

Aus der Klinik für Neurochirurgie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Oertel

Die Deletion von Chromosom 17q bei rezidivierenden Meningeomen

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2019

vorgelegt von: Sina Hemmer
geb. am: 25.07.1991 in Lebach

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
Zusammenfassung.....	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Meningeome	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Ätiologie	2
1.1.3 WHO Einteilung.....	2
1.1.4 Therapie	4
1.1.5 Rezidivverhalten.....	4
1.1.6 Untersuchte Chromosomen	6
1.2 Zielsetzung der Arbeit	11
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Material.....	13
2.1.1 Patientenpopulation	13
2.1.2 Klinische Variablen	13
2.2 Methoden	14
2.2.1 Silanisieren der Objektträger	14
2.2.2 Herstellung der Tupfpräparate.....	14
2.2.3 Herstellung der DNA-Sonden.....	14
2.2.4 Vergleichs- und Kontrollmaterial	17
2.2.5 Direkte und indirekte Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	18
3 Ergebnisse.....	26
3.1 Auswertung der FISH.....	26
3.2 Deletion von Chromosom 17q im zeitlichen Verlauf.....	27
3.3 Chromosomale Aberrationsmuster	32
3.3.1 Chromosom 17.....	36
3.3.2 Chromosom 22.....	37
3.3.3 Chromosom 1.....	37
3.3.4 Chromosom 10.....	37
3.4 Chromosomenaberrationen in Abhängigkeit vom WHO Grad	38
3.4.1 WHO Grad I	38
3.4.2 WHO Grad II	38
3.4.3 WHO Grad III.....	39

3.5	Vergleich Zytogenetik und FISH.....	41
4	Diskussion.....	42
4.1	Klinische Aspekte der Meningeome.....	42
4.2	Zytogenetische Aspekte der Meningeome.....	42
4.2.1	Chromosom 1.....	42
4.2.2	Chromosom 10.....	43
4.2.3	Chromosom 22.....	43
4.2.4	Chromosom 17.....	43
4.2.5	Interpretation der zeitlichen Verlaufsmuster	44
4.3	Falldiskussion Patient 4	45
4.4	Chromosomale Aberrationsmuster	46
4.4.1	Chromosom 17 mit Chromosom 1, 10 und 22	46
4.4.2	Komplexe Aberrationsmuster	46
4.5	Zytogenetik versus FISH im Literaturvergleich	47
4.6	Einordnung in den klinischen Kontext	48
4.6.1	Diskussion der WHO Einteilung	48
4.6.2	„Genetic Progression Score“ und Nachsorgeschema	48
4.7	Schlussfolgerung und Ausblick	49
4.7.1	Klassische Zytogenetik versus FISH in der Meningeomdiagnostik.....	49
4.7.2	Ist der Verlust von Chromosom 17 ein spätes Ereignis in der Tumorprogression der Meningeome?.....	50
4.7.3	Korreliert der Verlust von Chromosom 17 mit dem WHO-Grad der Tumoren?.....	50
4.7.4	Limitationen der Arbeit und mögliche Folgeprojekte	50
4.7.5	Empfehlung zur zukünftigen Diagnostik und Therapie.....	51
5	Literaturverzeichnis	52
6	Publikationen	59
7	Anhang.....	60
7.1	FISH Auswertungen	60
7.2	Chemikalien- und Geräteverzeichnis.....	70
8	Danksagung.....	73

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3: Sonden Chromosomen 1p und 22q	24
Abbildung 4: Sonden Chromosomen 10 und 17	24
Abbildung 5: Tumor 1342/01, FISH Chromosom 10 und 17q; Deletion von Chromosom 17q, grün=Chromosom 10, rot=Chromosom 17q	26
Abbildung 6: Tumor 1342/01, FISH Chromosom 10 und 17q; Deletion von Chromosom 17q, grün=Chromosom 10, rot=Chromosom 17q	26
Abbildung 7: Tumor 1240/02, FISH Chromosomen 1p und 22q; Verlust von 1p und 22q, grün=1p, rot=22q.....	27
Abbildung 8: Tumor 1240/02, FISH Chromosomen 1p und 22q; Verlust von 1p und 22q, grün=1p, rot=22q.....	27
Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf des Verlustes von Chromosom 17 für Patient 4; x- Achse:, 5=Rezidiv 5, 6=Rezidiv6, 7=Rezidiv7, 8=Rezidiv8; y-Achse= prozentualer Verlust von Chromosom 17 im untersuchten Tumorgewebe.....	31
Abbildung 11: Eingruppierung der Verlaufsgruppen, x-Achse: Verlustmuster, y- Achse: Anzahl der Patienten	32
Abbildung 13: Prozentuale Häufigkeit der chromosomalen Aberrationsmuster in Bezug zu Chromosom 17q	36
Abbildung 15: Modifiziertes onkogenetisches Baumdiagramm nach Ketter et al....	49
Abbildung 16: Nachsorgeschema nach Ketter et al., OP=Operation, NMR=Kernspintomographie, FDG-PET=Fluordesoxyglucose- Positronen-Emissions-Tomographie	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung nach der WHO-Klassifikation 2016 ³⁸	3
Tabelle 2: Histologische Einteilungskriterien der Meningeome nach der WHO-Klassifikation ³⁸	3
Tabelle 4: Kandidatengene auf Chromosom 22q.....	7
Tabelle 5: Kandidatengene auf Chromosom 1p.....	8
Tabelle 6: Kandidatengene auf Chromosom 10q.....	9
Tabelle 7: Kandidatengene auf Chromosom 17.....	11
Tabelle 8: Dot-Blot Verdünnungsreihe mit Absteigender Konzentration der Sonde .	16
Tabelle 9: Patientendaten zu Patient 1: PrimT = Primärtumor, RezX = Rezidivnummer, Kein Material = Patient wurde in auswärtiger Klinik operiert/kein Tumormaterial (mehr) in der klinikeigenen Tumorbank vorhanden	27
Tabelle 10: Patientendaten zu Patient 2: PrimT = Primärtumor, RezX = Rezidivnummer, Kein Material = Patient wurde in auswärtiger Klinik operiert/kein Tumormaterial (mehr) in der klinikeigenen Tumorbank vorhanden	28
Tabelle 11: Patientendaten zu Patient 3: PrimT = Primärtumor, RezX = Rezidivnummer, Kein Material = Patient wurde in auswärtiger Klinik operiert/kein Tumormaterial (mehr) in der klinikeigenen Tumorbank vorhanden	28
Tabelle 12: Patientendaten zu Patient 4: PrimT = Primärtumor, RezX = Rezidivnummer, Kein Material = Patient wurde in auswärtiger Klinik operiert/kein Tumormaterial (mehr) in der klinikeigenen Tumorbank vorhanden	28
Tabelle 13: Patientendaten zu Patient 5: PrimT = Primärtumor, RezX = Rezidivnummer, Kein Material = Patient wurde in auswärtiger Klinik operiert/kein Tumormaterial (mehr) in der klinikeigenen Tumorbank vorhanden	29
Tabelle 14: Patientendaten zu Patient 6: PrimT = Primärtumor, RezX = Rezidivnummer	29
Tabelle 15: Patientendaten zu Patient 7: PrimT = Primärtumor, RezX = Rezidivnummer, Kein Material = Patient wurde in auswärtiger Klinik	

operiert/kein Tumormaterial (mehr) in der klinikeigenen Tumorbank vorhanden	29
Tabelle 16: Auflistung der Tumoren mit zugehörigen WHO Grad und Verlust der Chromosomen 1, 10, 17 und 22, sowie Gewinne von Chromosom 17 in der FISH, 0=kein Verlust, 1=Verlust nachweisbar, n.a.= nicht auswertbar; Angabe der Aberrationshäufigkeit absolut und in Prozent. Die Ergebnisse der FISH für die Sondenkombination 1p/22q für Tumor 2376/13 waren nicht auswertbar	33
Tabelle 17: Aberrationsmuster A1-10 mit Farbkodierung.....	34
Tabelle 18: Auflistung der Tumoren des WHO Grades I; Verlust der Chromosomen p1, 10, 17q und 22q, sowie Gewinne von Chromosom 1q7 in der FISH, 0=kein Verlust, 1=Verlust vorhanden	38
Tabelle 19: Auflistung der Tumoren des WHO Grades II; Verlust der Chromosomen 1p, 10, 1q7 und 22q, sowie Gewinne von Chromosom 17q in der FISH, 0=kein Verlust, 1=Verlust vorhanden	38
Tabelle 20: Auflistung der Tumoren des WHO Grades III; Verlust der Chromosomen 1p, 10, 17q und 22q, sowie Gewinne von Chromosom 17q in der FISH, 0=kein Verlust, 1=Verlust vorhanden, n.a.= nicht auswertbar	39
Tabelle 21: Vergleich der zytogenetischen Vorergebnisse für die Chromosomen 1, 10, 17 und 22 mit den jeweiligen FISH Ergebnissen der gleichen Tumoren; die fehlenden Prozentangaben für den Verlust von Chromosom 1 und 22 waren aus den Vorergebnissen nicht ersichtlich.....	41

Abkürzungsverzeichnis

<i>A.d.</i>	Aqua destillata
<i>ALPL</i>	Alkaline phosphatase gene
<i>AP1B1/BAM22</i>	AP-1 complex subunit beta-1 gene
<i>BCIP</i>	5-Bromo-4-Chloro-Ondolyolphosphat
<i>BCR</i>	Breakpoint cluster gene
<i>BRCA1</i>	Breast cancer 1 gene
<i>BRCA2</i>	Breast cancer 2 gene
<i>BSA</i>	Bovine serum albumine
<i>CDKN2C</i>	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor C gene
<i>CGH</i>	Comparative genomic hybridization
<i>CLTCL1, CLH22, CLTD</i>	Clathrin heavy chain like 1 gene
<i>cm</i>	Zentimeter
<i>Cy3</i>	Carbocyanin 3
<i>DAPI</i>	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<i>DIG</i>	Digoxigenin
<i>DMBT1</i>	Deleted in malignant brain tumors 1 protein gene
<i>DNA</i>	Englisch für Desoxyribonukleinsäure
<i>EDTA</i>	Ethylendiaminetetraacetic acid
<i>EPB41</i>	Erythrocyte membrane protein band 4.1 gene
<i>ERBB2</i>	erb-B2 receptor tyrosine kinase 2 gene
<i>EtOH</i>	Ethanol
<i>FA</i>	Formamid
<i>FISH</i>	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
<i>FITC</i>	Fluoresceinisothiocyanat
<i>GADD45A</i>	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha
<i>GAS2L1/GAR22</i>	GAS2-like protein 1 gene
<i>GPS</i>	Genetic Progression Score
<i>HCl</i>	Chlorwasserstoff
<i>INK4C,</i>	Inhibitors of CDK4 gene
<i>KCl</i>	Kaliumchlorid
<i>LARGE</i>	Glycosyltransferase-like protein LARGE1 gene

<i>M</i>	Molar
<i>Mg</i>	Magnesium
<i>min</i>	Minuten
<i>MMAC1</i>	mutated in multiple advanced cancers gene
<i>MNI</i>	Meningioma 1 gene
<i>MXII</i>	MAX-interacting protein 1 gene
<i>NaAc</i>	Natriumacetat
<i>NaCl</i>	Natriumchlorid
<i>NBT</i>	Nitroblau-Tetrazoliumsalsz
<i>NF1</i>	Neurofibromin 1 gene
<i>NF2</i>	Neurofibromatose Typ 2/Neurofibromin 2 (Gen)
<i>NM23</i>	non-metastatic gene 23
<i>NRAS</i>	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog gene
<i>OT</i>	Objektträger
<i>p53</i>	Tumor protein 53
<i>PBS</i>	Phosphate buffered saline
<i>PDGFB</i>	Platelet-derived growth factor subunit B gene
<i>PFA</i>	Paraformaldehyd
<i>PTEN</i>	phosphatase and tensin homolog gene
<i>RAD54L/hRAD54</i>	DNA repair and recombination protein RAD54-like gene
<i>RNA</i>	Englisch für Ribonukleinsäure
<i>RPS6KB1</i>	Ribosomal protein S6 kinase beta-1 gene
<i>RRP22</i>	Ras-related protein on chromosome 22
<i>sec</i>	Sekunden
<i>SMARCB1, INI1,</i>	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily B member 1 gene
<i>SSC</i>	Saline sodium citrate
<i>TIMP3</i>	Metalloproteinase inhibitor 3 gene
<i>TP53</i>	Tumor protein 53 gene
<i>TP73</i>	Tumor protein 73 gene
<i>WHO</i>	World Health Organization
<i>ZNS</i>	Zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

Meningeome gehören zu den häufigsten intrakraniellen Tumoren. Obwohl die Mehrzahl der Meningeome durch eine vollständige Resektion geheilt werden können, weisen bis zu 20 % der Tumore ein aggressives Verhalten mit rascher Tumorprogression beziehungsweise einem Rezidivwachstum auf. Die genetische Analyse von Meningeomen zeigt meist einen normalen Karyotyp oder eine Monosomie von Chromosom 22 als einzige zytogenetische Aberration. Die Tumorprogression und das Rezidivverhalten von Meningeomen sind mit sekundären chromosomalen Verlusten assoziiert. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der Deletion von Chromosom 17q bei Patienten mit rezidivierenden Meningeomen zu bestimmen.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren alle Patienten, die aufgrund eines Meningeomrezidivs in der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes zwischen 1999 und 2015 operiert wurden. Aus diesem Kollektiv wurden weiter nur die Patienten ausgewählt, von denen mindestens zwei Tumorproben von unterschiedlichen Operationszeitpunkten vorlagen, um die zytogenetische Progression der Tumore im zeitlichen Verlauf zu untersuchen. Die zytogenetische Untersuchung der Tumorproben erfolgte mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) für die Chromosomen 1p, 10, 17q und 22q.

Insgesamt wurden 22 Tumorproben (3 Primärtumorproben, 19 Rezidivtumorproben) von sieben Patienten untersucht. In 20/22 (90,1 %) der Tumore konnte eine Deletion von Chromosom 17q detektiert werden. In allen Primärtumorproben war die Deletion von Chromosom 17q ebenfalls nachweisbar. Es zeigte sich im zeitlichen Verlauf kein stetiger An- oder Abstieg des prozentualen Anteils der 17q-Deletion in den Tumorproben der Patienten.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals eine Deletion von Chromosom 17q in einem Kollektiv von Patienten mit rezidivierenden Meningeomen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung gezeigt werden. Deletionen der chromosomalen Region 17q könnten ein frühes Ereignis in der Progression von Meningeomen darstellen. Der Nachweis dieser Deletion könnte in der klinischen Anwendung als potentieller Marker für Malignität und ein erhöhtes Rezidivrisiko bei Meningeomen dienen.

Summary

Deletion of chromosome 17q in recurrent meningiomas

Meningiomas are among the most frequent intracranial tumours. Although the majority of meningiomas can be cured by surgical resection, up to 20 % of the tumours show an aggressive clinical course with tumour recurrence or progressive disease.

Cytogenetically, meningiomas frequently harbour a normal karyotype or monosomy of chromosome 22 as the sole anomaly. However, progression of meningiomas is associated with a non-random pattern of secondary losses. The aim of this study was to determine the role of deletions of chromosome 17q in patients with recurrent meningiomas.

A total of seven patients underwent repeated surgery for recurrent meningiomas between 1999 and 2015 at the Department of Neurosurgery at the Saarland University Hospital. Patients were included in this study in case tumor samples from two or more different meningiomas of the same patient were available. Fluorescence in situ hybridization (FISH) was performed on interphase nuclei of tumor cells from the tumour samples to evaluate the clonal cytogenetic evolution of recurrent meningiomas. Collectively, 22 biopsies (3 primary tumours, 19 recurrent tumours) from seven patients were examined. In 20/22 (90.1 %) specimens, the tumor samples showed a 17q deletion. The three primary tumors also showed a 17q deletion. In the course of time, there was no steady in- or decrease in the percentage of deletions of chromosome 17q in the patients' tumors.

In conclusion, this is the first report to demonstrate deletion of chromosome 17q via fluorescence-in-situ-hybridization in patients with recurrent meningiomas. Deletion of chromosome 17q could display an early event in meningioma progression. Accordingly, deletion of chromosome 17q might clinically serve as a marker for malignancy and a higher risk for meningioma recurrence.

1 Einleitung

1.1 Meningeome

Die Meningeome gehören zur Gruppe der extrazerebralen Tumoren und sind gekennzeichnet durch ihr überwiegend gutartiges Wachstumsverhalten. Ihr Wachstum geht von den arachnoidalen Deckzellen der Hirnhäute aus, und sie wachsen meist als scharf begrenzte intradurale Raumforderungen mit Anheftung an die Dura mater, wobei sie umliegendes Hirngewebe verdrängen.⁵²

1.1.1 Epidemiologie

Meningeome stellen die zweithäufigsten primären Tumore des zentralen Nervensystems (ZNS) bei Erwachsenen dar. Die jährliche Inzidenz beträgt 10,5 pro 100.000 weiblichen Einwohnern und 4,8 pro 100.000 männlichen Einwohnern.³⁸ Ausgehend von Autopsie-Befunden, die asymptotische Meningeome miteinschlossen, zeigten *Rausing et al.* eine Prävalenz für Meningeome von 1,4 %.⁵¹

Der prozentuale Anteil der Meningeome unter den Tumoren des ZNS beträgt etwa 30 %.⁵² Dabei beträgt das Verhältnis von erkrankten Frauen zu Männern für intrakranielle Meningeome 1,4-2,8:1. Von spinalen Meningeomen sind in 80 % der Fälle Frauen betroffen.¹⁶ Mit steigender Malignität der Meningeome gleicht sich die weibliche Prädominanz allerdings aus. Männer und Frauen sind von höhergradigen (WHO Grad II und III) Meningeomen gleich häufig betroffen.²⁰

Das Meningeom tritt vor allem bei älteren Patienten auf. Seinen Erkrankungsgipfel findet es im 65. Lebensjahr.³⁸ Fälle von kindlichen Meningeomen wurden ebenfalls beobachtet, meist einhergehend mit einem aggressiven Verhalten der Tumore.^{52,40}

Abhängig von Tumorgröße und -lokalisierung ist die klinische Symptomatik der Meningeome in Art und Ausprägung sehr inhomogen. Meist bleiben Meningeome asymptomatisch und werden nur post mortem autopsisch diagnostiziert. Symptomatisch werden Meningeome in der Regel durch fokale neurologische Defizite oder einen Krampfanfall. Ursächlich hierfür ist die Kompression spezifischer Hirnparenchymareale oder eine allgemeine intrakranielle Druckerhöhung.⁷¹

1.1.2 Ätiologie

Die Ätiologie der Meningeome gilt als weitestgehend ungeklärt. Einzig eine therapeutische oder akzidentelle Strahlenexposition der Hirnhäute ist ein gesicherter Risikofaktor für die Entstehung eines Meningeoms. Das Risiko nach Bestrahlung der Hirnhäute an einem Meningeom zu erkranken, ist um etwa 10 % erhöht.^{15,53,58}

Ein weiterer ätiologischer Ansatz ist eine Begünstigung des Meningeomwachstums durch hormonelle Stimulation. Dies ist einerseits begründet durch die Geschlechtsspezifität der Tumore, andererseits wurde ein verstärktes Meningeomwachstum bei Frauen während der Schwangerschaft beobachtet. Außerdem wurde in über 50 % aller gutartigen Meningeome eine erhöhte Progesteronrezeptordichte festgestellt. Ist diese erhöht, wurde eine Korrelation mit einer erhöhten Proliferation und Malignität der Meningeome gezeigt.^{10,19,55,5} *Carroll et al.*, sowie *Hsu et al.* zeigten 1993 und 1997 außerdem, dass *in vitro* unter Zugabe von Progesteron eine Wachstumsförderung von Meningeomen, und durch Progesteron-Antagonisten eine Wachstumshemmung derselben, erreicht werden konnte.^{10,19}

Ein Zusammenhang zwischen dem gleichzeitigen oder zeitversetzten Auftreten von Mammakarzinomen und Meningeomen, der aufgrund von Tumorregistern hergestellt werden sollte, konnte von *Schoenberg et al.* nicht bestätigt werden.⁶¹

Es konnte ein Zusammenhang zwischen verschiedenen Erbkrankheiten und dem Auftreten von Meningeomen nachgewiesen werden. Hierzu zählt die Neurofibromatose Typ 2 (NF2), bei der ein Gendefekt auf Chromosom 22 die Entstehung von Meningeomen begünstigt (siehe auch Kapitel 1.1.6, Abschnitt 1).

Das *Cowden Syndrom*, das *Gorlin Syndrom*, das *Li-Fraumeni Syndrom*, das *Turcot Syndrom* und das *Von Hippel Lindau Syndrom* sind weitere Erbkrankheiten, bei denen ein Zusammenhang zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Meningeome diskutiert wird.⁴⁸

1.1.3 WHO Einteilung

Nach der aktuellen Einteilung der WHO werden Meningeome in drei Grade mit insgesamt 15 Subtypen und aufsteigendem Mortalitäts- und Rezidivrisiko unterteilt.³⁸

(Tabelle 1)

Tabelle 1: Einteilung nach der WHO-Klassifikation 2016³⁸

WHO Grad I	Meningotheliales Meningeom
	Fibröses (fibroblastisches) Meningeom
	Transitionales (gemischtes) Meningeom
	Psammomatöses Meningeom
	Angiomatöses Meningeom
	Mikrozystisches Meningeom
	Sekretorisches Meningeom
	Lymphoplasmazellreiches Meningeom
	Metaplastisches Meningeom
WHO Grad II	Choroides Meningeom
	Klarzelliges Meningeom
	Atypisches Meningeom
WHO Grad III	Papilläres Meningeom
	Rhabdoides Meningeom
	Anaplastisches (malignes) Meningeom

Etwa 80 % aller Meningeome entsprechen WHO-Grad I, 15-20 % WHO-Grad II und 1-3 % WHO-Grad III.^{52,29} Die Einteilung erfolgt ausschließlich nach den folgenden histologischen Kriterien:

Tabelle 2: Histologische Einteilungskriterien der Meningeome nach der WHO-Klassifikation³⁸

WHO Grad I	Kein Nachweis von Kriterien für WHO Grad II und III
	Jede Histologie ohne Nachweis klarzelliger, chordoider, papillärer oder rhabdoider Anteile
WHO Grad II	4 oder mehr Mitosen pro 10 <i>high-power fields</i>
	Invasives Wachstum in das Hirngewebe
	3/5 der folgenden Kriterien:
	Erhöhte Zellularität
	Kleine Zellen mit erhöhter Kern-Plasma-Relation
	Prominente Nucleoli
	Strukturverlust
	Nekrosen
WHO Grad III	Anaplasie
	20 oder mehr Mitosen pro 10 <i>high-power fields</i>

1.1.4 Therapie

Goldstandard in der Therapie der Meningeome ist die Tumorresektion. Dabei sind die Heilungsrate und das Rezidivrisiko abhängig von der Vollständigkeit der Tumorexzision, sowie dem histologischen und zytogenetischen Profil des Tumors.^{7,27} Die Einteilung des Resektionsausmaßes erfolgt nach *Simpson* (vgl. *Tabelle 3*).⁶³ Mit steigendem Simpson-Grad steigt auch das Rezidivrisiko.

