

Aus dem Institut für Pathologie  
im Zentrum für Interdisziplinäre Fächer II,  
Sektion Kinderpathologie  
(Leiter: Prof. Dr. med. I. Leuschner)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**DIE IN SITU REVERSE TRANSKRIPTASE-  
POLYMERASEKETTENREAKTION  
(IS RT-PCR) BEIM ALVEOLÄREN RHABDOMYOSARKOM  
AM BEISPIEL DER  
TRANSLOKATION (2;13)(q35;q14)**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**ANDREA RAETHER**  
aus Flensburg

Kiel 2010

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. M. Krams

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. R. Gläser

Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.2011

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 31.10.2011

gez. Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi

**Meiner Familie gewidmet**



# **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>4</b>
2.1 Proben und Patientendaten	4
2.2 Kontrolle des Amplifikationsproduktes:	
Die Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	4
2.3 Die In Situ Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (IS RT-PCR)	10
2.4 Primed In Situ Labeling (PRINS)	14
2.5 Immunhistochemische Detektion	18
2.6 Materialien, Lösungen und Hersteller	19
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>23</b>
<b>4. Diskussion</b>	<b>36</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>43</b>
<b>6. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen</b>	<b>44</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>45</b>
<b>8. Danksagung</b>	<b>57</b>
<b>9. Lebenslauf</b>	<b>58</b>



## 1. Einleitung

Rhabdomyosarkome (RMS) zählen zu den häufigsten Weichteilsarkomen im Kindes- und Jugendalter (Enzinger und Shiraki, 1969; Harms, 1996). Bereits 1854 wurde erstmals ein RMS in der Zunge eines 21jährigen Patienten beschrieben (Weber, 1854).

Histologisch gehören sie in die Gruppe der klein-, rund- und blauzelligen Tumoren („small round blue cell tumors“). Diese Gruppe beinhaltet mehrere unterschiedliche, wenig differenzierte Weichteiltumoren, die aufgrund ihrer morphologischen Ähnlichkeit schwierig zu diagnostizieren sind (Dehner, 1981). Zu nennen sind hier die Tumoren der Ewing-Sarkom Familie, Neuroblastome, Wilms-Tumoren und maligne Lymphome.

RMS gehen von primitiven mesenchymalen Zellen aus, die ein desmin- und myosinhaltiges Zytoskelett entwickeln und aufgrund dieser myogenetischen Tendenz eine phänotypische Ähnlichkeit zur Skelettmuskulatur aufweisen (Harms und Schmidt, 1997). Sie können starke Unterschiede in der Differenzierung zeigen und treten in den unterschiedlichsten Organen auf. Horn und Enterline teilten die RMS erstmals in pleomorphe, alveoläre, embryonale und botryoide Subtypen ein (Horn und Enterline, 1958).

Neben dieser klassischen Einteilung wurden noch weitere Klassifikationen vorgenommen (Palmer et al., 1983; Caillaud et al., 1989; Tsokos et al., 1984, 1992), wobei die heute international gebräuchliche Klassifizierung in der „International Childhood Soft Tissue Sarcoma Pathology Classification Study“ erarbeitet wurde (Newton et al., 1989) und auch prognostische Kriterien mit einschließt.

Das alveoläre RMS (aRMS) spielt in den Klassifikationen eine besondere Rolle, da es von allen RMS die schlechteste Prognose hat (Hays et al., 1983; Harms et al., 1985). Der Grund liegt hauptsächlich in der frühen hämatogenen Metastasierung (Gehan et al., 1981; Ruymann et al., 1984; Raney et al., 1988; Koscielniak et al., 1992; Harms, 1995b) bei relativ kleinem Primärtumor (Pilgrim et al., 1997). Zusätzlich zeigen auch epidemiologische Daten Unterschiede zwischen aRMS und anderen RMS.

Beim aRMS sind hauptsächlich die Extremitäten und der Stamm betroffen während embryonale RMS (eRMS) bevorzugt im Kopf- und Halsbereich vorkommen (Newton et al., 1988; Ruymann und Gruffermann, 1991; Raney et al., 1993). Das eRMS tritt häufiger bei Jungen auf (m:w = 1,7:1) und hat einen Häufigkeitsgipfel in den ersten fünf Lebensjahren. Im Gegensatz dazu bestehen für das aRMS keine signifikanten Unterschiede in der Geschlechtsverteilung (m:w = 1,1:1) (Harms et al., 1995a).

Bezüglich der Häufigkeit ist eine nahezu gleichmäßige Verteilung im Kindes- und Adoleszentenalter zu beobachten (Hays et al., 1982; Harms, 1995a).

Aufgrund der histologischen Vielfalt und der vorwiegend niedrigen Differenzierung stellt sich die Diagnostik schwierig dar. Dabei können auch viele Nicht-Rhabdomyosarkome wie extraossäre Ewing-Sarkome, periphere neuroektodermale Tumoren, maligne Lymphome und Wilms-Tumoren mit RMS verwechselt werden. Auch die prognostisch und therapeutisch wichtige Unterscheidung von aRMS zu eRMS ist mit herkömmlichen Methoden nicht immer eindeutig möglich, da auch die histologischen Kriterien bisher unterschiedlich festgelegt wurden. Harms et al. (1985) klassifizierten RMS als alveolär, auch wenn nur geringe Anteile mit alveolärem Muster enthalten waren. Dagegen charakterisierten Bale et al. (1983) ein RMS erst dann als alveolär, wenn in mindestens 70% der angeschnittenen Tumoroberfläche ein alveoläres Muster zu erkennen war.

Neben der Histologie ist die Immunhistochemie ein weiterer wichtiger Bestandteil der Diagnostik (Tsokos, 1986; Carter et al., 1992). Mittlerweile ist eine Vielzahl von Markern der Muskeldifferenzierung bekannt, die für eine immunhistochemische Untersuchung von RMS eingesetzt werden können; in erster Linie zu nennen sind das Intermediärfilament Desmin und muskelspezifisches Aktin.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen können vereinzelt jedoch nicht eindeutig interpretiert werden, da die Marker auch in verschiedenen Nicht-Rhabdomyosarkomen positiv ausfallen können (Rangdaeng et al., 1991, Parham et al., 1992). Da wegen der unterschiedlichen Prognosen auch verschiedene Therapieprotokolle entwickelt wurden (Raney et al., 1993), ist eine frühe und exakte Diagnosestellung erforderlich (Leuschner und Harms, 1999).

Einen großen Fortschritt für die Diagnostik brachte die Entdeckung der für das aRMS charakteristischen Chromosomentranslokation  $t(2;13)(q35;q14)$  (Seidal et al. 1982, Turc-Carel et al. 1986, Douglass et al. 1987). Es hat sich über die Jahre gezeigt, dass die  $t(2;13)$  die am häufigsten nachgewiesene Translokation ist (Reichmuth et al., 1996). Ferner konnte in aRMS eine weitere Translokation, die  $t(1;13)(p36;q14)$ , (Douglass et al., 1991; Biegel et al., 1991) nachgewiesen werden. Diese ist seltener, jedoch auch typisch für aRMS. Je nach Untersuchung zeigen aRMS zu ca. 90% die  $t(2;13)(q35;q14)$  und zu ca. 10% die  $t(1;13)(p36;q14)$  (Biegel et al., 1991; Douglass et al., 1991; Whang-Peng et al., 1992; Anderson et al., 1997).



Eine Untersuchung von Gallego Melcón et al. (2007), die auf einer größeren Fallzahl beruht, zeigt eine andere Verteilung der Translokationen: Die t(2;13)(q35;q14) wird mit einer Häufigkeit von 70% beschrieben, die t(1;13)(p36;q14) mit einer Häufigkeit von 10-15%. In anderen Arbeiten finden sich zu 25% keine erkennbaren Translokationen (Davicioni et al., 2009). Darüber hinaus konnten in neueren Untersuchungen noch weitere Translokationen beim aRMS nachgewiesen werden: t(2;2)(p23;q35) sowie t(2;8)(q35;q13) (Sumegi et al., 2009).

In der vorliegenden Arbeit haben wir uns mit der am häufigsten vorkommenden Translokation, t(2;13)(q35;q14), beschäftigt. Zusammen mit der t(1;13)(p36;q14) ist diese Translokation durch ein Rearrangement des FOXO1-Gens (ehemals FKHR) auf dem Chromosom 13 charakterisiert:

Hierbei verbindet sich bei der t(2;13)(q35;q14) das FOXO1-Gen mit dem PAX3-Gen auf dem Chromosom 2 (Barr et al., 1991, 1992; Galili et al., 1993; Shapiro et al., 1993).

Bei der t(1;13)(p36;q14) kommt es zu einer Verbindung des FOXO1-Gens mit dem PAX7-Gen auf Chromosom 1 (Shapiro et al., 1993; Davis et al., 1994; Webber-Hall et al., 1996; Noguera, 1996). Nach Transkription dieser Fusionsgene und anschließender Translation entstehen die Fusionsproteine PAX3-FOXO1 bzw. PAX7-FOXO1. (Schematische Darstellung der Translokation siehe Abbildung 1)

Nach Identifizierung der beteiligten Gene wurden Untersuchungsprotokolle entwickelt, die mittels der Polymerasekettenreaktion die Fusionstranskripte der verschiedenen Translokationen erkennen (Barr et al., 1995; Downing et al., 1995; Kelly et al., 1996; Anderson et al., 1997). Da die für diese Untersuchungstechnik nötige Ribonukleinsäure (RNA) aus dem Gewebe isoliert wird, ist jedoch nicht mit letzter Sicherheit zu sagen, aus welchem Zelltyp sie stammt und ob alle Tumorzellen die Translokation tragen.

Wir haben in dieser Arbeit versucht, die Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) ohne vorhergehende Isolierung der RNA direkt auf dem histologischen Gewebsschnitt durchzuführen. Diese Technik der so genannten In Situ RT-PCR (IS RT-PCR) ermöglicht den Nachweis der tumorspezifischen Translokation ohne den Zellverband zu zerstören und damit eine direkte Zuordnung der nachgewiesenen Fusionstranskripte zu bestimmten Zelltypen (Embleton et al., 1992; Peters et al., 1997; Krams et al., 2000).

Unser Hauptziel lag dabei in der Etablierung eines relativ einfachen Protokolls, das auch in der Routinediagnostik Verwendung finden könnte.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Proben und Patientendaten**

In der vorliegenden Arbeit wurden 23 alveoläre Rhabdomyosarkome (aRMS) untersucht. Die Tumorproben als auch die Patientendaten wurden aus dem Archiv des Kinder-Tumorregisters, Kiel am Institut für Paidopathologie (Direktor: Prof. Dr. med. I. Leuschner) genommen. In allen Fällen standen uns formalinfixierte, paraffineingebettete Gewebeproben zur Verfügung. Darüber hinaus lagen von allen Tumoren weitere Schnittpräparate mit zusätzlichen immunhistochemischen Färbungen vor, die zur Diagnosesicherung durchgeführt worden waren. Ferner kamen drei embryonale Rhabdomyosarkome und drei Ewing Sarkome zur Untersuchung. Patientendaten und Tumorcharakteristika sind in der Tabelle 10 im Abschnitt Ergebnisse dargestellt.

### **2.2 Kontrolle des Amplifikationsproduktes:**

#### **Die Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)**

(verwendete Chemikalien und Geräte s. Abschnitt 2.6)

##### **2.2.1 Prinzip der PCR und der RT-PCR**

Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaktion, PCR), (Saiki et al., 1985; Mullis et al., 1986; Mullis and Faloona, 1987), besteht in der Vervielfältigung von Desoxyribonukleinsäuren (DNA) mit Hilfe eines hitzestabilen Enzyms (Polymerase). Es wird dabei von einem doppelsträngigem DNA-Strang ausgegangen, der als Matrize dient und die gesuchte Basensequenz enthält. Dieser DNA-Doppelstrang wird dann durch Hitze denaturiert, wobei zwei Einzelstränge entstehen. Die gesuchte Sequenz wird nun mit zwei kurzen Oligonukleotiden (Primern), die der DNA-Polymerase als Startpunkte dienen, eingerahmt. Dabei müssen die Primer so gewählt werden, dass ein Oligonukleotid jeweils komplementär zu einem der beiden Einzelstränge ist und so spezifisch an die Matrize binden kann. In einem weiteren Schritt katalysiert nun die DNA-Polymerase ausgehend von den Primermolekülen den Aufbau eines komplementären DNA-Stranges an beiden Einzelsträngen. Dabei findet die Verlängerung der hybridisierten Primer in 5'-3'Richtung statt, wobei jeweils die Anzahl der vorhandenen DNA-Moleküle verdoppelt wird. Das technische Prinzip der PCR besteht also aus drei Arbeitsschritten: 1. Denaturierung (Schmelzen), 2. Primer-Hybridisierung

(Annealing), 3. DNA-Synthese (Elongation). Werden diese Schritte zyklisch durchlaufen, kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung des gesuchten DNA-Abschnittes. Die Reaktionsschritte werden bei unterschiedlichen, vorher definierten Temperaturen durchgeführt: Denaturierung bei etwa 90°C, schnelles Abkühlen auf ca. 60°C zur Primer-Hybridisierung; die DNA-Synthese findet zwischen 65-72°C statt.

Da die hohen Temperaturen, die für die Denaturierung der DNA notwendig sind, auch andere Proteine denaturieren, u.a. auch die Polymerasen, müsste man nach jedem Zyklus das Enzym erneut hinzugeben. Seit Einführung einer hitzestabilen DNA-Polymerase (aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, Taq-Polymerase) von Saiki et al. (1988) erübrigt sich dieser Schritt.

Wenn die Ziel-Nukleinsäure in Form von RNA vorliegt, muß diese vor der PCR-Reaktion zunächst in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dazu wird eine Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) eingesetzt. Die bei diesem Vorgang (Reverse Transkription, RT) entstandene cDNA kann dann im Anschluß als Ausgangsprodukt für eine PCR verwendet werden. Die Kombination beider Methoden wird als RT-PCR zusammengefasst.

### **2.2.2 Vorbereitung**

Von dem paraffingebetteten Tumorgewebe wurden vier bis fünf Gewebeschnitte, jeweils 5µm dick, in ein Reaktionsgefäß gegeben. Zur Entparaffinisierung wurde das Gewebe zweimal für 5 Minuten mit je 1ml Xylol inkubiert und der Überstand nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 14000 U/min. jeweils verworfen. Danach folgte eine Inkubation mit 100% Ethanol für 3 x 5 Minuten wie oben beschrieben.

### **2.2.3 RNA-Extraktion**

Nach dem Lufttrocknen wurde das Gewebe mit 1ml Trizol überschichtet und mit dem Ultra Turrax T8 bei höchster Umdrehungsstufe mechanisch homogenisiert.

Das Homogenisat wurde mit 200 µl Chloroform gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde bei 14000 U/min. ca. 15 Minuten zentrifugiert, danach die obere wässrige Phase abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

In einem weiteren Schritt wurden 500 µl Isopropylalkohol hinzugegeben und die Lösung dann 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen (Fällung). Nach dem Zentrifugieren (ca. 10 Minuten bei 14000 U/min.) konnte der Überstand entfernt und ein RNA-Pellet gesehen werden.

Nach einer zweiten Waschung mit 75% Ethanol wurde das RNA-Pellet 10 Minuten luftgetrocknet. Anschließend wurde die RNA in 20 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC) - behandeltem Wasser aufgelöst und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### 2.2.4 Reverse Transkription und PCR

1 µg RNA wurde in komplementäre DNA (cDNA) überschrieben, die anschließend in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen vervielfältigt wurde. Der Reaktionsansatz der Reversen Transkription bestand aus 1 µg total RNA, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 1mM von jedem Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 µM Random Hexamers und 2,5 U/µl Reverse Transkriptase des Moloney Murine Leukemia Virus (MuLV). Der Reaktionsansatz wurde mit Aqua dest. auf insgesamt 40 µl aufgefüllt. Die Reaktionsbedingungen der Reversen Transkription sind in Tabelle 1 dargestellt.

