

Aus dem Institut für Pathologie
(Direktor: Prof. Dr. med. Christoph Röcken)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Molekulargenetische Charakterisierung
pleuropulmonaler Blastome im Kindes- und Jugendalter
mittels komparativer genomischer Hybridisierung und
Fluoreszenz in-situ Hybridisierung**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität

vorgelegt von
Laura Elisabeth de León Escapini
aus Koblenz

Kiel 2017

Referent: Prof. Dr. Christoph Röcken

Korreferent: Prof. Dr. Ulrich Mrowietz

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2017

Zum Druck genehmigt: 28.08.2017

gez. PD Dr. Ilske Oschlies

Für meine Eltern, Timo und meinen Sohn David Matteo

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
2 Material	5
2.1 Tumorgewebe	5
2.2 Arbeitsgeräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	6
3 Methoden	9
3.1 Komparative genomische Hybridisierung (CGH)	9
3.1.1 DNA-Isolierung aus paraffineingebettetem Tumormaterial	10
3.1.2 DNA-Konzentrationsbestimmung mittels Photometer	11
3.1.3 Agarose-Gel-Elektrophorese	11
3.1.4 Random Priming mit direkt markierten Nukleotiden	12
3.1.5 Hybridisierung	13
3.1.6 Waschen	14
3.1.7 Auswertung der CGH	14
3.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	16
3.2.1 Entparaffinierung und Rehydrierung	18
3.2.2 Thermische Antigendemaskierung	18
3.2.3 Proteolytische Antigenmaskierung	18
3.2.4 Sondenanwendung und Hybridisierung	18
3.2.5 Verwendete Sonden	19
3.2.6 Auswertung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	22
4 Ergebnisse	23
4.1 Komparative genomische Hybridisierung (CGH)	23

4.1.1	Aberrationen beim weiblichen und männlichen Geschlecht.....	23
4.1.2	Aberrationen der Typ II und Typ III PPBs	24
4.1.3	Häufigkeiten der Chromosomenaberrationen	26
4.2	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	28
4.2.1	Amplifikation des IGF1-R Gens (15q26).....	28
4.2.2	Zugewinn von Chromosom 8.....	30
5	Diskussion.....	33
5.1	Detektierte genetische Aberrationen.....	33
5.2	Publizierte genetische Veränderungen beim PPB.....	34
5.3	Die Rolle des IGF-Systems und des IGF1 Rezeptors in Tumoren	36
6	Ausblick.....	40
7	Zusammenfassung.....	41
	Literaturverzeichnis.....	42
	Danksagung.....	51
	Lebenslauf	52
	Veröffentlichungen.....	55
	Erklärung	56

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilung nach Geschlecht bezogen auf Tumorsubtyp II und III.....	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Metaphasen CGH	10
Abbildung 3: Beispiel einer Gel-Ektrophorese	12
Abbildung 4: Darstellung eines CGH-Profiles	15
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	17
Abbildung 6: Prinzip der Kreatech IGF1-R (15q26)/15q11 FISH-Probe	20
Abbildung 7: Beispielbild der Kreatech IGF1-R (15q26)/15q11 FISH-Probe	20
Abbildung 8: Prinzip der Kreatech TM SE 8 (D8Z1) (Satellite Enumeration) FISH-Probe.....	21
Abbildung 9: CGH-Profil Chromosom 15	32
Abbildung 10: FISH-Amplifikation Chromosom 15q26	32
Abbildung 11: CGH-Profil Chromosom 15	32
Abbildung 12: FISH-Zugewinn Chromosom 8.....	32

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Arbeitsgeräte	6
Tabelle 2: Verwendete Materialien	7
Tabelle 3: Eingesetzte Chemikalien Reagenzien, Kits und Substrate.....	7
Tabelle 4: Signale der IGF1-R (15q26) /15q11 FISH-Probe	20
Tabelle 5: Aberrationen beim männlichen Geschlecht	23
Tabelle 6: Aberrationen beim weiblichen Geschlecht	24
Tabelle 7: Aberrationen der Typ II PPBs	24
Tabelle 8: Aberrationen der Typ III PPBs	25
Tabelle 9: Aberrationen der einzelnen Chromosomen.....	27
Tabelle 10: Amplifikation des IGF1-R Gens 15q26	29
Tabelle 11: Zugewinn von Chromosom 8.....	31