Tabelle 3: Einteilung der Resektionsgrade nach Simpson⁶³

I	Makroskopisch komplette Entfernung mit Exzision der Duramatrix und infiltrierten Knochens. Duraplastik erforderlich	Rezidivrate: 9 %
II	Makroskopisch komplette Entfernung, Koagulation der Duramatrix an der Ansatzstelle	Rezidivrate: 19 %
III	Makroskopisch komplette Entfernung ohne Resektion oder Koagulation der Duramatrix, oder der extraduralen Infiltrationen	Rezidivrate: 29 %
IV	Partielle Resektion, intraduraler Resttumor	Rezidivrate: 44 %
V	Tumordekompression mit/ohne Biopsie	Rezidivrate nicht sinnvoll messbar

1.1.5 Rezidivverhalten

Die Rezidivwahrscheinlichkeit der Meningeome nach operativer Tumorresektion ist abhängig vom Resektionsgrad, jedoch sind auch der WHO-Grad und das zytogenetische Profil des Tumors weitere Einflussfaktoren.

Für benigne Meningeome (entsprechend WHO Grad I) beträgt die Rezidivwahrscheinlichkeit nach totaler Resektion 7-25 %, für atypische Meningeome 29-52 % und für anaplastische Meningeome 50-94 %.³⁸ Das mittlere progressionsfreie Überleben ist mit steigendem WHO-Grad verkürzt.³⁹ *Jääskeläinen et al.* konnten ein mittleres progressionsfreies Überleben von 7,5 Jahren für benigne Meningeome (WHO Grad I), gegenüber 2,4-3,5 Jahren für höhergradige Meningeome (WHO Grad II und III) zeigen.²⁰

Anhand des WHO-Grades der Tumore lässt sich nur bedingt eine Aussage über ihre Rezidivwahrscheinlichkeit treffen. Unter der Annahme, dass die genetische Progression der Meningeome mit sekundären chromosomalen Aberrationen eine signifikante Rolle im Hinblick auf ihr Rezidivverhalten spielt, leiteten *Ketter et al.* 2007 deshalb einen „Genetischen Progressions-Score“ (GPS) her, um die Rezidivneigung

eines Tumors besser abschätzen zu können. *Abbildung 1* zeigt exemplarisch die Errechnung eines Baumdiagrammes mit dessen Hilfe Aussagen über die genetische Entwicklungsstufe, die Progression, sowie die Rezidiventstehung von Meningeomen getroffen werden können. Hierzu werden Akkumulationen genetischer Veränderungen, die Tumorlokalisierung und der WHO-Grad in die Berechnungen miteinbezogen. Ein hoher GPS-Wert geht mit einer früheren Rezidiventstehung einher.^{25,23}

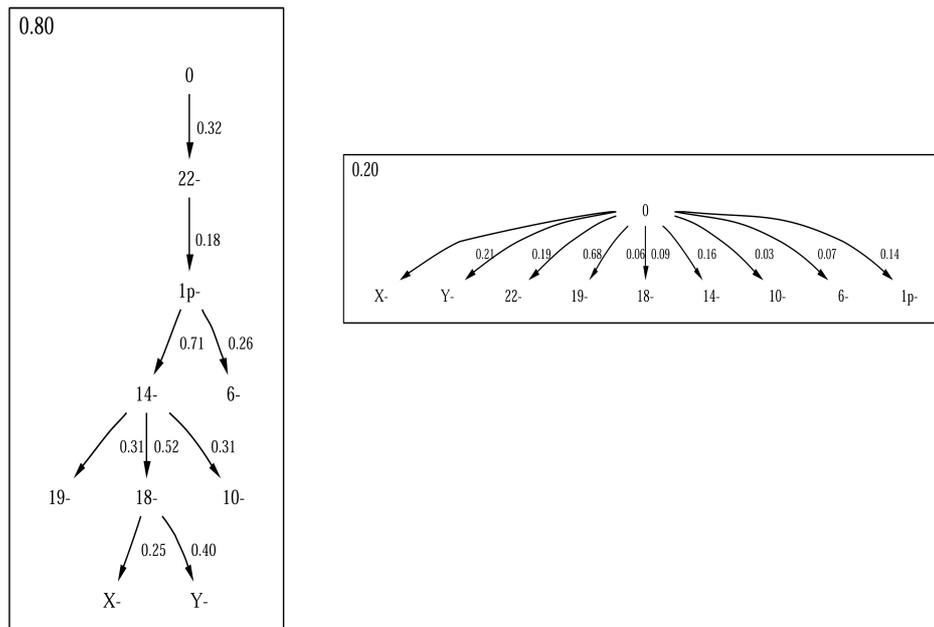


Abbildung 1: Errechnetes Baumdiagramm zur Tumorprogression von Meningeomen²⁵

Ähnlich dem Modell von *Ketter et al.* konnte durch *Sahm et al.* gezeigt werden, dass eine Einteilung der Meningeome basierend auf einer Methylierungsanalyse ihrer DNA ebenfalls sinnvoll wäre. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich insgesamt sechs Methylierungsmuster nachweisen lassen, die sich hinsichtlich des Rezidivverhaltens und des progressionsfreien Überlebens der Patienten unterscheiden.⁶⁰

Auf chromosomaler Ebene ist der Verlust des kurzen Armes von Chromosom 1 der einzige vom WHO-Grad unabhängige Marker für eine erhöhte Rezidivwahrscheinlichkeit bei Meningeomen.³⁶ Zusätzlich wurde durch *Sahm et al.* die Bedeutung einer Mutation des *TERT*-Promotors auf genetischer Ebene als ebenfalls unabhängiger Prädiktor für eine erhöhte Rezidivwahrscheinlichkeit beschrieben.⁵⁹

Im Hinblick auf das Rezidivverhalten stellen Meningeome mit einem hyperdiploiden Chromosomensatz eine gesonderte Entität dar. Verglichen mit Meningeomen, die einen

hypodiploiden oder diploiden Chromosomensatz aufweisen, gehen Meningeome mit hyperdiploidem Chromosomensatz mit einer schlechteren Prognose und einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit einher.²⁴

Ebenfalls bekannt ist, dass durch eine intratumorale genetische Heterogenität der Meningeome das Rezidivverhalten und die Progression durch einzelne Zellen mit komplexen Aberrationen und ausgeprägter Hypodiploidie beeinflusst werden können.⁶⁷ Insgesamt gehen komplexe Aberrationen mit einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit und einem erhöhten Risiko der Malignisierung der Meningeome einher.^{37,17}

1.1.6 Untersuchte Chromosomen

Chromosom 22

Die Monosomie 22 bei Meningeomen ist eine der ersten entitätsspezifischen zytogenetischen Alterationen, die in einem soliden Tumor konsistent nachgewiesen werden konnte.^{73,75}

Sie ist die häufigste primäre genetische Veränderung in allen drei WHO-Graden und tritt in diesen mit jeweils etwa gleicher Frequenz auf. Ihr wird deshalb eine Rolle in der frühen Tumorgenese, nicht aber als Progressionsfaktor zugesprochen.^{70,12} Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Monosomie 22 nicht in allen histologischen Subtypen gleich häufig auftritt und außerdem in Abhängigkeit zur Tumorlokalisation steht.⁷⁰ Erst sekundär erfolgen zusätzliche progressionsassoziierte chromosomale Aberrationen, wie beispielsweise der Verlust des kurzen Armes von Chromosom 1.²⁵

Die Region für ein Kandidatengen auf Chromosom 22 konnte auf die Bande 22q12 eingegrenzt werden.¹² Auf dieser wurde das *NF2*-Gen bei Patienten mit Neurofibromatose Typ 2 identifiziert und kartiert.^{56,66} Das *NF2*-Gen wird als „Driver“-Kandidatengen für die Meningeom-Pathogenese angesehen und kodiert für das Protein Merlin (auch Schwannomin oder Neurofibromin 2 genannt). Dieses gehört zur 4.1 Protein-Familie, deren Mitglieder das Actin-Zytoskelett mit Zelloberflächenglykoproteinen verbinden. Patienten, die an Neurofibromatose Typ 2 leiden, erkranken durch einen Gendefekt des *NF2*-Gens gehäuft an Meningeomen und bilateralen Vestibularisschwannomen. Bei diesen, und nahezu allen *NF2*-assoziierten Meningeomen, sowie bei 50 % aller sporadischen Meningeome, konnte eine somatische inaktivierende *NF2*-Mutation festgestellt werden, meist einhergehend mit

allelischem Verlust oder Monosomie 22 und verbunden mit einem Expressionsverlust von Merlin.^{57,31} Das *NF2*-Gen wird deshalb als Tumorsuppressorgen angesehen.

Auf dem langen Arm von Chromosom 22 sind weitere Kandidatengene lokalisiert (Tabelle 4). Diese zeigen jedoch nur selten Alterationen und es konnte bisher kein Zusammenhang zwischen diesen Alterationen und dem Wachstumsverhalten der Meningeome hergestellt werden.^{16,52, 31}

Tabelle 4: Kandidatengene auf Chromosom 22q

Gen	Lokus	Funktion
CLTCL1, CLH22, CLTD	22q11.21	Endozytose
SMARCB1, INI1, SNF5, hSNF5	22q11.23	Chromatinremodeling, Zellzykluskontrolle
BCR	22q11.23	Breakpoint Cluster
MN1	22q12.1	Unbekannt
NF2 (Merlin)	22q12.2	Verbindet Zellmembranproteine mit Zytoskelett
AP1B1, BAM22	22q12.2	Endozytose
GAS2L1, GAR22	22q12.2	Zytoskelett, Wachstumshemmung
RRP22	22q12.2	RAS-Signalweg
TIMP3	22q12.3	Metalloproteinase Inhibitor
LARGE	22q12.3-q13.1	N-acetylglucosaminyltransferase
PDGFB	22q13.1-q13.1	Wachstumsfaktor

Chromosom 1

Der Verlust des kurzen Armes von Chromosom 1 ist die häufigste progressionsassoziierte genetische Aberration in Meningeomen.⁴³ Von *Chang et al.* konnte 2010 ein *Loss of heterozygosity* von 1p32 in 28 % der WHO-Grad I Meningeome und in 60 % aller WHO-Grad II und III Meningeome festgestellt werden.¹¹

Der Verlust von Chromosom 1p geht nicht nur mit einem höheren histologischen Grad der Tumore einher, sondern auch mit einem erhöhten Rezidivrisiko.^{11,22,32} Es wurde gezeigt, dass der Verlust des kurzen Armes von Chromosom 1 der einzige vom WHO-Grad der Meningeome unabhängige chromosomale Marker für eine Rezidiventstehung ist.³⁶ In der Studie von *Linsler et al.* war der Verlust von 1p zusätzlich assoziiert mit einer kürzeren Überlebenszeit der Patienten. Der Verlust von Chromosom 1p gilt als entscheidender Schritt für eine anaplastische Progression der Tumore unabhängig vom Tumorstadium.^{74,1}

Lokalisiert auf 1p36.1-p34 befindet sich das *ALPL*-Gen, dessen Produkt die gewebeunspezifische Alkalische Phosphatase ist. Diese ist stark aktiv in gesunden arachnoidalen Zellen und in Zellen von WHO-Grad I Meningeomen. In Geweben mit einem Verlust von 1p ist die Enzymaktivität der gewebeunspezifischen Alkalischen Phosphatase bedeutend geringer als in Geweben mit anderen Karyotypen.⁴³

Deshalb führten *Niedermayer et al.* 1997 eine histochemische Detektion der gewebeunspezifischen Alkalischen Phosphatase an Gewebeschnitten als Detektion für den Verlust von 1p ein. Eine aufwendige Karyotypisierung konnte so durch eine schnelle und kostengünstige Alternative zur Bestimmung des 1p-Verlustes ersetzt werden.⁴⁴ *Bouvier et al.* zeigten, dass ein Verlust der Aktivität der Alkalischen Phosphatase als Indikator für ein erhöhtes Rezidivrisiko eines Meningeoms genutzt werden kann.⁸ Das *ALPL*-Gen wird deshalb als Tumorsuppressorgen angesehen.

Auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 werden weitere Kandidatengene kodiert (vgl. *Tabelle 5*). Für *EPB41* und *GADD45A* konnte kein Zusammenhang zwischen dem Expressionsmuster und dem Rezidivverhalten von Meningeomen gezeigt werden.⁴⁹ Ebenso konnten *Mendiola et al.* zeigen, dass *hRAD54* nicht in der Pathogenese von atypischen Meningeomen involviert ist. Ein negativer Einfluss durch Genpolymorphismen konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden.⁴¹

Außerdem wurde gezeigt, dass die Expression von *INK4C* und Mutationen von *CDKN2C* und *TP73* nicht mit der Prognose bei Meningeomen korrelieren.^{30,16}

Tabelle 5: Kandidatengene auf Chromosom 1p

Gen	Lokus	Funktion
TP73	1p36.3	Apoptose
EPB41	1p36.2-p34	Verbindet Zellmembranproteine mit Zytoskelett
ALPL	1p36.1-p34	Alkalische Phosphatase
RAD54, RAD54L, hRAD54	1p32	DNA Reparatur
INK4C, CDKN2C	1p32	Zellzykluskontrolle
GADD45A, GADD45, DDIT1	1p31.2-p31.1	DNA Reparatur
NRAS	1p13.2	Singaltransduktion

Chromosom 10

Der Verlust von Chromosom 10 ist bei Meningeomen mit einer erhöhten Malignität der Tumore assoziiert. Ein Verlust von Chromosom 10 ist in etwa 5-12 % der benignen

Meningeome, in 29-40 % der atypischen und in 40-58 % der malignen Meningeome nachweisbar.³¹

In primären Glioblastomen konnte ein *Loss of heterozygosity* von Chromosom 10 in 90 % der Tumore nachgewiesen werden.⁴⁵ Auch Prostata-, Nierenzell- und Mammakarzinome zeigen einen Verlust von Chromosom 10, insbesondere von Chromosom 10q. Dies lässt darauf schließen, dass in dieser Region Tumorsuppressorgene liegen (vgl. *Tabelle 6*).^{35,64}

Mögliches Kandidatengen ist *PTEN/MMAC1*. Das *PTEN*-Gen (Synonym *MMAC1*) auf Chromosom 10q23.3 kodiert für das gleichnamige Protein. *PTEN* beeinflusst das Zellwachstum durch Antagonisierung von Tyrosinkinase und reguliert die Tumorzellinvasion und Metastasierung.³⁵ *PTEN*-Mutationen wurden von *Steck et al.* in Glioblastomen, Prostata-, Nierenzell- und Mammakarzinomen gezeigt.⁶⁴ In einer Studie von *Bostrom et al.* wurde gezeigt, dass ein Verlust von Chromosom 10q zwar in 69 % der Glioblastome und in 41 % der Meningeome existiert, allerdings konnte eine Genmutation des *PTEN*-Genes nur in 25 % der untersuchten Glioblastome nachgewiesen werden. Eine *PTEN*-Mutation in den untersuchten Meningeomen wurde nicht detektiert. Es ist also davon auszugehen, dass es noch weitere Tumorsuppressorgene in dieser Region geben könnte.^{16,7}

Hinsichtlich des Überlebens der Patienten mit Meningeomen und des Auftretens von möglichen Rezidiven gehen ein *Loss of heterozygosity* auf Chromosom 10q26.12 und 10q26.3 mit einer kürzeren Überlebenszeit und respektive oder mit einer kürzeren Zeit bis zum Auftreten eines Rezidives einher.³¹

Weitere Kandidatengene auf Chromosom 10q sind *MXI1* und *DMBT1*. Ein Zusammenhang zwischen diesen Genen und der Tumorgenese von Meningeomen ist bisher nicht beschrieben.

Tabelle 6: Kandidatengene auf Chromosom 10q

Gen	Lokus	Funktion
PTEN, MMAC1	10q23.31	Zellzykluskontrolle
MXI1	10q25	Myc Antagonist
DMBT1	10q25.3-q26.1	Immunantwort?, Differenzierung?

Chromosom 17

Chromosomale Aberrationen von Chromosom 17 wurden bisher nur in Meningeomen vom WHO Grad II und III beschrieben.^{16,69,26,33,2} Dabei wurde meist ein chromosomaler Gewinn oder eine Amplifikation einer Genregion festgestellt.¹⁶ *Weber et al.* zeigten eine Amplifikation einer Genregion auf dem langen Arm von Chromosom 17 in 42 % der untersuchten anaplastischen Meningeome (WHO III). Mögliches Onkogen dieser Region ist *RPS6KB1*.^{69,9}

Ein *Loss of heterozygosity* auf Chromosom 17p hingegen konnte von *Lee et al.* 2004 in vier von 43 Fällen gezeigt werden, von *Kim et al.* 1998 in zwei von 30 untersuchten Meningeomen. Die untersuchten Tumoren waren maligne Meningeome (WHO III).^{26,33} Einen Verlust von Chromosom 17 durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) konnte von *Arnoldus et al.* 1992 in einem von 30 Fällen gezeigt werden. Das untersuchte Meningeom war ein Rezidiv.²

Bekannt Tumorsuppressorgene auf Chromosom 17 sind *TP53* und *BRCA1*. Deletionen von *TP53* gehen laut einer Studie von *Yakut et al.* vermutlich mit höhergradigen Meningeomen und erhöhter Rezidivwahrscheinlichkeit einher. Die Gruppe zeigte mittels FISH in drei von elf WHO II und III Meningeomen eine Deletion von *TP53*. Alle drei Tumoren rezidierten im Verlauf. Im Vergleich dazu gab es keine *TP53*-Deletion in 23 WHO I Meningeomen.⁷²

In einer Studie von *Kirsch et al.* konnte in 60 untersuchten Meningeomen kein *Loss of heterozygosity* für *BRCA1* und *BRCA2* gezeigt werden. Ein Zusammenhang zwischen genetischen Alterationen von *BRCA1* und *BRCA2* und dem Auftreten von Meningeomen ist daher nicht bewiesen.²⁸

Kawai et al. konnten zeigen, dass eine Deletion von 17q als prädiktiver Marker für das Auftreten von Lebermetastasen beim kolorektalen Karzinom fungiert. In dieser Region befinden sich die Kandidatengene *NM23* und *ERBB2* (Onkogen).²¹ Eine gesteigerte Expression von *NM23* geht mit einer verbesserten Prognose sowohl beim kolorektalen Karzinom als auch beim Mamma Karzinom einher.^{13,14} Eine Korrelation zwischen einer Deletion von 17q und dem Auftreten von Rezidiven beim kolorektalen Karzinom oder beim Mamma Karzinom ist nicht beschrieben. Bei den Meningeomen geht eine Deletion von Chromosom 17q mit einer erhöhten Malignität einher. Ob auch hier *NM23* eine Rolle in der Progression spielt, ist bisher unklar. *Sefrioui et al.* beschrieben, dass eine hohe Kopienzahl von *ERBB2* im kolorektalen Karzinom zu einem kürzeren krankheitsfreien Überleben führt.⁶² Auch bei Meningeomen wurde gezeigt, dass ein

Gewinn von 17q mit erhöhter Malignität einhergeht. Ob *ERBB2* hier eine Rolle als Onkogen spielt, ist bisher ebenfalls nicht beschrieben.

Tabelle 7: Kandidatengene auf Chromosom 17

Gen	Lokus	Funktion
TP53 (p53)	17p13.1	Apoptose, Zellzykluskontrolle
NF1	17q11.2	RAS-Signalweg, Zellzykluskontrolle
RPS6KB1	17q23.2	Proliferationskontrolle
BRCA1	17q21.31	DNA Reparatur
NM23	17q21.33	Nukleosiddiphosphatkinase

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Ausgangspunkt der Arbeit war der in der *Comparative genomic hybridization* (CGH) des siebten Rezidives eines Patienten nachgewiesene Verlust von Chromosom 17. Die zuvor mittels CGH untersuchten Rezidive des Patienten zeigten diese Aberration nicht. Bisher gibt es keine Studien, die einen Verlust von Chromosom 17 in Meningeom und ihren Rezidiven mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zeigen.

In dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob der Verlust von Chromosom 17 ein spätes genetisches Ereignis in der Tumorprogression von Meningeomen darstellt, oder ob der Verlust auch in Primärtumoren und frühen Rezidiven auftritt. Die Ergebnisse wurden mit zytogenetischen Vorbefunden, die durch die Arbeitsgruppe erstellt wurden, verglichen.

Die Sensitivität der FISH zur Bestimmung einzelner chromosomaler Aberrationen ist größer als die der CGH.^{34,46} Daher wurde in dieser Arbeit die FISH als Methode zur Detektion einer Deletion von Chromosom 17q gewählt.

Um eine Aussage über den Zeitpunkt des Auftretens einer Deletion von Chromosom 17q in der Tumorgenese der untersuchten Meningeome treffen zu können, erfolgte die zytogenetische Untersuchung von mindestens zwei unterschiedlichen Tumorproben pro Patient, welche aus den Operationen der Primärtumor- oder Rezidivtumor Erkrankungen gewonnen wurden.

Zusätzlich wurden für 21 Tumore chromosomale Aberrationsmuster ausgewertet, die sich aus den FISH-Befunden für die Chromosomen 1, 10, 17 und 22 zusammensetzten. Hierbei wurden die Häufigkeit der einzelnen Muster ermittelt und Rückschlüsse auf das Wachstumsverhalten der Tumoren gezogen. Geprüft wurde zusätzlich, ob ein

Zusammenhang zwischen dem WHO-Grad der Meningeome und den Aberrationsmustern besteht.