<b>Tabelle 1: Reaktionsbedingungen der Reversen Transkription</b>		
Reverse Transkription	42°C	60 Minuten
Denaturierung	99°C	5 Minuten
Abkühlung	4°C	5 Minuten

Die nachfolgende PCR wurde nach Anderson et al. (1997) mit leichten Veränderungen durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine verschachtelte PCR. Das bedeutet, dass nach der ersten Amplifikation eine zweite Amplifikation mit verschachtelten, so genannten „inneren“ Primern erfolgte. Das Reaktionsgemisch setzte sich wie folgt zusammen:

50 mM KCl, 10 mM Tris HCl, pH 8,3, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM von jedem dNTP, 0,2 µM Primer PAX3 und FOXO1-A, 0,125U/µl AmpliTaq-Gold.

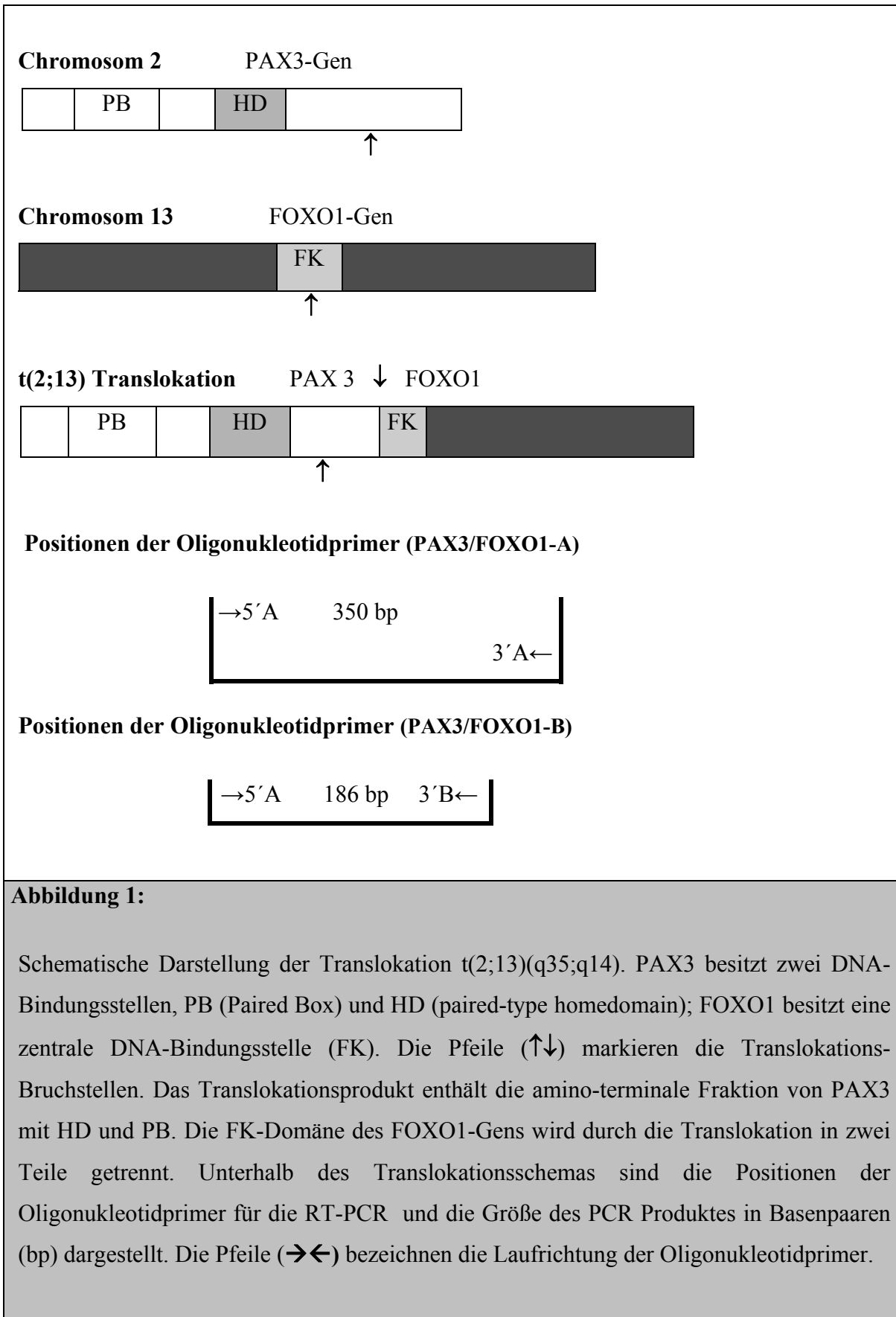
Nach erfolgter erster PCR wurde 1 µl des unverdünnten Reaktionsgemisches in einer zweiten PCR weiter mit den Primern PAX3 und FOXO1-B vervielfältigt.

Die Temperaturprofile für beide PCR-Reaktionen sind in nachfolgender Tabelle 2 dargestellt:

<b>Tabelle 2: Temperaturprofile für beide RT-PCR Reaktionen</b>			
<b>1. Zyklus</b>	Denaturierung	95°C	4 Minuten
	Annealing	68°C	30 Sekunden
	DNA-Synthese	72°C	30 Sekunden
<b>darauf folgten weitere 40 Zyklen:</b>			
	Denaturierung	95°C	15 Sekunden
	Annealing	68°C	15 Sekunden
	DNA-Synthese	72°C	5 Sekunden

Als Positivkontrolle wurde RNA von Beta-Aktin, die ubiquitär transkribiert wird, parallel amplifiziert. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Positionen der Primer sind in Abbildung 1 dargestellt.

<b>Tabelle 3: Oligonukleotidprimer-Sequenzen für die PCR-Reaktionen und für die Positivkontrolle mit Beta-Aktin</b>	
PAX3	5' AGC TAT ACA GAC AGC TTT GT 3'
FOXO1-A	5' CTC TGG ATT GAG CAT CCA CC 3'
FOXO1-B (innerer Primer und PRINS-Primer)	5' TCC AGT TCC TTC ATT CTG CA 3'
Aktin Sense (Aktin-S)	5' GAG CGG GAA ATC GTC CGT GAC ATT 3'
Aktin Antisense (Aktin-AS)	5' GAT GGA GTT GAA GGT AGT TTC GTG 3'



## 2.2.5 Spezifitätsprüfung der RT-PCR mit Southern Blot

- **Gel-Elektrophorese, Transfer und Fixation**

Für die Gelelektrophorese wurde ein Gel aus 1,5 g NuSieve Agarosepulver und 100 ml 1 x Tris-Acetat-EDTA Puffer (TAE) hergestellt. Dafür wurde die Lösung in einem Glaskolben in der Mikrowelle erhitzt und anschließend nach vollständiger Auflösung der Agarose in einem Wasserbad (50-60°C) ca. 20 Minuten abgekühlt. Das Gel wurde dann in eine Gelkammer gegossen und härtete darin aus. Jeweils 10 µl des PCR-Produktes wurden mit 2 µl Auftragspuffer auf einer Alufolie vermischt. Dieses Gemisch wurde dann in die Löcher des fertigen Gels gegeben. Als Längenstandard wurde der 10 µl Mass Ruler™ verwendet. Anschließend wurde für zwei Stunden eine Spannung von 125 V an die Kammer angelegt. Nach Ablauf der Gelelektrophorese wurde die DNA mit Ethidiumbromid gefärbt, unter UV-Transillumination sichtbar gemacht und dann fotografiert (siehe Abbildung 3 im Kapitel 3). Im Anschluß wurde das Gel für 15 Minuten denaturiert, danach für weitere 15 Minuten neutralisiert und schließlich mit 20xSSC per Kapillartransfer auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Dieses so genannte Blotting erfolgte über Nacht. Danach wurde die Membran kurz in 2xSSC gespült und die DNA mit UV-Licht fixiert (0,6 J/cm<sup>2</sup>).

- **Hybridisierung**

Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 30°C mit einem Formamid-haltigem Puffer (DIG Easy Hyb). Als Sonde wurde der Primer FOXO1-B verwendet, der zuvor mit terminaler Deoxynucleotidyltransferase am 5'-Ende mit DIG-11-dUTP markiert worden war (Probenkonzentration: 10 pmol/ml). Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal in 2xSSC für 30 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend einmal in 0,1xSSC bei 37° C gewaschen.

- **Detektion**

Die Detektion erfolgte für 30 Minuten durch Inkubation mit Antikörpern gegen Digoxigenin. Diese Antikörper sind F(ab)<sub>2</sub>-Fragmente vom Schaf, die mit alkalischer Phosphatase gekoppelt sind (Verdünnung 1:5000 in DIG Blocking Buffer). Nach zweimaligem Waschen der Membran für 15 Minuten und Inkubation in Detektionspuffer wurde die Farblösung Nitro Blue Tetrazoliumchlorid/5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat (NBT/BCIP) aufgetragen. Das Farbprodukt ist dunkelblau.

## **2.3 Die In Situ Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (IS RT-PCR)**

(verwendete Chemikalien und Geräte s. Abschnitt 2.6)

### **2.3.1 Prinzip der IS RT-PCR**

Die IS RT-PCR findet nicht wie die konventionelle PCR in einem Reaktionsgefäß, sondern auf dem Gewebeschnitt statt. Dieses Verfahren dient dazu, Nukleinsäuren in ihrer natürlichen zellulären Umgebung zu vermehren und anschließend zu lokalisieren. Dadurch können Zellgruppen oder gar einzelne Zellen, die die Ziel-DNA bzw. die Ziel-RNA exprimieren, im histologischen Schnitt sichtbar gemacht werden.

Bei dieser Technik liegt die Schwierigkeit hauptsächlich in der Vorbereitung der Schnittpräparate. Die Gewebepерmeabilisierung sowie die Optimierung der Reaktionsparameter sind dabei entscheidend für den Erfolg der nachfolgenden PCR.

### **2.3.2 Anfertigen der Gewebe-Schnitte**

Von den formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeproben wurden histologische Serienschnitte angefertigt und auf silanisierte Objektträger gebracht, die für die Anwendung des Gene Amp in Situ 1000 Systems vom Hersteller empfohlen werden. Das zur Silanisierung verwendete 3-Aminopropyltriethoxy-Silan führt zu einer besonders widerstandsfähigen Haftung von Gewebe und Glasoberfläche. Die frischen Gewebeschnitte wurden dann über Nacht bei 37°C getrocknet und anschließend für einige Stunden in trockener Umgebung bei 60°C inkubiert.

### **2.3.3 Vorbereitung**

Die Gewebeschnitte wurden zur Deparaffinisierung für 3 x 10 Minuten in Xylol gestellt. Danach folgten 2 x 5 Minuten in 100% Ethanol. Anschließend ließen wir die Gewebeproben an der Luft trocknen.

### **2.3.4 Permeabilisierung des Gewebes**

Die Gewebepерmeabilisierung ermöglicht den Zugang der Reaktionskomponenten zu den zellulären Nukleinsäuren und stellt damit einen wichtigen Schritt dar. Eine zu starke Permeabilisierung führt zur Aufhebung der Zellmorphologie; wird das Gewebe zu wenig vorbehandelt, kann die PCR nicht stattfinden. Zur Permeabilisierung der Gewebeschnitte



stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Da es kein allgemeingültiges Verfahren gibt, konnte nur durch empirische Versuche die optimale Methode für die eigenen Schnittpräparate gefunden werden. Für unsere Arbeit wurden folgende fünf Möglichkeiten ausgetestet:

1. Die Gewebeschnitte wurden mit der Protease Pepsin in einer Konzentration von 0,01% in 0,1N Salzsäure (HCl) bei 37°C auf einer Wärmeplatte in einer Verdaureihe mit Zeiten von 2 bis 10 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch wiederholtes Waschen in Phosphat Buffered Saline (PBS) bei Raumtemperatur beendet.
2. Die Gewebeschnitte wurden mit Citratpuffer in der Mikrowelle zwischen 15-35 Minuten auf voller Stufe aufgeköcht; anschließend wurde ein Teil der Gewebeschnitte auch nach der Energiezufuhr noch für weitere 15-25 Minuten inkubiert. Zur Beendigung dieses Schrittes wurden die Gewebeschnitte zweimal für 5 Minuten in Aqua dest. gewaschen.
3. Die Gewebeschnitte wurden mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Puffer (150µM, pH 8,0) in der Mikrowelle 10 Sekunden aufgeköcht und 15 Minuten ohne weitere Energiezufuhr inkubiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Anschließend wurden die Gewebeproben für einige Minuten bei Raumtemperatur in PBS gewaschen und danach in reines Aqua dest. gestellt.
4. Die Gewebeschnitte wurden wie in Punkt 3 beschrieben vorbereitet. Anschließend wurde ein Protease-Andau mit 0,005% Pepsin in 0,01 N HCl durchgeführt (wie in Punkt 1 beschrieben). Dann wurden die Gewebeschnitte für 2 x 2 Minuten mit Aqua dest. gespült.
5. Die Gewebeschnitte wurden für 20 Minuten mit 0,1N HCl bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde ein enzymatischer Andau mit Proteinase K durchgeführt (Konzentration 0,05 und 0,1 µg/ml; 200 µl/Schnitt). Die Gewebeschnitte wurden für 10 Minuten auf einer Wärmeplatte bei 37°C inkubiert und in kaltem PBS gestoppt.

Nach jeder Vorbehandlung erfolgte eine Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit anschließender Lufttrocknung.

Nach Austestung aller Möglichkeiten der Permeabilisierung entschieden wir uns für die unter Punkt 4 aufgeführte Variante, weil mit dieser Methode die meisten Gewebeblöcke reaktiv waren.

### 2.3.5 Optimierung der Reaktionsparameter

Die verschiedenen Reaktionsparameter wurden einzeln anhand eines geeigneten Gewebeblocks überprüft. Nach Optimierung der Gewebepерmeabilisierung wurde der Einfluß der Kationenkonzentration, der Primerkonzentrationen und des PCR-Profiles auf die Effektivität der IS RT-PCR untersucht. Als Ziel-RNA diente die ubiquitär exprimierte RNA von Beta-Aktin. Dabei sollte ein starkes Farbsignal in allen Zellen nachweisbar sein.

- **Die Kationenkonzentration**

Zweiwertige Kationen wie Magnesiumionen ( $Mg^{2+}$ ) und Manganionen ( $Mn^{2+}$ ) sind wichtige Kofaktoren von nucleinsäurebindenden Enzymen. Eine optimale Ionenkonzentration ist für die Taq-Polymerase beschrieben und liegt bei ca. 1,2 – 2,5 mM Gesamt-[ $Mg^{2+}$ ]. Bei Konzentrationen von über 6 mM verliert die Taq-Polymerase ihre Aktivität. (Lawyer et al., 1989; Linz et al., 1990)

Für die rTth-Polymerase liegen die Mangankonzentrationen zwischen 1-4 mM. Zur Optimierung unserer Versuche testeten wir Manganionenkonzentrationen von 1,0-4,0 mM.

- **Primerwahl und Primerkonzentration**

Im Allgemeinen werden Primer mit einer Größe von etwa 20-30 Basenpaaren (bp) verwendet. Bei zu großer Moleküllänge nimmt die Hybridisierungszeit zu; wenn der eingesetzte Primer zu klein ist, ist die erwünschte Spezifität nicht mehr gegeben.

Die Wahl der Primerkonzentration gilt als ein weiterer kritischer Punkt bei der PCR (Linz und Degenhardt, 1990). Wir testeten Konzentrationen von 0,1 bis 1,0  $\mu$ M. Die verwendeten Primer-Sequenzen wurden bereits in Tabelle 3 beschrieben.

- **Enzym und Reaktionsgemisch**

Die rTth-Polymerase ist eine rekombinante, ursprünglich aus *Thermus thermophilus* isolierte, thermostabile DNA-Polymerase, die im Gegensatz zur Taq-Polymerase eine hohe Reverse Transkriptase-Aktivität aufweist (Myers and Gelfand, 1991). Daher ist dieses Enzym auch für das Umschreiben von RNA in cDNA geeignet. Aufgrund der Enzymaktivität bei hohen Temperaturen (68°-75° C) werden fast alle Sekundärstrukturen der RNA aufgelöst, welche eine erfolgreiche cDNA-Synthese verhindern können. Weiterhin kann durch die Verwendung eines Bicine-haltigen Puffers sowohl die Reverse Transkription als auch die PCR in einem Reaktionsansatz durchgeführt werden.

