma"  
Molecular and Cellular Biology, S.1348-1355 (2007)
13. Fletcher C et al. "Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone/WHO Classification of Tumours"  
IARC, Lyon, S.146-154, Chapter: Rhabdomyosarcoma (2002)
14. Riede UN et al. „Allgemeine und spezielle Pathologie“  
Thieme, Stuttgart, S.1130-1131, Kapitel: Rhabdomyosarkom, 5. Aufl. (2004)
15. Böcker et al. „Pathologie“  
Urban&Fischer, München, S.1115-1116, 4.Aufl. (2008)
16. Robbins et al. „Pathologic Basis of Disease“  
Elsevier, Philadelphia, S.1321-1322, Chapter: Rhabdomyosarcoma, 7. Aufl. (2005)
17. Koletzko „Kinder- und Jugendmedizin“  
Springer, Heidelberg, S.315-316 (2007)
18. Bühling K et al. „Intensivkurs - Allgemeine und spezielle Pathologie“  
Elsevier, München, S.114, Kapitel: Rhabdomyosarkom, 3. Aufl. (2004)
19. Fredericks WJ et al. „The PAX3-FKHR Fusion Protein created by the t(2;13) translocation in alveolar rhabdomyosarcomas is a more potent transcriptional activator than PAX3“  
Molecular and Cellular Biology 15, S.1522-1535 (1995)
20. Barr FG "Gene fusions involving PAX and FOX family members in alveolar rhabdomyosarcoma"  
Oncogene 20, S.5736-5746 (2001)
21. Margue CM et al. "Transcriptional modulation of the anti-apoptotic protein BCL-XL by the paired box Transcription factors PAX3 and PAX3/FKHR"  
Oncogene 19, S.2921-2929 (2000)

22. Barr FG “The role of chimeric paired box transcription factors in the pathogenesis of pediatric rhabdomyosarcomas”  
Cancer Research 59, S.1711-1715 (1999)
23. Gallego Melcón S et al. “Molecular biology of rhabdomyosarcoma”  
Clinical Translational Oncology 9, S.415-419 (2007)
24. Fletcher C et al. “Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone/WHO Classification of Tumours”  
IARC, Lyon; S.298-300, Chapter: Ewing sarcoma (2002)
25. Adler „Knochenkrankheiten“  
Springer-Verlag, München, S. 366-370 , 3. Aufl. (2005)
26. Riede UN et al. „Allgemeine und spezielle Pathologie“  
Thieme, Stuttgart, S.1161-1162, Kapitel: Ewing-Sarkom, 5.Aufl. (2004)
27. Ban J et al. “EWS/FLI1 suppresses NOTCH-activated p53 in Ewing`s sarcoma”  
Cancer Research 68, S.7100-7109 (2008)
28. Hu HM et al. “EWS/FLI1 suppresses retinoblastoma protein function and senescence in Ewing`s sarcoma cells”  
Journal Orthopaedic Research 26, S.886-893 (2008)
29. Wakahara K et al. “EWS-FLI1 up-regulates expression of the Aurora A and Aurora B kinases”  
Molecular Cancer Research 6, S.1937-1945 (2008)
30. Beauchamp E et al. “GLI1 is a Direct Transcriptional Target of EWS-FLI1-Oncoprotein”  
Journal Biol. Chem. 284, S.9074-9082 (2009)
31. Fletcher C et al. “Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone/WHO Classification of Tumours”  
LIPS, Lyon. S.211-212, Chapter: Clear cell sarcoma (2002)
32. Weiss SW et al. “Enzinger and Weiss` Soft Tissue Tumours”  
Elsevier, Cleveland, S.926-934, Chapter: Clear cell Sarcoma (2007)
33. Davis IJ et al. “Oncogenic MITF dysregulation in clear cell sarcoma: defining the MiT family of human cancers”  
Cancer Cell. 9, S.473-484 (2006)