Diese Arbeit soll also Aufschluss über die folgenden Fragen geben:

- Ist der Verlust von Chromosom 17 ein spätes Ereignis in der Tumorprogression der Meningeome?
- Korreliert der Verlust von Chromosom 17 mit dem WHO-Grad der Tumoren?
- Welchen klinischen Einfluss könnte der Verlust von Chromosom 17 auf die Nachsorge von Meningeom-Patienten nach erfolgter Tumorsektion haben?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenpopulation

Untersucht wurden sieben Patienten (drei Frauen, vier Männer) mit rezidivierenden Meningeomen. Dabei wurden von jedem Patienten mindestens zwei verschiedene Tumoren untersucht. Als Tumorproben lagen entweder Teile des Primärtumors und mindestens eines Rezidives, oder Tumoranteile von mindestens zwei Rezidiven des gleichen Patienten vor. Die Anzahl aller den Kriterien entsprechenden und untersuchten Tumorproben betrug 22.

Die Patienten wurden in der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes im Zeitraum von Juni 1999 bis Oktober 2015 operiert. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug zum Zeitpunkt der Erstdiagnose 45,4 Jahre. Das durchschnittliche Alter der weiblichen Patienten betrug bei Erstdiagnose 50,3 Jahre, das der männlichen Patienten 39 Jahre. Alle Patienten erteilten ihr schriftliches Einverständnis zur genetischen Analyse der Tumorproben. Ein positives Votum der Ethikkommission der Landesärztekammer des Saarlandes liegt vor (Kennnummer 178/07).

Die Tumorproben wurden nach der Entnahme bis zur Erstellung der Tupfpräparate in der institutseigenen Tumorbank bei -80°C kryokonserviert.

2.1.2 Klinische Variablen

Tumorklassifikation

Entsprechend der Klassifikation von *Olivecrona* von 1947 erfolgte die Unterteilung in neun unterschiedliche Lokalisationen: Konvexität, parasagittale Region, Tuberculum sellae, Olfaktorius, Keilbeinflügel, hintere Schädelgrube, Tentorium, ventrikulär und Spinalkanal.⁴⁷

Die Lokalisation der Meningeome wurde an Hand der präoperativen CCT bzw. MRT Untersuchungen festgelegt.

Tumorentfernung

Als vollständig entfernt wurden solche Meningeome klassifiziert, welche im Grad I und II nach Simpson reseziert wurden.

Histologische Klassifikation

Die untersuchten Tumoren umfassten ein Meningeom des WHO-Grades I, 13 Meningeome des WHO-Grades II, und acht Meningeome des WHO-Grades III. Repräsentative Tumoranteile wurden in den Instituten für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes histopathologisch untersucht.

2.2 Methoden

2.2.1 Silanisieren der Objektträger

Die Objektträger (OT) wurden für die Herstellung der Tupfpräparate silanisiert. Hierzu wurden die OT für 30 sec in Aceton gewaschen und geschwenkt.

Es folgte ein Waschschrift für 10 sec in 2 % 3-(Triethoxysilyl)-propylamin und eine Spülung der OT, zweimalig in Aceton und zweimalig in *Aqua destillata* (A.d.). Die OT wurden im Wärmeschrank bei 37 °C getrocknet.

2.2.2 Herstellung der Tupfpräparate

Die tiefgefrorenen Tumorproben wurden bei Raumtemperatur zum Antauen gebracht und unter der Sterilbank mit einer Pinzette auf die OT getupft.

Die Tupfpräparate wurden 10-15 min lang getrocknet und für 30 sec in DeLauney-Fixans fixiert.

Die Tupfpräparate wurden an der Luft getrocknet anschließend bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.3 Herstellung der DNA-Sonden

In dieser Arbeit wurden zur Herstellung der DNA-Sonden Plasmid-Vektoren verwendet, die zuvor von der Arbeitsgruppe hergestellt wurden.

Mit der Biotin-Nick-Translation nach *Rigby et al.* wurden die Plasmid-Vektoren fragmentiert und die entstandenen DNA-Fragmente wurden anschließend markiert. Das Produkt ist die DNA-Sonde⁵⁴.

Für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) erwies sich eine Länge der DNA-Sonden von 200 bis 500 Basenpaaren als effektiv⁴².

Biotin-Nick-Translation nach Rigby et al. 1977

Bei der Biotin-Nick-Translation wurden mit dem Hapten Biotin markierte Nukleotide (Biotin-16-dUTP) in die Sonden-DNA für Chromosom 10 eingebaut. Das Biotin ist dabei über Kohlenstoffatome mit dem Uridin der Nukleotide verbunden. Die markierten Nukleotide sind im Biotin-Nick-Translations-Mix enthalten.

Dieser enthält weiterhin DNase I, DNA Polymerase I und nicht markierte Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). In einem ersten Reaktionsschritt fügt die DNase I in Anwesenheit von Mg²⁺-Ionen Einzelstrangbrüche („Nicks“) in die Plasmid-DNA ein. Daraufhin entfernt die DNA-Polymerase I durch ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität aus den Nicks einzelne Nukleotide in Syntheserichtung und ersetzt durch ihre Polymeraseaktivität die entfernten Nukleotide durch die im Biotin-Nick-Translations-Mix enthaltenen markierten und unmarkierten Nukleotide.

Durchführung der Biotin-Nick Translation

Als Reaktionsansatz wurden 1200-1500 ng Plasmid-DNA mit 4 µl Bio-Nick-Translations-Mix zusammen in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und mit A.d. auf 20 µl aufgefüllt. Es erfolgte die Inkubation des Ansatzes für 90 min bei 15 °C im Thermomixer und dann das Stoppen der Reaktion mit 1 µl 0,5 M EDTA. Der Reaktionsansatz wurde wiederholt inkubiert, für 10 min bei 65 °C im Thermomixer oder im Wasserbad. Zum Fällern der DNA aus dem Reaktionsansatz wurden 2,1 µl 3 M NaAc und 52,5 µl EtOH absolut (-20 °C) hinzupipettiert und über Nacht bei 4 °C gelöst.

Am Folgetag wurde das Eppendorfgefäß mit dem Reaktionsansatz für 25 min bei 4 °C und 14000 U/min zentrifugiert. 200 µl EtOH 70 % wurden hinzugegeben und die Lösung weitere 15 min bei 4 °C und 14000 U/min zentrifugiert.

Der Überstand über dem am Boden des Eppendorfgefäßes ausgefallenen DNA-Anteils (Pellet) wurde abpipettiert und verworfen. Das verbliebene Pellet wurde bei 37 °C auf der Heizplatte getrocknet und über Nacht in 40 µl A.d. gelöst.

Der Erfolg der Biotin-Nick-Translation wurde mit Hilfe der Dot-Blot-Technik überprüft.

Dot Blot Technik

Die Technik beruht auf der Eigenschaft von Nitrocellulose DNA zu binden und diese durch eine enzymatische Reaktion sichtbar zu machen. Sie wurde erstmals von *Timmons und Dunbar* 1990 beschrieben.⁶⁵

Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe der markierten DNA-Sonde angefertigt und jeweils 1 µl jeder Verdünnungsstufe untereinander punktförmig auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen und an der Luft getrocknet.

Tabelle 8: Dot-Blot Verdünnungsreihe mit Absteigender Konzentration der Sonde

V1	1 µl Sonden-DNA in 9 µl 6xSSC
V2	1 µl V1 in 9 µl 6xSSC
V3	1 µl V2 in 9 µl 6xSSC
V4	1 µl V3 in 9 µl 6xSSC
V5	1 µl V4 in 9 µl 6xSSC
V6	1 µl V5 in 9 µl 6xSSC

Die Bindung von DNA und Nitrocellulose wurde durch das Backen der Membran für 30 min bei 90 °C verstärkt.

Anschließend wurden durch die Zugabe von circa 20 ml Blockpuffer für 30 min bei 37 °C die unspezifischen Bindungen gesättigt. Nach Abkippen des Blockpuffers folgte das zweimalige Waschen der Membran in TN-Puffer. Die Nitrocellulosemembran wurde mit 3 µl Streptavidin-Alkalischer Phosphatase, bzw. Anti-Dig-Alkalische Phosphatase und 3 ml TN-Puffer für 30 min bei Raumtemperatur unter ständiger Bewegung auf einer Schüttelplatte inkubiert. Nach einem Waschschrift mit TN-Puffer und 10-minütiger Behandlung der Nitrocellulosemembran mit dem Dot-Puffer auf der Schüttelplatte, erfolgte die Zugabe der Substrate BCIP und NBT, deren Reaktionsprodukt mit der Alkalischen Phosphatase als violetter Farbstoffkomplex sichtbar wurde. Hierzu wurden 5,7 ml Dot-Puffer, 33 µl NBT und 25 µl BCIP vermischt, auf die Membran gegeben und 30 min im Dunkeln inkubiert. Das Stoppen der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von etwa 10 ml EtOH 70 %.

Die Farbreaktion verhält sich proportional zur Einbaurate der mit Biotin markierten Nukleotide und konnte deshalb kolorimetrisch gemessen werden. Um in der FISH erfolgreich angewendet werden zu können, sollte die Sonden-DNA im Dot-Blot noch

bis zur Verdünnungsstufe V5 sichtbar sein (entspricht einer Sonden-Konzentration von 1 pg/ μ l). Die in dieser Arbeit verwendeten Sonden erfüllten diese Bedingung.

2.2.4 Vergleichs- und Kontrollmaterial

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Sonden wurden vorab mittels FISH an Interphasekernen von gesunden, humanen Lymphozyten auf ihre Spezifität und Signalqualität getestet.

Zur Herstellung der Lymphozytenpräparate wurde einem Spender venöses Blut in einem Lithiumheparinröhrchen entnommen und in einer Vollblutkultur über 72 Stunden bei 37 °C im Brutschrank kultiviert und einmal täglich geschwenkt. Zum Ansatz der Vollblutkultur wurden 0,8 ml Vollblut und 8 ml Medium PB-MAX™ Karyotyping zusammen in ein Zellkulturgefäß gegeben.

Nach 70,5 Stunden wurde die Mitose der Lymphozyten, die sich zu diesem Zeitpunkt in der Metaphase befanden, gestoppt. Hierzu wurden 40 μ l sterile Colcemid-Lösung zum Kulturansatz hinzugegeben. Der Vorgang diente dem Gewinn von Chromosomen, die sich später lichtmikroskopisch darstellen ließen. Die Kultur wurde für 1,5 Stunden bis zum Ablauf der insgesamt 72 Stunden bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert.

Das Medium-Blut-Gemisch wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 1000 U/min ohne Bremse zentrifugiert. Der sichtbare Überstand wurde bis auf ein Minimum abgesaugt und erst tropfenweise mit 37 °C warmem 0,52 % KCl bis auf ein Endvolumen von 8 ml überschichtet und danach ohne Luftblasen mit einer Pasteurpipette resuspendiert.

Beim Starten des Resuspendierens wurde gleichzeitig eine Stoppuhr eingeschaltet. Nach 1 bis 2 min wurden die resuspendierten Lösungen bei 37 °C im Wasserbad bis zum Ablauf von 8 min inkubiert. Das KCl bewirkt durch seine osmotische Wirkung einen Wassereinstrom in die Lymphozyten, der in Kombination mit dem Vorgang des Resuspendierens zu einem Platzen der Zellen führt. Infolgedessen kommen die Zellkerne frei zum Liegen.

Die Probenröhrchen wurden weitere 10 min bei 1000 U/min ohne Bremse zentrifugiert und das überstehende KCl bis auf einen Rest von circa 0,5 ml abpipettiert und verworfen. Im verbleibenden KCl-Rest wurde das Pellet am Boden resuspendiert und zur Hälfte in einer Pasteurpipette aufgenommen. Ein Tropfen eiskalte Fixativ-Lösung, die zuvor bei -18 °C gelagert wurde, wurde in das Probenröhrchen gegeben und die

Zellen darin resuspendiert. Der Vorgang wurde mit schrittweise größer werdenden Fixativ-Volumina bis auf ein Endvolumen von 8 ml wiederholt. Es folgte die Inkubation der Lösung bei -20 °C für 1 Stunde und das Zentrifugieren für 10 min bei 1000 U/min ohne Bremse.

Der Überstand wurde abpipettiert und der Vorgang des Resuspendierens mit der Fixans-Lösung, die Inkubation bei -20 °C für 1 Stunde und das Zentrifugieren für 10 min bei 1000 U/min noch mindestens zweimal wiederholt.

Die fixierte Zellsuspension wurde mit einer Pipette aus einer Höhe von etwa 50 cm auf gereinigte OT getropft und für 3 Tage an der Luft getrocknet. Die optische Kontrolle der Lymphozytenpräparate erfolgte unter dem Phasenkontrastmikroskop.

2.2.5 Direkte und indirekte Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Einführung

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) dient dem Nachweis von DNA oder RNA direkt in fixierten Präparaten von Geweben oder Zellen. In dieser Arbeit wurde die Methode zur Detektion von DNA in isolierten Zellkernen angewandt. Es wurde ein modifiziertes Protokoll nach *Pinkel et al.* verwendet.⁵⁰

Die Technik beruht auf dem Prinzip der komplementären Basenpaarung, bei der eine künstlich hergestellte Sonde aus einer Nukleinsäure an die komplementäre Nukleinsäure im zu untersuchenden Präparat sequenzspezifisch hybridisiert (vgl. *Abbildung 2*).

Die Bezeichnung „in-situ“ bedeutet, dass die Methode unmittelbar am jeweiligen Gewebe oder der zu untersuchenden Struktur angewandt wird.

Um das Ergebnis der FISH sichtbar zu machen, wurden in dieser Arbeit nichtradioaktiv markierte Sonden in direkten und indirekten Markierungs- und Detektionssystemen verwendet. Diese unterscheiden sich in der Anzahl ihrer Komponenten, den Reaktionsschritten und in der Flexibilität der Anwendung. Merkmal der direkten Systeme (Sonden für Chromosom 1p und 22q) ist, dass an die DNA-Sonde direkt ein fluoreszierender Farbstoff wie FITC oder Cy3 gekoppelt ist.

Bei den indirekten Systemen (Sonden für Chromosom 17q und 10) werden zuerst niedermolekulare Modifikationsgruppen (zum Beispiel Haptene wie Biotin) über die Nick-Translation in die Sonden-DNA integriert. An diese Modifikationsgruppen

binden universelle Detektionseinheiten (Proteine oder Antikörper) über nichtkovalente Wechselwirkungen.

Um das Sondensignal unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen, werden fluoreszierende Reportermoleküle (z.B. Fluorochrome) an die Detektionseinheit gekoppelt.⁵⁰

Ziel der FISH ist der Nachweis genetischer Aberrationen, beispielsweise in Form von Verlusten oder Gewinnen chromosomaler DNA. Bei der FISH können simultan mehrere Fluorochrome, bzw. Farbstoffe, zur Anwendung kommen, wodurch die gleichzeitige gezielte Untersuchung mehrerer Chromosomen möglich ist.

Entscheidend bei der Auswertung der FISH sind die Anzahl der sichtbaren Hybridisierungssignale sowie ihre räumliche Beziehung zueinander.

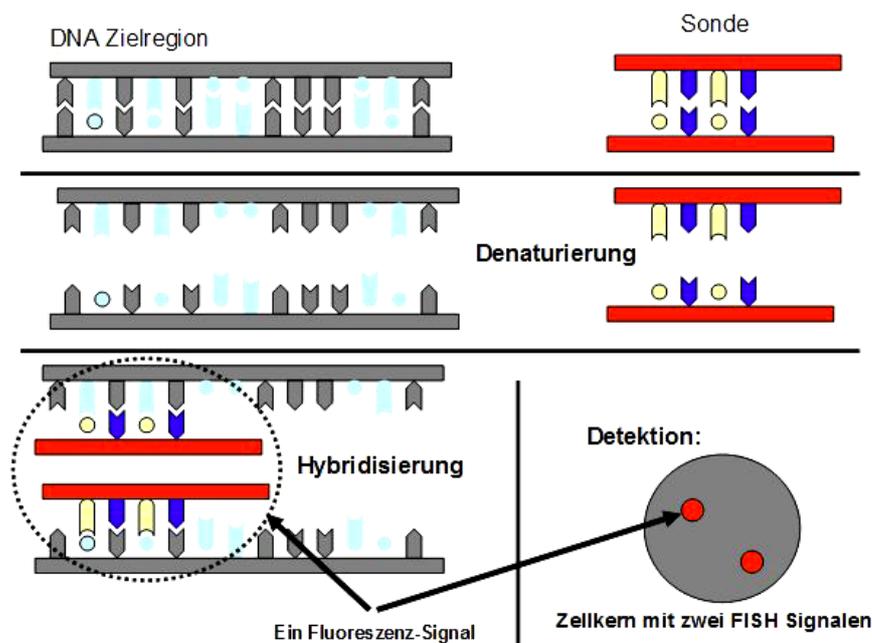


Abbildung 2: Das Prinzip der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Durchführung

Vorbehandlung der Objektträger

Die Tupfpräparate (Tumorproben) oder Tropfpräparate (Lymphozyten) wurden mit einer RNase Lösung vorbehandelt, um die Rate an Fehlhybridisierungen der DNA-Sonden an RNA-Sequenzen zu minimieren. Hierzu wurden 100 µl 2xSSC und 1 µl RNase auf die OT pipettiert, mit einem Deckglas versehen und für 30 min bei 37 °C

in einer feuchten Kammer im Wärmeschrank inkubiert. Alle OT wurden für 3 mal 5 min bei Raumtemperatur in einer Küvette in 2xSSC gewaschen. Anschließend erfolgte nur für die Tupfpräparate, die mit dem indirekten Detektionssystem behandelt wurden, das Spülen der OT in 2xSSC in einer Küvette bei 70 °C im Wasserbad.

Pepsinbehandlung

Es erfolgte eine Pepsinbehandlung der OT, deren Dauer je nach Präparat und Detektionssystem variierte (Lymphozyten: 1:35 min, Tupfpräparate: 1:55 - 2:45 min). Hierfür wurden in einer Küvette 100 ml A.d., 120 µl 25 % HCl und 100 µl 10 % Pepsinlösung bei 37 °C im Schüttelwasserbad vermischt und die OT in die Lösung gestellt. Der Pepsinverdau dient der Vorbereitung der Zellkernmembranen auf dem OT, sodass diese für die DNA-Sonden permeabel werden.

Fixierung und Dehydrierung

Die Präparate wurden zur Fixierung für 5 min in eine Küvette in 1xPBS gestellt und für 10 min in einer Lösung aus 4 % PFA/PBS bei 4 °C inkubiert. Die OT wurden wenige Sekunden in 1xPBS gespült und für 5 min in frischem 1xPBS bei Raumtemperatur gewaschen.

Für die Tupfpräparate, die mit dem indirekten Detektionssystem behandelt wurden, folgte eine Inkubation für 20 min in einer Küvette mit 2xSSC bei 70 °C im Wasserbad. Es schloss sich die Dehydrierung der Präparate an, wozu die OT jeweils für 5 min mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 80 %, 99 % EtOH) behandelt und für 30 min an der Luft getrocknet wurden.

Denaturierung und Hybridisierung

Auf jeden Objektträger wurden im indirekten System 10 µl Hybridisierungs-Mix gegeben, welcher pro OT folgende Zusammensetzung aufwies:

- 7 µl Hybridisierungspuffer
- 1,0 µl Sonde 17 (Digoxigenin-markiert)
- 1,25 µl Sonde 10 (Biotin-markiert)
- 0,5 µl A.d.

Im direkten System für die Sonden 1p und 22q wurden je 5 µl des fertigen Hybridisierungsmixes auf die OT gegeben. Alle OT wurden luftdicht mit einem 18x18 mm großen Deckglas und Fixogum verschlossen und getrocknet.

Für die FISH müssen sowohl die DNA-Sonde als auch die DNA der Tumorproben als DNA-Einzelstränge vorliegen. Hierzu wurden die Präparate durch Erhitzen (indirektes System 10 min bei 80 °C, direktes System 2 min bei 75 °C) über ihren Schmelzpunkt hinaus auf der Heizplatte denaturiert. Um die Struktur der Chromosomen beim Erhitzen über den Schmelzpunkt hinaus weniger stark zu zerstören, wurde letzterer durch die Zugabe von 6 µl Formamid in den Hybridisierungspuffer auf 75-80 °C herabgesetzt. Durch seine starke Polarität schwächt Formamid die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Einzelsträngen ab und ermöglicht somit eine Denaturierung der DNA auch bei geringeren Temperaturen.

Die Renaturierung der DNA erfolgte über Nacht unter langsamem Abkühlen bei 37 °C in der Wärmekammer. Die markierte Sonde hybridisierte komplementär an die Target-DNA im zu untersuchenden Gewebe.

Stringenzwaschung

Das Fixogum wurde mit einer Pinzette entfernt und das Deckglas abgeschlagen. Durch die Stringenzwaschung wird erreicht, dass nicht, oder nur unspezifisch, hybridisierte Sonden-Anteile aus dem Präparat ausgewaschen werden.

Für die Präparate, die mittels des direkten Detektionssystems behandelt wurden, erfolgte die Stringenzwaschung in 0,4 x SSC in einer Küvette im Wasserbad bei 72 °C für 2 min.

Die OT wurden bei Raumtemperatur für 30 sec in 2xSSC/0,05 % Tween-20 gewaschen, für 10 sec in A.d. gespült und für 30 min an der Luft getrocknet.

Für die mit dem indirekten System behandelten Präparate erfolgte die Stringenzwaschung durch Waschen der OT in 2xSSC bei 42 °C in einer Küvette im Schüttelwasserbad für 2 mal 5 und 1 mal 7 min (Lymphozyten 3 mal 5 min) sowie anschließendes Waschen in 60 % FA/2xSSC bei 42 °C für 2 mal 5 und 1 mal 7 min (Lymphozyten 3 mal 5 min) in einer Küvette im Schüttelwasserbad.

Detektion der Signale

Die OT wurden zur Detektion der Signale für 5 min in einer Küvette mit 4xSSC/0,1 % TritonX bei Raumtemperatur behandelt. Es schloss sich das 1. Blocken der unspezifischen Bindungsstellen an. Hierfür wurden 100 µl 5 % BSA/4xSSC auf jeden OT pipettiert, diese mit einem Deckglas versehen und in einer feuchten Kammer bei

Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Die anschließenden Arbeitsschritte erfolgten im Dunkeln um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern.

Die Detektion der Signale erfolgte durch die Zugabe von 0,5 µl Streptavidin-FITC in einer Lösung mit 100 µl 5 %BSA/4xSSC pro OT, Abdecken der OT mit einem Deckglas und der Inkubation in einer feuchten Kammer bei 37 °C im Wärmeschrank für 60 min. In dieser Zeit bindet das mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC markierte Streptavidin an das in die DNA-Sonde integrierte Biotin.