Für die Polymerase Kettenreaktion wurde das EZ *rTth* RNA PCR Kit von Perkin Elmer verwendet. Das Reaktionsgemisch für einen Gewebeschnitt (insgesamt 50 µl) bestand aus 1x konzentriertem EZ-Puffer, 3,0 mM Mn(OAc)<sub>2</sub>, 0,3 mM von allen vier dNTP, 0,1 U/µl rTth-Polymerase und 0,4 µM von jedem Oligonukleotidprimer.

Das Gemisch wurde mit Aqua dest. auf insgesamt 50 µl aufgefüllt und mit Hilfe eines Assembly Tools und eines Klammermechanismus auf die Gewebeschnitte aufgebracht. Auf diese Weise wurde die Reaktionskammer hermetisch abgeschlossen.

In nachfolgender Tabelle 4 ist der Reaktionsansatz für die IS RT-PCR mit Ausgangs- und Endkonzentration sowie das Volumen der einzelnen Chemikalien pro Gewebeschnitt zusammengestellt:

<b>Tabelle 4 : Reaktionsansatz der IS RT-PCR für einen Gewebeschnitt</b>			
	Ausgangskonzentration	Volumen	Endkonzentration
EZ-Puffer	5 x konz.	10 µl	1 x konz.
Mn(OAc) <sub>2</sub>	25 mM	6 µl	3 mM
dNTP- Mix	dATP	6 µl	0,3 mM
	dGTP		0,3 mM
	dTTP		0,3 mM
	dCTP		0,3 mM
rTth-Polymerase	2,5 U/µl	2µl	0,1 U/µl
Primer 1	20 µM	1 µl	0,4 µM
Primer 2	20 µM	1 µl	0,4 µM
Aqua dest.		24 µl	
Total:		50 µl	

- **Zykluszahl, Temperaturen und Reaktionszeiten (PCR-Profil)**

Es wurden verschiedene Anzahlen von PCR-Zyklen getestet (10-40). Für unser endgültiges Protokoll entschieden wir uns für eine Anzahl von 30 Zyklen, da die Gesamtfehlerzahl bei darüber liegenden Zykluszahlen erwartungsgemäß deutlich ansteigt (Mullis et al., 1986).

Die Temperaturen und Reaktionszeiten wählten wir in Anlehnung an PCR-Protokolle von Anderson et al., 1997; Peters et al., 1997 und Krams et al., 2000.

Als PCR-Gerät wurde das Gene Amp In Situ PCR System 1000 verwendet. Die Reaktionsbedingungen sind in nachfolgender Tabelle 5 dargestellt:

<b>Tabelle 5: Reaktionsbedingungen der IS RT-PCR</b>		
Reverse Transkription	65°C	50 Minuten
Denaturierung	94°C	2 Minuten
<b>Es folgten 30 PCR-Zyklen:</b>		
Denaturierung	94°C	45 Sekunden
Annealing/ Elongation	65°C	2 Minuten
<b>nach 30 Zyklen einmalig:</b>		
Elongation	70°C	7 Minuten

Im Anschluß wurden die Gewebeschnitte auf 4°C abgekühlt.

Nach Beendigung der IS RT-PCR wurden die Gewebeschnitte für 5 Minuten in Aqua dest. und danach für mindestens 10 Minuten in 100% Ethanol gestellt.

## 2.4 Primed In Situ Labeling (PRINS)

(verwendete Chemikalien und Geräte s. Abschnitt 2.6)

Der PCR-Amplifizierung folgte das Primed In Situ Labeling (PRINS). Hierfür wurde ein spezifischer Detektionsprimer, ein so genannter „innerer“ Primer verwendet. Die Primer-Sequenz ist in Tabelle 3 beschrieben.

Mit Hilfe dieses Oligonucleotidprimers werden in einem einzelnen Polymerase-Zyklus Digoxigenin (DIG)-markierte dNTP (DIG-11-dUTP) in eine Kopie der Amplikons eingebaut. Nach Ablauf der PRINS-Reaktion können die eingebauten DIG-dNTP mit einem monoklonalen Antikörper gegen Digoxigenin, der mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist, und einer anschließenden Farbreaktion sichtbar gemacht werden.

Die für die PRINS verwendete Polymerase (Stoffelfragment) besitzt keine Endo- oder Exonukleaseaktivität. Diese Eigenschaft verhindert den unspezifischen Einbau von markierten dNTP.

Das Reaktionsgemisch für einen Gewebeschnitt bestand aus:

1 x konzentriertem Stoffpuffer, 0,8 mM DIG-labeling-Mix, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, je 2 µM Primer (PAX3 und FOXO1-B), 0,05 U/µl Stoffelfragment, sowie 2% Formamid. Das Gemisch wurde für jeden Gewebeschnitt mit Aqua dest. auf insgesamt 50 µl aufgefüllt.

Eine Übersicht des Reaktionsansatzes mit Ausgangs- und Endkonzentration sowie das Volumen der einzelnen Chemikalien pro Gewebeschnitt ist in Tabelle 6 zusammengefasst:

<b>Tabelle 6: Reaktionsansatz der PRINS-Reaktion für einen Gewebeschnitt</b>			
	Ausgangskonzentration	Volumen	Endkonzentration
Stoffpuffer	10 x konz.	5 µl	1 x konz.
DIG-labeling-Mix	20 mM	2 µl	0,8 mM
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	5 µl	2,5 mM
Primer 1	0,1 mM	1 µl	2µM
Primer 2	0,1 mM	1 µl	2µM
Stoffelfragment	10 U/µl	0,25 µl	0,05 U/µl
Formamid	100 %	1 µl	2%
Aqua dest.		34,75 µl	
Total:		50 µl	

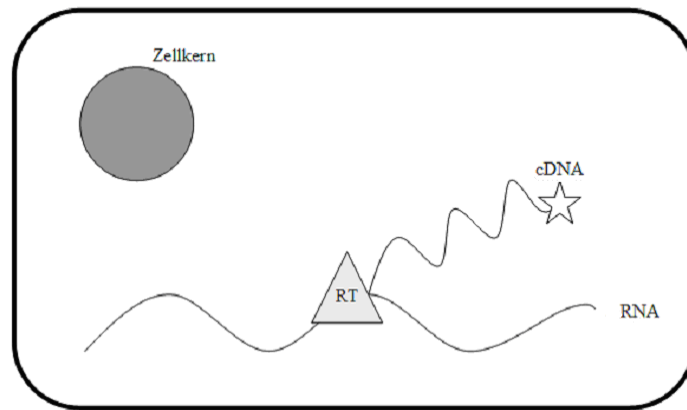
Die PRINS-Reaktion wurde ebenfalls auf dem Gene Amp In Situ PCR System 1000 durchgeführt.

Die Schnitte wurden zunächst auf 80°C erhitzt („hot start“). Daran schloss sich ein einziger Reaktionsschritt an. Das Temperaturprofil der PRINS-Reaktion ist in nachfolgender Tabelle 7 dargestellt:

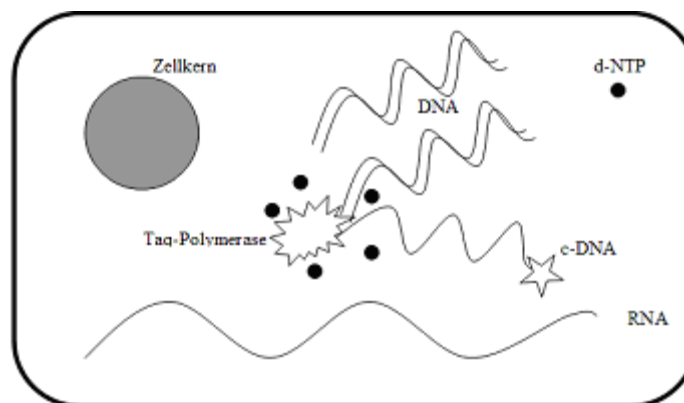
<b>Tabelle 7: Temperaturprofil der PRINS-Reaktion</b>		
„hot start“	Erhitzen bis 80°C	
Denaturierung	95°C	2 Minuten
Hybridisierung	70°C	1 Minute

Nach der PRINS-Reaktion wurden die Gewebeschnitte sofort für zweimal 5 Minuten in 2x konzentriertes SSC bei 50°C gestellt.

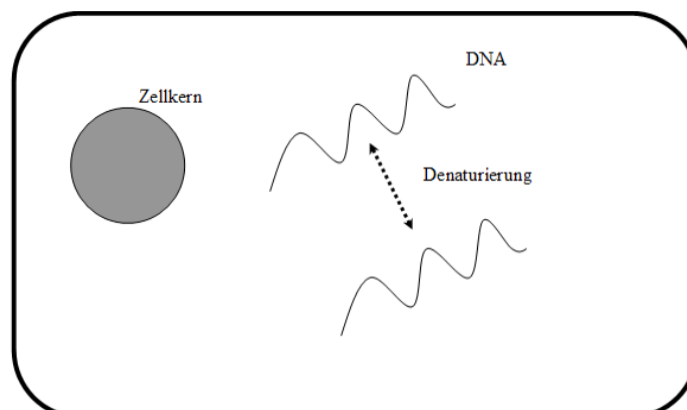
Die wesentlichen Reaktionsschritte sind in nachfolgenden Abbildungen 2 a-e graphisch dargestellt:



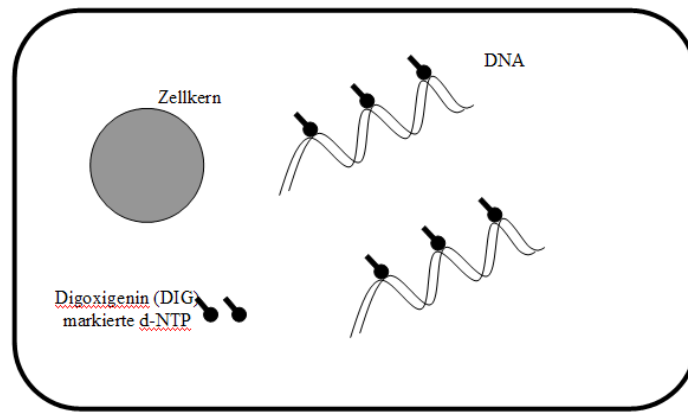
**Abb. 2a: Reverse Transkription:** Mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) wird RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben



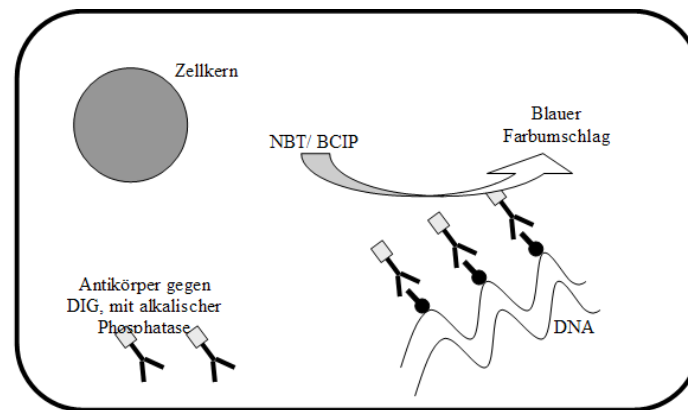
**Abb. 2b: In Situ Polymerase Kettenreaktion:** Kopieren der cDNA mittels einer thermostabilen Polymerase (Taq-Polymerase)



**Abb. 2c: PRINS-Reaktion 1. Schritt :** Denaturierung des DNA-Doppelstrangs bei 95°C



**Abb. 2d: PRINS-Reaktion 2. Schritt** : Einbau von Digoxigenin markierten d-NTP



**Abb. 2e: PRINS 3. Schritt und 4. Schritt**: Inkubation mit Antikörpern gegen Digoxigenin (gekoppelt mit alkalischer Phosphatase) und anschließender Farbreaktion mit NBT/BCIP

## 2.5 Immunhistochemische Detektion

(verwendete Chemikalien und Geräte s. Abschnitt 2.6)

Die Gewebeschnitte wurden in eine Küvette mit DIG-Waschpuffer überführt und bei Raumtemperatur einige Minuten inkubiert. Danach wurden sie zweimal für 3 Minuten mit DIG-Waschpuffer gewaschen und anschließend mit Blocking-Puffer für 15 Minuten inkubiert.

Die Antikörperinkubation erfolgte mit Anti-DIG-F(ab)<sub>2</sub>-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase, jeweils 200 µl pro Gewebeschnitt (Verdünnung 1:500). Die Gewebeschnitte wurden dabei für 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nicht gebundene Antikörper wurden dann zweimal für jeweils 5 Minuten mit DIG-Waschpuffer abgewaschen. Anschließend wurden die Gewebeschnitte in eine Küvette mit Detektionspuffer für 5 Minuten bei Raumtemperatur gestellt.

Die Farbreaktion wurde mit NBT/BCIP, 200µl pro Gewebeschnitt, durchgeführt. Dafür wurden die Gewebeschnitte in eine dunkle Kammer gelegt. Die Farbreaktion wurde nach lichtmikroskopischer Kontrolle mit Stop-Puffer beendet.



## 2.6 Materialien, Lösungen und Hersteller

- **Chemikalien**

Reagenz (Freiname, Handelsname)	Hersteller
Ampli Taq DNA Polymerase (Ampli Taq Gold)	Perkin Elmer, Inc., Branchburg, New Jersey, USA
Antikörper gegen Digoxigenin	Roche Molecular Biochemicals, Grenzach, Deutschland
Auftragspuffer (6x Mass Loading Dye Solution)	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Aqua dest.	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Citratpuffer (10 mM Natriumcitrat, pH 6,0)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Chloroform z.A.	E.Merck, Darmstadt, Deutschland
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Denaturierungslösung (Southern Blot) (0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DIG-Wash and Block Buffer Set: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Wasch Puffer (10x): Maleinsäure-Puffer (10x) mit 3% Tween®20(v/v)</li> <li>• Maleinsäure-Puffer (10x)</li> <li>• Blockierungslösung (10x): 10% Blockreagenz (w/v) in Maleinsäurepuffer</li> <li>• Detektionspuffer (10x): 1M Tris-HCl, pH 9,5, 1M NaCl</li> </ul>	Roche Molecular Biochemicals, Grenzach, Deutschland
DIG-Easy Hyb (Formamid-haltiger Puffer)	Roche Molecular Biochemicals, Grenzach, Deutschland
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Ethanol, 99,6%	Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe, Deutschland

Reagenz (Freiname, Handelsname)	Hersteller
Formamid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
GeneAmp® EZ rTth RNA PCR Kit <ul style="list-style-type: none"> <li>• rTth DNA Polymerase</li> <li>• 5x EZ Buffer (Bicine-haltiger Puffer)</li> <li>• 25 mM Mn(OAc)<sub>2</sub></li> <li>• dATP; dCTP; dGTP; dTTP</li> </ul>	Perkin Elmer, Inc., Branchburg, New Jersey, USA
GeneAmp® PCR Buffer (10x)	Perkin Elmer, Inc., Branchburg, New Jersey, USA
HCl (Salzsäure)	E.Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropylalkohol	ICN Biomedicals, Inc., Aurora, Ohio, USA
Längenstandard, Mass Ruler™	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
MgCl <sub>2</sub> -Solution	Perkin Elmer, Inc., Branchburg, New Jersey, USA
MuLV Reverse Transcriptase (Gene Amp® RNA PCR)	Perkin Elmer, Inc., Branchburg, New Jersey, USA
NBT/BCIP (Nitro Blue Tetrazoliumchlorid / 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat)	Roche Molecular Biochemicals, Grenzach, Deutschland
Neutralisierungslösung (Southern Blot) (0,5 N Tris, pH 7,5, 3 M NaCl)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Nu Sieve® 3:1 agarose	FMC, Bio Products, Rockland, Maine, USA
Nylonmembran	Roche Molecular Biochemicals, Grenzach, Deutschland
PBS (Phosphat buffered saline)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
PCR Nucleotid Mix (Nucleotide)	Roche Molecular Biochemicals, Grenzach, Deutschland
PCR-DIG-labeling-Mix <ul style="list-style-type: none"> <li>• DIG-11-dUTP</li> </ul>	Roche Molecular Biochemicals, Grenzach, Deutschland
Pepsin	Roche Molecular Biochemicals, Grenzach, Deutschland