Abkürzungsverzeichnis

Amp.	Amplifikation
AK	Antikörper
Aqua dest.	Aqua destillata
CGH	Comparative genomische Hybridisierung
Chr.	Chromosom
Dapi	4',6-Diamin-2-phenylindol
DICER1	Double-Stranded RNA-Specific Endoribonuclease
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
IGF	Insulin-like growth factor
IGF1	Insulin-like growth factor 1
IGF2	Insulin-like growth factor 2
IGF1-R	Insulin-like growth factor 1-Rezeptor
Mbp	Mega-Basenpaare
Kbp	Kilo-Basenpaare
OD	Optische Dichte
OT	Objektträger
P53	Protein 53
PPB	Pleuropulmonales Blastom
PPBs	Pleuropulmonale Blastome
SSC	Sodium Citrat Standard
upM	Umdrehung pro Minute
VF	Verdünnungsfaktor

1 Einleitung

Das pleuropulmonale Blastom (PPB) ist ein seltener aggressiver Tumor des frühen Kindesalters, der mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Er ist der häufigste maligne Tumor der Lunge im Kindesalter (Dehner et al. 2015) und wird nach der WHO-Klassifikation der Lungentumore als mesenchymaler Tumor geführt (Travis et al. 2015). Er zählt wie das Hepatoblastom, das Neuroblastom und der Wilmstumor zu den dysontogenetischen Tumoren (Travis et al. 2004) und tritt typischerweise bei Kindern unter fünf Jahren auf (Priest et al. 2006, Taube et al. 2006).

1945 wurde erstmalig von Barnard ein ungewöhnlicher thorakaler Tumor bei einer 40-jährigen Patientin beschrieben. Wegen der Ähnlichkeiten mit dem Gewebe embryonaler Lungen bezeichnete Barnard den Tumor als „embryoma of the lung“ (W.G. Barnard 1952). 1961 wurde wegen der ähnlichen histopathologischen Eigenschaften des Tumors mit dem Wilms-Tumor (Nephroblastom) von Spencer der Terminus des „Pulmonalen Blastoms“ (PB) eingeführt. 1988 wurde dann von Manivel et al. vorgeschlagen, das pleuropulmonale Blastom als eigene, vom pulmonalen Blastom des Erwachsenenalters getrennte Tumorentität anzusehen.

Zur zentralen Registrierung aller diagnostizierten pleuropulmonalen Blastome (PPBs) wurde Mitte der 80er-Jahre das „International Pleuropulmonary Registry“ gegründet. Zum besseren Verständnis des PPB werden hier die biologischen Daten der Tumore der Klinik und der Endergebnisse gesammelt und weiter untersucht (International Pleuropulmonary Registry 2015).

Morphologie

Histopathologisch findet man beim PPB neben primitiven blastomatösen Bereichen ein malignes mesenchymales Stroma mit pluripotenten Eigenschaften. Durch die pluripotente Eigenschaft des Gewebes existieren verschiedene mesenchymale Differenzierungsmöglichkeiten, welche als Rhabdomyo-, Chondro-, Osteo- oder Liposarkom-Komponente auftreten können (Indolfi et al. 2000). Die Epithelzellen des PPB sind benigne (Manivel et al. 1988). Das PPB kann entweder intrapulmonal oder extrapulmonal unter Einbeziehung der Pleura, des Mediastinums oder des Diaphragmas lokalisiert sein (Indolfi et al. 2000), wobei eine extrapulmonale Manifestationen mit einer schlechteren Prognose assoziiert zu sein scheint (Indolfi et al. 2007). Die Hypothese, dass der Tumor vom splanchnopleuralen oder somatopleuralen Mesoderm zu stammen scheint, würde die pluripotenten Eigenschaften, das fehlende maligne Potential des Epithels und die unterschiedliche Lage in der Thoraxhöhle erklären (Manivel et al. 1988).

Klassifikation des PPBs

Nach Dehner et al. (1995) wird der Tumor in drei histopathologische Typen eingeteilt:

- Typ I PPB ist ein ausschließlich zystischer Tumor
- Typ II PPB besteht aus einem zystischen und einem soliden Anteil
- Typ III PPB ist ein rein solider Tumor

Typ I PPBs können aus unifokalen Zysten, multilokulären Zysten oder multifokalen Zysten bestehen. Die Zysten sind in den peripheren Lungenabschnitten lokalisiert und können außerdem in der viszeralen Pleura vorkommen. Das Stroma besteht aus einem benignen Epithel und primitive Mesenchymzellen (Priest et al. 2009). Die soliden Anteile der Typ II und Typ III PPBs können aus blastomatösen Arealen, die von einem lockeren Mesenchym umgeben sind, Inseln von teils atypischem Knorpel sowie rhabdomyosarkom-artigen Anteilen und anaplastischen Zellen, die vereinzelt oder in Verbänden vorkommen können, bestehen (Taube et al. 2006).