Die Deckgläser wurden abgeschlagen und die OT für 2 mal 5 min und 1 mal 7 min (Lymphozyten 3 mal 5 min) in einer Küvette mit 4xSSC/0,1 % TritonX bei 42 °C im Schüttelwasserbad gewaschen.

Amplifikation des FITC-Signals und Detektion der Digoxigenin-markierten Sonde

Ein zweites Blocken der unspezifischen Bindungen wurde für 10 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Amplifikation des FITC-Signals erfolgte durch die Zugabe einer Mischung aus 0,5 µl anti-Streptavidin in einer Lösung mit 100 µl 5 %BSA/4xSSC pro OT. Zur Detektion der Digoxigenin-markierten Sonde wurde dieser Lösung zusätzlich 0,25 µl anti-Dig-Cy3 pro OT hinzugefügt und die Lösung auf die OT pipettiert, die OT mit einem Deckglas versehen und in einer feuchten Kammer bei 37 °C für 60 min inkubiert. Das Anti-Streptavidin bindet in einer Antigen-Antikörper-Reaktion an die vier Untereinheiten des zuvor applizierten Streptavidins und amplifiziert dadurch das FITC-Signal, das anti-Dig-Cy3 bindet an die mit Digoxigenin markierte Sonde und detektiert das Cy3-Signal.

Identisch zum Vorgehen nach dem 1. Blocken wurden die OT für 2 mal 5 min und 1 mal 7 min (Lymphozyten 3 mal 5 min) in einer Küvette mit 4xSSC/0,1 % TritonX bei 42 °C im Schüttelwasserbad gewaschen und mit 100 µl 5 %BSA/4xSSC pro OT in feuchter Kammer bei Raumtemperatur für 10 min geblockt.

Es schloss sich eine wiederholte Inkubation zur Amplifikation und Detektion der Signale an. Eine Lösung aus 100 µl 5 %BSA/4xSSC, 0,5 µl Streptavidin-FITC und 0,25 µl Goat-anti-mouse-Cy3 pro OT wurde auf die OT pipettiert, mit einem Deckglas versehen und für 60 min in einer feuchten Kammer bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert.

Ein letzter Waschschrift in 4xSSC/0,1 % TritonX bei 42 °C in einer Küvette im Schüttelwasserbad für 2 mal 5 min und 1 mal 7 min (Lymphozyten 3 mal 5 min) schloss sich an.

Dehydrierung

Zur erneuten Dehydrierung wurden die OT in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 80 %, 99 % EtOH) für jeweils 5 min behandelt und für 30 min an der Luft getrocknet.

DAPI-Färbung

Zur Gegenfärbung der DNA in den Präparaten wurden für die mit dem direkten System behandelten OT 20 µl DAPI-Antifade und für die mit dem indirekten System behandelten OT 25 µl DAPI-Antifade auf die OT pipettiert.

Alle OT wurden mit einem Deckglas der Größe 26x52 mm versehen und bis zur Auswertung am Fluoreszenzmikroskop bei 4 °C gelagert.

Sichtbar sind nach Abschluss der FISH die mit DAPI-Antifade angefärbte DNA auf den OT, sowie die FITC- und Cy3-Signale der spezifisch mit den Sonden hybridisierten Ziel-DNA.

Auswertung der FISH

Die Auswertung der Präparate erfolgte mittels eines Fluoreszenzmikroskopes. Dabei wurden die Kriterien nach *Hopman et al.* Angewandt.¹⁸

Pro Präparat wurden, wenn möglich, 200 Zellkerne aus unterschiedlichen Arealen des Präparates ausgezählt. Die Zellkerne durften sich nicht überlappen. Zu Schwache Signale wurden als Fehlhybridisierung interpretiert und nicht gewertet. Signale, deren Abstand zueinander nicht mindestens einer Signalbreite entsprach, wurden als ein Signal gewertet.

Die DAPI Färbung zeigt in blau den Zellkern. In grün sichtbar sind die FITC-Signale der Sonden für die Chromosomen 10 und 1p. Rot zeigt die Cy3- Signale der Sonden für Chromosom 17q und 22q. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die durch die Sonden detektierten Abschnitte der Chromosomen 1, 10, 17 und 22.

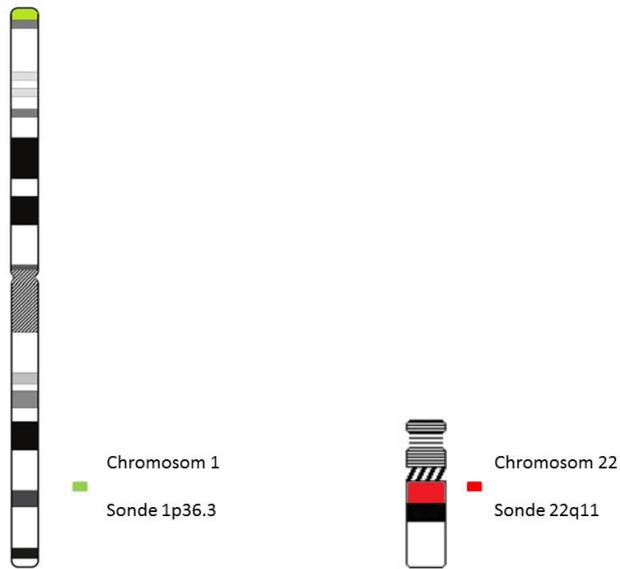


Abbildung 3: Sonden Chromosomen 1p und 22q

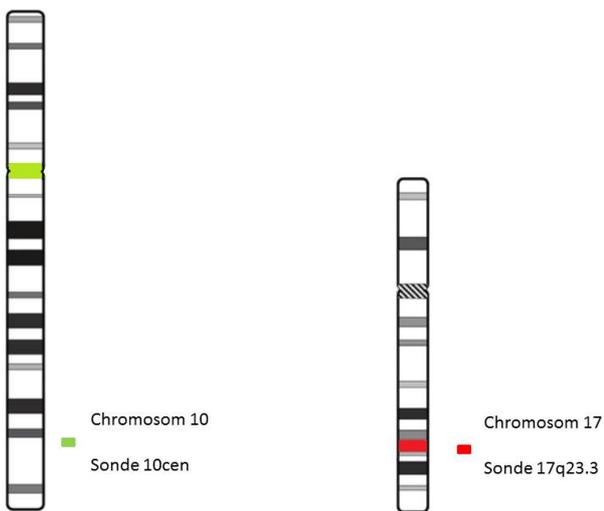


Abbildung 4: Sonden Chromosomen 10 und 17

Ein diploider Zellkern zeigt zwei Signale pro Chromosom. Ein Verlust eines Chromosoms ist also durch den fehlenden Nachweis eines FISH-Signals gekennzeichnet. Ein Gewinn eines Chromosoms durch mehr als zwei Signale pro Sonde.

Um die Signale als solche zu erkennen, dienten die Lymphozytenpräparate mit ihren Hybridisierungssignalen als Referenz. Da die Signale sich in unterschiedlichen Ebenen der Präparate befinden können, wurden alle Präparate während der Auswertung in allen Ebenen durchfokussiert.

Zur Festlegung der Grenzwerte wurden die Ergebnisse der FISH an der Kontrollgruppe (Lymphozyten von gesunden Spendern) ermittelt. Die Mehrzahl der ausgewerteten Zellerkerne wies die erwarteten zwei Signale pro applizierte Sonde auf. Um diesen Erwartungswert ergab sich allerdings aufgrund von Fehlhybridisierungen, somatischen Chromosomenpaarungen oder Verlust von Chromosomenstrukturen während der Hybridisierung eine Streuung. Es wurde angenommen, dass eine Aberration, die in mehr als 10 % der ausgewerteten Zellkerne vorhanden war, eine signifikante Aberration darstellt.

Die Aufnahmen wurden mit der Mikroskop-Kamera angefertigt und mit dem Bildbearbeitungsprogramm „cellSens Dimension“ in Helligkeit, Kontrast und Farbkanalintensität bearbeitet.

3 Ergebnisse

Inhalt dieser Arbeit sind 22 untersuchte Tumorproben von insgesamt sieben Patienten. An allen Präparaten wurde eine indirekte FISH mit der Sondenkombination 10cen/17q durchgeführt. Außerdem wurde in zehn von 22 Fällen zusätzlich eine direkte FISH mit der Sondenkombination 1p/22q durchgeführt. Ziel der Untersuchung war die Detektion chromosomaler Aberrationen der Chromosomen 1, 10, 17 und 22. In zehn von 22 Fällen waren bereits zytogenetische Vorbefunde unseres Institutes vorhanden, auf die zurückgegriffen werden konnte. Insgesamt konnten 21 vollständige Datensätze in Bezug auf die chromosomalen Aberrationen der Chromosomen 1p, 10, 17q und 22q erstellt werden.

3.1 Auswertung der FISH

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen beispielhaft an Tumor 1342/01 und 1240/02 die FISH Ergebnisse für die Sondenkombination 10/17q und 1p/22q, wie sie während der Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar sind. Die Abbildungen 3-6 zeigen jeweils einen Verlust respektive eine Deletion der untersuchten chromosomalen Regionen in den dargestellten Zellkernen.

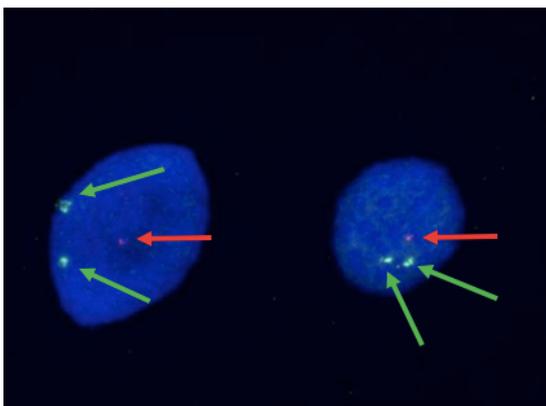


Abbildung 5: Tumor 1342/01, FISH Chromosom 10 und 17q; Deletion von Chromosom 17q, grün=Chromosom 10, rot=Chromosom 17q

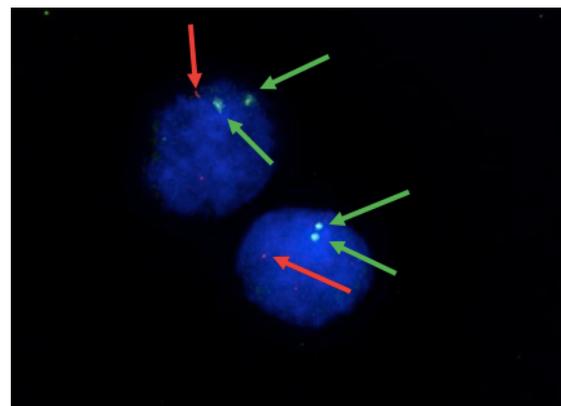


Abbildung 6: Tumor 1342/01, FISH Chromosom 10 und 17q; Deletion von Chromosom 17q, grün=Chromosom 10, rot=Chromosom 17q

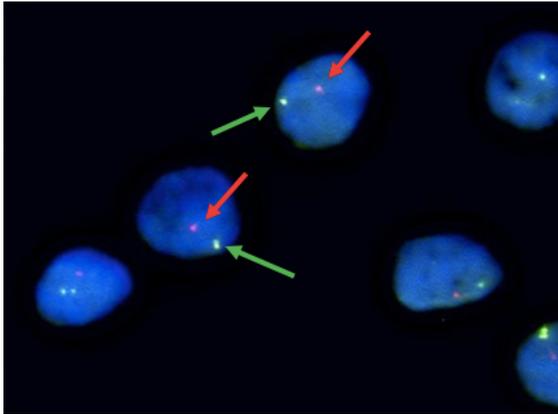


Abbildung 7: Tumor 1240/02, FISH Chromosomen 1p und 22q; Verlust von 1p und 22q, grün=1p, rot=22q

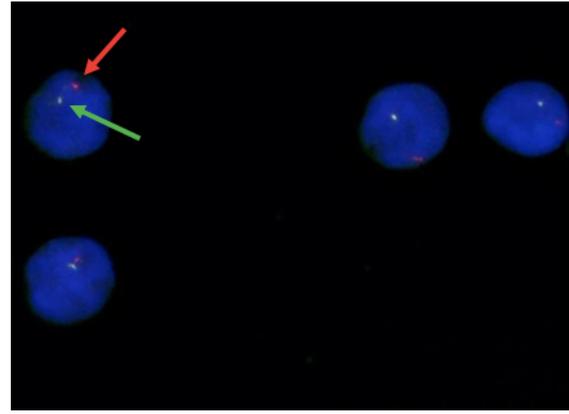


Abbildung 8: Tumor 1240/02, FISH Chromosomen 1p und 22q; Verlust von 1p und 22q, grün=1p, rot=22q

3.2 Deletion von Chromosom 17q im zeitlichen Verlauf

Die nachfolgenden Tabellen 5-11 zeigen den zeitlichen Verlauf des Verlustes von Chromosom 17 für die einzelnen Patienten in chronologischer Reihenfolge der Tumorresektionen.

Tabelle 9: Patientendaten zu Patient 1: PrimT = Primärtumor, RezX = Rezidivnummer, Kein Material = Patient wurde in auswärtiger Klinik operiert/kein Tumormaterial (mehr) in der klinikeigenen Tumorbank vorhanden

Patient	Alter bei Erstdiagnose	Tumor	OP-Daten	Tumor-Nummer	Deletion 17q
1	46 Jahre	PrimT	13.03.90	Kein Material	Kein Material
		Rez1	05.08.02	1240/02	44,50 %
		Rez2	11.10.04	1671/04	63,00 %
		Rez3	15.09.05	1440/05	32,50 %
		Rez4	24.08.06	1168/06	38,50 %

Tabelle 10: Patientendaten zu Patient 2: PrimT = Primärtumor, RezX = Rezidivnummer, Kein Material = Patient wurde in auswärtiger Klinik operiert/kein Tumormaterial (mehr) in der klinikeigenen Tumorbank vorhanden

Patient	Alter bei Erstdiagnose	Tumor	OP-Daten	Tumor-Nummer	Deletion 17q
2	38 Jahre	PrimT	09.11.09	1746/09	10,00 %
		Rez1	28.03.12	798/12	28,50 %
		Rez2	08.01.13	Kein Material	Kein Material
		Rez3	26.08.13	2376/13	0,00 %
		Rez4	11.08.14	Kein Material	Kein Material
		Rez5	21.10.15	2841/15	45,50 %

Tabelle 11: Patientendaten zu Patient 3: PrimT = Primärtumor, RezX = Rezidivnummer, Kein Material = Patient wurde in auswärtiger Klinik operiert/kein Tumormaterial (mehr) in der klinikeigenen Tumorbank vorhanden

Patient	Alter bei Erstdiagnose	Tumor	OP-Daten	Tumor-Nummer	Deletion 17q
3	34 Jahre	PrimT	30.07.81	Kein Material	Kein Material
		Rez1	24.08.88	Kein Material	Kein Material
		Rez2	19.02.02	1916/02	35,50 %
		Rez3	13.08.03	1248/03	18,50 %
		Rez4	01.02.05	168/05	52,50 %
		Rez5	19.11.08	Kein Material	Kein Material

Tabelle 12: Patientendaten zu Patient 4: PrimT = Primärtumor, RezX = Rezidivnummer, Kein Material = Patient wurde in auswärtiger Klinik operiert/kein Tumormaterial (mehr) in der klinikeigenen Tumorbank vorhanden

Patient	Alter bei Erstdiagnose	Tumor	OP-Daten	Tumor-Nummer	Deletion 17q
4	45 Jahre	PrimT	01.01.91	Kein Material	Kein Material
		Rez1	10.01.95	Kein Material	Kein Material
		Rez2	01.01.97	Kein Material	Kein Material
		Rez3	08.10.02	Kein Material	Kein Material
		Rez4	19.01.09	Kein Material	Kein Material
		Rez5	15.10.12	2630/12	68,50 %
		Rez6	18.07.13	2000/13	37,50 %
		Rez7	03.04.14	886/14	31,50 %
		Rez8	12.03.15	686/15	59,00 %

Tabelle 13: Patientendaten zu Patient 5: PrimT = Primärtumor, RezX = Rezidivnummer, Kein Material = Patient wurde in auswärtiger Klinik operiert/kein Tumormaterial (mehr) in der klinikeigenen Tumorbank vorhanden

Patient	Alter bei Erstdiagnose	Tumor	OP-Daten	Tumor-Nummer	Deletion 17q
5	32 Jahre	PrimT	06.07.99	1072/99	44,00 %
		Rez1	26.08.99	Kein Material	Kein Material
		Rez2	08.01.02	32/02	57,00 %

Tabelle 14: Patientendaten zu Patient 6: PrimT = Primärtumor, RezX = Rezidivnummer

Patient	Alter bei Erstdiagnose	Tumor	OP-Daten	Tumor-Nummer	Deletion 17q
6	61 Jahre	PrimT	05.03.01	379/01	11,00 %
		Rez1	10.08.01	1342/01	18,00 %
		Rez2	23.10.01	1808/01	0,00 %

Tabelle 15: Patientendaten zu Patient 7: PrimT = Primärtumor, RezX = Rezidivnummer, Kein Material = Patient wurde in auswärtiger Klinik operiert/kein Tumormaterial (mehr) in der klinikeigenen Tumorbank vorhanden

Patient	Alter bei Erstdiagnose	Tumor	OP-Daten	Tumor-Nummer	Deletion 17q
7	62 Jahre	PrimT	13.05.93	Kein Material	Kein Material
		Rez1	10.10.94	Kein Material	Kein Material
		Rez2	07.10.96	Kein Material	Kein Material
		Rez3	12.11.01	1936/01	51,50 %
		Rez4	15.10.13	2888/13	33,00 %

Abbildung 9 zeigt für die Patienten 1, 2, 3, 5, 6, und 7 graphisch dargestellt den prozentualen Verlustanteil von Chromosom 17q (y-Achse) in Abhängigkeit von der Zeit (x-Achse) in den untersuchten Tumoren. Patient 4 wird gesondert betrachtet (vgl. Abbildung 10).

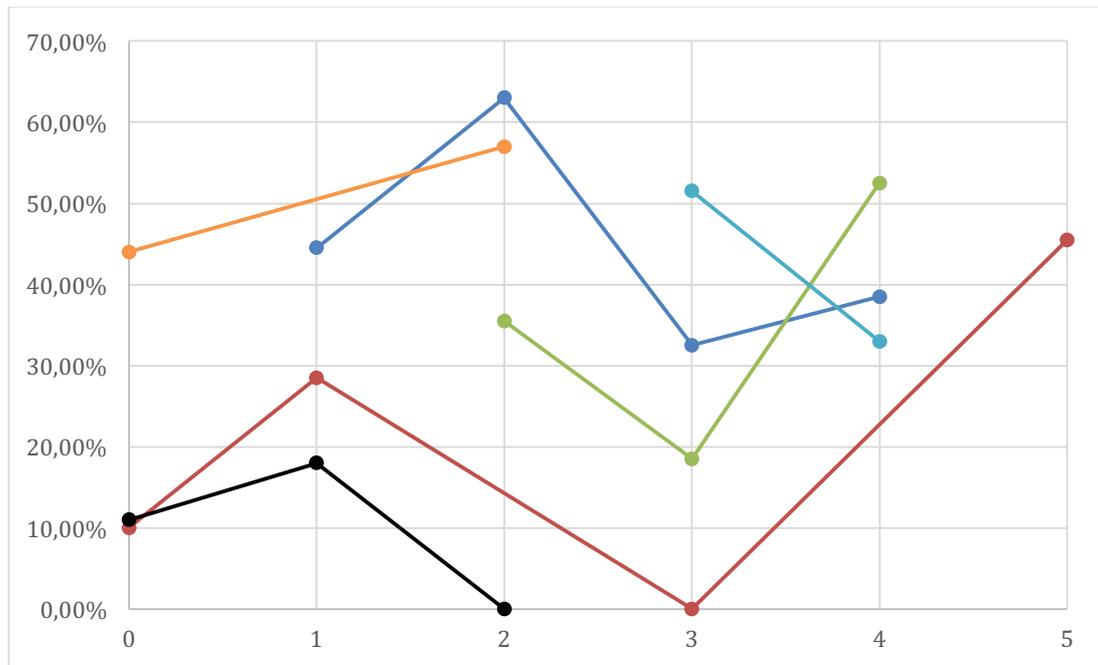


Abbildung 9: Zeitlicher Verlauf des Verlustes von Chromosom 17q für die Patienten 1, 2, 3, 5, 6, 7; x-Achse: 0= Primärtumor, 1=Rezidiv 1, 2=Rezidiv 2, 3=Rezidiv 3, 4=Rezidiv 4; y-Achse= prozentualer Verlust von Chromosom 17q im untersuchten Tumorgewebe; dunkelblau=Patient 1, rot=Patient 2, grün=Patient 3, orange=Patient 5, schwarz=Patient 6, hellblau=Patient 7

Bei allen sieben untersuchten Patienten konnte eine Deletion von Chromosom 17q gezeigt werden. Bei 5/7 Patienten war eine Deletion von Chromosom 17q in allen Tumoren nachweisbar.

Die Tumoren von Patient 6 und 2 zeigten eine initiale Deletion von Chromosom 17q, die in mindestens einem späteren Rezidiv nicht mehr nachweisbar war. Es konnte keine Deletion von Chromosom 17q gezeigt werden, die erst in einem Rezidiv, nicht jedoch im Primärtumor oder einem früheren Rezidiv nachweisbar war.

Bei den Patienten 1, 3, 4, 5 und 7 stieg der Anteil an Zellkernen mit einer nachweisbaren Deletion von Chromosom 17q zwischen dem vorletzten und dem letzten Untersuchungszeitpunkt. Insgesamt konnte allerdings keine stetige prozentuale Zunahme der Deletion von Chromosom 17q im zeitlichen Verlauf zwischen mehr als zwei Untersuchungszeitpunkten nachgewiesen werden.

Hingegen zeigte sich für die Patienten 6 und 7 eine Abnahme des prozentualen Deletionsanteils zwischen den beiden letzten Untersuchungszeitpunkten.

Der zeitliche Verlauf für Patient 4 wird in gesondert dargestellt, da bei diesem Patienten erst im fünften Rezidiv mit den Untersuchungen begonnen wurde (*Abbildung 10*).