34. Li KK et al. "The melanocyte inducing factor MITF is stably expressed in cell lines from human clear cell sarcoma"  
Br J Cancer. 89, S.1072-1078 (2003)
35. Panagopoulos I et al. "Molecular genetic characterization of the EWS/ATF1 fusion gene in clear cell sarcoma of tendons and aponeuroses"  
Int J Cancer 99, S.560-567 (2002)
36. Fujimura Y et al. "EWS-ATF-1 chimeric protein in soft tissue clear cell sarcoma associates with CREB-binding protein and interferes with p53-mediated trans-activation function"  
Oncogene 20, S.6653-6659 (2001)
37. Weiss SW et al. "Enzinger and Weiss Soft Tissue Tumours"  
Elsevier, Cleveland, S.477-514, (2007)
38. Fletcher C et al. "Pathology an Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone/WHO Classification of Tumours"  
LIPS, Lyon, S.35-46, Chapter: Liposarcoma (2002)
39. Riede UN et al. „Allgemeine und spezielle Pathologie“  
Thieme, Stuttgart, S.965, Kapitel: Liposarkom, 5. Aufl. (2004)
40. Wu X et al. „The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop”  
Genes Dev. 7, S.1126-1132 (1993)
41. Dei Tos AP et al. "Coordinated expression and amplification of the MDM2, CDK4, and HMGI-C genes in atypical lipomatous tumours"  
J Pathol. 190, S.523-525 (2000)
42. Ofir-Rosenfeld Y et al. "Mdm2 regulates p53 mRNA translation through inhibitory interactions with ribosomal protein L26"  
Mol Cell. 32, S.180-189 (2008)
43. Xiao ZX et al. "Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2"  
Nature. 375, S.694-698 (1995)
44. Bode-Lesniewska B et al. "Relevance of translocation type in myxoid liposarcoma and identification of a novel EWSR1-DDIT3 fusion"  
Genes Chromosomes Cancer 46, S.961-971 (2007)

45. Pérez-Mancera PA et al. "FUS-DDIT3 prevents the development of adipocytic precursors in liposarcoma by repressing PPARgamma and C/EBPalpha and activating eIF4E"  
PLoS ONE 3, S.2569 (2008)
46. Göransson M et al. "The myxoid liposarcoma FUS-DDIT3 fusion oncoprotein deregulates NF-kappaB target genes by interaction with NFKBIZ"  
Oncogene 28, S.270-278 (2009)
47. Rübber "Uroonkologie"  
Springer-Verlag, Heidelberg, S.637-646, 5. Aufl. (2009)
48. Robbins et al. "Pathologic Basis and Disease"  
Elsevier, Philadelphia, S.520-525, Chapter: Germ cell tumors, 7. Aufl. (2006)
49. Rubin et al. "Pathology"  
Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, S.767-773, 5. Aufl. (2006)
50. Reuter VE "Origins and molecular biology of testicular germ cell tumors"  
Modern Pathology 18, S.51-60 (2005)
51. van Echten et al. „No Recurrent Structural Abnormalities Apart FROM i(12p) in Primary Germ Cell Tumors of the Adult Testis"  
Genes, Chromosomes and Cancer, S.133-144 (1995)
52. Joachim HL et al. "Lymph Node Pathology"  
Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, S.65, 4. Aufl. (2009)
53. Ventura RA et al. "FISH Analysis of the Detection of Lymphoma associated chromosomal Abnormalities in Routine Paraffin embedded Tissue"  
Journal of Molecular Diagnostics 8, No2 (2006)
54. Pardue ML et al. "Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations"  
Proc Natl Acad Sci U S A 64, S. 600-604(1969)
55. Gall JG et al. "Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations"  
Proc Natl Acad Sci U S A, S.378-383 (1969)
56. Joos S et al. "Mapping and chromosome analysis: the potential of fluorescence in situ hybridization"  
Journal of Biotechnology 35, S.135-153 (1994)