Prognose der PPB

Das Typ I PPB ist prognostisch günstig und metastasiert nicht. Hingegen sind Typ II und III PPBs aggressive Tumore, die mit Metastasen und einer schlechten Prognose assoziiert sind. Als Metastasierungsorte wurden u.a. das ZNS (Priest et al. 2007), Knochen, Leber, Nebennieren und Ovarien genannt (Priest et al. 1997).

In der Arbeit von Priest et al. (1997) wurden außerdem häufige Symptome, die durch das PPB hervorgerufen werden, angegeben. Hierzu zählen u. a. Atembeschwerden, Husten, Fieber, Thoraxschmerzen, abdominelle Schmerzen und Unwohlsein. Doch die durch das PPB hervorgerufenen Symptome werden häufig fehlinterpretiert und als Pneumothorax oder Infektion der oberen Atemwege gedeutet (Indolfi et al. 2007).

Das mittlere Alter bei Diagnosestellung beträgt bei Typ I zehn Monate, bei Typ II 34 Monate und bei Typ III 44 Monate. Die 5-Jahres-Überlebensrate vom PPB liegt bei 45%. Näher betrachtet liegt die 5-Jahres-Überlebensrate vom Typ I PPB bei 83% und im Unterschied dazu vom Typ II und Typ III PPB bei 42% (Priest et al. 1997). Da es sich beim Typ III PPB sowohl klinisch als auch biologisch um die aggressivere Form des PPB (Dehner et al. 2015) handelt, sollten Typ II und Typ III PPBs dennoch getrennt betrachtet werden. Nach der kürzlich veröffentlichten Fallstudie mit 350 Fällen durch Messinger et al. (2015) existieren zwischen Typ II

und III deutliche Unterschiede bzgl. Prognose und Überlebenswahrscheinlichkeit. So wird die Überlebenswahrscheinlichkeit vom Typ II PPB im Vergleich zu Typ III PPB signifikant höher eingestuft. Die Tatsache, dass zum Zeitpunkt der Diagnose der Tumor oftmals inoperabel ist, trägt dazu bei, dass bereits zwei Jahre nach Diagnosestellung nahezu 70% der Patienten an den Folgen des PPB verstorben sind (Dehner et al. 2015). Die Therapie des PPB besteht in Abhängigkeit des Stadiums aus Tumoresektion, Chemotherapie und Strahlentherapie. In manchen Fällen ist im Vorfeld eine neoadjuvante Chemotherapie zur Tumormassenreduktion notwendig, wenn der Tumor aufgrund der Größe inoperabel ist. (International Pleuropulmonary Registry 2015). Die Tatsache, dass es beim PPB zum frühen Auftreten von Rezidiven und Metastasen kommt, macht deutlich, dass es sich um einen aggressiven Tumor handelt. Fast alle Rezidive treten in den ersten 24 Monaten nach Diagnose auf (Indolfi et al. 2007).

Nach heutigem Wissensstand sind Typ I, II und III PPB Stufen im Prozess der Tumorprogression (Dehner et al. 2015). Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer Progression von einem weniger aggressiven Typ zu einem aggressiveren Typ. Typischerweise kommt es dabei zu einer Progression vom Typ I zu Typ II oder Typ III PPB oder vom Typ II zum Typ III PPB (Dehner et al. 2015). Eine Regression vom Typ II oder Typ III PPB wurde bisher nicht beobachtet. Dieser Übergang vom Typ I PPB zum Typ II PPB und im weiteren Progress zu Typ III PPB führt zu einer zu morphologischen Veränderungen und korreliert zum anderen in Abhängigkeit vom Alter mit einer schlechteren Prognose. (Dehner et al. 2015).

Nach dem Stand der aktuellen Forschung existiert neben dem klassischen Typ I PPB auch noch das Typ Ir PPB. Dabei steht das „r“ für regress, was bedeutet, dass es zu einer Regression des Typ I PPB kommt und keine Progression zum Typ II und III PPB zu erwarten ist (Hill et al. 2008).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Prognose der PPBs von der Lokalisation des Tumors, dem histologischen Tumortyp und dem mittleren Alter bei Diagnose (Dehner et al. 2015) sowie von Tumorstadium und Metastasierungen abhängig ist.