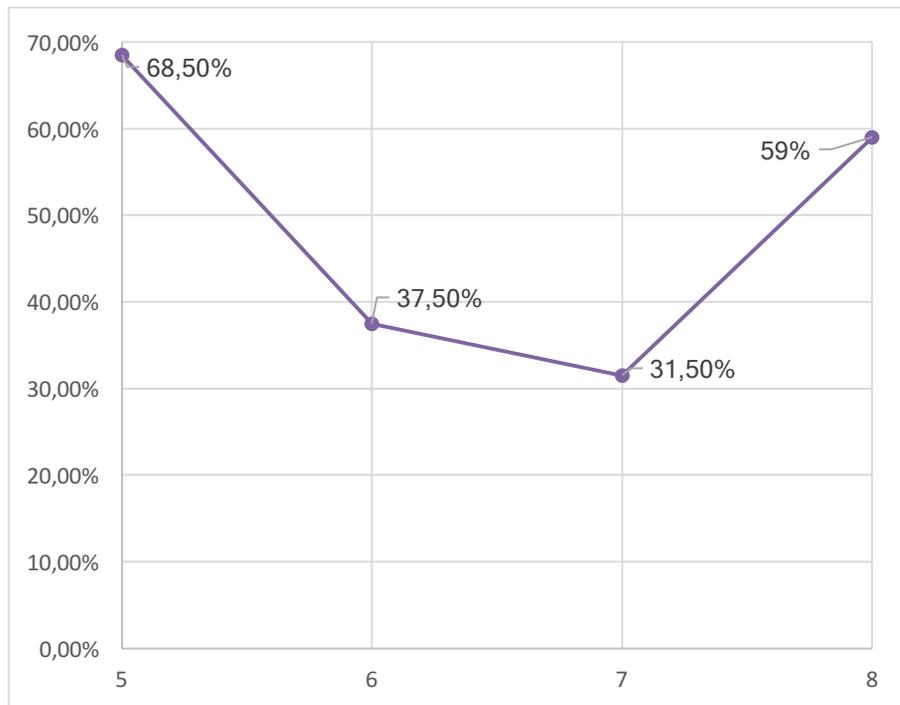


Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf des Verlustes von Chromosom 17 für Patient 4; x-Achse: 5=Rezidiv 5, 6=Rezidiv6, 7=Rezidiv7, 8=Rezidiv8; y-Achse= prozentualer Verlust von Chromosom 17 im untersuchten Tumorgewebe

Für Patient 4 zeigte sich eine Abnahme des Deletionsanteils von Chromosom 17q zwischen den Rezidiven 5 und 7 und anschließend eine Zunahme des Deletionsanteils zwischen den Rezidiven 7 und 8.

Die beschriebenen Verläufe aller Patienten wurden in unterschiedlichen Gruppen zusammengefasst (vgl. *Abbildung 11*). Hier zeigt sich, dass kein einheitlicher Verlauf hinsichtlich einer prozentualen Zu- oder Abnahme des Deletionsanteils von Chromosom 17q über die Zeit nachgewiesen werden konnte.

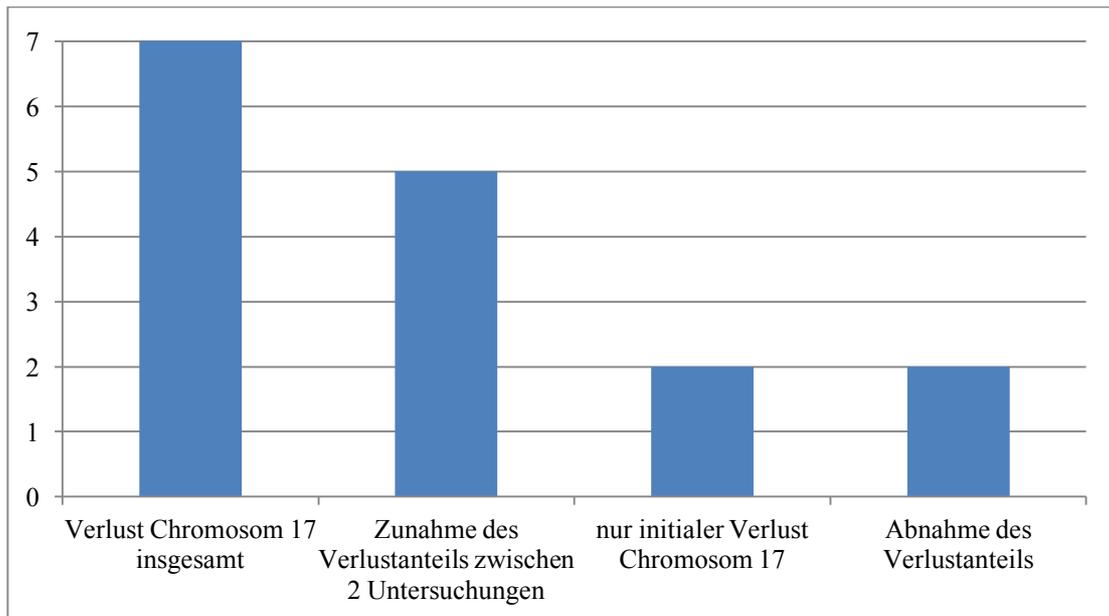


Abbildung 11: Eingruppierung der Verlaufsgruppen, x-Achse: Verlustmuster, y-Achse: Anzahl der Patienten

3.3 Chromosomale Aberrationsmuster

Eine Deletion von Chromosom 17q konnte in 20/22 Tumoren (90,1 %) nachgewiesen werden. In absteigender Häufigkeit konnten ebenfalls Verluste der Chromosomen 22 (in 17/21 Tumoren, 80,9 %), 1p (in 10/21 Tumoren, 47,6 %), und 10 (in 6/22 Tumoren, 27,3 %), sowie ein Gewinn von Chromosom 17q (in 8/22 Tumoren, 36,4 %), festgestellt werden.

Nachfolgend sind alle Ergebnisse in tabellarischer Form hinsichtlich des Verlusts oder Gewinns von Chromosom 17, sowie weiteren Verlusten von Chromosom 1, 10, und 22 dargestellt. Die Tumoren sind den entsprechenden Patienten zugeordnet und in chronologischer Reihenfolge aufgeführt (vgl. *Tabelle 12*).

Tabelle 16: Auflistung der Tumoren mit zugehörigen WHO Grad und Verlust der Chromosomen 1, 10, 17 und 22, sowie Gewinne von Chromosom 17 in der FISH, 0=kein Verlust, 1=Verlust nachweisbar, n.a.= nicht auswertbar; Angabe der Aberrationshäufigkeit absolut und in Prozent. Die Ergebnisse der FISH für die Sondenkombination 1p/22q für Tumor 2376/13 waren nicht auswertbar

Patient	Tumor	WHO	-17	-22	-1	-10	+17
Patient 1	1240/02	2	1	1	1	0	0
	1671/04	2	1	1	1	0	0
	1440/05	2	1	1	1	0	0
	1168/06	2	1	0	0	0	1
Patient 2	1746/09	3	1	1	1	0	1
	798/12	3	1	1	0	1	0
	2376/13	3	0	n.a.	n.a.	0	1
	2841/15	3	1	1	0	0	0
Patient 3	1916/02	2	1	0	0	0	0
	1248/03	2	1	0	0	0	1
	168/05	2	1	1	0	1	0
Patient 4	2630/12	2	1	1	1	1	0
	2000/13	2	1	1	1	1	0
	886/14	2	1	1	1	1	0
	686/15	2	1	0	0	1	0
Patient 5	1072/99	2	1	1	0	0	1
	32/02	2	1	1	0	0	0
Patient 6	379/01	3	1	1	1	0	1
	1342/01	3	1	1	1	0	1
	1808/01	3	0	1	0	0	1
Patient 7	1936/01	1	1	1	1	0	0
	2888/13	3	1	1	0	0	0
Absolute Häufigkeit			20/22	17/21	10/21	6/22	8/22
Häufigkeit in Prozent			90,1 %	80,9 %	47,6 %	27,3 %	36,4 %

Die detektierten chromosomalen Aberrationen konnten in insgesamt 10 Gruppen zusammengefasst werden. Es standen hierfür 21 vollständige Datensätze zur Verfügung. Diese werden nachfolgend aufgeführt und farblich als Aberrationsmuster kodiert. Für die einzelnen Aberrationsmuster werden die Abkürzungen A1-10 verwendet (vgl. *Tabelle 13*).

Entsprechend der Anzahl der Aberrationen pro Aberrationsmuster wurden die Aberrationsmuster unterteilt in komplexe und nicht komplexe Aberrationsmuster. Als komplex wurden jene Muster mit Aberrationen von drei oder mehr Chromosomen erachtet (A1, A2, A3, A5).

Tabelle 17: Aberrationsmuster A1-10 mit Farbkodierung

Aberrationsnummer	Aberrationsmuster	Farbkodierung
A1	-1p, -17, -22q	
A2	-1p, -17, +17, -22q	
A3	-1p, -10, -17, -22q	
A4	-17, -22q	
A5	-10, -17, -22q	
A6	-17, +17	
A7	-10, -17	
A8	-17, +17, -22q	
A9	+17, -22q	
A10	-17	

Nachfolgend sind alle nachgewiesenen Aberrationsmuster in ihrer prozentualen Häufigkeit und mit entsprechender Farbkodierung aufgeführt. A1 tritt in 19 % (4/21 Tumoren) der untersuchten Tumoren auf. A2, A3 und A4 konnten in jeweils 14,3 % (je 3/21 Tumoren) der Tumoren nachgewiesen werden. A5 und A6 konnten in 9,5 % (je

2/21 Tumoren) der Fälle gezeigt werden und A7, A8, A9 und A10 in jeweils 4,8 % (je 17/21 Tumoren) der untersuchten Tumoren (vgl. *Abbildung 12*).

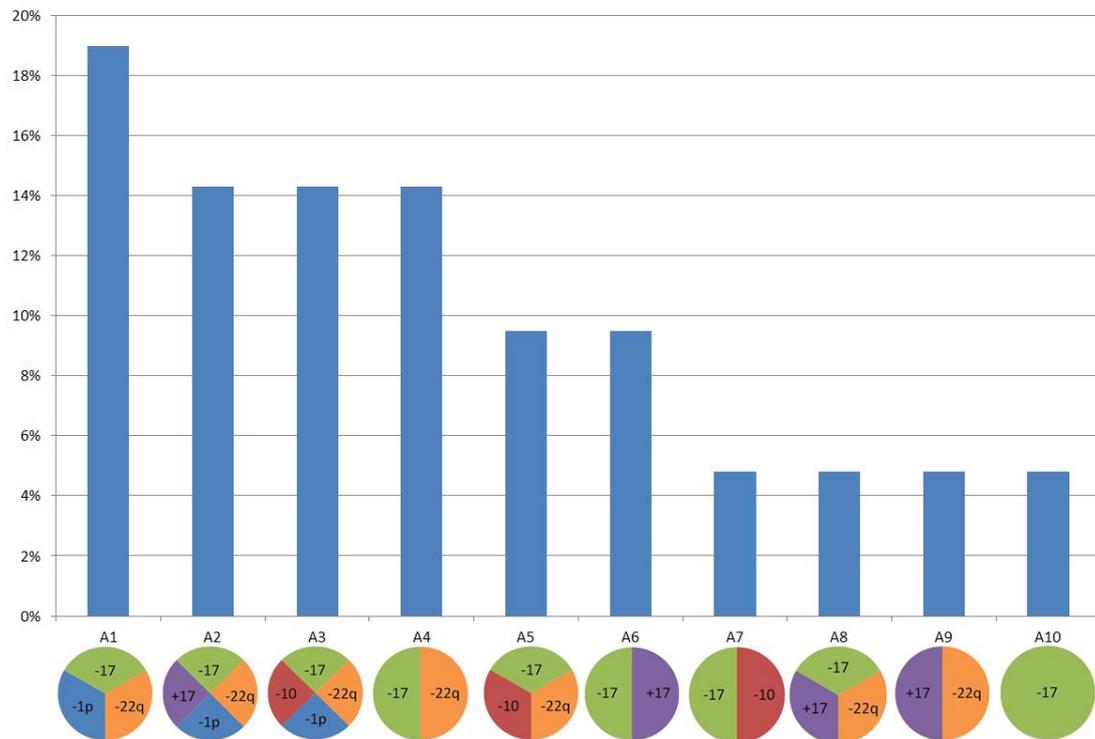


Abbildung 12: Prozentuale Häufigkeit aller chromosomalen Aberrationsmuster; Darstellung der Aberrationsmuster mit Farbkodierung

3.3.1 Chromosom 17

Nachfolgend ist die Häufigkeitsverteilung der Aberrationen der einzelnen untersuchten Chromosomen in Bezug zu Chromosom 17q dargestellt (*Abbildung 13*).

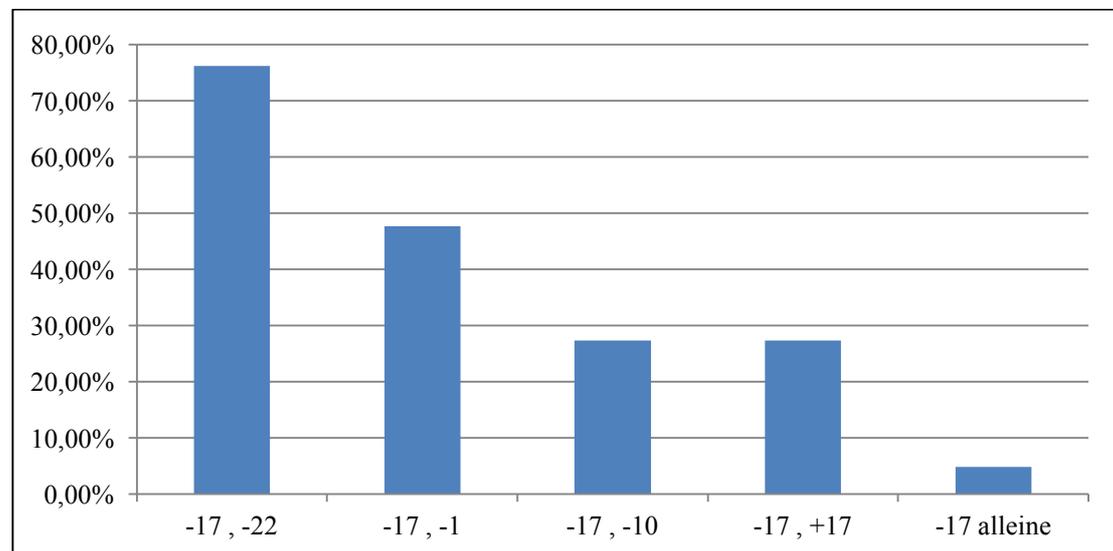


Abbildung 13: Prozentuale Häufigkeit der chromosomalen Aberrationsmuster in Bezug zu Chromosom 17q

Eine Deletion von Chromosom 17q zeigte sich in 20/22 Fällen (90,1%). In absteigender Häufigkeit waren die Kombinationen Deletion von Chromosom 17q und Verlust von Chromosom 22q (16/21 Tumore, 76,1 %) und Deletion von Chromosom 17q und Verlust von Chromosom 1p (10/21 Tumore, 47,6 %) detektierbar. In gleicher Häufigkeit zeigten sich die gleichzeitige Deletion und der Gewinn von Chromosom 17q (6/22 Tumore 27,3 %), sowie die Deletion von Chromosom 17q zusammen mit einem Verlust von Chromosom 10 (6/22 Tumore 27,3 %).

Eine chromosomale Aberration ohne die gleichzeitige Deletion von Chromosom 17q zeigte sich in 2/22 Fällen (Tumor 1808/01 und 2376/13, entsprechen 9 % der Tumoren). Dabei war in beiden Tumoren ein Gewinn von Chromosom 17 detektierbar, sowie der Verlust von Chromosom 22 in einem der beiden Fälle (Tumor 1808/01).

Lediglich ein Tumor (Tumor 1916/02, 1/21 Tumoren, 4,8 %) zeigte die alleine Deletion von Chromosom 17q ohne weitere chromosomale Aberrationen.

3.3.2 Chromosom 22

Ein Verlust von Chromosom 22 konnte in 17/21 (80,9 %) der untersuchten Tumore festgestellt werden. Dabei zeigte sich der gleichzeitige Verlust von Chromosom 17 in 16/17 Tumoren (94,12 %).

In 3/16 Tumoren (18,75 %) waren die Deletion von Chromosom 17q und der Verlust von Chromosom 22 die einzigen nachweisbaren chromosomalen Aberrationen.

In 13/16 Tumoren (81,2 %) mit nachgewiesenen Deletionen von Chromosom 17q und 22 waren zusätzlich weitere chromosomale Aberrationen nachweisbar.

Lediglich ein Tumor (Tumor 1808/01) wies einen Verlust von Chromosom 22 ohne die Deletion von Chromosom 17q auf. In diesem Fall zeigte sich ein Gewinn von Chromosom 17q als einzige zusätzliche chromosomale Aberration.

3.3.3 Chromosom 1

Eine Deletion von Chromosom 1p zeigte sich in 10/21 untersuchten Tumorproben (47,6 %). Hierbei lagen in allen Tumoren (100 %) mit dem Verlust von Chromosom 1p gleichzeitig auch eine Deletion von Chromosom 17q und ein Verlust von Chromosom 22 vor.

In 3/10 Fällen (33,33 %) zeigte sich zusätzlich ein Verlust von Chromosom 10 und in weiteren 3 Fällen (33,33 %) ein Gewinn von Chromosom 17q.

3.3.4 Chromosom 10

6/22 der untersuchten Tumoren (27,27 %) wiesen einen Verlust von Chromosom 10 auf. In 3/6 Fällen (50 %) lag dabei gleichzeitig eine Deletion von Chromosom 1p, 17q und ein Verlust von Chromosom 22 vor. 2/6 Tumoren (33,33 %) zeigten einen Verlust von Chromosom 10 und 22, sowie eine Deletion von Chromosom 17q und 1/6 Tumoren (16,66 %) wies den Verlust der Chromosomen 10 und die Deletion von Chromosom 17q als einzige chromosomale Aberrationen auf.

3.4 Chromosomenaberrationen in Abhängigkeit vom WHO Grad

Die Tumoren wurden hinsichtlich entsprechend den WHO-Graden in drei Gruppen unterteilt und werden nachfolgend mit den detektierten chromosomalen Aberrationen aufgeführt (vgl. Tabellen 14-16).

3.4.1 WHO Grad I

Tabelle 18: Auflistung der Tumoren des WHO Grades I; Verlust der Chromosomen p1, 10, 17q und 22q, sowie Gewinne von Chromosom 1q7 in der FISH, 0=kein Verlust, 1=Verlust vorhanden

Tumor	WHO	-17	-22	-1	-10	+17
1936/01	1	1	1	1	0	0
Absolute Häufigkeit		1/1	1/1	1/1	0/1	0/1
Häufigkeit in Prozent		100 %	100 %	100 %	0 %	0 %

Der Tumor mit der OP-Nummer 1937/01 wurde als einziger der untersuchten Tumore als WHO Grad I Tumor eingestuft. Er zeigt das Aberrationsmuster A1.

3.4.2 WHO Grad II

Tabelle 19: Auflistung der Tumoren des WHO Grades II; Verlust der Chromosomen 1p, 10, 1q7 und 22q, sowie Gewinne von Chromosom 17q in der FISH, 0=kein Verlust, 1=Verlust vorhanden

Tumor	WHO	-17	-22	-1	-10	(+17)
1240/02	2	1	1	1	0	0
1671/04	2	1	1	1	0	0
1440/05	2	1	1	1	0	0
1168/06	2	1	0	0	0	1
1916/02	2	1	0	0	0	0
1248/03	2	1	0	0	0	1
168/05	2	1	1	0	1	0
2630/12	2	1	1	1	1	0
2000/13	2	1	1	1	1	0
886/14	2	1	1	1	1	0
686/15	2	1	0	0	1	0
1072/99	2	1	1	0	0	1
32/02	2	1	1	0	0	0
Absolute Häufigkeit		13/13	9/13	6/13	5/13	3/13
Häufigkeit in Prozent		100%	69,2%	46,2%	38,5%	23,1%

Insgesamt wurden 13 der untersuchten Tumore dem WHO Grad II zugeordnet. In allen Tumoren dieser Gruppe ließ sich eine Deletion von Chromosom 17q nachweisen (100 %). Ein Verlust von Chromosom 22q wurde in 9/13 Tumoren (69,2 %) nachgewiesen. Der Verlust von Chromosom 1p wurde in 6/13 Tumoren (46,2 %), der Verlust von Chromosom 10 in 5/13 Tumoren (38,5 %) und ein Gewinn von Chromosom 17q in 3/13 Tumoren (23,1 %) nachgewiesen.

3/13 Tumoren (23,1 %) wiesen jeweils die Aberrationsmuster A1 und A3 auf. 2/13 Tumoren (15,4 %) zeigten das Aberrationsmuster A6. Je 1/13 Tumoren (7,7 %) zeigten die Aberrationsmuster A4, A5, A7, A8 und A10.

3.4.3 WHO Grad III

Tabelle 20: Auflistung der Tumoren des WHO Grades III; Verlust der Chromosomen 1p, 10, 17q und 22q, sowie Gewinne von Chromosom 17q in der FISH, 0=kein Verlust, 1=Verlust vorhanden, n.a.= nicht auswertbar

Tumor	WHO	-17	-22	-1	-10	+17
1746/09	3	1	1	1	0	1
798/12	3	1	1	0	1	0
2376/13	3	0	n.a.	n.a.	0	1
2841/15	3	1	1	0	0	0
379/01	3	1	1	1	0	1
1342/01	3	1	1	1	0	1
1808/01	3	0	1	0	0	1
Absolute Häufigkeit		5/7	6/6	3/6	1/7	5/7
Häufigkeit in Prozent		71,4 %	100 %	50 %	14,3 %	71,4 %

7/22 Tumoren wurden dem WHO Grad III zugeordnet. 5/7 dieser Tumoren (71,4 %) wiesen eine Deletion von Chromosom 17q auf. Einen Verlust von Chromosom 22 zeigten 6/6 Tumoren (100 %). In 3/6 Tumoren (50 %) wurde der Verlust von Chromosom 1 nachgewiesen. 1/7 Tumoren (14,3 %) zeigte den Verlust von Chromosom 10 und 5/7 Tumoren (71,4 %) zeigten den Gewinn von Chromosom 17q. Aufgrund eines unvollständigen Datensatzes konnte in Tumor 2376/13 kein Aberrationsmuster bestimmt werden. Die Aberrationsmuster der übrigen Tumoren werden im Folgenden erläutert. In 3/6 Tumoren (50 %) zeigte sich das

Aberrationsmuster A2. Die übrigen Tumoren wiesen jeweils die Aberrationsmuster A4, A5, und A9 auf (je 16,7 %).