<b>Reagenz (Freiname, Handelsname)</b>	<b>Hersteller</b>
Primer	Eurogenetec, Seraing, Belgien
Proteinase K	Roche Molecular Biochemicals, Grenzach, Deutschland
Random Hexamers	Promega Corporation, Madison, USA
RNase Zap®	Ambion, Austin, Texas, USA
Stoffel Fragment	Perkin Elmer, Inc., Branchburg, New Jersey, USA
Stoffelpuffer (10xStoffel Buffer)	Perkin Elmer, Inc., Branchburg, New Jersey, USA
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	Roche Molecular Biochemicals, Grenzach, Deutschland
SSC (Standard Saline Citrate)-Puffer (1xSSC: 150 mM Na-Citrat, 100 mM NaCl)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Stop-Puffer (0,1M NaCl, 0,1M Tris HCl, pH 7,4)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Sybr®Green I Nucleic Acid Gel Stain	Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, USA
Taq DNA-Polymerase	Roche Molecular Biochemicals, Grenzach, Deutschland
TAE (Tris-Acetat-EDTA)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Tris-HCl	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Tris (Trihydroxymethylaminomethan)	E.Merck, Darmstadt, Deutschland
Trizol™ Reagent	Gibco BRL, Life Technologies, Inc., Eggenstein, Deutschland
Waschlösung 2x : 2xSSC, 0,1% SDS	siehe SSC und SDS
Xylol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

- **Arbeitsgeräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Assembly Tool	Perkin Elmer, Langen, Deutschland
Elektrophoresekammer (H4)	Life Technologies, Inc., Rockville, Maryland, USA
Handschuhe	Ansell GmbH, München, Deutschland
Lichtmikroskop	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Mikrotom	Jung AG, Heidelberg, Deutschland
Mikrowelle R-3A55, 900 W	Sharp Electronics GmbH, Hamburg, Deutschland
PCR-Gerät: Gene Amp In Situ PCR System 1000	Perkin Elmer, Langen, Deutschland
PCR-Tubes 0,5ml	Biozym Diagnostik GmbH, Hess, Oldendorf, Deutschland
Pipetten Biozym Pre Cision	Biozym Diagnostik GmbH, Hess, Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen	Biozym Diagnostik GmbH, Hess, Oldendorf, Deutschland
PRINS-Gerät/ PCR Cyclers, Hybaid Omnislide	MWG Biotech, Gesellschaft für angewandte Biotechnologie, Ebersberg, Deutschland
Ultra Turrax T8 IKA	Labortechnik, Staufen, Deutschland
Vortex Genie 2 <sup>TM</sup>	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wärmeplatte Typ ST 893	Vogel, Gießen, Deutschland
Wasserbad	Labortechnik Köttermann GmbH & Co. KG, Uetze-Hönigsen, Deutschland
Zentrifuge 5415C Table Top	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 RT-PCR

Die RNA-Isolierung aus Paraffinschnitten erbrachte zwischen 1 und 5 µg Total-RNA. Nach enzymatischer Degradation genomischer DNA wurde jeweils 1 µg RNA in cDNA umgeschrieben und auf ausreichende Qualität überprüft. Dazu diente die Amplifikation eines sogenannten Housekeeping-Gens, in diesem Fall die RNA von Beta-Aktin. Bei gelungener Amplifikation war ein PCR-Fragment von 90 bp Länge zu erwarten.

Die Amplifikation der Fusionstranskripte wurde mittels einer geschachtelten PCR durchgeführt. Dabei wurde 1 µl der ersten PCR in einer zweiten PCR eingesetzt. Die erwarteten Amplifikate zeigten eine Länge von 160 Basenpaaren (nach der ersten PCR) und von 130 Basenpaaren (nach der zweiten PCR). Nach erfolgtem Transfer der Amplifikate auf eine Nylonmembran und Hybridisierung mit einer FOXO1-spezifischen Sonde konnte die Identität der Amplifikate gesichert werden.

Es wurden zwei Negativkontrollen durchgeführt:

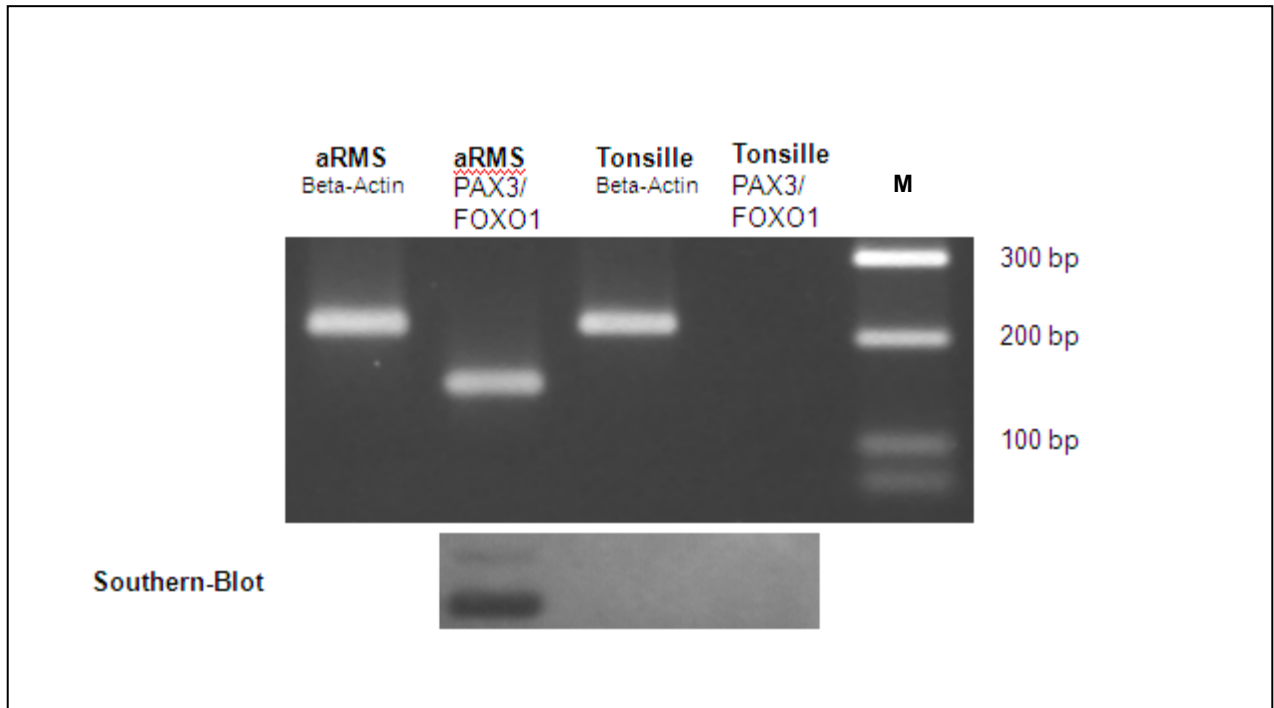
1. keine Reverse Transkription der RNA

und

2. Einsatz von RNA aus Normalgewebe (Tonsille) sowie von nicht-aRMS-Tumoren (eRMS, Ewing's Sarkome).

Beide Negativkontrollen zeigten niemals eine positive Reaktion.

Von den untersuchten 23 Gewebeproben wurden in 19 Fällen eine positive Reaktion auf Beta-Aktin RNA erzielt, vier Fälle zeigten keine ausreichend intakte RNA und waren somit nicht auswertbar. Von diesen 19 Fällen zeigten insgesamt neun Gewebeproben eine positive Reaktion auf PAX3/FOXO1 Transkripte.



### Abbildung 3: Gelelektrophorese und Southern Blot Hybridisierung

Gelelektrophoretische Darstellung der mit der RT-PCR amplifizierten Teilfragmente der PAX3/FOXO1-Fusionstranskripte (oben) sowie Spezifitätstestung des RT-PCR Produktes mit Hilfe der Southern Blot Hybridisierung (unten).

Spur M = Molekulargewichtswiderstand

## 3.2 IS RT-PCR

Beim Nachweis von Beta-Aktin RNA zeigte sich in fast allen Zellen eine starke zytoplasmatische Farbreaktion während der Zellkern optisch leer blieb. Dieses Reaktionsmuster war bei allen Tumoren und Normalgeweben gleich. Allerdings konnte man sowohl zwischen den einzelnen Zellen als auch zwischen den verschiedenen Gewebeblöcken eine unterschiedlich starke Anfärbung erkennen. Bei einigen Gewebeschnitten zeigte sich eine diffuse bläuliche Hintergrundfärbung, die auch in den Negativkontrollen und trotz Weglassen des Antikörpers weiter bestand.

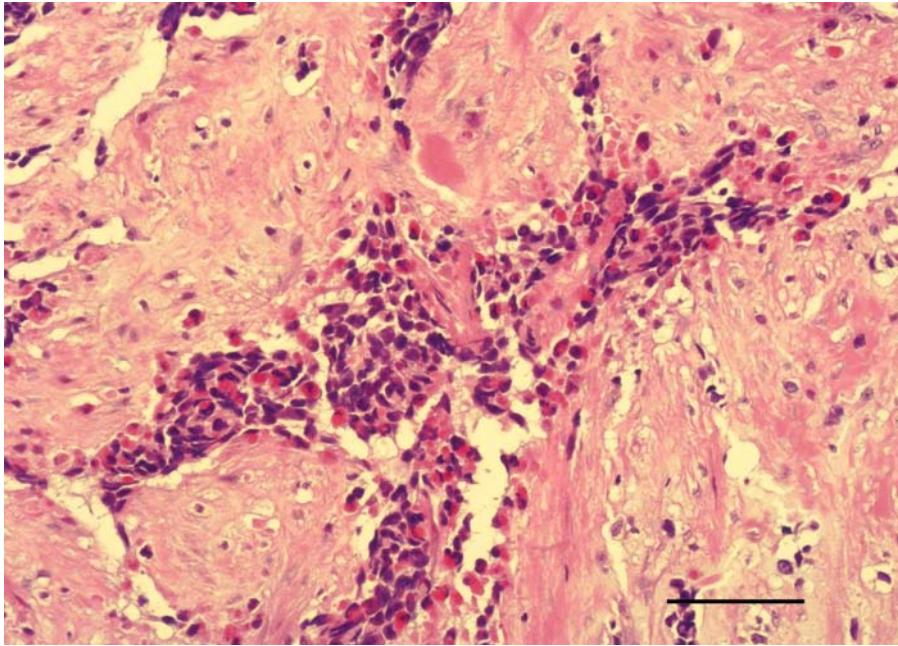
### 3.2.1 Gewebepерmeabilisierung

Für die Gewebepерmeabilisierung wurden verschiedene Protokolle getestet. Diese orientierten sich an bereits bekannten Protokollen (PCR-Protokolle von Anderson et al., 1997; Peters et al., 1997 und Krams et al., 2000).

Insgesamt konnten sich mit allen Protokollen auswertbare Ergebnisse erzielen lassen. In Hinblick auf den Routineeinsatz zeigte sich jedoch, dass die Kombination einer Mikrowellenbehandlung gefolgt von einer milden Proteinolyse am einfachsten zu handhaben war. Das bezieht sich auf den Anteil der auswertbaren Gewebeblöcke als auch auf das Ausmaß der erforderlichen Anpassung der Proteinolyse, die für einige Gewebeblöcke nötig waren. Dabei wurde nur die Dauer der Proteinolyse variiert, während die Mikrowelleninkubation konstant durchgeführt wurde.

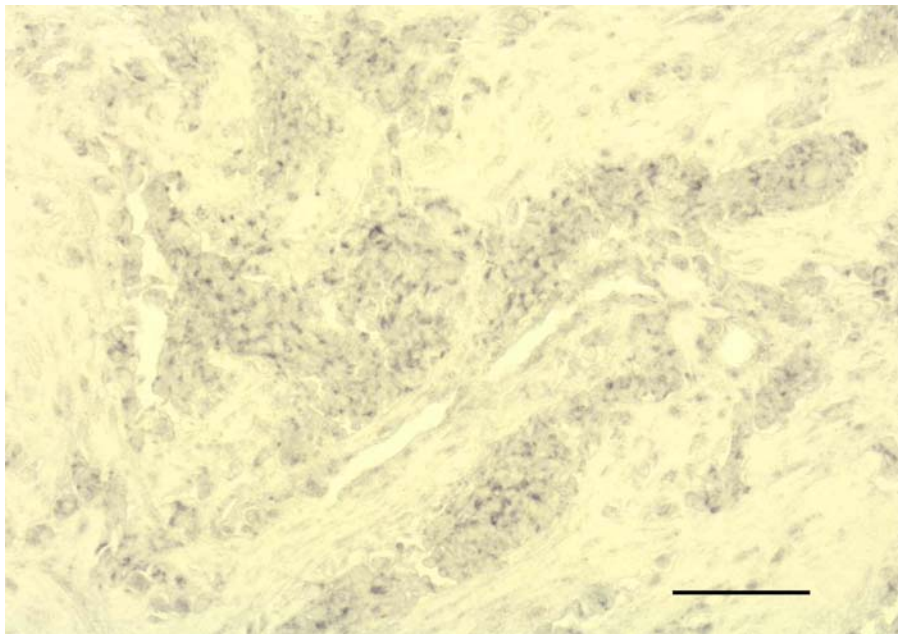
Eine zu „kurze“ Vorbehandlung führte zu keiner oder nur zu einer schwachen Farbreaktion. Mit zunehmender Proteinolyse konnte man dann auch eine zunehmend stärkere Farbreaktion beobachten. Mit noch stärkerer Proteinolyse erreichte man bis zu einem gewissen Punkt auch stärkere Farbsignale, die zellulären Strukturen wurden aber immer mehr zerstört und die morphologische Beurteilung des Gewebes wurde stark erschwert.

Die nachfolgenden Abbildung 4 a-c zeigen die IS RT-PCR mit unterschiedlich starker Gewebepерmeabilisierung als sogenannte „Verdaureihe“:



**Abbildung 4 a)**

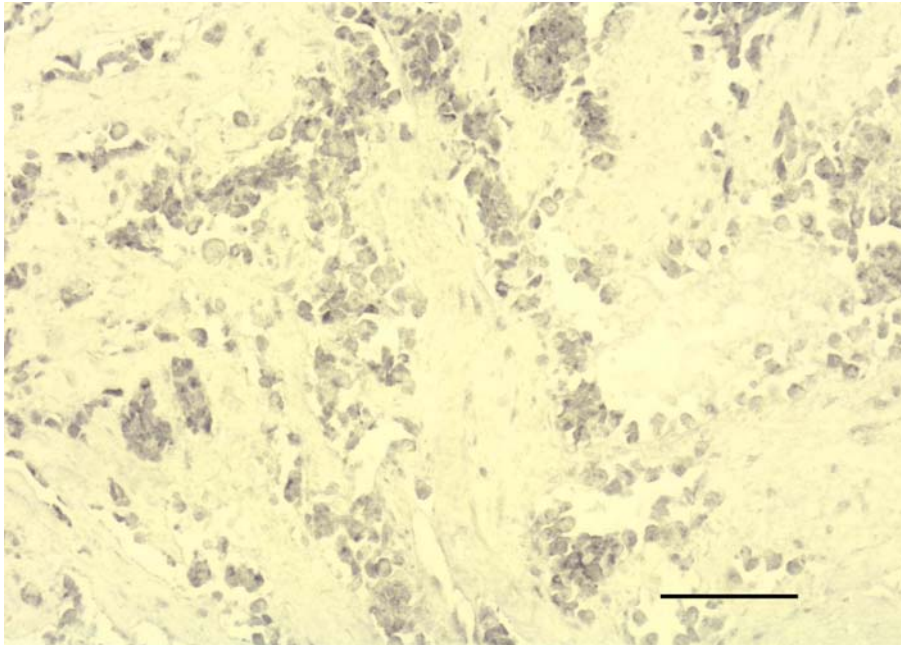
HE Übersichtsfärbung, Balkenlänge entspricht 50 $\mu$ m



**Abbildung 4 b)**

Mikrowellenvorbehandlung und **2 Min.** Proteinolyse mit 0,005 % Pepsin in 0,01 N, Balkenlänge entspricht 50 $\mu$ m



**Abbildung 4 c)**

Mikrowellenvorbehandlung und **10 Min.** Proteinolyse mit 0,005 % Pepsin in 0,01 N HCl, Balkenlänge entspricht 50 $\mu$ m

Während nach 2 min. Proteinolyse das Reaktionsprodukt auf das Zytoplasma beschränkt ist, lässt sich nach 10 min. Proteinolyse nur eine diffuse Anfärbung der ganzen Zelle erkennen.