57. Trask BJ "Fluorescence *in situ* hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping"  
Trends in genetics I S.149-154 (1991)
58. Thiemann F et al. „Leitfaden Molekulare Diagnostik“  
Wiley-VCH-Verlag, Weinheim, S.197-214 (2006)
59. Gerhard DS et al. „Localization of a unique gene by direct hybridization in situ”  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA Genetics 78, S.3755-3759 (1981)
60. Harper M et al. “Localization of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11”  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA; Genetics 78, S.4458-4460 (1981)
61. Hyytinen E et al. “Improved technique for analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tumors by fluorescence in situ hybridization”  
Cytometry 16, S.93-99 (1994)
62. Coleman WB et al. “Molecular Diagnostics”  
Humana Press, Totowa, New Jersey, S.189-202 (2006)
63. Birnboim HC “A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA”  
Methods Enzymol 100, S.243-255 (1983)
64. Birnboim HC et al. “A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA”  
Nucleic Acids Research 7, S.1513-1523 (1979)
65. Rigby PW et al. “Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I”  
J Mol Biol 113, S.237-251 (1977)
66. Eble J et al. “Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs/WHO Classifikation of Tumours”  
IARC Press, Lyon, S.221-249 (2004)
67. Antonescu CR “The role of genetic testing in soft tissue sarcoma”  
Histopathology 48, S.13-21 (2006)



68. Sirvent M et al. "Detection of MDM2-CDK4 Amplification by Fluorescence In Situ Hybridization in 200 Paraffin-embedded Tumor Samples: Utility in Diagnosing Adipocytic Lesions and Comparison With Immunohistochemistry and Real-time PCR"  
Am J Surg Pathology 31, S.1476-1489 (2007)
69. Weaver J et al. "Fluorescence in situ hybridization for MDM2 gene amplification as a diagnostic tool in lipomatous neoplasms"  
Modern Pathology 21, S.943-949 (2008)
70. Weiss SW et al. "Enzinger and Weiss` Soft Tissue Tumours"  
Elsevier, Cleveland, S.480 (2007)
71. Bridge et al. "Molecular diagnosis of Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor in routinely processed tissue: a comparison of two FISH strategies and RT-PCR in malignant round cell tumors"  
Modern Pathology 19, S.1-8 (2006)
72. Jambhekar et al. "Comparative Analysis of Routine Histology, Immunohistochemistry, Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, and Fluorescence In Situ Hybridization in Diagnosis of Ewing Family of Tumors"  
Arch Pathol Lab Med 130, S.1813-1818 (2006)
73. Munir et al. "Utilization of Fluorescence In Situ Hybridization in the Diagnosis of 230 Mesenchymal Neoplasms"  
Arch Pathol Lab Med 134, S.1797-1803 (2010)
74. Willmore-Payne et al. "Translocations and Amplifications of Chromosome 12 in Liposarcoma Demonstrated by the LSI *CHOP* Breakapart Rearrangement Probe"  
Arch Pathol Lab Med 132, S.952-957 (2008)
75. Machado I et al. "Molecular Diagnosis of Ewing Sarcoma Family of Tumors: A Comparative Analysis of 560 Cases With FISH and RT-PCR"  
Diagn Mol Pathology 18, S.189-199 (2009)
76. Sun Y et al. "Diagnostic value of SYT-SSX fusion gene detection by fluorescence in-situ hybridization for synovial sarcoma"  
Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi 37, S.660-664 (2008)

77. Matsumura T et al. "Advantage of FISH analysis using FKHR probes for an adjunct to diagnosis of rhabdomyosarcomas"  
Virchows Arch 452, S.251-258 (2008)
78. Downs-Kelly E et al. „The utility of fluorescence in situ hybridization (FISH) in the diagnosis of myxoid soft tissue neoplasms”  
Am J Surg Pathol 32, S.8-13 (2008)
79. Ten Heuvel et al. „Diagnostic accuracy of FISH and RT-PCR in 50 routinely processed synovial sarcomas”  
Appl Immunohistochem Mol Morphol 16, S.246-250 (2008)
80. Athale et al. "Use of reverse transcriptase polymerase chain reaction for diagnosis and staging of alveolar rhabdomyosarcoma, Ewing sarcoma family of tumors, and desmoplastic small round cell tumor"  
J Pediatr Hematol Oncol. 23, S.99-104 (2001)
81. Hisaoka et al. "Detection of TLS/FUS-CHOP fusion transcripts in myxoid and round cell liposarcomas by nested reverse transcription-polymerase chain reaction using archival paraffin-embedded tissues"  
Diagn Mol Pathol. 7, S. 96-101(1998)
82. Swerdlow SH et al. "WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues"  
IARC, Lyon, S.32-37, 4. Aufl. (2008)