Genetische Veränderungen

Bisher existiert nur eine limitierte Anzahl von publizierten genetischen Untersuchungen (Karyotypisierung, Sequenzierung, CGH und FISH), die komplexe genetische Veränderungen aufzeigen. Hill et al. (2009) haben in elf Fällen des familiären PPB-Syndroms erstmals eine Mutation im DICER1 Gen auf Chromosom (Chr.) 14q nachgewiesen. Slade et al. (2011) zeigen in ihrer Studie, dass sowohl familiäre PPBs als auch sporadisch auftretende PPBs Mutationen im DICER1 aufweisen. Nach der Auffassung der Autoren Slade et al. (2011) soll die

Mutation im DICER1 Gen eine entscheidende Erklärung der PPBs sein. In der von Pugh et al. (2014) veröffentlichten Studie konnte mittels Exom-Sequenzierung beim PPB in zwölf Fällen eine Keimbahnmutation, in drei Fällen eine somatische „loss-of-function“ Mutation und in allen 15 Fällen eine somatische missense Mutation der RNase IIb Domäne im DICER1 Gen nachgewiesen werden.

Zu den ebenfalls häufig nachgewiesenen genetischen Veränderungen zählen Zugewinne von Chromosom 8 (Priest et al. 1996, Vargas et al. 2001), Trisomien von Chromosom 2 (Sciot et al. 1994, Yang et al. 1997) und Verluste von Chromosom 17p (Vargas et al. 2001, Kelsey et al. 1997).

Zielsetzung der Arbeit

Ein Ziel dieser Arbeit war, mit Hilfe der CGH chromosomale Aberrationen zu identifizieren, um daraus Rückschlüsse auf die Tumorgenese zu erhalten. Weiterhin sollten durch Anwendung der FISH die Fälle weiter untersucht werden, bei denen relevante genetische Aberrationen nachgewiesen werden konnten.

Im Detail soll besondere Aufmerksamkeit folgenden Fragen zugewandt werden:

- Welche genetischen Veränderungen sind bisher beim PPB bekannt?
- Welche Unterschiede der Ergebnisse dieser Arbeit ergeben sich zu den bisher publizierten Arbeiten?
- Existieren genetische Unterschiede zwischen Typ II und III PPBs?

2 Material

2.1 Tumorgewebe

Das Tumormaterial stammt aus dem Archiv der Sektion für Kinderpathologie der Universität Kiel, Kindertumorregister der GPOH. Die untersuchten Tumore wurden von 1982-2002 aufgenommen und klassifiziert. Der größte Teil der Patienten wurde im Rahmen der Cooperativen Weichteilsarkom-Studie (CWS) der Deutschen Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) behandelt. Entsprechende Ethikvoten der Studien liegen vor. Einverständniserklärungen der Patienten bzw. der Erziehungsbevollmächtigten für wissenschaftliche Untersuchungen am Tumorgewebe wurden im Rahmen der jeweiligen Studien eingeholt. Es wurden insgesamt 16 PPBs der Lunge untersucht, bei denen acht zum weiblichen und acht zum männlichen Geschlecht zuzuordnen waren, entsprechend einem Verhältnis von 1:1. Nach der Klassifikation nach Dehner gehörten zwölf der PPBs zum Tumorsubtyp III, vier zum Tumorsubtyp II und keine Probe zum Tumorsubtyp I. Sieben der männlichen und fünf der weiblichen Proben wurden dem Subtyp III, eine der männlichen und drei der weiblichen Proben dem Subtyp 2 zugeordnet. Das Tumormaterial wurde in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet und für die CGH und FISH aufgearbeitet. Ergänzende klinische Daten zu den Tumoren lagen nicht vor.

In der nachfolgenden Abbildung 1 ist die Verteilung der 16 untersuchten Fälle bzgl. Geschlecht und Tumorsubtyp als Säulendiagramm dargestellt.