### 3.2.2 Optimierung der Reaktionsparameter der IS RT-PCR

- **Manganionenkonzentration**

Zur Feststellung der optimalen Manganionenkonzentration wurden Gewebeschnitte mit verschiedenen Konzentrationen von  $\text{Mn}(\text{OAc})_2$  (von 1,0 mM bis zu 4,0 mM) getestet. Dabei erwies sich eine Manganionenkonzentration von 2,5 -3,0 mM als optimal (siehe Tabelle 8):

<b>Tabelle 8: Abhängigkeit der Reaktionsstärke von der Manganionenkonzentration im Reaktionsgemisch</b>							
Mn(OAc) <sub>2</sub> / mM	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0
Reaktionsstärke	○	(+)	+	+++	+++	+	(+)
○ = keine Reaktion / (+) = sehr geringe Reaktion/ + = geringe Reaktion/ +++ = stärkste Reaktion							

- **Primerwahl und Primerkonzentration**

In der IS RT-PCR wurden Primerkonzentrationen von 0,1-1,0  $\mu\text{M}$  getestet. In dem getesteten Bereich zeigten sich keine größeren Unterschiede bezüglich der erreichten Signalstärke. Wir wählten für alle weiteren Versuche eine Konzentration von 0,2  $\mu\text{M}$ .

- **Zyklenzahl**

Um die Anzahl der Reaktionszyklen zu bestimmen, bei der einerseits eine genügend große Menge des nachweisbaren Amplifikationsproduktes entsteht und andererseits die Bildung unspezifischer Nebenprodukte am geringsten gehalten wird, wurden mehrere empirische Versuche mit unterschiedlichen Zyklenzahlen durchgeführt. In späteren Versuchen arbeiteten wir dann mit einer Zyklenzahl von 30, da wir bei 40 Zyklen eine zu große Menge an Reaktionsartefakten und unspezifischen Nebenprodukten beobachteten (siehe Tabelle 9):

<b>Tabelle 9: Abhängigkeit des Färbeergebnisses von der Zyklenzahl</b>				
Zyklenzahl	10	20	30	40
Ergebnis	○	+	+++	+++
○ = keine spezifische Anfärbung/ + = geringe spezifische Anfärbung/ +++ = starke spezifische Anfärbung				

### 3.3 Primed In Situ Labeling (PRINS)

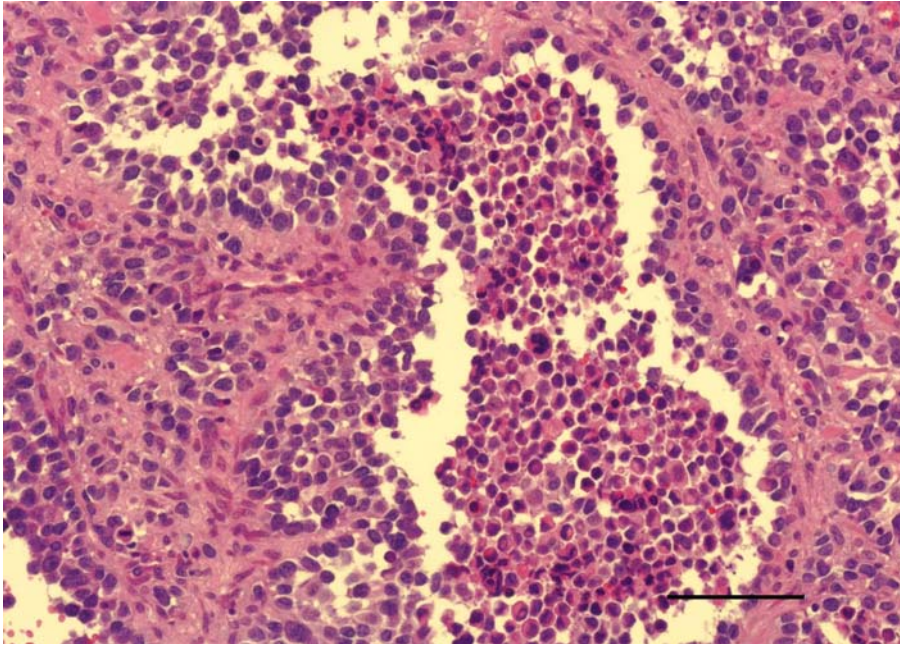
Die PRINS-Reaktion wurde wie unter 2.4 beschrieben durchgeführt. Allerdings zeigte sich in anfänglichen Experimenten, dass durch eine zu lange Denaturierung eine unspezifische nukleäre Farbreaktion auftrat.

- **Enzymkonzentration**

In der PRINS-Reaktion wurde das Stoffel-Fragment der Taq-Polymerase in einer Konzentration von 0,05 U/ $\mu$ l verwendet. Mit höheren Enzymkonzentrationen zeigte sich keine stärkere Reaktion.

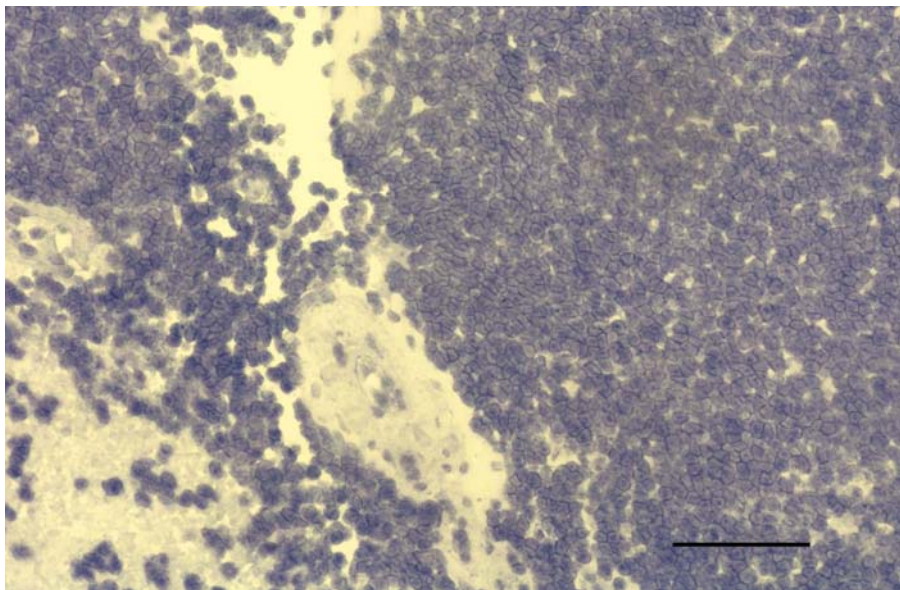
### 3.4 Ergebnisse der IS RT-PCR an kindlichen Tumoren:

Von den 23 untersuchten aRMS zeigten 18 eine positive Reaktion mit Primern gegen Beta-Aktin. Dagegen konnte mit der konventionellen RT-PCR in 19 Fällen verwertbare Beta-Aktin RNA gefunden werden. Von diesen konnten Fusionstranskripte der PAX3/FOXO1 Translokation in acht Tumoren nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich auch hier eine deutliche zytoplasmatische Farbreaktion, während der Zellkern optisch leer blieb. Allerdings waren nur die Tumorzellen angefärbt. Bindegewebszellen als auch Blutgefäße zeigten keine Reaktion. Alle Negativkontrollen zeigten keine oder nur eine geringe unspezifische Hintergrundfärbung. Nicht-aRMS-Tumoren besaßen amplifizierbare Beta-Aktin-RNA; mit Primern gegen das PAX3/FOXO1 Fusionstranskript ließ sich jedoch keine Reaktivität erzielen.



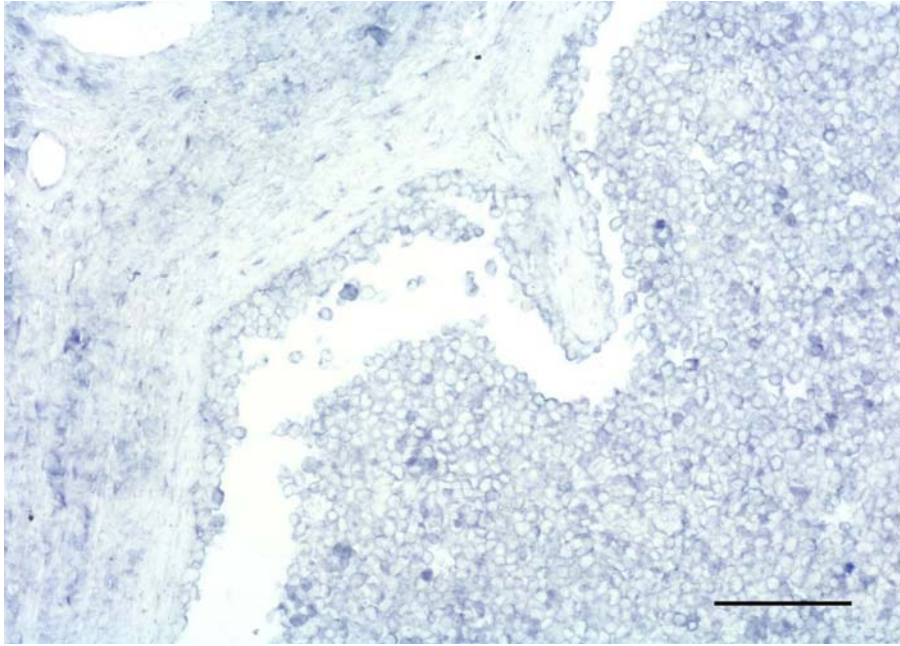
**Abbildung 5 a)**

Darstellung eines alveolären Rhabdomyosarkoms, Hämatoxylin-Eosin, Balkenlänge entspricht 50µm.

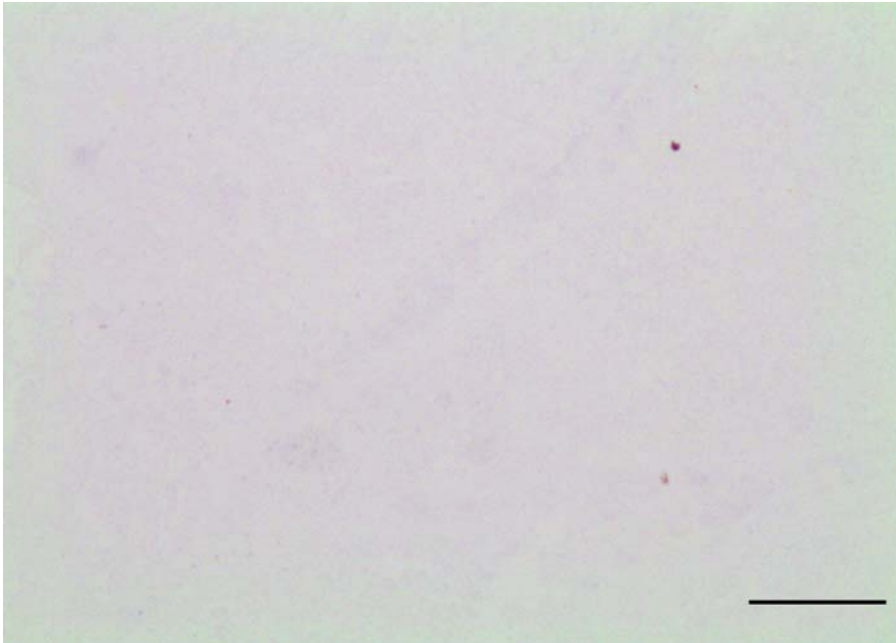


**Abbildung 5 b)**

Darstellung von Beta-Aktin RNA mit der IS RT-PCR an Tumorgewebe eines alveolären Rhabdomyosarkoms. Fast alle Zellen zeigen ein zytoplasmatisches Reaktionsprodukt (dunkelblau), während der Zellkern nur eine schwache Anfärbung erkennen lässt (sog. „Positivkontrolle“); Farbstoff Nitroblautetrazolium, Balkenlänge entspricht 50µm.

**Abbildung 5 c)**

Darstellung von PAX3/FOXO1-RNA mit der IS RT-PCR an Tumorgewebe eines alveolären Rhabdomyosarkoms. Fast alle Tumorzellen zeigen ein zytoplasmatisches Reaktionsprodukt (dunkelblau), während der Zellkern nur eine schwache Anfärbung erkennen lässt. Stromale Zellen lassen keine eindeutige Farbreaktion erkennen. Farbstoff Nitroblautetrazolium, Balkenlänge entspricht 50µm.

**Abbildung 5 d)**

IS RT-PCR ohne Oligonukleotidprimer (sog. „Negativkontrolle“) an Tumorgewebe eines alveolären Rhabdomyosarkoms. Es ist nur eine schwache Hintergrundfärbung zu erkennen. Farbstoff Nitroblautetrazolium, Balkenlänge entspricht 100µm.

Tabelle 10: Ergebnis-Übersicht über alle 23 Tumorfälle									
Nr.	KT-Nr.	Geschlecht	Alter bei Diagnose	Histologische Diagnose	Lokalisation	In Situ RT-PCR		In Vitro RT-PCR	
						Beta-Aktin	PAX3/FOXO1	Beta-Aktin	PAX3/FOXO1
1	29/99 (165/98)	männlich	14 Jahre	aRMS	kleines Becken	+	+	+	+
2	439/97	männlich	13 Jahre	aRMS, solider Subtyp	rechter Oberschenkel	+	-	+	-
3	539/97	männlich	8 Jahre	aRMS	Stirnhaut	+	+	+	+
4	944/97 (548/97)	weiblich	21 Monate	Embryonales RMS, wenig differenziert	Rechte Halsseite	+	+	+	+
5	560/97	weiblich	2 Jahre, 11 Monate	aRMS	linke Flanke, paravertebral	+	+	+	+
6	659/97	weiblich	16 Jahre	aRMS	LK-Metastase (Lokalisation ohne Angabe)	+	+	+	+
7	663/96 (323/96)	männlich	2 Jahre, 3 Monate	aRMS	Metastase, supraclavicular (Primärtumor in Nasenregion)	-	-	-	-
8	141/96 (925/94) (910/94)	männlich	17 Jahre	aRMS	Perianaler TU	-	-	-	-

Nr.	KT-Nr.	Geschlecht	Alter bei Diagnose	Histologische Diagnose	Lokalisation	In Situ RT-PCR		In Vitro RT-PCR	
						Beta-Aktin	PAX3/FOXO1	Beta-Aktin	PAX3/FOXO1
9	870/96 (451/96)	männlich	6 Jahre	aRMS	Proximaler Unterarm rechts	+	+	+	+
10	564/96	männlich	5 Jahre	aRMS	Thorakale Biopsie	+	-	+	-
11	1249/95 (521/94)	weiblich	7 Jahre	aRMS (mit eRMS-Anteil)	Zunge	-	-	-	-
12	404/96 (102/96) (1273/95) (1267/95)	männlich	16 Jahre	aRMS	Tumor im kleinen Becken (LK-Metastase; KM-Stanze)	-	-	-	-
13	1258/95	weiblich	5 Jahre	aRMS	Weichteile rechter Fuß	+	-	+	-
14	697/95	männlich	17 Jahre	aRMS	Orbita	+	-	+	-
15	171/95 (940/94)	weiblich	12 Monate	aRMS	Rechte Wade	+	-	+	-
16	1113/95	männlich	11 Monate	aRMS	Linker Oberschenkel	+	+	+	+
17	1203/95	weiblich	14 Jahre	aRMS	Ulnare Handkante links	-	-	+	+



Nr.	KT-Nr.	Geschlecht	Alter bei Diagnose	Histologische Diagnose	Lokalisation	In Situ RT-PCR		In Vitro RT-PCR	
						Beta-Aktin	PAX3/FOXO1	Beta-Aktin	PAX3/FOXO1
18	394/95	weiblich	Keine Angabe CWS1010	aRMS (mit eRMS-Anteil)	Keine Angabe	+	-	+	-
19	885/94	männlich	12 Jahre	aRMS	Linker Daumenballen	+	-	+	-
20	95/95 (1045/94)	weiblich	9 Monate	aRMS	Linker Oberschenkel	+	-	+	-
21	88/94	männlich	18 Jahre	aRMS	Ulnerar. Handrücken rechts	+	-	+	-
22	358/94	männlich	2 Jahre, 2 Monate	aRMS	Rechter Oberschenkel	+	-	+	-
23	1083/93 (1209/92)	weiblich	2 Jahre, 9 Monate	aRMS	Linker Mundvorhof und Kieferhöhle	+	+	+	+

**Legende:**  
 PCR: + = positives Ergebnis; - = kein Ergebnis; n.a. = nicht auswertbar;  
 KT-Nr. = Fall-Nummer im Kieler Kinder-Tumorregister  
 LK = Lymphknoten, KM = Knochenmark

Patientendaten (Geburtsdatum, Geschlecht und Lokalisation) und histologische Diagnose wurden uns vom Institut für Pädiopathologie zur Verfügung gestellt.