## 7. Abkürzungsverzeichnis

AAF	Acetylaminofluoren
Abb.	Abbildung
ALS	atypisches Lipom/hochdifferenziertes Liposarkom
AMCA	7-amino-4- methylcoumarin-3-acetic acid
ARMS	alveoläres Rhabdomyosarkom
BAC	bacterial artificial chromosome
BAP	break-apart probe, Bruchpunktsonde
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
CEP	chromosome enumeration probes
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DAPI	6-Diamidino-2-Phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DLS	dedifferenziertes Liposarkom
DNP	Dinitrophenol
dNTP	Deoxynucleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Deoxyuridintriphosphate
ebq	exabecquerel
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERMS	embryonales Rhabdomyosarkom
ES	Ewing-Sarkom

## Abkürzungsverzeichnis

---

et al.	et alii/ae, und andere
EWSR1	Ewing sarcoma breakpoint region 1
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKHR	Forkhead in human rhabdomyosarcoma
HIC1	Hypermethylated in cancer 1
Kb	Kilobasen
KZS	Klarzell-Sarkom
KZT	Keimzelltumor
LB-Agar	lysogeny <u>b</u> roth-Agar
LB-Medium	lysogeny <u>b</u> roth-Medium
LK	Lymphknoten
LSI	locus-specific identifiers
MDM2	mouse double minute
min.	Minute
ml	Milliliter
M	molar
mM	millimolar
MRLS	myxoid/rundzelliges Liposarkom
MW	Mittelwert
Myc	myelocytomatosis oncogene
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NP-40	Nonylphenoethoxylat mit MO = 40
OT	Objektträger

## Abkürzungsverzeichnis

---

PAC	Phage 1 Artificial Chromosome
PBS	phosphate buffered saline
PLS	pleomorphes Liposarkom
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT-PCR	real-time Polymerase-Kettenreaktion
RT	Raumtemperatur
RZPD	Primärdatenbank des Deutschen Ressourcenzentrums für Genomforschung
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SS	Synovial-Sarkom
SSC	saline-sodium citrate
STABW	Standardabweichung
SYT	synovial sarcoma translocation
Tab.	Tabelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
WCP	whole chromosome paint
WHO	World Health Organisation
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Rosenwald und Herrn Prof. Dr. Müller-Hermelink danke ich für die Möglichkeit der Promotion am Pathologischen Institut der Universitätskliniken Würzburg.

Herrn Prof. Dr. Ott danke ich für die Überlassung des Promotionsthemas und für die hervorragende menschliche und fachliche Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Horn für die zeitaufwendige Beratung und Anleitung in allen Phasen dieser Arbeit.

Ich bedanke mich beim L'Ospedale San Raffaele Mailand für die freundliche Zusammenarbeit und die Bereitstellung des Untersuchungsmaterials.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Pathologischen Institutes insbesondere bei Frau Eichelbrönner für die Einarbeitung und Betreuung der Laborarbeiten sowie für alle hilfreichen Ratschläge und die stets angenehme Zusammenarbeit.

Herrn Schmelter danke ich für die schöne gemeinsame Zeit im Labor, die große Unterstützung während dieser Arbeit und die tiefe Freundschaft, die uns seit vielen Jahren verbindet.

Ganz besonders möchte ich mich bei Kathrin Müller bedanken für die grenzenlose Unterstützung und die unendliche Geduld bis zum Abschluss dieser Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie für die jahrelange Unterstützung und die Ermöglichung des Studiums.