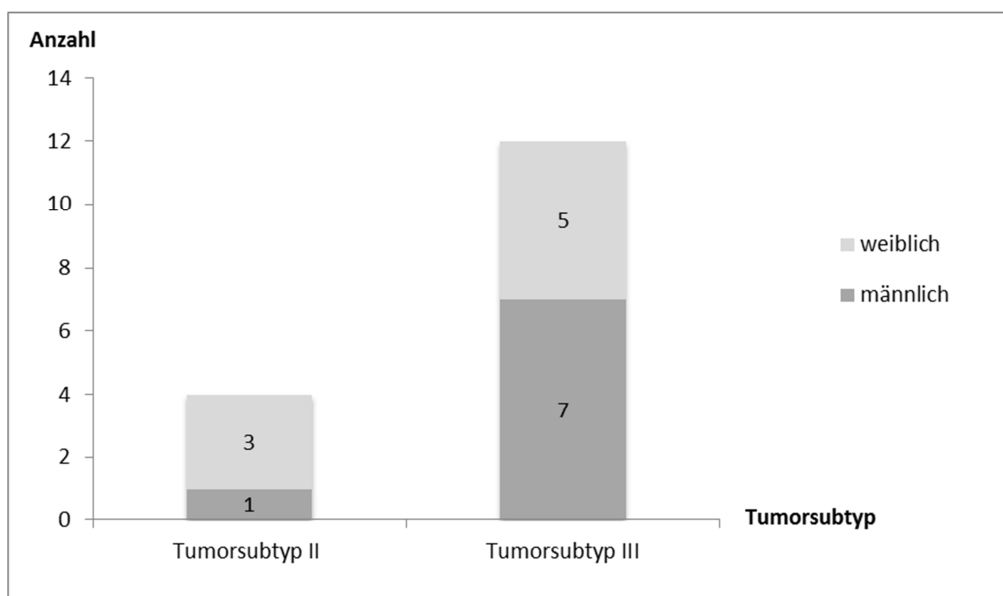


Abbildung 1: Verteilung nach Geschlecht bezogen auf Tumorsubtyp II und III

2.2 Arbeitsgeräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

In den nachfolgenden Tabellen sind die verwendeten Arbeitsgeräte, Materialien sowie die Chemikalien, Reagenzien, Kits und Substrate samt der Bezugsquellen aufgeführt, die für die CGH und FISH Analyse benötigt wurden.

Tabelle 1: Verwendete Arbeitsgeräte

Arbeitsgeräte	Firma
Aufnahmeschrank für Wasservollentsalzungspatronen	Fa. Miele
Brutschrank	Fa. Memmert, Schwabach
CDD-Kamera	Fa. JAI Corporation Virginia, USA
Diamantschreiber	Fa. Roth, Karlsruhe
Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2)	Fa. Carl Zeiss, Jena
Gelelektrophorese-Apparatur	Fa. Bio-Rad, München
Gelelektrophoresekammer	Fa. MWG Biotech, Ebersberg
Heizplatte	Fa. Ikamag, Staufen
Kühlplatte	Fa. Medite, Burgdorf
Kühlschrank Premium no-frost	Fa. Liebherr
Laborwaage	Fa. Sartorius, Göttingen
Laborwecker	Fa. Roth Karlsruhe
Messzylinder	Fa. Assistent, Sondheim
Mikroskopleuchte: Mikroskop Illuminating System HBO 100	Fa. Zeiss, Jena
Mikrowelle Sharp R 7180	Fa. Sharp, (USA)
Objektiv 100x/1,4 oil Plan Apochromat	Fa. Zeiss, Jena
Patrone für Deionisierung des Wassers	Fa. Walter, Augsburg
PC, ausgestattet mit der ISIS-3-Software	Fa. MetaSystems GmbH, Altus- heim
Ph-Meter	Fa. WTW, Weilheim
Pipetten	Fa. Eppendorf, Hamburg
Schüttler	Fa. Edmund Bühler, Tübingen
Standküvetten	Fa. Roth, Karlsruhe

Arbeitsgeräte	Firma
Thermocycler (PTC 2000)	Fa. MJ Research Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf
UV-Photometer	Fa. Hoefer, San Francisco, Kalifornien, USA
UV-Tisch mit Fotodokumentation	Fa. Kaiser, Buchen
Vorschaltgerät ebq 100 isolated für Quecksilberleuchten	Fa. Zeiss, Jena
Vortex	Fa. Janke und Kunkel, Staufen
Wasserbad	Fa. Köttermann/ GFL, Uetze/Hänigsen
Zentrifuge	Fa. Eppendorf, Hamburg

Tabelle 2: Verwendete Materialien

Materialien	Firma
Deckgläschen, eckig: 24x60mm, 24x40mm	Fa. Menzel, Braunschweig
Metaphasen Objektträger	Fa. Vysis, Stuttgart
Microscope Cover Glasses 18x18mm	Fa. Menzel, Braunschweig
Microscope Cover Glasses 25x50mm	Fa. Menzel, Braunschweig
Pasteur Pipette, Länge 150mm	Fa. Brand Wertheim
Reaktionsgefäße (1,5ml 39x10 mm)	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Sterile Pipettenspritzen	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Sterile Falcon-Röhrchen: 15ml, 50ml	Fa. Greiner, Nürtingen
Super Frost® Plus- Objektträger (25x7x1 mm)	Fa. Menzel, Braunschweig