## 4. Diskussion

Die Diagnose undifferenzierter, klein-rund-blauzelliger Tumoren ist aus verschiedenen Gründen schwierig. Diese Gruppe von Tumoren umfasst Rhabdomyosarkome (RMS), Ewingsarkome, Nephroblastome, Neuroblastome sowie Lymphome und Leukämien. Diese Tumoren können einander im histologischen Bild sehr ähnlich sein und stellen deshalb für den Pathologen eine diagnostische Herausforderung dar. Da es sich jedoch um sehr unterschiedliche Entitäten handelt und sehr spezielle Therapieprotokolle existieren, ist eine genaue und reproduzierbare Diagnostik von großer Wichtigkeit. Bereits 1982 wurde eine Translokation in einer Zelllinie eines alveolären Rhabdomyosarkoms gefunden, und es stellte sich in darauffolgenden Arbeiten heraus, dass diese Translokation typisch für das alveoläre RMS ist (Seidal et al., 1982). Damit hatte man einen tumorspezifischen Marker gefunden.

Chromosomale Translokationen wurden zuerst mittels Karyotypisierung nachgewiesen. Dies ist eine zuverlässige Methode zur Erfassung numerischer und grobstruktureller chromosomaler Veränderungen. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass man frisches Tumorgewebe *in vitro* kultivieren muss, um auswertbare Metaphasen zu präparieren. Dies ist technisch aufwendig, zusätzlich lassen sich auf diese Weise nur ca. 10% der soliden Tumoren analysieren.

Eine weitere Methode ist die Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH). Ähnlich wie die In Situ Hybridisierung (ISH) kann sie zum Nachweis von Nukleinsäuren in Geweben, einzelnen Zellen, Metaphase-Chromosomen oder zur Beurteilung der mRNA-Verteilung in ganzen Embryonen eingesetzt werden. Diese Reaktion wird „in situ“ durchgeführt, also direkt im jeweiligen Gewebe und nicht „in vitro“. Hierbei werden markierte DNA-Sonden an die nachzuweisenden Nukleinsäuren hybridisiert. Die Sonden sind bei der ISH mit Haptenen (z.B. Digoxigenin) markiert, die nach der Hybridisierung durch eine Antikörper-Farbreaktion lichtmikroskopisch darstellbar gemacht werden können. Im Unterschied dazu werden bei der FISH die DNA-Sonden mit fluoreszierenden Molekülen markiert. Zur Betrachtung benötigt man in diesem Falle ein Fluoreszenzmikroskop. Durch den Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe können dabei gleichzeitig mehrere Zielstrukturen nachgewiesen werden. Je nach Einsatz der Sonde entstehen dann im Falle einer Translokation entweder Fusionsignale oder „aufgebrochene“ Signale.

Zusammenfassend bestehen die ISH und FISH aus folgenden Schritten: Vorbereitung des Präparates und der Sonde – Hitzedenaturierung – Hybridisierung – Inkubation mit Antikörper

– Farbreaktion – licht- oder fluoreszenz-mikroskopische Auswertung. Diese Methodik ist seit Jahren fester Bestandteil molekulargenetischer Diagnostik und wird in vielen Gebieten eingesetzt.

Im Hinblick auf das aRMS gibt es bislang relativ wenige bzw. kleine FISH-Studien. Darüber hinaus haben sich die meisten Studien hauptsächlich mit der Verarbeitung von frischem Gewebe beschäftigt (Biegel et al., 1995; Mc Manus et al., 1996).

In jüngeren Studien wurde die FISH Methode zunehmend technisch verfeinert. Die Ziele lagen zum einen in der Entwicklung von Versuchsprotokollen, die auch in der Routinediagnostik Verwendung finden können. Zum anderen beschäftigten sie sich insbesondere mit der Untersuchung von formalinfixiertem und paraffineingebettetem Gewebe, da diese Gewebeform am häufigsten zur Verfügung steht. In allen Studien konnten eine hohe Spezifität und Sensitivität nachgewiesen werden (Yamaguchi et al., 2005; Nishio et al., 2006; Zhong et al., 2010).

Nach Klonierung und Identifizierung der an der Translokation beteiligten Gene können ferner RT-PCR-Protokolle entwickelt werden, die es heute erlauben, aus kleinsten Tumorfragmenten eine molekulargenetische Diagnose zu stellen. Diese sehr sensitive und schnelle Methode erlaubt es, dank der exponentiellen Vervielfältigung weniger DNA-Moleküle, auch aus wenigen Zellen verwertbare Resultate zu erzielen und eine eindeutige Aussage zu treffen. Die RNA-Extraktion aus sehr kleinen, formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebestückchen ist jedoch manchmal sehr schwierig, insbesondere da das Gewebe in erster Linie für die histologische Diagnosestellung benötigt wird. Die RNA-Analyse aus formalinfixiertem und paraffineingebettetem Gewebe war bisher stets limitiert durch die Wahrscheinlichkeit einer Qualitätseinbuße der extrahierten RNA. Dies kann bedingt sein durch verschiedene Faktoren wie zum Beispiel Fragmentierung oder auch chemische Modifikation (Srinivasan et al., 2002; von Ahlfen et al., 2007).

Bislang haben sich dieser Problematik nur wenige Studien gewidmet. Fritsch et al. haben 2002 erstmalig eine umfassende RT-PCR Studie mit ausschließlich formalinfixierten Gewebestücken durchgeführt. Hier konnte neben einer einfachen Durchführbarkeit (Praktikabilität) eine hohe Sensitivität und Spezifität nachgewiesen werden. Die zusätzliche Kontrolle von unerwarteten oder unklaren Befunden durch FISH sowie die abschließende Beurteilung der ermittelten Ergebnisse durch einen erfahrenen Pathologen wird allerdings empfohlen.

In einer anderen Studie haben Sinn et al. 2009 eine weitere Methode zur RNA Extraktion aus formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebe zur Anwendung gebracht. Nach Deparaffinisierung und Behandlung mit Proteinase K wurden Nukleinsäuren isoliert, magnetisch gereinigt und weiterverarbeitet.

Sowohl FISH als auch RT-PCR sind potente molekulargenetische Methoden mit jeweils spezifischen Vor- und Nachteilen. Diese wurden 2008 von J.A. Bridge in einer Übersichtsarbeit ausführlich gegenübergestellt:

Beide Methoden können sowohl mit frischem, gefrorenem als auch formalinfixiertem und paraffineingebettetem Gewebe durchgeführt werden. Sie können Ergebnisse liefern, wenn das Probengewebe für zytogenetische Analysen nicht ausreichend ist, oder die konventionelle zytogenetische Diagnostik versagt hat. Sowohl FISH als auch RT-PCR sind diagnostisch nützlich, sensitiv und spezifisch und relativ schnell durchführbar.

Als besonderer Vorteil der RT-PCR gilt die Durchführbarkeit auch mit kleinen Gewebemengen sowie die Nutzbarkeit bei der Detektion von Minimal-Residuen oder bei frühem Wiederauftreten der Erkrankung.

Als Nachteil ist beiden Methoden gemeinsam, dass sie nicht als Screening-Methode einsetzbar sind, da in beiden Fällen die zu untersuchende Ziel-Anomalie bzw. ein Fusionstranskript für die Untersuchung bekannt sein muss. Daher ist nur ein gezielter Einsatz in der Routinediagnostik möglich. Nachteilig bei der RT-PCR ist, dass nicht alle Sarkome charakteristische Fusionstranskripte zeigen. Darüber hinaus kann die Qualität der Ziel-mRNA durch Abbau vermindert sein und die entwickelten Primer-Sets können unübliche Varianten nicht nachweisen, was zu falsch negativen Ergebnissen führen kann. Limitierungen bei FISH werden in der begrenzten Anzahl der verfügbaren Sonden und der Erfordernis einer Fluoreszenzeinheit gesehen.

Auf der RT-PCR basierend haben wir nun eine Methode entwickelt, die es erlaubt, diese chimären Transkripte im histologischen Schnitt darzustellen.

Um diese Methode zu validieren untersuchten wir 23 Tumorproben von aRMS sowie einige andere Kindertumoren und Normalgewebe auf das Vorliegen der für aRMS charakteristischen  $t(2;13)$ . Alle Tumorproben wurden nach RNA-Extraktion mit konventioneller RT-PCR auf das Vorliegen von amplifizierbarer RNA und chimären Transkripten überprüft.

Im Vergleich der Ergebnisse zwischen konventioneller RT-PCR und IS RT-PCR zeigte sich eine Übereinstimmung in 22 von 23 Fällen. Dabei wurde von uns nur die wesentlich häufigere Translokation t(2;13) untersucht. Die Spezifität dieser Methode konnte anhand von zahlreichen Negativkontrollen belegt werden: Dazu gehörten technische Negativkontrollen, wie zum Beispiel der vorherige RNase-Verdau der Gewebe, der Einsatz von nicht zueinander passenden Primern oder auch semantische Negativkontrollen, wie der Einsatz von nicht tumorösem Gewebe oder nicht-aRMS.

Bei der Erarbeitung des IS RT-PCR-Protokolls wurden von uns zwei entscheidende Punkte identifiziert: die Gewebepvorbereitung und die Detektion der chimären Transkripte.

Durch empirische Versuche fanden wir eine Methode der Gewebepvorbereitung, die in einem Großteil der Fälle zu auswertbaren Resultaten führte. Diese Methode besteht aus einer Hitzebehandlung in der Mikrowelle mit darauffolgender Proteinolyse. Im optimalen Fall soll die RNA im Zytoplasma frei zugänglich sein und gleichzeitig die Zellstruktur für die histologische Untersuchung erhalten bleiben. Eine zu geringe Permeabilisierung führte in unseren Experimenten zu fehlenden oder schwachen Farbsignalen und mit stärker werdender Permeabilisierung wurde auch das Farbsignal stärker. Dies liegt möglicherweise an einem verbesserten Zugang der rTth zu den zytoplasmatischen Nukleinsäuren oder an einer stärkeren Exponierung derselben. Da das Ergebnis der Gewebepvorbereitung u.a. stark abhängig ist von der Fixierung des Gewebes, fanden wir jedoch auch Gewebelöcke, die nicht auswertbar waren. Dieses Problem ist schon seit längerem aus In Situ Hybridisierungs-Versuchen (ISH) bekannt. Damals hat man herausgefunden, dass bestimmte Fixative als auch zu lange Fixationszeiten die Zugänglichkeit der Nukleinsäuren stark beeinträchtigen.

Diesem Problem begegneten wir mit einer stärkeren Proteinolyse der Gewebeschnitte während der Gewebepvorbereitung. Dies führte in einem gewissen Rahmen zu verbesserten Ergebnissen. Bei einer zu langen Proteinolyse litt allerdings die Zellmorphologie zu stark.

Ein weiterer Nachteil einer zu langen Proteinolyse liegt in der Permeabilisierung des Gewebes selbst. Die während der PCR vervielfältigten DNA- Moleküle werden nicht genug am Ort ihrer Entstehung gehalten und während der nachfolgenden Waschvorgänge aus dem Zytoplasma gespült.

Für die Proteinolyse benutzten wir das Enzym Pepsin. Der Andau mit der Protease Pepsin hat verschiedene Vorteile: Erstens besitzt Pepsin ein Wirkoptimum im sauren Milieu und kann somit durch einfache pH-Verschiebung gehemmt werden. Zweitens spaltet Pepsin die vier Peptidbindungen Glutaminsäure-Tyrosin [glu-tyr], Glutaminsäure-Phenylalanin [glu-phe], Tyrosin-Cystin [tyr-cys] und Cystin-Tyrosin [cys-tyr] und ist somit relativ mild. Im Vergleich

dazu spaltet die Proteinase K wesentlich mehr Peptidbindungen, hat ein Wirkungsoptimum bei einem pH von 7,5 und ist somit viel aggressiver. Obwohl die Proteinase K in zahlreichen Protokollen zur In Situ Hybridisierung eingesetzt wird, war die Proteinolyse mit Pepsin in unseren Händen einfacher zu steuern, insbesondere war der Bereich der optimalen Vorbereitung größer. Auch wurde schon durch die vorhergegangene Mikrowellenbehandlung in leicht saurem Milieu das Gewebe alteriert und war somit für die nachfolgende Proteinolyse angreifbarer.

Der zweite kritische Punkt war die Visualisierung der PCR-Produkte. Dafür verwendeten wir eine Methode, die aus der Zytogenetik bekannt ist: die PRINS-Reaktion. Diese Reaktion besteht aus Denaturierung, Anlagerung eines spezifischen Primers und Verlängerung dieses Primers unter Einbau markierter Nukleotide. Dieses Verfahren hat zwei Vorteile: Zum einen erlaubt es die spezifische Detektion des PCR-Produktes. Zum anderen werden zahlreiche markierte Nukleotide eingebaut, was die Sensitivität erhöht.

Eine andere Möglichkeit der Detektion ist der direkte Einbau markierter Nukleotide während der PCR. Dieses Verfahren führte bei uns allerdings zu starken unspezifischen Signalen sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern (Sällström et al., 1993). Um den unspezifischen Einbau markierter Nukleotide zu minimieren, verwendeten wir in der PRINS das Stoffel-Fragment der Taq-Polymerase. Bei diesem handelt es sich um eine Variante der Taq-Polymerase, bei der die 5'→3' Exonukleaseaktivität entfernt wurde. Auf diese Weise wurde vermieden, dass fragmentierte und partiell denaturierte genomische DNA im Zellkern als auch unspezifische PCR-Produkte im Zytoplasma nicht Primer-abhängig verlängert und somit markiert werden.

Eine weitere Methode der Detektion besteht in der Hybridisierung mit spezifischen Oligonukleotiden. Diese Verfahren garantiert zwar eine hohe Spezifität, leidet jedoch unter der geringeren Markierungsdichte.

Tumorspezifische Translokationen werden überwiegend bei Lymphomen und Leukämien beobachtet. Auch bei verschiedenen Weichteilsarkomen sind solche Translokationen bekannt. Von differentialdiagnostischer Bedeutung beim aRMS sind neben der von uns untersuchten t(2;13) auch die t(1;13) und, unter anderen, die t(11;22) des Ewing-Sarkoms (Aurias et al., 1984) und die t(X;18) des Synovial-Sarkoms (Turc-Carel et al., 1986; Fligman et al., 1995).

Das PAX3-Protein gehört zu der „paired box (PB)“-Familie der Transkriptionsfaktoren. Diese haben wichtige Funktionen in der embryonalen Muskelentwicklung. Sie beinhalten eine DNA-bindende Domäne bestehend aus einer „paired-box (PB)“, einem Octapeptid (OP) und

einer „paired-type homedomain (HD)“. Diese Abschnitte zusammen kodieren für die DNA-bindende Spezifität (Barr et al., 1993; Galili et al., 1993; Mercado et al., 2007).

Das FOXO1-Protein beinhaltet eine carboxylterminale transaktivatorische Domäne in einer Prolin-reichen und säurehaltigen Region (PA) und eine „forkhead DNA-bindende Domäne“ (FK), die durch die Translokation geteilt wird (Barr et al., 1993). Das FOXO1-Gen gehört zu der Gruppe der „forkhead box Proteine“ (FOX). Diese besitzen bestimmte Funktionen während der Embryonalentwicklung und zeigen eine gewebsspezifische Expression in adulten Geweben. Mittlerweile sind viele Unterklassen an FOX-Proteinen bekannt. 2000 wurde eine einheitliche Nomenklatur vereinbart, in denen diese Proteine in Unterklassen von FOXA bis FOXR eingeteilt wurden (Kaestner et al., 2000).