Es erfolgte eine Auswertung der prozentualen Häufigkeiten der Aberrationsmuster in Abhängigkeit vom WHO Grad der Tumoren (vgl. *Abbildung 14*). Da nur 1 Tumor vom WHO Grad I untersucht wurde, wurde dieser in der untenstehenden Graphik nicht berücksichtigt.

Im WHO Grad II stellen A1 und A3 mit jeweils 23,1 % die häufigsten Aberrationsmuster dar (je 3/13 Tumoren). A6 konnte in 15,4 % der Tumoren nachgewiesen werden (2/13 Tumoren). Die Muster A4, A5, A7, A8 und A10 konnten in jeweils 7,7 % der Tumoren gezeigt werden (je 1/13 Tumoren). Die Aberrationsmuster A2 und A9 ließen sich für die Tumoren im WHO Grad II nicht nachweisen.

Im WHO Grad III lag in 50 % der Fälle (3/6 Tumoren) das Aberrationsmuster A2 vor. In absteigender Häufigkeit zeigten sich die Aberrationsmuster A4, A5 und A9 in jeweils 16,7 % der Tumoren (je 1/6 Tumoren). Die Aberrationsmuster A1, A3, A6, A7, A8 und A10 ließen sich im WHO Grad III nicht nachweisen.

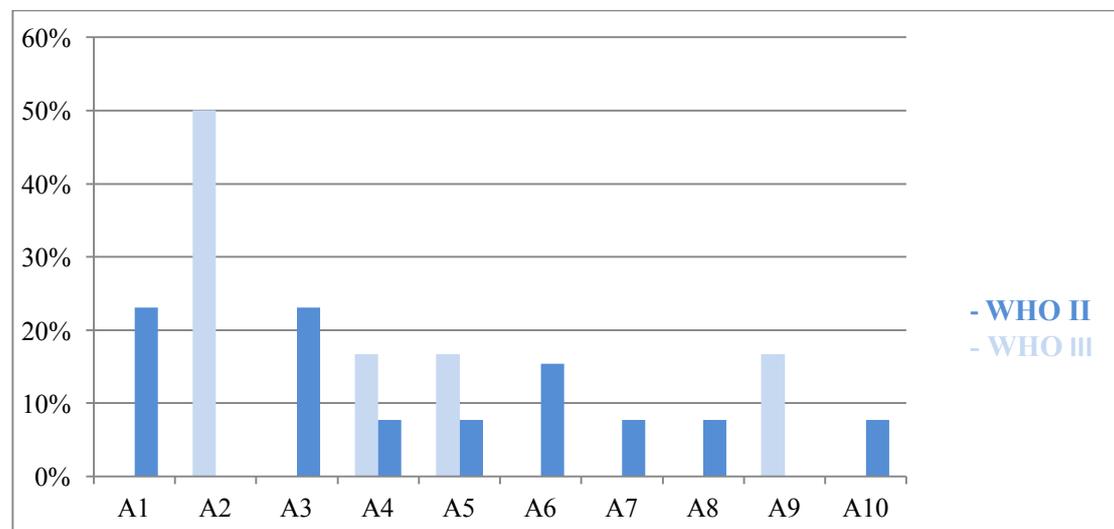


Abbildung 14: Vergleich der Tumore WHO Grad II und III hinsichtlich der prozentualen Häufigkeit der Aberrationsmuster A1-10. dunkelblau: WHO Grad II, hellblau: WHO Grad III.

3.5 Vergleich Zytogenetik und FISH

Zytogenetische Vorbefunde (Karyotyp oder CGH) für die Chromosomen 1, 10, 17 und 22 von insgesamt zehn Tumoren, die durch die Arbeitsgruppe bereits vor Beginn dieser Arbeit erhoben wurden, wurden mit den FISH Ergebnissen der gleichen Tumoren aus dieser Arbeit verglichen (vgl. *Tabelle 21*). Die zuvor erhobenen Daten wurden freundlicherweise für die Erstellung dieser Arbeit zur Verfügung gestellt.

Tabelle 21: Vergleich der zytogenetischen Vorergebnisse für die Chromosomen 1, 10, 17 und 22 mit den jeweiligen FISH Ergebnissen der gleichen Tumoren; die fehlenden Prozentangaben für den Verlust von Chromosom 1 und 22 waren aus den Vorergebnissen nicht ersichtlich

Tumor	Zytogenetische Vorergebnisse	FISH 17		FISH 10		FISH 1	FISH 22
		Aberration	Anteil	Aberration	Anteil		
1168/06	der(1)t(1;9)(p12;q21)	-17; +17	38,5%; 11%				
1916/02	46, XY	-17	35,5%				
1248/03	46, XY	-17; +17	18,5%;24,5%				
2630/12	CGH: -1p, -10, -22	-17	68,5%	-10	70%	-1	-22
2000/13	CGH: -1p, -10, -22	-17	37,5%	-10	85,5%	-1	-22
886/14	CGH: -1p, -10, -17 , -22	-17	31,5%	-10	61,5%	-1	-22
1072/99	-22q	-17; +17	44%;10%				-22
32/02	-22	-17	57%				-22
379/01	-1p, -22	-17; +17	11%; 37,5%			-1	-22
1342/01	-1p, -22	-17; +17	18%; 38,5%			-1	-22

Sieben Tumoren wurden karyotypisiert, die übrigen drei Tumoren wurden mittels CGH untersucht. Aberrationen der Chromosomen 1, 10 und 22 konnten, wenn vorhanden, in allen Fällen mit der Karyotypisierung, der CGH und der FISH nachgewiesen werden. In einem Fall (886/14) zeigte sich in der CGH ein Verlust von Chromosom 17, der auch in der FISH gezeigt werden konnte. Die übrigen neun Tumoren zeigten den Verlust von Chromosom 17 ausschließlich in der FISH.

Insbesondere zeigt sich, dass bei Tumor 886/14 ein Verlust von Chromosom 17 mittels CGH und FISH nachgewiesen werden konnte und der Deletionsanteil von Chromosom 17q in der FISH 31,5 % betrug. Tumor 2630/12 zeigte einen Deletionsanteil für Chromosom 17q von 68,5 %, ohne dass ein Verlust von Chromosom 17 mittels CGH nachgewiesen werden konnte.

4 Diskussion

4.1 Klinische Aspekte der Meningeome

Die Diagnostik der Meningeome stellt behandelnde Ärzte vor eine Herausforderung. Bekannt ist, dass die histologische Diagnostik und die Einteilung in die WHO-Grade nicht immer mit dem klinischen Verlauf sowie dem Wachstums- und Rezidivverhalten der Tumore korrelieren.

Das Resektionsausmaß ist ein Prädiktor für einen möglichen rezidivierenden Verlauf der Meningeome. Es konnte gezeigt werden, dass chirurgische Radikalität bei der Tumorsektion mit einer geringeren Rezidivrate einhergeht.⁶⁸ Der Erkrankungsgipfel für Meningeome liegt im 65. Lebensjahr.³⁸ Das durchschnittliche Alter der Patienten in dieser Arbeit beträgt 45,4 Jahre. Das Verhältnis von erkrankten Frauen zu Männern beträgt nach den Literaturangaben für intrakranielle Meningeome 1,4-2,8:1.¹⁶ Die weibliche Prädominanz gleicht sich jedoch mit steigender Malignität aus.²⁰ In dieser Arbeit beträgt das Verhältnis von erkrankten Frauen zu Männern 3:4. Da es sich in allen Fällen um rezidivierende Tumoren mit aggressivem Verhalten handelt, bestätigt dies die Literaturangaben.

4.2 Zytogenetische Aspekte der Meningeome

Neben dem chirurgischen Resektionsausmaß und der histologischen Diagnostik stellt die zytogenetische Diagnostik einen wichtigen Aspekt in der Meningeomtherapie dar. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit untersuchten Chromosomen, detektierte Aberrationen und Kandidatengene der untersuchten Regionen in den Kontext der aktuellen Literatur eingeordnet.

4.2.1 Chromosom 1

Ein Verlust von Chromosom 1p trat in untersuchten Tumoren dieser Arbeit in 47,6 % der Fälle auf. *Linser et al.* beschrieben einen Verlustanteil von Chromosom 1p von 35,2 % in Meningeomen aller WHO Grade.³⁶ *Ketter et al.* konnten für ein größeres Kollektiv einen Verlustanteil von 9,1 % beschreiben.²⁵

Es konnte in diesen Arbeiten ebenso gezeigt werden, dass der Verlust von Chromosom 1p mit einer höheren Rezidivwahrscheinlichkeit einhergeht. Aufgrund der

Selektionsbias, die durch die Auswahl von Patienten besteht, die alle bereits Rezidive ausgebildet hatten, ist die in dieser Arbeit nachgewiesene Häufigkeit des Verlustes von Chromosom 1p mit den oben genannten Literaturangaben vereinbar.

4.2.2 Chromosom 10

Der Verlust von Chromosom 10 wird in der Literatur mit 5-58 % angegeben und ist mit einem kürzeren Gesamtüberleben der Patienten, sowie einer höheren Rezidivwahrscheinlichkeit assoziiert.^{6,31} In der vorliegenden Arbeit konnte ein Verlust von Chromosom 10 in 27,3 % der untersuchten Tumore nachgewiesen werden und entspricht daher den Literaturangaben.

4.2.3 Chromosom 22

Für den Verlust von Chromosom 22q sind über alle WHO Grade hinweg Häufigkeiten von 33-60 % beschrieben.^{16,36,1,34} Zwar ist das alleinige Auftreten des Verlustes von Chromosom 22q nicht mit einem Tumorprogress oder einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit assoziiert, jedoch ist ein komplexer Karyotyp mit erhöhter Malignität der Meningeome assoziiert.^{24,37,17} Auch in dieser Arbeit konnten in 57,14 % der Fälle (12/21 Tumoren) Tumoren mit komplexen Aberrationsmustern nachgewiesen werden, die einen Verlust von Chromosom 22 zeigten.

Insgesamt zeigte sich in dieser Arbeit der Verlust von Chromosom 22 in 80,9 % der Tumoren (17/21 Tumoren). Das Ergebnis ist aufgrund des ausgewählten Patientenkollektivs als realistisches Ergebnis einzuordnen.

4.2.4 Chromosom 17

Arnoldus et al. untersuchten 30 Meningeome mittels FISH der Chromosomen 1, 6, 7, 10, 11, 17, 18, 22, X, und Y. Ein Verlust von Chromosom 17 konnte in 1 von 30 Fällen gezeigt werden. Dieser Tumor war ein Rezidiv.²

Yakut et al. zeigten 2002 eine Deletion von *p53* auf Chromosom 17p mittels FISH in 3 von 34 untersuchten Meningeomen. Hiervon wurde ein Tumor dem WHO Grad II zugeordnet, die übrigen beiden Tumoren dem WHO Grad III. Alle 3 Patienten entwickelten im Follow Up ein Rezidiv. Eine Aneuploidie von Chromosom 17 konnte nicht gezeigt werden.⁷²

Ein LOH von Chromosom 17p in Meningeomen konnte in mehreren Arbeiten gezeigt werden. Hierbei kann jedoch keine Aussage über die in dieser Arbeit untersuchte Region 17q getroffen werden.^{11,26,33,3}

Ein dem dieser Arbeit ähnlicher Versuchsaufbau wurde von *Lamszus et al.* durchgeführt. Untersucht wurden fünf Patienten mit jeweils mehreren Meningeomrezidiven hinsichtlich eines LOH. Chromosom 17 wurde hierbei nicht betrachtet.³² Auch *Lopez-Gines et al.* untersuchten insgesamt zehn Meningeomrezidive von neun Patienten. Eine Karyotypisierung der Tumore zeigte jedoch keinen Verlust von Chromosom 17.³⁷

Die oben genannten Arbeiten unterscheiden sich von der hier vorliegenden Arbeit in mehreren Aspekten. Sie zeigen Aberrationen von Chromosom 17 in Meningeomen in Form von DNA-Verlusten. Eine chromosomale Deletion von Chromosom 17 konnte nur in einem Fall nachgewiesen werden. Es bestand hier eine Korrelation der DNA-Verluste zu einem aggressiveren Verhalten der Tumore verglichen mit Tumoren ohne entsprechende Verluste. Mehrere Tumoren eines Patienten wurden in diesen Arbeiten jedoch nicht untersucht. Eine Aussage über die Entwicklung von Aberrationen von Chromosom 17 in einem zeitlichen Verlauf für einzelne Patienten konnte daher bisher nicht getroffen werden.

Jene Arbeiten, die mehrere Tumoren eines Patienten untersuchten, trafen keine Aussage über Chromosom 17, oder konnten mit der gewählten Methodik keinen Verlust von Chromosom 17 nachweisen.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten stellen also erstmals einen Aberrationsverlauf von der chromosomalen Region 17q bei sieben Patienten mit rezidivierenden Meningeomen dar, wobei von jedem Patienten mindestens zwei Tumore untersucht wurden und eine Deletion von Chromosom 17q in insgesamt 90,1 % der untersuchten Tumoren nachgewiesen werden konnte.

4.2.5 Interpretation der zeitlichen Verlaufsmuster

Es wurden vier verschiedene Verlaufsgruppen für den Verlust von Chromosom 17 beobachtet (vgl. *Abbildung 11*, S. 32). Hier zeigt sich, dass bei 5/7 Patienten ein steigender Deletionsanteil von Chromosom 17q zwischen dem vorletzten und letzten Untersuchungszeitpunkt auftrat. Hingegen trat in nur 2/7 Fällen eine Abnahme des Deletionsanteils zwischen dem vorletzten und letzten Untersuchungszeitpunkt auf.

Eine konstante Zunahme des Deletionsanteils von Chromosom 17q zwischen allen Untersuchungszeitpunkten konnte nicht beobachtet werden.

Außerdem trat eine Deletion von Chromosom 17q auch in Primärtumoren und frühen Rezidiven auf. Diese Erkenntnisse widerlegen die These, dass der Verlust von Chromosom 17 ein spätes Ereignis in der Tumorgenese von Meningeomen darstellt.

4.3 Falldiskussion Patient 4

Ausgangspunkt dieser Arbeit war der nachgewiesene Verlust von Chromosom 17 in der CGH von Tumor 2000/13. Der Tumor war das sechste Rezidiv von Patient 4. In der CGH des fünften Rezidives des gleichen Patienten war kein Verlust von Chromosom 17 nachweisbar. Es wurde daher die Hypothese formuliert, dass der Verlust von Chromosom 17 ein spätes Ereignis in der Tumorprogression von Meningeomen darstellen könnte. In dieser Arbeit konnte durch FISH gezeigt werden, dass in allen untersuchten Tumorproben des Patienten eine Deletion von Chromosom 17q detektiert werden konnte. (vgl. *Tabelle 12*, S.28; *Abbildung 10*, S.31).

In der Analyse der Aberrationsmuster zeigt sich das komplexe Abberationsmuster A2 für die Rezidive 5 bis 7 und das Abberationsmuster A7 für das Rezidiv 8. Das komplexe Aberrationsmuster A2 in den Rezidiven 5 bis 7, welches die Deletionen von Chromosom 1p, 10, 22q und 17q einschließt, spricht für eine erhöhte Malignität der Tumoren. Histopathologisch wurden alle Tumoren des Patienten dem WHO-Grad II zugeordnet. Die Tumoren zeigen trotz dieser Einteilung ein hoch aggressives und rezidivierendes Verhalten. Der Krankheitsverlauf von Patient 4 verdeutlicht daher exemplarisch die eingeschränkte Beurteilung der Meningeomalignität anhand des WHO-Grades, wie bereits von *Ketter et al.* diskutiert.²⁰

Der Verlust von Chromosom 1p und 17q in Kombination mit dem Krankheitsverlauf des Patienten und dem Rezidiv-Verhalten der Tumore bekräftigt außerdem die Hypothese, dass die Verluste von Chromosom 1p und 17q einen Einfluss auf das Rezidiv-Verhalten von Meningeomen ausüben.

In Zusammenschau aller Ergebnisse dieser Arbeit, bei denen unter anderem Primärtumoren und erste Rezidive unterschiedlicher Patienten untersucht wurden und ebenfalls eine Deletion von Chromosom 17q zeigten, kann die Hypothese widerlegt werden, dass der Verlust von Chromosom 17 ein spätes Ereignis in der Tumorgenese von Meningeomen darstellt.

4.4 Chromosomale Aberrationsmuster

4.4.1 Chromosom 17 mit Chromosom 1, 10 und 22

In der Verteilung der Aberrationsmuster der einzelnen Chromosomen in Bezug auf Chromosom 17 zeigt sich, dass die Kombinationen Verlust von Chromosom 17 und 22, Chromosom 17 und 1, Chromosom 17 und 10 sowie gleichzeitiger Gewinn und Verlust von Chromosom 17 etwa in gleicher Ordnung verteilt sind wie die Häufigkeit der einzelnen Chromosomenaberrationen ohne Bezug zueinander. Dies spricht dafür, dass der Verlust von Chromosom 17 keinen Einfluss auf das Auftreten weiterer chromosomaler Aberrationen hat.

4.4.2 Komplexe Aberrationsmuster

In dieser Arbeit konnten bei 21 vollständigen Datensätzen (FISH Ergebnisse für 1p, 10, 17, 22q) 10 verschiedene Aberrationsmuster festgestellt werden. Diese können nach ihrer Komplexität geordnet werden. Beschrieben ist, dass ein komplexerer Karyotyp bei Meningeomen mit höherer Malignität einhergeht.^{24,37,17} Auch in dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass die Mehrzahl der Meningeome vom WHO Grad II und III komplexe Aberrationsmuster aufweist, was eine mögliche Erklärung für das Rezidiv-Verhalten der Tumore darstellt. Im Vergleich der Aberrationsmuster für die WHO Grade II und III lässt sich zeigen, dass das komplexe Muster A2 im WHO Grad II am häufigsten vorkommt. Dies spricht dafür, dass diese Tumore ein aggressives Verhalten zeigen können und vermehrt zu Rezidiven neigen, obwohl histologisch nicht die Kriterien des WHO Grad III erfüllt sind. Eine Einstufung der Meningeome nicht nur nach histologischen, sondern auch genetischen Merkmalen, wird deshalb als sinnvoll erachtet.

4.5 Zytogenetik versus FISH im Literaturvergleich

In 10 Tumoren, die mittels FISH und konventioneller Karyotypisierung hinsichtlich des Verlustes von Chromosom 17 untersucht wurden, konnte dieser Verlust mittels FISH in 100 % der Fälle nachgewiesen werden, mittels Karyotypisierung lediglich in 10 % der Fälle.

Lerner et al. konnten zeigen, dass die FISH zur Detektion chromosomaler Aberrationen von Chromosom 1p und 9 der Karyotypisierung überlegen ist.³⁴

Auch *Olde Nordkamp et al.* zeigten, dass die FISH in der Detektion bestimmter Aberrationen sensitiver ist als die Karyotypisierung. Diese verschafft dem Untersucher jedoch ein globales Bild über die genetische Konstitution der untersuchten Zellen.⁴⁶

Ursächlich für die Diskrepanz der Ergebnisse ist nach den Literaturangaben das selektive und keiner externen Kontrolle unterliegende Wachstum der Zellen in der Zellkultur. Nicht feststellbar ist dabei, ob es sich bei den wachsenden Zellen um gesundes Gewebe oder Tumorzellen handelt. Aufgrund der Heterogenität der Tumoren ist das Ergebnis der Zellkultur also abhängig von dem für die Zellkultur verwendeten Areal der Tumorprobe und dem individuellen Wachstumsverhalten des Tumors in der Zellkultur.⁶⁷

Außerdem unterscheiden sich die Methoden in der Anzahl der ausgewerteten Zellkerne. Zur Karyotypisierung werden zehn Mitosen pro Tumorprobe ausgewertet. Chromosomale Aberrationen können so zwar nachgewiesen werden, aufgrund der genetischen Heterogenität und des nicht selektiven Wachstums von Tumorzellen und gesunden Zellen in der Zellkultur lässt sich jedoch nur ein unzureichender Rückschluss auf die möglichen Aberrationen des gesamten Tumors ziehen. Bei der FISH werden 200 Zellkerne ausgewertet. Dies gewährleistet eine höhere statistische Signifikanz der Ergebnisse.

Daher wird empfohlen die FISH als Methode der Wahl zur gezielten Detektion chromosomaler Aberrationen der Chromosomen 10 und 17 zu verwenden, die Methoden der Karyotypisierung und der FISH jedoch komplementär zu nutzen.

4.6 Einordnung in den klinischen Kontext

4.6.1 Diskussion der WHO Einteilung

Die aktuelle WHO Einteilung der Meningeome erfolgt ausschließlich nach histologischen Kriterien.

Nach den Literaturangaben wird ein niedriger WHO Grad bei Meningeomen mit einem niedrigen Rezidivrisiko assoziiert. Die ausschließlich histologische Einteilung erfasst jedoch nicht solche Fälle, die trotz der Einteilung in den WHO Grad I ein rezidivierendes Wachstumsverhalten zeigen.³⁸ Diese und frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe können zeigen, dass genetische Marker geeignet sind, gerade solche Tumore besser zu klassifizieren und die Patienten so einer geeigneten Therapie und Nachsorge zu unterziehen. Auch *Sahm et al.* konnten zeigen, dass eine Klassifizierung der Meningeome nach histologischen, genetischen und epigenetischen Markern sinnvoll ist. Insbesondere Mutationen des *TERT*-Promotors gehen, unabhängig vom WHO-Grad der Tumore, mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben der Patienten einher.⁶⁰

Es wird daher empfohlen, diese diagnostischen Möglichkeiten verstärkt zu nutzen und in die WHO Einteilung der Meningeome einfließen zu lassen.^{34,60,4}

4.6.2 „Genetic Progression Score“ und Nachsorgeschema

Im untersuchten Patientenkollektiv tritt der Verlust von Chromosom 17q häufiger auf als der Verlust von Chromosom 22q (90,91 % versus 77,27 %). Außerdem zeigt sich ein Verlust auch in Primärtumoren und frühen Rezidiven. Im Kontext des „Genetic Progression Score“ (GPS)²⁵ und den hierzu erstellten onkogenetischen Baumdiagrammen ist der Verlust von Chromosom 17 deshalb nicht wie ursprünglich angenommen als spätes, sondern als frühes Ereignis in der Tumorgenese von Meningeomen einzuordnen.

Der Nachweis des Verlustes von Chromosom 17 ist in dieser Arbeit mit weiteren Aberrationen assoziiert, sollte jedoch auch als isolierte Aberration zu einer Eingruppierung des Tumors in die GPS Gruppe III und das entsprechende Nachsorgeschema führen.