Tabelle 3: Eingesetzte Chemikalien Reagenzien, Kits und Substrate

Chemikalien, Reagenzien, Kits, Substrate	Firma
Agarose	Fa. Sigma, München
Bioprime DNA Labelling System	Fa. Invitrogen TM Kalifornien, USA
Zitronensäure-Monohydrat	Fa. Merck, Darmstadt
Cot-1 DNA	Fa. Roche Diagnostics GmbH,

Chemikalien, Reagenzien, Kits, Substrate	Firma
	Mannheim
DAPI/ Antifade (Vectashield)	Fa. Vector, Burlingame, Kalifornien, USA
DNA-Längenstandards: 1kb DNA Ladder	Fa. Promega, Mannheim
EDTA	Fa. Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Fa. Merck, Darmstadt
Ethanol (70, 85, 96, 100%)	Fa. Merck, Darmstadt
Fixogum	Fa. Marabu
Formamid	Fa. Merck, Darmstadt
Hybridisierungspuffer	Fa. Kreatech, Holland
HCl	Fa. Meck
Immersionsöl für die Mikroskopie	Fa. Merck, Darmstadt
KCL	Fa. Merck, Darmstadt
TM SE 8 (D8Z1) (Satellite Enumeration) FISH Probe	Fa. Kreatech (Niederlande)
IGF1-R (15q26)/15q11 FISH Probe FISH Probe	Fa. Kreatech (Niederlande)
Ladepuffer	Fa. Promega, Mannheim
Master Mix (30%)	Fa. Merck, Darmstadt
MiniElute DNA Extraction Kit	Fa. Quiagen, Hilden
NaCl	Fa. Merck
Proteinase K	Fa. Qiagen, Hilden
QIAmp DNA Mini Kit, Tissue Protocol	Fa. Roche Diagnostics, Mannheim
Random Priming	Invitrogen, Labelling System, Carlsband, USA
Spectrum Green dNTP/- Red dNTP,	Abbott, Deutschland
Spectrum Red Control DNA	Abbott, Deutschland
SSC Puffer: 20x	Fa. Sigma, München
Tween 20	Fa Merck, Darmstadt
Xylol, 100%	Fa. Merck, Darmstadt

3 Methoden

Im nachfolgenden Abschnitt werden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden beschrieben. Zum einen handelt es sich dabei um die komparative genomische Hybridisierung (CGH) und zum anderen um die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).

3.1 Komparative genomische Hybridisierung (CGH)

Die CGH ist eine molekular-zytogenetische Methode, die durch eine Zweifarben-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, in einem einzigen Hybridisierungsversuch, einen Überblick über mögliche Chromosomenaberrationen liefert (Kallioniemi et al. 1994). Insbesondere ist die CGH für die genetische Analyse von Tumoren von großem Nutzen. Bis zum heutigen Tage konnte mit Hilfe der CGH eine Vielzahl von Chromosomenaberrationen bei unterschiedlichen Tumorentitäten identifiziert werden. Die CGH wurde von Kallioniemi et al. (1992) und Du Manoir et al. (1993) unabhängig voneinander entwickelt und dient dem Nachweis von genetischen Imbalancen und wird heute als Screeningmethode eingesetzt.

Erfasst werden Verluste, Zugewinne, Deletionen und Amplifikationen (Kallioniemi et al. 1992). Hingegen werden balancierte Translokationen oder Inversionen nicht detektiert. Auch Punktmutationen und umschriebene Veränderungen innerhalb des Gens werden mittels CGH nicht nachgewiesen (Kallioniemi et al. 1994). Ferner liegen keine Informationen über den aktuellen Ploidiegrad vor, da nur relative genetische Veränderungen erfasst werden können (Speicher et al. 1994).

Bei dem zu untersuchenden Material sollte es sich um repräsentatives Tumorgewebe mit einer hohen Anzahl maligner Zellen handeln. Liegt eine zu hohe Anzahl von normalen Zellen vor, sinkt die Detektionsrate der Imbalancen innerhalb des Genoms durch die CGH signifikant (Kallioninemi et al. 1994).