In dem PAX3-FOXO1-Fusionsprotein sind also die intakten DNA-bindenden Domänen vom PAX3- Protein und die C-terminale Hälfte von FK und PA kombiniert. Dieses Fusionsprotein ist ein stärkerer transkriptioneller Aktivator als das PAX3-Protein allein (Bennicelli et al., 1995, 1996, 1999; Fredericks et al., 1995). Es konnte gezeigt werden, dass das Fusionsprotein Fibroblasten transformieren kann (Scheidler et al., 1996; Ginsberg et al., 1998). Dies liegt möglicherweise daran, dass es an die durch das PAX3-Protein physiologischerweise transkribierten Gene bindet, diese aber nicht mehr richtig reguliert. Daraus resultiert eine starke Über- oder Unterexpression der betroffenen Gene.

Sollte nun die t(2;13) und die Bildung eines transformierenden PAX3-FOXO1 Fusionsproteins einen wichtigen Schritt in der Entstehung von aRMS darstellen, so müssten sie relativ früh in der Tumorentwicklung auftreten und alle Tumorzellen sollten die t(2;13) tragen (Davicioni et al., 2006; Laé et al., 2007). Tatsächlich konnten wir in allen Tumorzellen von PAX3-FOXO1-positiven aRMS PAX3-FOXO1-Transkripte nachweisen. Dies spricht indirekt für eine wichtige Rolle der PAX3-FOXO1-Fusionsproteine in der Tumorentstehung und ist gleichzeitig ein Hinweis auf eine mögliche Monoklonalität der aRMS (Goldstein et al., 2006).

Bezogen auf die bereits erwähnten Vorteile und Limitationen von FISH und RT-PCR ist die in dieser Arbeit gewählte Methodik sicherlich in gleicher Weise einzuordnen wie die konventionelle RT-PCR. Ein großer Unterschied, und unserer Ansicht nach auch weiterer Vorteil, ist allerdings die gleichzeitige Darstellbarkeit von Zellmorphologie und Translokationsnachweis auf einem Gewebeschnitt.

Vergleicht man abschließend die IS RT-PCR mit FISH und RT-PCR so kann man feststellen, dass bei allen drei molekulargenetischen Methoden die Extraktion der Ziel RNA einen

entscheidenden technischen Schritt im Versuchsaufbau darstellt. Vor allem die Vorbehandlung des formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebes stellt immer eine besondere Herausforderung dar. In Anbetracht der Tatsache, dass diese Gewebeform mit Abstand am häufigsten für diagnostische Zwecke zur Verfügung steht, gibt es für alle drei Methoden noch relativ wenige umfangreiche Studien, die sich mit dieser Thematik auseinandersetzen. Darüber hinaus sollte betont werden, dass alle hier diskutierten Methoden nur mit gleichzeitiger, fachlicher Beurteilung des Pathologen in Einklang mit der Routinediagnostik zu bringen sind.



## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit haben wir mit der IS RT-PCR ein Protokoll entwickelt, das es erlaubt, spezifische RNA-Moleküle in histologischen Schnittpräparaten darzustellen.

Dabei ging es uns in erster Linie um die Erstellung eines einfachen Protokolls, das den verschiedenen Gewebetypen angepasst und somit in der täglichen Diagnostik verwendet werden kann.

Dieses so optimierte Protokoll wurde dann anhand einer Gruppe von alveolären Rhabdomyosarkomen und anderen Tumoren nachgeprüft. Nachgewiesen wurden RNA-Moleküle der tumorassoziierten t(2;13), die PAX3/FOXO1-Fusionstranskripten entsprechen.

In diesen Untersuchungen wurde eine Übereinstimmung von konventioneller RT-PCR und IS RT-PCR in 22 von 23 Fällen gefunden. Gleichzeitig konnten wir zeigen, dass die PAX3/FOXO1-Fusionstranskripte in t(2;13)-positiven Tumoren immer in fast allen Zellen dargestellt werden konnten, was auf eine wichtige Rolle für den Tumorstoffwechsel hinweist.

Für die Untersuchungen werden nur kleine Gewebeproben benötigt, und auch die Untersuchung von formalinfixierten Biopsien ist möglich. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist darüber hinaus der molekulargenetische Nachweis der Translokation und der Zellmorphologie zur gleichen Zeit (Parham et al., 2007).

Daher kann die IS RT-PCR neben der Lichtmikroskopie und der Immunhistochemie eine wichtige zusätzliche Technik in der Diagnostik kindlicher Tumoren spielen.

## 6. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A	Adenin
aRMS	alveoläres Rhabdomyosarkom
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA (DNS)	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eRMS	embryonales Rhabdomyosarkom
FISH	Fluoreszenz In Situ Hybridisierung
G	Guanin
IS RT-PCR	In Situ Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
ISH	In Situ Hybridisierung
KCl	Kaliumchlorid
KTR	Kindertumorregister
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
NBT/BCIP	Nitro Blue Tetrazoliumchlorid / 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PRINS	Primed In Situ Labeling
RNA (RNS)	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SSC	Standard Saline Citrate
T	Thymin
t	Translokation
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tris	Trihydroxymethylaminomethan

## 7. Literaturverzeichnis

- Aurias, A., Rimbaut, C., Buffe, D., Zucker, J.M., Mazabraud, A. : Translocation involving chromosome 22 in Ewing's sarcoma. A cytogenetic study of four fresh tumors. *Cancer Genet Cytogenet.* 1984 May;12(1):21-25.
- Anderson, J.; Renshaw, J.; Mc Manus, A; Carter, R.; Mitchell, C.; Adams, S.; Pritchard-Jones, K.: Technical Advance, Amplification of the t(2;13) and t(1;13) translocations of alveolar rhabdomyosarcoma in small formalin-fixed biopsies using a modified reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Am.J. Pathol.* 1997; 150 (2): 477-482.
- Bale, P.M.; Parsons, R.E.; Stevens, M.M.: Diagnosis and behaviour of juvenile rhabdomyosarcoma. *Hum. Pathol.* 1983; 14: 596-611.
- Barr, F.G.; Sellinger, B.; Emanuel, B.S.: Localization of the rhabdomyosarcoma t(2;13) breakpoint on a physical map of chromosome 13. *Genomics* 1991; 11: 941-947.
- Barr, F.G.; Holick, J.; Nycum, L.; Biegel, J.A.; Emanuel, B.S.: Localization of the t(2;13) breakpoint of alveolar rhabdomyosarcoma on a physical map of chromosome 2. *Genomics* 1992; 13: 1150-1156.
- Barr, F.G.; Chatten, J.; D'Cruz, C.M.; Wilson, A.E.; Nauta, L.E.; Nycum, L.M.; Biegel, J.A.; Womer, R.B.: Molecular assays for chromosomal translocations in the diagnosis of pediatric soft tissue sarcomas. *JAMA* 1995; 273: 553-557.
- Bennicelli, J.L., Fredericks, W.J., Wilson, R.B., Rauscher, F.J. 3rd, Barr, F.G.: Wild type PAX3 protein and the PAX3-FOXO1 fusion protein of alveolar rhabdomyosarcoma contain potent, structurally distinct transcriptional activation domains. *Oncogene.* 1995 Jul.6; 11(1): 119-30.
- Bennicelli, J.L., Edwards, R.H., Barr F.G.: Mechanism for transcriptional gain of function resulting from chromosomal translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 1996 May 28; 93(11): 5455-9.

- Bennicelli, J.L., Advani, S., Schäfer, B.W., Barr F.G.: PAX3 and PAX7 exhibit conserved cis-acting transcription repression domains and utilize a common gain of function mechanism in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene*. 1999 Jul. 29; 18(30): 4348-56.
- Biegel, J.A.; Meek, R.S.; Parmiter, A.H.; Conrad, K.; Emanuel, B.S.: Chromosomal translocation t(1;13)(p36;q14) in a case of alveolar rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1991; 3: 483-484.
- Biegel, J.A., Nycum, L.M., Valentine, V., et al.: Detection of the t(2;13)(q35;q14) and PAX3-FKHR fusion in alveolar rhabdomyosarcoma by fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1995; 12:186-192.
- Bridge, J.A.: Advantages and limitations of cytogenetic, molecular cytogenetic and molecular diagnostic testing in mesenchymal neoplasms. *J. Orthop. Sci.* 2008. 13: 273-282.
- Caillaud, J.M.; Gérard-Marchand, R.; Marsden, H.B.; van Unnik, A.J.M.; Rodary, C.; Rey, A.; Flamant, F.: Histopathologic classification of childhood rhabdomyosarcoma: a report from the International Society of Pediatric Oncology Pathology Panel. *Med. Pediatr. Oncol.* 1989; 17: 391-400.
- Carter R.L.; McCarthy, K.P.: Diagnosis of rhabdomyosarcomas with particular reference to immunohistochemical markers. *Prog. Surg. Pathol.* 1992; 12: 251-267.
- Davicioni, E., Finckenstein, F.G., Shahbazian, V., Buckley, J.D., Triche, T.J., Anderson, M.J.: Identification of a PAX-FKHR gene expression signature that defines molecular classes and determines the prognosis of alveolar rhabdomyosarcomas. *Cancer Res.* 2006 Jul 15;66(14):6936-46.
- Davicioni, E.; Anderson, M.J.; Finckenstein, F.G., Lynch, J.C.; Qualman, S.J.; Shimada, H.; Schofield, D.E.; Buckley, J.D.; Meyer, W.H.; Sorensen, P.H.; Triche, T.J.: Molecular classification of rhabdomyosarcoma – genotypic and phenotypic determinants of diagnosis: a report from the Children’s Oncology Group. *Am.J.Pathol.* 2009 Feb;174(2): 550-64.

- Davis, J.R.; D'Cruz, C.M.; Lovell, M.A.; Biegel, J.A.; Barr, F.G.: Fusion of PAX7 to FKHR by the variant t(1;13)(p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.* 1994; 54: 2869-2872.
- Dehner, L.P.: Soft tissue sarcomas of childhood: the differential diagnostic dilemma of the small blue cell. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 1981; 43-59.
- Douglass, E.C.; Valentine, M.; Etcubanas, E.; Parham, D.; Webber, B.L.; Houghton, P.J.; Green, A.A.: A specific chromosomal abnormality in rhabdomyosarcoma. (published erratum appears in *Cancer Genet. Cytogenet.* 1988; 47: 232) *Cytogenet. Cell Genet.* 1987; 45: 148-155.
- Douglass, E.C.; Rowe, S.T.; Valentine, M.; Parham, D.M.; Berkow, R.; Bowman, W.P.: A second non-random translocation t(1;13)(p36;q14) in alveolar rhabdomyosarcoma. Fourth International Workshop on Chromosomes in Solid Tumors, Tuscon, AZ, Feb. 24-26, 1991.
- Douglass, E.C.; Rowe, S.T.; Valentine, M.; Parham, D.M.; Berkow, R.; Bowman, W.P.; Maurer, H.M.: Variant translocations of chromosome 13 in alveolar rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1991; 3: 480-482.
- Downing, J.R.; Khandekar, A.; Shurtleff, S.A.; Head, D.R.; Parham, D.M.; Webber, B.L.; Pappo, A.S.; Hulshof, M.G.; Conn, W.P.; Shapiro, D.N.: Technical Advance, Multiplex RT-PCR assay for the differential diagnosis of alveolar rhabdomyosarcoma and Ewing's sarcoma. *Am.J. Pathol.* 1995; 146 (3): 626-634.
- Enzinger, F.M.; Shiraki, M.: Alveolar rhabdomyosarcoma. An analysis of 110 cases. *Cancer* 1969; 24: 18-31.
- Embleton, M.J.; Gorochow, G.; Jones, P.T.; Winter, G.: In-cell PCR from : amplifying and linking the rearranged immunoglobulin heavy and light chain V-genes within single cells. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20: 3831-3837.

- Fligman, I., Lonardo, F., Jhanwar, S.C., Gerald, W.L., Woodruff, J., Ladanyi, M.: Molecular diagnosis of synovial sarcoma and characterization of a variant SYT-SSX2 fusion transcript. *Am. J. Pathol.* 1995 Dec; 147(6):1592-9.
- Fredericks, W.J., Galili, N., Mukhopadhyay, S., Rovera, G., Benniselli, J., Barr, F.G., Rauscher, F.J. 3rd: The PAX3-FKHR fusion protein created by the t(2;13) translocation in alveolar rhabdomyosarcomas is a more potent transcriptional activator than PAX3. *Mol.Cell.Biol.* 1995 Mar; 15(3): 1522-35.
- Fritsch, M.K., Bridge, J.A., Schuster, A.E., Perlman, E.J., Argani, P.: Performance characteristics of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for the detection of tumor-specific fusion transcripts from archival tissue. *Pediatric and Dev. Pathol.* 2002; 6:43-53.
- Galili, N.; Davis, R.; Fredericks, W.; Mukhopadhyay, S.; Rauscher, F.; Emanuel, B.; Rovera, G.; Barr, F.G.: Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumor alveolar rhabdomyosarcoma. *Nature Genet.* 1993; 5: 230-235.
- Gallego Melcón, S.; Sánchez de Toledo Codina, J.: Molecular biology of rhabdomyosarcoma. *Clin.Transl.Oncol.* 2007 Jul;9(7): 415-9.
- Gehan, E.A.; Glover, F.N.; Maurer, H.M.; Sutow, W.W.; Hays, D.M.; Lawrence, W. Jr.; Newton, W.A. Jr.; Soule, E.H.: Prognostic factors in children with rhabdomyosarcoma. *Natl. Cancer Inst. Monogr* 1981; 56: 83-92.
- Ginsberg, J.P., Davis, R.J., Benniselli, J.L., Nauta, L.E., Barr, F.G.: Up-regulation of MET but not neural cell adhesion molecule expression by the PAX3-FKHR fusion protein in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.* 1998 Aug 15;58(16):3542-6.
- Goldstein, M., Meller, I., Issakov, J., Orr-Urtreger, A.: Novel genes implicated in embryonal, alveolar, and pleomorphic rhabdomyosarcoma: a cytogenetic and molecular analysis of primary tumors. *Neoplasia.* 2006 May;8(5):332-43.

- Harms, D.; Schmidt, D.; Treuner, J.: Soft tissue sarcomas in childhood. A study of 262 cases including 169 cases of rhabdomyosarcoma. *Z. Kinderchir.* 1985; 40: 140-145.
- Harms, D.: Soft tissue sarcomas in the Kiel Pediatric Tumor Registry. In: Harms, D; Schmidt, D. (Eds.) *Current Topics in Pathology*, Springer, Berlin, 1995a; 89: 31-43.
- Harms, D.: Alveolar rhabdomyosarcoma: A prognostically unfavorable rhabdomyosarcoma type and its necessary distinction from embryonal rhabdomyosarcoma. In: Harms, D.; Schmidt, D. (Eds) *Current Topics in Pathology*, Springer, Berlin, 1995b; 89: 273-296.
- Harms, D.: Kieler Kindertumorregister: *Deutsches Ärzteblatt* 1996; 93: A-746-754 (Heft 12).
- Harms, D.; Schmidt, D.: Solide Tumoren des Kindes- und Adoleszentenalters. In: Remmele, W. (Hrsg) *Pathologie* 1997, Bd 4., 2. Aufl., Springer, Berlin, 501-549.
- Hays, D.M.; Soule, E.H.; Lawrence, W. Jr.; Gehan, E.A.; Maurer, H.M.; Donaldson, M.; Raney, R.B.; Tefft, M.: Extremity Lesions in the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study (IRS-I): A preliminary report. *Cancer*, 1982, 49: 1-8.
- Hays, D.M.; Newton, W.A. Jr.; Soule, E.H.; Foulkes, M.A.; Raney, R.B.; Tefft, M.; Ragab, A.; Maurer, H.M.: Mortality among children with rhabdomyosarcomas of the alveolar histologic subtype. *J. Pediatr. Surg.* 1983; 18: 412-417.
- Horn, R.C.; Enterline, H.T.: Rhabdomyosarcoma: A clinicopathological study and classification of 39 cases. *Cancer* 1958; 11: 181-199.
- Kaestner, K.H., Knöchel, W., Martinez, D.E.: Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev.* 2000. 14(2): 142-146
- Kelly, K.M.; Womer, R.B.; Barr, F.G.: Minimal disease detection in Patients with alveolar rhabdomyosarcoma using a reverse transcriptase-polymerase chain reaction method. *Cancer* 1996; 78: 1320-1327.