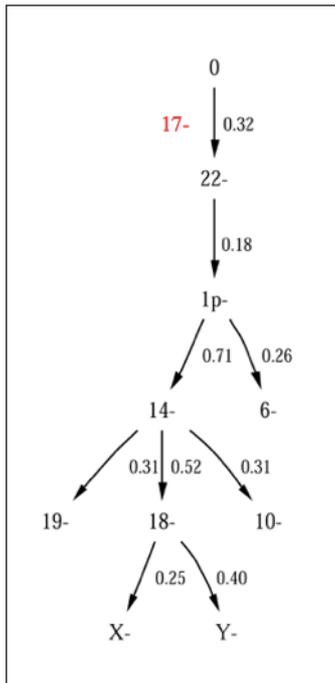


Abbildung 15: Modifiziertes onkogenetisches Baumdiagramm nach Ketter et al.

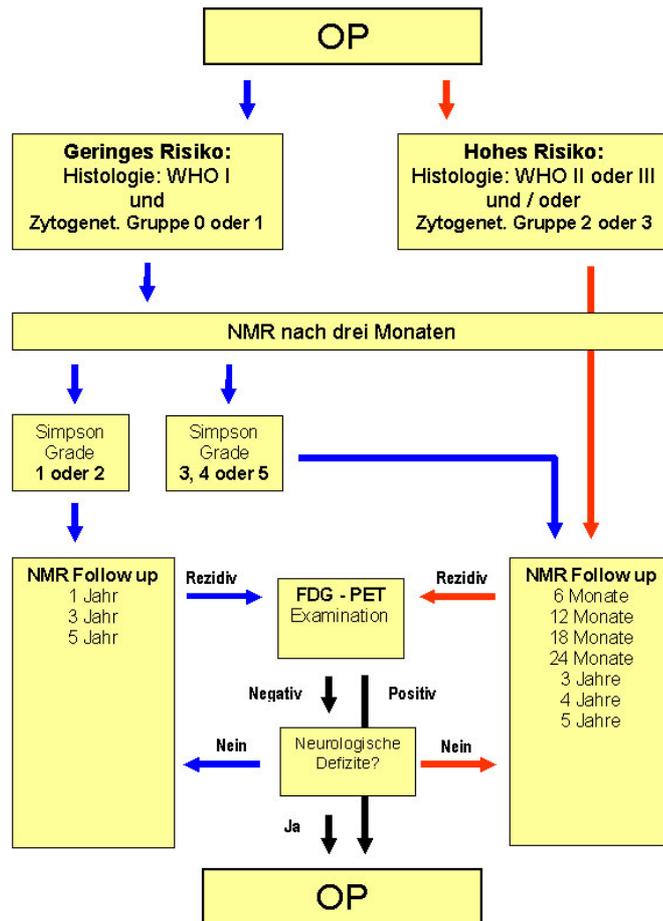


Abbildung 16: Nachsorgeschema nach Ketter et al., OP=Operation, NMR=Kernspintomographie, FDG-PET=Fluordesoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomographie

4.7 Schlussfolgerung und Ausblick

4.7.1 Klassische Zytogenetik versus FISH in der Meningeomdiagnostik

In dieser Arbeit liegt von 10/22 Tumoren eine FISH der Chromosomen 10 und 17, sowie entweder ein Karyotyp oder eine *Comparative genomic hybridization* (CGH) zum Vergleich vor. In 9/10 Fällen zeigten sich chromosomale Aberrationen in der FISH, die mittels Karyotypisierung oder CGH nicht nachweisbar waren. Um eine validere Aussage über die Sensitivität der FISH hinsichtlich dieser Aberrationen treffen zu können, könnte eine größere Zahl an Tumoren mit beiden Methoden untersucht und die Ergebnisse verglichen werden. Jedoch konnte bisher gezeigt werden, dass die FISH in der Diagnostik chromosomaler Aberrationen der Chromosomen 1, 9 und 17 der Zytogenetik überlegen ist. Die Karyotypisierung und die CGH vermitteln jedoch ein

globales Bild des Karyotyps der untersuchten Tumorproben. Es wird daher empfohlen, beide Methoden komplementär anzuwenden.^{34,46}

4.7.2 Ist der Verlust von Chromosom 17 ein spätes Ereignis in der Tumorprogression der Meningeome?

Im untersuchten Patientenkollektiv war eine Deletion der chromosomalen Region 17q auch in den untersuchten Primärtumoren und in frühen Rezidiven nachweisbar. Dies widerlegt die Hypothese, dass der Verlust von Chromosom 17 ein spätes Ereignis in der Tumorprogression der Meningeome darstellt.

Eine Deletion von Chromosom 17q könnte hingegen als früher diagnostischer Marker für ein rezidivierendes Tumorverhalten bei Primärtumoren genutzt werden.

4.7.3 Korreliert der Verlust von Chromosom 17 mit dem WHO-Grad der Tumoren?

Bei den untersuchten Meningeomen handelt es sich um einen Tumor im WHO Grad I, 13 Tumoren vom WHO Grad II und 7 Tumoren vom WHO Grad III. Die 17q Deletion trat im WHO Grad II und III etwa gleich häufig auf. Eine direkte Korrelation mit dem WHO Grad lässt sich hieraus nicht ableiten. Jedoch zeigten sich bei den Tumoren im WHO Grad II und III insgesamt überwiegend komplexe Aberrationsmuster mit Nachweis einer Deletion von Chromosom 17q. Wie bereits aus der Literatur bekannt, korreliert eine Hypodiploidie mit einer raschen Tumorprogression der Meningeome.

4.7.4 Limitationen der Arbeit und mögliche Folgeprojekte

In dieser Arbeit konnte ein Verlust von Chromosom 17q in 19/22 Fällen gezeigt werden. Als Einschlusskriterium der untersuchten Patienten galt die bereits erfolgte Ausbildung eines Meningeomrezidivs. Es muss daher von Verzerrung der Ergebnisse durch die Selektion der Patienten ausgegangen werden.

Aufgrund der prozentualen Häufigkeit der Deletion von Chromosom 17q in diesem Patientenkollektiv ist jedoch trotzdem davon auszugehen, dass diese chromosomale Aberration mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der Rezidivbildung einhergeht und der Verlust außerdem schon im Primärtumor oder einem frühen Rezidiv nachweisbar ist.

Außerdem ist aufgrund der geringen Patientenzahl im untersuchten Kollektiv eine statistische Auswertung der erhobenen Daten nur bedingt möglich.

Um die Bedeutung der Deletion von Chromosom 17q hinsichtlich des Rezidiv-Verhaltens der Meningeome besser einordnen zu können, könnte in einem Nachfolgeprojekt eine FISH an einer heterogenen Gruppe von Meningeomen und einer größeren Fallzahl durchgeführt werden. Vorstellbar wäre eine Untersuchung an einer Gruppe von Tumoren aller WHO Grade sowie Tumoren aller GPS Gruppen. Die Patienten sollten daraufhin prospektiv untersucht und das progressionsfreie Überleben beobachtet werden. Eine Evaluation der statistischen Unabhängigkeit des Verlustes von Chromosom 17 wäre dann möglich.

Um außerdem die Bedeutung der Kandidatengene *NM23* und *ERBB2* auf Chromosom 17q weiter zu untersuchen, sind Expressionsanalysen der beiden Gene in Meningeomen mit einer Deletion von 17q, verglichen mit Meningeomen ohne eine solche Deletion, in der Zukunft denkbar.

4.7.5 Empfehlung zur zukünftigen Diagnostik und Therapie

Die zu Beginn dieser Arbeit gestellte Frage, welchen Einfluss die Deletion von Chromosom 17q auf die Nachsorge von Meningeom-Patienten nach erfolgter Tumorresektion haben könnte, lässt sich anhand der erhobenen Daten wie folgt beantworten:

Die Deletion von Chromosom 17q stellt in den erhobenen Daten ein frühes Ereignis in der Tumorgenese von Meningeomen dar. Aufgrund dieser und in vorherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe erhobenen Daten wird die Untersuchung aller resezierten Meningeome direkt postoperativ mittels FISH für die Chromosomen 1, 10, 17 und 22 empfohlen. Anschließend könnte eine Eingruppierung der Patienten entsprechend des Nachsorgeschemas für Meningeome nach *Ketter et al.* erfolgen.

Eine nachgewiesene Deletion von Chromosom 17q könnte vorerst zu einer Eingruppierung in das engmaschige Nachsorgeschema führen, bis durch ein weitere Untersuchungen die Bedeutung von Chromosom 17 in der Tumorprogression bestätigt oder widerlegt werden kann.

5 Literaturverzeichnis

1. Al-Mefty O, Kadri PAS, Pravdenkova S, Sawyer J, Stangeby C, Husain M: Malignant progression in meningioma: documentation of a series and analysis of cytogenetic findings. **J Neurosurg** **101**:210–218, 2004
2. Arnoldus EP, Wolters LB, Voormolen JH, Van Duinen SG, Raap AK, Van der Ploeg M, et al: Interphase cytogenetics: a new tool for the study of genetic changes in brain tumors. **J Neurosurg** **76**:997–1003, 1992
3. Asirvatham JR, Pai R, Chacko G, Nehru AG, John J, Chacko AG, et al: Molecular characteristics of meningiomas in a cohort of Indian patients: loss of heterozygosity analysis of chromosomes 22, 17, 14 and 10. **Neurol India** **61**:138–43, 2013
4. Barresi V, Caffo M, Tuccari G: Classification of human meningiomas: lights, shadows, and future perspectives. **J Neurosci Res** **0**:2016
5. Blaauw G, Blankenstein MA, Lamberts SW: Sex steroid receptors in human meningiomas. **Acta Neurochir (Wien)** **79**:42–7, 1986
6. Boström J, Cobbers JM JL: Mutation of the PTEN (MMAC1) Tumor Suppressor Gene in a Subset of Glioblastomas but not in Meningiomas with Loss of Chromosome Arm 11q. **Cancer Res** **58**:29–33, 1998
7. Boström J, Ludwig Cobbers J, Wolter M, Tabatabai G, Weber RG, Lichter P, et al: Mutation of the PTEN (MMAC1) tumor suppressor gene in a subset of glioblastomas but not in meningiomas with loss of chromosome arm 10q. **Cancer Res** **58**:29–33, 1998
8. Bouvier C, Liprandi A, Colin C, Giorgi R, Quilichini B, Metellus P, et al: Lack of alkaline phosphatase activity predicts meningioma recurrence. **Am J Clin Pathol** **124**:252–258, 2005
9. Büschges R, Ichimura K, Weber RG, Reifenberger G, Collins VP: Allelic gain and amplification on the long arm of chromosome 17 in anaplastic meningiomas. **Brain Pathol** **12**:145–153, 2002
10. Carroll RS, Glowacka D, Dashner K, Black PM: Progesterone Receptor Expression in Meningiomas. **Cancer Res** **53**:1312–1317, 1993
11. Chang IB, Cho BM, Moon SM, Park SH, Oh SM, Cho SJ: Loss of Heterozygosity at 1p, 7q, 17p, 22q in Meningiomas. **J Korean Neurosurg Soc** **48**:14–19, 2010

12. Dumanski JP, Carlbom E, Collins VP, Nordenskjöld M: Deletion mapping of a locus on human chromosome 22 involved in the oncogenesis of meningioma. **Proc Natl Acad Sci** **84**:9275–9279, 1987
13. Fang M, Tao Y, Liu Z, Huang H, Lao M, Huang L, et al: Meta-Analysis of the Relationship between NM23 Expression to Gastric Cancer Risk and Clinical Features. **Biomed Res Int** **2017**:2017
14. Han W, Zhang C, Cao F, Cao F, Jiang L, Ding H: Prognostic and clinicopathological value of NM23 expression in patients with breast cancer : A systematic review and meta-analysis. **Curr Probl Cancer** **41**:80–93, 2017
15. Harrison MJ, Wolfe DE, Lau T-S, Mitnick RJ, Sachdev VP: Radiation-induced meningiomas: experience at the Mount Sinai Hospital and review of the literature. **J Neurosurg** **75**:564–574, 1991
16. Hartmann C, Boström J, Simon M: Diagnostic and molecular pathology of meningiomas. **Expert Rev Neurother** **6**:1671–1683, 2006
17. Henriques Domingues P, Sousa P, Otero Á, Gonçalves JM, Ruiz L, De Oliveira C, et al: Proposal for a new risk stratification classification for meningioma based on patient age, WHO tumor grade, size, localization, and karyotype. **Neuro Oncol** **16**:735–747, 2014
18. Hopman AH, Ramaekers FC, Raap AK, Beck JL, Devilee P, van der Ploeg M, et al: In situ hybridization as a tool to study numerical chromosome aberrations in solid bladder tumors. **Histochemistry** **89**:307–16, 1988
19. Hsu DW, Efird JT, Hedley-Whyte ET: Progesterone and estrogen receptors in meningiomas: prognostic considerations. **J Neurosurg** **86**:113–120, 1997
20. Jääskeläinen J, Haltia M, Servo A: Atypical and anaplastic meningiomas: radiology, surgery, radiotherapy, and outcome. **Surg Neurol** **25**:233–42, 1986
21. Kawai M, Komiyama H, Hosoya M, Okubo H, Fujii T: Impact of chromosome 17q deletion in the primary lesion of colorectal cancer on liver metastasis. **Oncol Lett** **12**:4773–4778, 2016
22. Ketter R, Henn W, Niedermayer I: Predictive value of progression-associated chromosomal aberrations for the prognosis of meningiomas: a retrospective study of 198 cases. **J Neurosurg** **95**:601–607, 2001
23. Ketter R, Kim Y, Feiden W: Correspondence of tumor localization with tumor recurrence and cytogenetic progression in meningiomas. **Neurosurgery** **62**:61–70, 2008

24. Ketter R, Kim YJ, Storck S, Rahnenführer J, Romeike BFM, Steudel WI, et al: Hyperdiploidy defines a distinct cytogenetic entity of meningiomas. **J Neurooncol** **83**:213–221, 2007
25. Ketter R, Urbschat S, Henn W, Feiden W, Beerenwinkel N, Lengauer T, et al: Application of oncogenetic trees mixtures as a biostatistical model of the clonal cytogenetic evolution of meningiomas. **Int J Cancer** **121**:1473–1480, 2007
26. Kim JH, Lee SH, Rhee CH, Park SY, Lee JH: Loss of heterozygosity on chromosome 22q and 17p correlates with aggressiveness of meningiomas. **J Neurooncol** **40**:101–6, 1998
27. Kim Y-J, Ketter R, Henn W, Zang KD, Steudel W-I, Feiden W: Histopathologic indicators of recurrence in meningiomas: correlation with clinical and genetic parameters. **Virchows Arch** **449**:529–38, 2006
28. Kirsch M, Zhu JJ, Black PM: Analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in sporadic meningiomas. **Genes Chromosom Cancer** **20**:53–59, 1997
29. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, et al: The WHO classification of tumors of the nervous system. **J Neuropathol Exp Neurol** **61**:215-225-229, 2002
30. Korshunov A, Shishkina L, Golanov A: Immunohistochemical analysis of p16INK4a, p14ARF, p18INK4c, p21CIP1, p27KIP1 and p73 expression in 271 meningiomas correlation with tumor grade and clinical outcome. **Int J Cancer** **104**:728–734, 2003
31. Lamszus K: Meningioma Pathology, Genetics, and Biology. **J Neuropathol Exp Neurol** **63**:275–286, 2004
32. Lamszus K, Kluwe L, Matschke J, Meissner H, Laas R, Westphal M: Allelic Losses at 1p, 9q, 10q, 14q, and 22q in the Progression of Aggressive Meningiomas and Undifferentiated Meningeal Sarcomas. **Cancer Genet Cytogenet** **110**:103–110, 1999
33. Lee JYK, Finkelstein S, Hamilton RL, Rekha R, King JT, Omalu B: Loss of Heterozygosity Analysis of Benign, Atypical, and Anaplastic Meningiomas. **Neurosurgery** **55**:1163–1173, 2004
34. Lerner C, Ketter R, Linsler S, Henn W, Oertel J, Urbschat S: Establishment of a molecular cytogenetic analysis for native tumor tissue of meningiomas-suitable for clinical application. **Mol Cytogenet** **7**:2014

35. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, et al: PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. **Science (80-) 275**:1943–1947, 1997
36. Linsler S, Kraemer D, Driess C, Oertel J, Kammers K, Rahnenführer J, et al: Molecular biological determinations of meningioma progression and recurrence. **PLoS One 9**:e94987, 2014
37. Lopez-Gines C, Cerda-Nicolas M, Barcia-Salorio JL, Llombart-Bosch A: Cytogenetical findings of recurrent meningiomas-a study of 10 tumors. **Cancer Genet Cytogenet 85**:113–117, 1995
38. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavanee WK: **WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System Revised 4th Edition**. International Agency for Research on Cancer (IARC) 69372 Lyon Cedex 08, France, 2016
39. Maier H, Ofner D, Hittmair A, Kitz K, Budka H: Classic, atypical, and anaplastic meningioma: three histopathological subtypes of clinical relevance. **J Neurosurg 77**:616–23, 1992
40. Matsuno A, Fujimaki T, Sasaki T, Nagashima T, Ide T, Asai A, et al: Clinical and histopathological analysis of proliferative potentials of recurrent and non-recurrent meningiomas. **Acta Neuropathol 91**:504–10, 1996
41. Mendiola M, Bello MJ, Alonso J, Leone PE, Vaquero J, Sarasa JL, et al: Search for mutations of the hRAD54 gene in sporadic meningiomas with deletion at 1p32. **Mol Carcinog 24**:300–304, 1999
42. Moench TR, Gendelman HE, Clements JE, Narayan O, Griffin DE: Efficiency of in situ hybridization as a function of probe size and fixation technique. **J Virol Methods 11**:119–30, 1985
43. Müller P, Henn W, Niedermayer I, Ketter R, Feiden W, Steudel W, et al: Deletion of Chromosome 1p and Loss of Expression of Alkaline Phosphatase Indicate Progression of Meningiomas. **Clin Cancer Res 5**:3569–3577, 1999
44. Niedermayer I, Feiden W, Henn W, Steilen-Gimbel H, Steudel W-I, Zang KD: Loss of Alkaline Phosphatase Activity in Meningiomas: A rapid histochemical technique indicating progression-associated deletion of a putative tumor suppressor gene on the distal part of the short arm of chromosome 1. **J Neuropathol Exp Neurol 56**:879–886, 1997
45. Ohgaki H, Kleihues P: Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. **Am J Pathol 170**:1445–53, 2007

46. Olde Nordkamp L, Mellink C, van der Schoot E, van den Berg H: Karyotyping, FISH, and PCR in acute lymphoblastic leukemia: competing or complementary diagnostics? **J Pediatr Hematol Oncol** **31**:930–935, 2009
47. Olivecrona H: The parasagittal meningiomas. **J Neurosurg** **4**:327–341, 1947
48. Perry A, Gutmann DH, Reifenberger G: Molecular pathogenesis of meningiomas. **J Neurooncol** **70**:183–202, 2004
49. Piaskowski S, Rieske P, Szybka M, Wozniak K, Bednarek A, Pluciennik E, et al: GADD45A and EPB41 as tumor suppressor genes in meningioma pathogenesis. **Cancer Genet Cytogenet** **162**:63–67, 2005
50. Pinkel D, Straume T, Gray JW: Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc Natl Acad Sci** **83**:2934–2938, 1986
51. Rausing A, Ybo W, Stenflo J: Intracranial meningioma—a population study of ten years. **Acta Neurol Scand** **46**:102–110, 1970
52. Riemenschneider MJ, Perry A, Reifenberger G: Histological classification and molecular genetics of meningiomas. **Lancet Neurol** **5**:1045–1054, 2006
53. Rienstein S, Loven D, Israeli O, Ram Z, Rappaport ZH, Barkai G, et al: Comparative genomic hybridization analysis of radiation-associated and sporadic meningiomas. **Cancer Genet Cytogenet** **131**:135–140, 2001
54. Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P: Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. **J Mol Biol** **113**:237–51, 1977
55. Roelvink NC, Kamphorst W, van Alphen HA, Rao BR: Pregnancy-related primary brain and spinal tumors. **Arch Neurol** **44**:209–15, 1987
56. Rouleau GA, Seizinger BR, Wertelecki W, Haines JL, Superneau DW, Martuza RL, et al: Flanking Markers Bracket the Neurofibromatosis Typ2 Gene on Chromosome 22. **Am J Hum Genet** **46**:323–328, 1990
57. Rutledge MH, Xie YG, Han FY, Peyrard M, Collins VP, Nordenskjöld M, et al: Deletions on chromosome 22 in sporadic meningioma. **Genes, Chromosomes and Cancer** **10**:122–130, 1994
58. Sadetzki S, Flint-Richter P, Ben-Tal T, Nass D: Radiation-induced meningioma: a descriptive study of 253 cases. **J Neurosurg** **97**:1078–1082, 2002

59. Sahm F, Schrimpf D, Olar A, Koelsche C, Reuss D, Bissel J, et al: TERT Promoter Mutations and Risk of Recurrence in Meningioma. **J Natl Cancer Inst** **108**:1–4, 2016
60. Sahm F, Schrimpf D, Stichel D, Jones DTW, Hielscher T, Schefzyk S, et al: DNA methylation-based classification and grading system for meningioma : a multicentre , retrospective analysis. **Lancet Oncol** **18**:682–94, 2017
61. Schoenberg BS, Christine BW, Whisnant JP: Nervous system neoplasms and primary malignancies of other sites. The unique association between meningiomas and breast cancer. **Neurology** **25**:705–712, 1975
62. Sefrioui D, Vermeulin T, Blanchard F, Chapusot C, Beaussire L, Armengol-Debeir L, et al: Copy number variations in *DCC/ 18q* and *ERBB2/ 17q* are associated with disease-free survival in microsatellite stable colon cancer. **Int J Cancer** **140**:1653–1661, 2017
63. Simpson D: The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** **20**:22–39, 1957
64. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon a H, et al: Identification of a candidate tumour suppressor gene, *MMAC1*, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. **Nat Genet** **15**:356–362, 1997
65. Timmons TM, Dunbar BS: Protein blotting and immunodetection. **Methods Enzymol** **182**:679–88, 1990
66. Trofatter JA, Maccoppiin MM, Rutter JL, Murreil JR, Duyao MP, Parry DM, et al: A Novel Moesin- , Ezrin- , Radixin-like Gene Is a Candidate for the Neurofibromatosis Tumor Suppressor. **Cell** **72**:791–800, 1993
67. Urbschat S, Rahnenführer J, Henn W, Feiden W, Wemmert S, Linsler S, et al: Clonal cytogenetic progression within intratumorally heterogeneous meningiomas predicts tumor recurrence. **Int J Oncol** **39**:1601–8, 2011
68. Voß KM, Spille DC, Sauerland C, Suero Molina E, Brokinkel C, Paulus W, et al: The Simpson grading in meningioma surgery: does the tumor location influence the prognostic value? **J Neurooncol** **133**:641–651, 2017
69. Weber RG, Boström J, Wolter M, Baudis M, Collins VP, Reifenberger G, et al: Analysis of genomic alterations in benign , atypical , and anaplastic meningiomas : Toward a genetic model of meningioma progression. **Proc Natl Acad Sci** **94**:14719–14724, 1997

70. Wellenreuther R, Kraus JA, Lenartz D, Menon AG, Schramm J, Louis DN, et al: Analysis of the Neurofibromatosis 2 Gene Reveals Molecular Variants of Meningioma. **Am J Pathol** **146**:827–832, 1995
71. Wu A, Garcia MA, Magill ST, Chen W, Vasudevan HN, Perry A, et al: Presenting Symptoms and Prognostic Factors for Symptomatic Outcomes Following Resection of Meningioma. **World Neurosurg** **111**:e149–e159, 2018
72. Yakut T, Bekar A, Doygun M, Acar H, Egeli U, Ogul E: Evaluation of relationship between chromosome 22 and p53 gene alterations and the subtype of meningiomas by the interphase-FISH technique. **Teratog Carcinog Mutagen** **22**:217–225, 2002
73. Zang KD, Singer H: Chromosomal constitution of meningiomas. **Nature** **216**:84–85, 1967
74. Zang KD: Meningioma: a cytogenetic model of a complex benign human tumor, including data on 394 karyotyped cases. **Cytogenet Cell Genet** **93**:207–220, 2001
75. Zankl H, Zang KD: Cytological and cytogenetical studies on brain tumors. 4. Identification of the missing G chromosome in human meningiomas as no. 22 by fluorescence technique. **Humangenetik** **14**:167–169, 1972

6 Publikationen

Posterbeiträge

13th Meeting of the European Association of Neuro-Oncology, 10.-14. Oktober 2018, Stockholm/SE

Hemmer S, Urbschat S, Oertel J, Ketter R: The influence of complex cytogenetic aberration patterns on recurrent meningiomas.