Es existieren zwei unterschiedliche CGH-Methoden. Zum einen ist das die Metaphasen-CGH und zum anderen die Array-CGH. Bei der Metaphasen-CGH wird die zu untersuchende Tumor-DNA und Kontroll-DNA mit entsprechendem Fluoreszenzfarbstoff entweder grün oder rot markiert und im Verhältnis 1:1 auf denaturierten Kontrollmetaphasen aufgetragen und hybridisiert. Ist die Tumor-DNA an einer Stelle überexprimiert, so erscheint das Chromosom / die Region in der Farbe der Tumor-DNA, also grün. Liegt dagegen ein Verlust an Tumor-DNA vor, so erscheint das Chromosom / die Region in der Farbe der Referenz-DNA, also rot. Die Metaphasenchromosomen werden anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht und mit Hilfe einer speziellen Software analysiert. Ein Nachteil der Metaphasen-

CGH besteht darin, dass die Sensitivität dieser Technik limitiert ist und von der Kopienzahl der veränderten Region abhängt. Durch Joos et al. (1993) konnte eine 20-fache Amplifikation mit einer Auflösung von 100 kbp nachgewiesen werden. Deletionen wurden in der Größenordnung von zehn (Du Manoir et al. 1995) bis 20 mbp (Kallioniemi et al. 1992) detektiert.

Bei der Array CGH liegt im Gegensatz zur Metaphasen CGH die Ziel-DNA nicht in Form ganzer Metaphasenchromosomen vor, sondern es handelt sich um einen Glasobjektträger, auf dem sich in einem Raster fixierte und definierte DNA Fragmente (Array) befinden. Ein weiterer Unterschied zur Metaphasen CGH liegt darin, dass mittels der Array CGH auch kleine Deletionen oder Duplikationen von weniger als 100 kbp detektiert werden können (Murken J. et al. 2006).

In der nachfolgenden Abbildung ist die Metaphasen CGH Methode nochmals schematisch dargestellt.

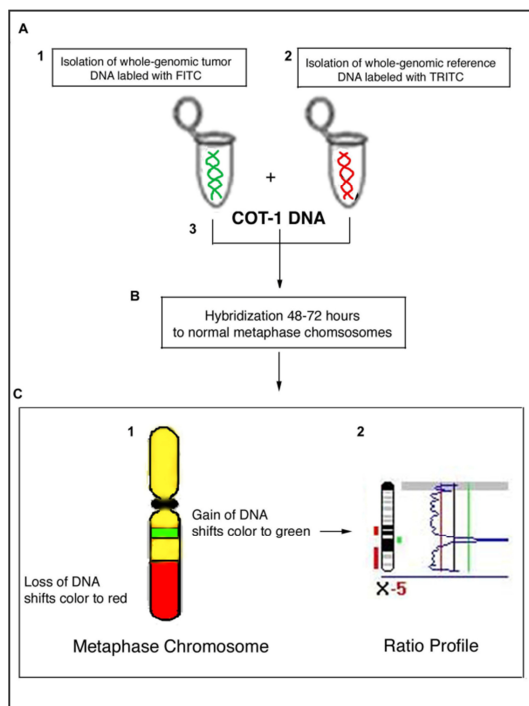


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Metaphasen CGH

- A) Die Tumor-DNA ist grün markiert/
Die Referenz-DNA ist rot markiert*
- B) Hybridisierung am Metaphasenchromosom / Verluste sind grün und Zugewinne rot markiert*
- C) Errechnetes Ratio-Profil der CGH*

Quelle: Nicole McNeil et al 2003

Permission requested from the Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.

3.1.1 DNA-Isolierung aus paraffineingebettetem Tumormaterial

Die DNA-Isolierung erfolgte aus paraffineingebettetem Tumorgewebe. Dazu wurden von jedem Fall sechs Gewebsschnitte à 10µm Schnittdicke angefertigt. Eine Entparaffinierung wurde erreicht, indem die Proben zwei Mal für zehn Minuten mit 1.000µl Xylol und zwei Mal für zehn Minuten mit 1.000µl Ethanol inkubiert und bei 13.000 upm für zehn Minuten zentri-

fugiert wurden. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und die Proben wurden im Brutschrank bei 60°C über Nacht getrocknet.

Zur Auflösung der Zellmembran wurden die Proben am nächsten mit Tag 200µl DNA Isolierungspuffer (ATL) und 40µl Proteinase K angereichert. Der Ansatz wurde dann im Vortex vermischt. Anschließend wurden die Proben im Thermomixer über Nacht bei 56°C und 850 upm erhitzt.