- Koscielniak, E.; Rodary, C.; Flamant, F.; Carli, M.; Treuner, J.; Pinkerton, R.; Grotto, P.: Metastatic rhabdomyosarcoma and histologically similar tumors in childhood: A retrospective European multi-center analysis. *Med. Pediatr. Oncol.* 1992; 20: 209-214.
- Krams, M.; Peters, J.; Boeckel, F.; Raether, A.; Ambros, P.F.; Parwaresch, R.; Harms, D.: In situ reverse-transcriptase polymerase chain reaction demonstration of the EWS/FLI-1 fusion transcript in Ewing's sarcomas and peripheral primitive neuroectodermal tumors. *Virchows Arch.* 2000; 437: 234-240.
- Laé, M., Ahn, E.H., Mercado, G.E., Chuai, S., Edgar, M., Pawel, B.R., Olshen, A., Barr, F.G., Ladanyi, M.: Global gene expression profiling of PAX-FKHR fusion-positive alveolar and PAX-FKHR fusion-negative embryonal rhabdomyosarcomas. *J Pathol.* 2007 Jun; 212(2):143-51.
- Lawyer, F.C., Stoffel, S., Saiki, R.K., Myambo, K., Drummond, R., Gelfand, D.H.: Isolation, characterization and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J. Biol. Chem.* 1989 Apr. 15; 264(11): 6427-37.
- Leuschner, I.; Harms, D.: Pathologie der Rhabdomyosarkome des Kindes- und Adoleszentenalters. Ein Bericht des Kindertumorregisters bei der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH). *Pathologie* 1999; 20: 87-97.
- Linz, U.; Delling, U.; Rübsamen-Waigmann, H.: Systematic studies on parameters influencing the performance of the polymerase chain reaction. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1990; 28: 5-13.
- Linz, U.; Degenhard, H.: Die Polymerase-Kettenreaktion – Ein Überblick. *Naturwissenschaften* 1990; 77: 515-530.
- Mc Manus, A.P., O'Reilly, M.A.J, Pritchard-Jones, K., et al.: Interphase fluorescence in situ hybridization detection of t(2;13)(q35;q14) in alveolar rhabdomyosarcoma: a diagnostic tool in minimally invasive biopsies. *J. Pathol.* 1996; 178:410-414.



- Mercado, G.E., Barr, F.G.: Fusions involving PAX and FOX genes in the molecular pathogenesis of alveolar rhabdomyosarcoma: recent advances. *Curr Mol Med.* 2007 Feb;7(1):47-61. Review.
- Mullis, K.B.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.K.; Horn, G.; Erlich, H.A.: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 1986; 51 (1): 263-273.
- Mullis, K.B. & Faloona, F.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 1987; 155: 335-350.
- Myers, T.W. and Gelfand, D.H.: Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry* 1991; 30: 7661-7666.
- Newton, W.A.; Soule, E.H.; Hamoudi, A.B.; et al.: Histopathology of childhood sarcomas, Intergroup Rhabdomyosarcoma Studies I and II: clinicopathologic correlation. *J.Clin. Oncol.* 1988; 6: 67-75.
- Newton, W.; Triche, T.; Marsden, H.; Ninfo, V.; Harms, D.; Gehan, E.; Maurer, H.: International Childhood Soft Tissue Sarcoma Pathology Classification Study: Design and implementation utilizing Intergroup Rhabdomyosarcoma Study II clinical and pathology data. *Med. Pediatr. Oncol.* 1989; 17: 308.
- Newton, W.A. Jr.; Gehan, E.A.; Webber, B.L.; Marsden, H.B.; van Unnik, A.J.M.; Hamoudi, A.B.; Tsokos, M.G.; Shimada, H.; Harms, D.; Schmidt, D.; Ninfo, V.; Cavazzana, A.O.; Gonzales-Crussi, F.; Parham, D.M.; Reiman, H.M.; Asmar, L.; Beltangady, M.S.; Sachs, N.E.; Triche, T.J.; Maurer, H.M.: Classification of rhabdomyosarcomas and related sarcomas. Pathologic aspects and proposal for a new classification. An Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. *Cancer* 1995; 76: 1073-1085.
- Nishio, J., Althof, P.A., Bailey, J.M., Zhou, M., Neff, J.R., Barr, F.G., Parham, D.M., Teot, L., Qualmann, S.J., Bridge, J.A.: Use of a novel FISH assay on paraffin-embedded tissues as an adjunct to diagnosis of alveolar rhabdomyosarcoma. *Laboratory Investigation* 2006; 86:547-556.

- Noguera, R.: Cytogenetics and tissue culture of small round cell tumors of bone and soft tissue. *Sem. Diag. Pathol.* 1996; 13: 171-183.
- Palmer, N.F.; Foulkes, M.A.; Sachs, N.; Newton, W.A.: Rhabdomyosarcoma: A cytological classification of prognostic significance. *Proc. Annual Meet. Am. Soc. Clin. Oncol.* 1983; 2: 229.
- Parham, D.M.; Dias, P.; Kelly, D.R. ; Rutledge, J.C. ; Houghton, P. : Desmin positivity in primitive neuroectodermal tumors of childhood. *Am. J. Surg. Pathol.* 1992; 16: 483-492.
- Parham, D.M., Qualman, S.J., Teot, L., Barr, F.G., Morotti, R., Sorensen, P.H., Triche, T.J., Meyer, W.H.; Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children's Oncology Group. Correlation between histology and PAX/FKHR fusion status in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Am J Surg Pathol.* 2007 Jun;31(6):895-901.
- Peters, J.; Krams, M.; Wacker, H.H.; Carstens, A.; Weisner, D.; Hamann, K., Menke, M.; Harms, D.; Parwaresch, R.: Detection of rare RNA sequences by single-enzyme in situ reverse transcription-polymerase chain reaction. High-resolution analyses of interleukin-6 in paraffin sections of lymph nodes. *Am. J. Path.* 1997; 150: 469-476.
- Pilgrim, T.B.; Rebmann, O.G.; Winkler, P.; Knietig, R.K.; Niethammer, D.; Koscielniak, E.; Treuner, J.: The prognostic significance of initial tumor volume for metastatic relapse in paediatric soft tissue sarcoma. *Med. Pediatr. Oncol.* 1997; 29: 331.
- Raney, R.B. Jr.; Tefft, M.; Maurer, H.M.; Ragab, A.H.; Hays, D.M.; Soule, E.H.; Foulkes, M.H.; Gehan, E.A.: Disease patterns in survival rate in children with metastatic soft-tissue sarcoma. A report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study (IRS)-I. *Cancer* 1988; 62: 1257-1266.

- Raney, R.B.; Hays, D.M.; Tefft, M.; Triche, T.J.: Rhabdomyosarcoma and the undifferentiated sarcomas. In: Pizzo, P.A.; Poplack, D.G. (Eds.) Principles and practice of paediatric oncology. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia, PA: JB Lippincott; 1993: 769-794.
- Rangdaeng, S.; Truong, L.D.: Comparative immunohistochemical staining for desmin and muscle-specific actin: a study of 576 cases. *Am. J. Clin. Pathol.* 1991; 96: 32-45.
- Reichmuth, C.; Markus, M.A.; Hillemanns, M.; Atkinson, M.J.; Unni, K.K.; Saretzki, G.; Höfler, H.: The diagnostic potential of the chromosome translocation t(2;13) in rhabdomyosarcoma: A PCR study of fresh-frozen and paraffin-embedded tumor samples. *J Pathol.* 1996; 180: 50-57.
- Ruyman, F.B.; Newton, W.A. Jr.; Ragab, A.H.; Donaldson, M.H.; Foulkes, M.: Bone marrow metastases at diagnosis in children and adolescents with rhabdomyosarcoma. A report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. *Cancer* 1984; 53: 368-373.
- Ruyman, F.B.; Grufferman, S.: Introduction and epidemiology of soft tissue sarcomas. In: Maurer, H.M.; Ruyman, F.B.; Pochedly, C. (Eds.) Rhabdomyosarcoma and related tumors in children and adolescents. CRC Press, Boca Raton 1991; 3-18.
- Sällström, J.F., Zehbe, I., Alemi, M., Wilander, E.: Pitfalls of in situ polymerase chain reaction (PCR) using direct incorporation of labelled nucleotides. *Anticancer Res.* 1993 Jul.-Aug.; 13(4): 1153.
- Saiki, R.K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K.B.; Horn, G.T.; Erlich, H.A.; Arnheim, N.: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230 (4732): 1350-1354.
- Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B.; Erlich, H.A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491.

- Scheidler, S., Fredericks, W.J., Rauscher, F.J. 3rd, Barr, F.G., Vogt, P.K.: The hybrid PAX3-FKHR fusion protein of alveolar rhabdomyosarcoma transforms fibroblasts in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996 Sep 3;93(18):9805-9.
- Seidal, T.; Mark, J.; Hagmar, B.; Angervall, L.: Alveolar rhabdomyosarcoma: A cytogenetic and correlated cytological and histological study. *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. A* 1982; 90: 345-354.
- Shapiro, D.N.; Sublett, J.E.; Li, B.; Downing, J.R.; Naeve, C.W.: Fusion of PAX3 to a member of the forkhead family of transcription factors in human alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.* 1993; 53: 5108-5112.
- Shapiro, D.N.; Sublett, J.E.; Li, B.; Valentine, M.B.; Morris, S.W.; Noll, M: The gene for PAX7, a member of the paired-box-containing genes, is localized on human chromosome arm 1p36. *Genomics* 1993; 17: 767-769.
- Sinn, B.V., Darb-Esfahani, S., Wirtz, R.M., Faggad, A., Weichert, W., Buckendahl, A., Noske, A., Müller, B.M., Budczies, J., Sehouli, J., Braicu, E.I., Dietel, M., Denkert, C.: Vascular endothelial growth factor C mRNA expression is a prognostic factor in epithelial ovarian cancer as detected by kinetic RT-PCR in formalin fixed paraffin-embedded tissue. *Virchows Arch.* 2009; 455:461-467.
- Srinivasan, M., Sedmak, D., Jewell, S.: Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am. J. Pathol* 2002; 161(6): 1961-1971.
- Sumegi, J.; Streblov, R.; Frayer, R.W.; Cin, P.D.; Rosenberg, A.; Meloni-Ehrig, A.; Bridge, J.A: Recurrent t(2;2) and t(2;8) translocations in rhabdomyosarcoma without the canonical PAX-FOXO1 fuse PAX3 to members of the nuclear receptor transcriptional coactivator family. *Genes Chromosomes Cancer.* 2009 Dec 1.
- Tsokos, M.; Miser, A.; Pizzo, P.; Triche, T.: Histologic and cytologic characteristics of poor prognosis childhood rhabdomyosarcoma. *Lab. Invest.* 1984; 50: 61A.

- Tsokos, M.: The role of immunocytochemistry in the diagnosis of rhabdomyosarcoma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1986; 110: 776-778.
- Tsokos, M.; Webber, B.L.; Parham, D.M.; Wesley, R.A.; Miser, A.; Miser, J.S.; Etcubanas, E.; Kinsella, T.; Grayson, J.; Glatstein, E.; Pizzo, P.A.; Triche, T.J.:  
Rhabdomyosarcoma: A new classification scheme related to prognosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1992; 116: 847-855.
- Turc-Charel, C.; Lizard-Nacol, S.; Justrabo, E.; Favrot, M.; Philip, T.; Tabone, E.: Consistent chromosomal translocations in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1986; 19: 361-362.
- Turc-Carel, C., Dal Cin, P., Limon, J., Li, F., Sandberg, A.A.: Translocation X;18 in synovial sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 1986 Sep;23(1):93.
- Von Ahlfen, S., Missel, A., Bendrat, K., et al.: Determinants of RNA quality from FFPE samples. *PLoS ONE* 2007; 2(12):e1261.
- Webber-Hall, S.; McManus, A.; Anderson, J.; Nojima, T.; Abe, S.; Pritchard-Jones, K.; Shipley, J.: Novel formation and amplification of the PAX7-FKHR fusion gene in a case of alveolar rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1996; 17: 7-13.
- Weber, C.O.: Anatomische Untersuchung einer hypertrophischen Zunge nebst Bemerkungen über die Neubildung quergestreifter Muskelfasern. *Virchows Arch. A Histopathol. Anat.* 1854; 7: 115.
- Whang-Peng, J.; Knutson, T.; Theil, K.; Horowitz, M.; Triche, T.: Cytogenetic studies in subgroups of rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1992; 5: 299-310.
- Yamaguchi, U., Hasegawa, T., Morimoto, Y., Tateishi, U., Endo, M., Nakatani, F., Kawai, A., Chuman, H., Beppu, Y., Kurotaki, H., Furuta, K.: A practical approach to the clinical diagnosis of Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor and other small round cell tumors sharing EWS rearrangement using new fluorescence in situ

hybridization probes for EWSR1 on formalin fixed, paraffin wax embedded tissue. *J. Clin.Pathol.* 2005; 58(10):1051-6.

Zhong, M., De Angelo, P., Osborne, L., Keane-Tarchichi, M., Goldfischer, M, Edelmann, L., Yang, Y., Linehan, W., Merino, M., Aisner, S., Hameed, M.: Dual-colour, Break-apart FISH assay on paraffin-embedded tissues as an adjunct to diagnosis of Xp11 translocation renal cell carcinoma and alveolar soft part sarcoma. *Am.J.Surg.Pathol.* 2010; 34(6):757-766.

## 8. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. I. Leuschner, Leiter der Sektion Kinderpathologie, für die Bereitstellung des Untersuchungsgutes mitsamt allen klinischen Daten, des Arbeitsplatzes, aller Arbeitsgeräte und der benötigten Chemikalien zur Durchführung meiner Versuche.

Ebenso möchte ich mich bei den medizinisch-technischen Assistentinnen des Institutes bedanken, die mich in die Herstellung von Schnittpräparaten von Paraffinblöcken eingewiesen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Matthias Krams. Er hat das Thema für die Dissertation ausgewählt und mich von Beginn an bei der Planung und Durchführung der Versuche unterstützt.

Durch seine Hilfe und Anregungen in der praktischen Arbeit aber vor allem auch durch seine ständige Gesprächsbereitschaft, Motivation und Unterstützung bei der Auswertung und Interpretation der Ergebnisse hat er maßgeblich dazu beigetragen, dass ich die Dissertation abschließen konnte.

Ein herzlicher Dank geht an dieser Stelle an Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. Dieter Harms, der durch den Aufbau des Kindertumorregisters in Kiel und seine Forschung auf dem Gebiet der Rhabdomyosarkome die große Basis für die Planung und den Aufbau dieser Arbeit gewesen ist.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und insbesondere bei meinen Eltern sehr herzlich bedanken. Sie standen mir zu jeder Zeit und in jeder Hinsicht hilfreich zur Seite.





## 9. Lebenslauf

**Andrea Raether**, geboren am 06.02.1974 in Flensburg

Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Eltern:	Dipl.-Ing. Friedmar Raether und Edith Raether, geb. Kollmann
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Schulen:</b></li> </ul>	
1980 – 1984	Grundschule am Heidenberger Teich, Kiel
1984 – 1993	Gymnasium im Bildungszentrum Mettenhof, Kiel
11. Juni 1993	Abitur
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Studium und Beruf:</b></li> </ul>	
1993 – 2000	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
17. August 1995	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
29. August 1996	Erstes Staatsexamen
19. März 1999	Zweites Staatsexamen
11. Mai 2000	Drittes Staatsexamen (Ärztliche Prüfung)
September 2000 bis März 2002	Ärztin im Praktikum, Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin am Klinikum Elmshorn
15. März 2002	Approbation als Ärztin
April 2002 bis Februar 2011	Tätigkeit als Assistenzärztin in der Abteilung für Anästhesiologie, Schmerztherapie, Intensiv- und Rettungsmedizin, Sana Kliniken Lübeck GmbH, Krankenhaus Süd
04. Juli 2007	Fachärztin für Anästhesiologie
seit Juli 2007	Weiterbildung für die Zusatzbezeichnung „Spezielle anästhesiologische Intensivmedizin“
19. Dezember 2007	Zusatzbezeichnung „Notfallmedizin“
13. April 2010	Fertigstellung der Dissertation
Seit Februar 2011	Tätigkeit als Fachärztin in der Abteilung für Anästhesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin und Schmerztherapie, Asklepios Klinik Altona, Hamburg