Neuro-Oncology , Supplement 3, 2018, doi 10.1093/neuonc/noy139.367

68. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC) e.V. 15.-17. Mai 2017 in Magdeburg

Hemmer S, Urbschat S, Oertel J, Ketter R: Deletion of chromosome 17q as an important step in the clonal cytogenetic evolution of recurrent meningiomas.

69. Jahrestagung 2018 der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC) e.V. 3.-6. Juni 2018 in Münster

Hemmer S, Urbschat S, Oertel J, Ketter R: The influence of complex cytogenetic aberration patterns on recurrent meningiomas.

Vorträge

Jahrestagung Sektion Neuroonkologie der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC) e.V. 9.-10. November 2018 in Innsbruck/AT

Hemmer S, Urbschat S, Oertel J, Ketter R: The influence of complex cytogenetic aberration patterns on recurrent meningiomas.

Paper

Hemmer S, Urbschat S, Oertel J, Ketter R: Deletions in the 17q chromosomal region and their influence on the clonal cytogenetic evolution of recurrent meningiomas.

Submitted

7 Anhang

7.1 FISH Auswertungen

Lymphozytenpräparat

FISH für Chromosom 17

202 Zellkerne ausgewertet

46xy		
Anzahl der Signale Chromosom 17, rot	0	
	1	6 (2,97%)
	2	188 (93,06%)
	3	6 (2,97%)
	4	2 (0,99%)

FISH für Chromosom 10

200 Zellkerne ausgewertet

46xy		
Anzahl der Signale Chromosom 10, grün	0	
	1	15 (7,5%)
	2	184 (92%)
	3	1 (0,5%)

Tumor 1240/02

FISH 10/17

200 Zellkerne ausgewertet

1240/02		Anzahl der Signale für Chromosom 17, rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale für Chromosom 10, grün	0					
	1		8 (4%)	6 (3%)	6	
	2		89 (44,5%)	78 (39%)	6 (3%)	4 (2%)
	3		3 (1,5%)			

FISH 1p/22q

200 Zellkerne ausgewertet

1240/02		Anzahl der Signale Chromosom 22q, rot		
		0	1	2
Anzahl der Signale Chromosom 1p, grün	0			
	1	2 (1%)	158 (79%)	25 (12,5%)
	2		6 (3%)	9 (4,5%)

Tumor 1671/04

FISH 10/17

200 Zellkerne ausgewertet

1671/04		Anzahl der Signale für Chromosom 17, rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale für Chromosom 10, grün	0					
	1		8 (4%)	3 (1,5%)		
	2		126 (63%)	57 (28,5%)	3 (1,5%)	1 (0,5%)
	3		2 (1%)			

FISH 1p/22q

200 Zellkerne ausgewertet

1674/01		Anzahl der Signale Chromosom 22q, rot		
		0	1	2
Anzahl der Signale für Chromosom 1p, grün	0			
	1	1 (0,5%)	173 (86,5%)	7 (3,5%)
	2		12 (6%)	7 (3,5%)
	3			
	4			

Tumor 1440/05

FISH 10/17

200 Zellkerne ausgewertet

1440/05		Anzahl der Signale für Chromosom 17, rot					
		0	1	2	3	4	5
Anzahl der Signale für Chromosom 10, grün	0						
	1		5 (2,5%)	8 (4%)	3 (1,5%)		
	2	1 (0,5%)	65 (32,5%)	72 (36,5%)	19 (9,5%)	11 (5,5%)	1 (0,5%)
	3		6 (3%)	8 (4%)	1 (0,5%)		

FISH 1p/22q

200 Zellkerne ausgewertet

1440/05		Anzahl der Signale für Chromosom 22q, rot			
		0	1	2	3
Anzahl der Signale für Chromosom 1p, grün	0				
	1	2 (1%)	183 (91,5%)	3 (1,5%)	1 (0,5%)
	2		3 (1,5%)	8 (4%)	

Tumor 1168/06

FISH 10/17

200 Zellkerne ausgewertet

1168/06		Anzahl der Signale für Chromosom 17, rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale für Chromosom 10, grün	0					
	1	6 (3%)	3 (1,5%)	5 (2,5%)	1 (0,5%)	
	2	77 (38,5%)	81 (40,5%)	22 (11%)	2 (1%)	
	3		2 (1%)	1 (0,5%)		

Tumor 1746/09

FISH 10/17

200 Zellkerne ausgewertet

1746/09		Anzahl der Signale für Chromosom 17, rot						
		0	1	2	3	4	5	6
Anzahl der Signale für Chromosom 10, grün	0							
	1	1 (0,5%)	2 (1%)	4 (2%)	4 (2%)	4 (2%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)
	2		20 (10%)	72 (36%)	48 (24%)	30 (15%)	7 (3,5%)	6 (3%)

Tumor 798/12

FISH 10/17

200 Zellkerne ausgewertet

798/12		Anzahl der Signale für Chromosom 17, rot						
		0	1	2	3	4	5	6
Anzahl der Signale für Chromosom 10, grün	0		2 (1%)		1 (0,5%)			
	1	1 (0,5%)	23 (11,5%)	41 (20,5%)	11 (5,5%)	4 (2%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)
	2	2 (1%)	28 (14%)	46 (23%)	17 (8,5%)	17 (8,5%)	1 (0,5%)	2 (1%)
	3				1 (0,5%)	1 (0,5%)		

FISH 1p/22q

200 Zellkerne ausgewertet

798/12		Anzahl der Signale für Chromosom 22q, rot			
		0	1	2	3
Anzahl der Signale für Chromosom 1p, grün	0				
	1		6 (3%)	7 (3,5%)	
	2		77 (38,5%)	107 (53,5%)	
	3		2 (1%)		
	4				1 (0,5%)

Tumor 2376/13

FISH 10/17

200 Zellkerne ausgewertet

2376/13		Anzahl der Signale für Chromosom 17, rot					
		0	1	2	3	4	5
Anzahl der Signale für Chromosom 10, grün	0						
	1	1 (0,5%)	1 (0,5%)	8 (4%)	2 (1%)		
	2		16 (8,5%)	78 (39%)	67 (33,5%)	18 (9%)	4 (2%)
	3			3 (1,5%)			
	4					1 (0,5%)	

Tumor 2841/15

FISH 10/17

200 Zellkerne ausgewertet

2841/15		Anzahl der Signale für Chromosom 17, rot			
		0	1	2	3
Anzahl der Signale für Chromosom 10, grün	0				
	1		2 (1%)	2 (1%)	1 (0,5%)
	2		91 (45,5%)	87 (43,5%)	15 (7,5%)

FISH 1p/22q

200 Zellkerne ausgewertet

2841/15		Anzahl der Signale für Chromosom 22q, rot			
		0	1	2	3
Anzahl der Signale für Chromosom 1p, grün	0				
	1		3 (1,5%)	3 (1,5%)	
	2		145 (72,5%)	47 (23,5%)	1 (0,5%)
	3				
	4			1 (0,5%)	

Tumor 1916/02

FISH 10/17

200 Zellkerne ausgewertet

1916/02		Anzahl der Signale für Chromosom 17, rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale für Chromosom 10, grün	0					
	1		7 (3,5%)	10 (5%)	4 (2%)	1 (0,5%)
	2	3 (1,5%)	71 (35,5%)	84 (42%)	17 (8,5%)	2 (1%)
	3					1 (0,5%)

Tumor 1248/03

FISH 10/17

200 Zellkerne ausgewertet

1248/03		Anzahl der Signale für Chromosom 17, rot					
		0	1	2	3	4	5
Anzahl der Signale für Chromosom 10, grün	0					1 (0,5%)	
	1		3 (1,5%)	10 (5%)	10 (5%)		
	2	1 (0,5%)	37 (18,5%)	74 (37%)	49 (24,5%)	9 (4,5%)	3 (1,5%)
	3			1 (0,5%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)	

Tumor 168/05

FISH 10/17

200 Zellkerne ausgewertet

168/05		Anzahl der Signale für Chromosom 17, rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale für Chromosom 10, grün	0					
	1	2 (1%)	105 (52,5%)	74 (37%)	5 (2,5%)	1 (0,5%)
	2	2 (1%)	4 (2%)	6 (3%)	1 (0,5%)	

FISH 1p/22q

100 Zellkerne ausgewertet. Aufgrund der Präparatqualität konnten keine 200 Zellkerne ausgewertet werden. Für einen Wiederholungsversuch war kein Tumormaterial mehr vorhanden.

168/05		Anzahl der Signale für Chromosom 22q, rot		
		0	1	2
Anzahl der Signale für Chromosom 1p, grün	0			
	1		7 %	
	2	2 %	66%	18%
	3		6%	1%

Tumor 2630/12

FISH 10/17

200 Zellkerne ausgewertet

2630/12		Anzahl der Signale für Chromosom 17, rot			
		0	1	2	3
Anzahl der Signale für Chromosom 10, grün	0				
	1		108 (54%)	32 (16%)	3 (1,5%)
	2	2 (1%)	29 (14,5%)	17 (8,5%)	6 (3%)
	3		3 (1,5%)		

Tumor 2000/13

FISH 10/17

200 Zellkerne ausgewertet

2000/13		Anzahl der Signale für Chromosom 17, rot			
		0	1	2	3
Anzahl der Signale für Chromosom 10, grün	0				
	1	1 (0,5%)	75 (37,5%)	96 (48%)	12 (6%)
	2		5 (2,5%)	9 (4,5%)	2 (1%)

Tumor 886/14

FISH 10/17

200 Zellkerne ausgewertet

886/14		Anzahl der Signale für Chromosom 17, rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale für Chromosom 10, grün	0			1 (0,5%)		
	1	4 (2%)	63 (31,5%)	60 (30%)	8 (4%)	5 (2,5%)
	2	1 (0,5%)	16 (8%)	32 (16%)	9 (4,5%)	
	3					
	4					1 (0,5%)

Tumor 686/15

FISH 10/17

200 Zellkerne ausgewertet

686/15		Anzahl der Signale für Chromosom 17, rot					
		0	1	2	3	4	5
Anzahl der Signale für Chromosom 10, grün	0						
	1		118 (59%)	49 (24,5%)	7 (3,5%)	2 (1%)	
	2		9 (4,5%)	9 (4,5%)	5 (2,5%)		
	3						1 (0,5%)

Tumor 1072/99

FISH 10/17

200 Zellkerne ausgewertet

1072/99		Anzahl der Signale für Chromosom 17, rot					
		0	1	2	3	4	5
Anzahl der Signale für Chromosom 10, grün	0						
	1		9 (4%)	8 (4%)	2 (1%)		
	2	1 (0,5%)	88 (44%)	64 (32%)	20 (10%)	3 (1,5%)	
	3			2 (1%)			1 (0,5%)
	4			1 (0,5%)			
	5				1 (0,5%)		

Tumor 32/02

FISH 10/17

200 Zellkerne ausgewertet

32/02		Anzahl der Signale für Chromosom 17, rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale für Chromosom 10, grün	1		14 (7%)	8 (4%)		
	2		114 (57%)	59 (29,5%)	2 (1%)	1 (0,5%)
	3				1 (0,5%)	
	4			1 (0,5%)		

Tumor 379/01

FISH 10/17

200 Zellkerne ausgewertet

379/01		Anzahl der Signale für Chromosom 17, rot							
		0	1	2	3	4	5	6	7
Anzahl der Signale für Chromosom 10, grün	0								
	1		14 (7%)	6 (3%)	6 (3%)	1 (0,5%)			
	2		22 (11%)	68 (34%)	50 (25%)	25 (12,5%)	2 (1%)		1 (0,5%)
	3				3 (1,5%)				
	4				1 (0,5%)	1 (0,5%)			

Tumor 1342/01

FISH 10/17

200 Zellkerne ausgewertet

1342/01		Anzahl der Signale für Chromosom 17, rot					
		0	1	2	3	4	5
Anzahl der Signale für Chromosom 10, grün	0						
	1		2 (1%)	6 (3%)			
	2		36 (18%)	70 (35%)	54 (27,5%)	22 (11%)	5(2,5%)
	3		1 (0,5%)	2 (1%)			
	4					2 (1%)	

Tumor 1808/01

FISH 10/17

200 Zellkerne ausgewertet

1808/01		Anzahl der Signale für Chromosom 17, rot							
		0	1	2	3	4	5	6	7
Anzahl der Signale für Chromosom 10, grün	0								
	1			3 (1,5%)	4 (2%)	5 (2,5%)	2 (1%)		
	2		9 (4,5%)	41 (20,5%)	49 (24,5%)	47 (23,5%)	28 (14%)	8 (4%)	4 (2%)

FISH 1p/22

200 Zellkerne ausgewertet

1808/01		Anzahl der Signale für Chromosom 22q, rot			
		0	1	2	3
Anzahl der Signale für Chromosom 1p, grün	0				
	1		11 (5,5%)	11 (5,5%)	
	2	1 (0,5%)	49 (24,5%)	119 (59,5%)	2 (1%)
	3			7 (3,5%)	

Tumor 1936/01

FISH 10/17

200 Zellkerne ausgewertet

1936/01		Anzahl der Signale für Chromosom 17, rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale für Chromosom 10, grün	0					
	1		6 (3%)	2 (1%)	1 (0,5%)	
	2	2 (1%)	103 (51,5%)	73 (36,5%)	8 (4%)	1 (0,5%)
	3		1 (0,5%)	3 (1,5%)		

FISH 1p/22q

200 Zellkerne ausgewertet

1936/01		Anzahl der Signale für Chromosom 22q, rot		
		0	1	2
Anzahl der Signale für Chromosom 1p, grün	1	1 (0,5%)	44 (22%)	1 (0,5%)
	2	1 (0,5%)	141 (70,5%)	8 (4%)
	3		4 (2%)	

Tumor 2888/13

FISH 10/17

200 Zellkerne ausgewertet

2888/13		Anzahl der Signale für Chromosom 17, rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale für Chromosom 10, grün	0					
	1		14 (7%)	14 (7%)	3 (1,5%)	
	2	3 (1,5%)	66 (33%)	84 (42%)	7 (3,5%)	3 (1,5%)
	3		2 (1%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)	
	4			2 (1%)		

FISH 1p/22q

200 Zellkerne ausgewertet

2888/13		Anzahl der Signale für Chromosom 22q, rot			
		0	1	2	3
Anzahl der Signale für Chromosom 1p, grün	0				
	1	1 (0,5%)	4 (2%)	9 (4,5%)	
	2	1 (0,5%)	68 (34%)	114 (57%)	2 (1%)
	3	1 (0,5%)			

7.2 Chemikalien- und Geräteverzeichnis

Lösungen und Puffer

Blockpuffer	1% Magermilchpulver in 6x SSC
Delauney-Fixativ	100 ml Ethanol 96%, vergällt 100 ml Aceton 0,1 ml 1M Trichloressigsäure
DOT-Puffer	0,1 M Tris 0,1 M NaCl 0,05 M MgCl ₂ pH 9,5
Fixativ für Zellkulturbearbeitung	Methanol: Eisessig 3:1
Formamid deionisiert	100 ml Formamid 10 g Mischbettionenaustauscher
Hybridisierungspuffer	6 µl Formamid 1µl 20xSSC
6M NaCl	34,84 g NaCl 100ml a.d.
Paraformaldehyd (4%)	4g Paraformaldehyd 100 ml 1x PBS
1x PBS	200 ml 5xPBS 800 ml a.d.
5x PBS	1,0 g KCL 1,0 g KH ₂ PO ₄ 40 g NaCl 8,9 g Na ₂ HPO ₄ in 800 ml a.d. auflösen pH 7 einstellen auf 1000 ml A. d. auffüllen
Pepsin	10 % Pepsin in a.d. bei 37°C lösen
RNase A	50 mg RNase 5 ml 2xSSC
20 x SSC	100ml 20xSSC 900ml a.d.
6 x SSC	150 ml 20 x SSC 350 ml a.d.
4 x SSC	200 ml 20 x SSC 800 ml a.d.
4 x SSC/ Triton	4 x SSC 0,1 % Triton X-100
TN Puffer	1,2 g Tris 0,87 g NaCl 100 ml a.d.
2% 3-(Triethoxysilyl)-propylamin (SILAN)	3ml 3-(Triethoxysilyl)-propylamin 147. Aceton

Chemikalienverzeichnis

Chemikalie	Hersteller
Aqua ad inieci	Braun
Ethanol vergällt	Merck
Biotin-Nick-Translations-Mix	Roche Diagnostics
EDTA	Sigma
Natriumacetat	Merck
EtOH absolut	Merck
Nitrocellulosemembran	Hybond N+, Amersham Biosciences
Magermilchpulver	Merck
Streptavidin-Alkalischer Phosphatase	Vector Laboratories
Anti-Dig-Alkalischer Phosphatase	Roche Diagnostics
PB-MAX™Karyotyping	GIBCO
KaryoMAX™Colcemid Solution liquid	GIBCO
Kaliumchlorid	Sigma
Hybridisierungsmix 1p/22q	Metasystems
RNAse A	Sigma
NaCl	Merck
HCl	Merck
Pepsin	Sigma
Kaliumchlorid	Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Merck
Formamid	Merck
Fixogum	Marabu
BSA bovine serum albumine	Sigma
Streptavidin-FITC	Vector Laboratories
anti-Streptavidin	Vector Laboratories
anti-Dig-Cy3	Roche Diagnostics
Goat-anti-mouse-Cy3	Roche Diagnostics
DAPI-Vectashield with DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Trichloressigsäure	VWR
Methanol	Merck
Eisessig	Merck
Mischbettionenaustauscher	Biograd AG X-108
BCIP	Fa. Roth
NBT	Fa. Roth
PFA	Merck

Weitere, nicht aufgeführte Chemikalien, wurden durch die Hersteller Sigma, Merck oder Braun bezogen.

Geräteverzeichnis

Gerät	Hersteller
Heizplatte	Fa. Medax Typ17801 Ser.Nr.21065
CO2-Wärmeschrank	Fa. Heraeus 6000
LaminAir	Heraeus HB2448 K
Wärmeschrank	Memmert
CO2-Wärmeschrank	Fa.Binder
Phasenkontrastmikroskop	Zeiss PrimoVert
Wasserbad Klein (ZK-Labor)	Thermomix
Zentrifuge	Hettich Rotina 35
Kompaktschüttler	Edmund Bühler TH 15
Ultratiefkühlschrank -86°C	MDF-U50V/Sanyo
Wärmeschrank	Jouan N° 1995/3777
Wasserbad	GFL Typ1012
Schüttelwasserbad	GFL Typ 1083
Wärmeplatte mit Rührfunktion	VWR
pH- Meter	Sartorius
Kühlschrank	VWR
Kühlzentrifuge	Sigma 3-16PK mit Wartungsvertrag
Ultra-Kühlzentrifuge für Eppis	Hermle Z 233MK
Maxi Cyclor	My Research PTC 100 weiß
Maxi Cyclor	My Research PTC 100 schwarz
Hyspin	Anachem 16K
Mikrozentrifuge	Labnet
Thermomixer comfort	Eppendorf
Heizplatte	Medite OTS 40
Fluoreszenzmikroskop Olympus BX43	Olympus
Mikroskopkamera Oympus XC30	Olympus
Bildbearbeitungssoftware cellSens Dimension	Olympus

8 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. Joachim Oertel für die Überlassung der Dissertation bedanken. Durch seine Motivation für die Forschung und die klinische Arbeit in der Neurochirurgie hat er maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Ralf Ketter für seine fachliche und menschliche Unterstützung. Von seiner langjährigen Erfahrung in Forschung und Klinik habe ich stets profitiert.

Ein ebenso großer Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. Steffi Urbschat für ihre fachliche Unterstützung während der gesamten Promotion, die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe im neurochirurgischen Forschungslabor und ihre motivierenden Worte während unserer gesamten Zusammenarbeit.

Bei Sigrid Welsch und Sonja Hoffmann möchte ich mich für die Einarbeitung in die Methodik und die technische Hilfestellung bei der Durchführung der Versuche bedanken.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich stets motiviert und an das Gelingen dieser Arbeit geglaubt haben.

Für ihre uneingeschränkte Unterstützung während der Promotion und darüber hinaus möchte ich mich besonders bei meinen Eltern bedanken. Diese Arbeit sei ihnen gewidmet.