Am darauffolgenden Tag wurden die Proben zur Inaktivierung der Proteinase K im Thermomixer für acht Minuten bei 95°C inkubiert und dann bei 13.500 upm für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert. Anschließend wurden den Proben 200µl AL-Puffer zugegeben, im Thermomixer bei 70°C gemischt und für zehn Minuten bei 14.000 upm zentrifugiert. Dann erfolgte eine fünfminütige Inkubation mit 200µl Ethanol (100%). Die Proben wurden auf Filtersäulen gesetzt und bei 10.000 upm zentrifugiert. Die Filter wurden anschließend in eine neue Säule gesetzt, der Durchlauf verworfen und erneut bei 10.000 upm zentrifugiert. Danach wurden die Filter mit 500µl AW1 Puffer versetzt und für drei Minuten bei 14.000 upm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde erneut verworfen. Anschließend wurde 500µl AW2 Puffer auf die Filter gegeben, für drei Minuten bei 14.000 upm zentrifugiert und der Durchlauf erneut verworfen.

Um die DNA aus den Filtern herauszulösen, wurden die Filter verkehrt herum in ein neues Gefäß gegeben, mit 50µl AE Puffer versetzt und bei 10.000 upm für zwei Minuten zentrifugiert. Es erfolgte eine Wiederholung dieses letzten Schrittes. Auf diese Weise wurden 100µl isolierte DNA gewonnen.

3.1.2 DNA-Konzentrationsbestimmung mittels Photometer

Um die Reinheit der DNA zu bestimmen, kann die DNA-Konzentration mittels Photometer bei 260nm, dem Absorptionsmaximum der DNA, gemessen werden. 100µl Aqua ad iniectabilia wurden als Referenzwert verwendet. Dazu wurden 5µl DNA mit 95µl Aqua ad iniectabilia verdünnt (VF 20: 5µl + 95µl Aqua ad iniectabilia) und im Photometer gemessen. Es wurde jeweils bei 260nm und bei 280nm gemessen. Um den Reinheitsgrad der DNA-Lösung zu bestimmen, wurde der Quotient aus $OD_{260/280}$ (OD_{260} : optische Dichte der DNA, OD_{280} : optische Dichte von Proteinen) bestimmt. Der errechnete Wert sollte bei 1,7- 1,95 liegen.

3.1.3 Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Agarose-Gel-Elektrophorese erfolgte für 45 Minuten bei 109 Volt.

Die Agarose-Gel-Elektrophorese dient dazu, DNA-Fragmente von unterschiedlicher Größe in einem elektrischen Feld ihrer Länge nach aufzutrennen und zu sortieren. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wandern durch das Agarose-Gel, das in einer Salzlösung liegt, Richtung Kathode. Zu beachten ist, dass sich kleine DNA-Fragmente schneller bewegen als große DNA-Fragmente (Murken et al. 2006 S. 101).

Zur Herstellung des Agarose-Gels werden 0,75 g Agarose zusammen mit 50 ml 1-fach TBE Puffer (5ml 10-facher TBE Puffer auf 45ml Aqua bidest) erhitzt und so in Lösung gebracht. Nach Abkühlung wurden dem Gel 7,5µl fluoreszierendes Ethidiumbromid zugegeben, was der Anfärbung der DNA-Fragmente dient. Das Gel wurde anschließend in eine Gelkammer gegeben und war nach ca. 20 Minuten auspolarisiert.

Die DNA-Fragmentlänge sollte zwischen 500-10.00 bp liegen. 5µl DNA einer Probe wurden zusammen mit 3µl DNA Loading Puffer in eine Geltasche gegeben. Um die Länge der DNA-Fragmente zu bestimmen wurde parallel ein DNA-Längenstandard aus 3 µl Loading Puffer, 5µl Aqua ad iniectabilia und 2 µl Standard (100 BP + 500BP) in eine Geltasche pipettiert. Die DNA-Fragmente wurden anschließend unter einem UV-Gerät kontrolliert und mit der integrierten Kamera fotodokumentiert.

Die nachfolgende Abbildung 3 zeigt eine exemplarische Darstellung einer Gel-Elektrophorese.

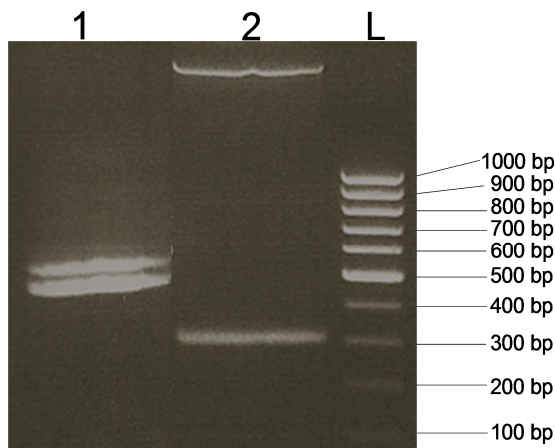


Abbildung 3: Beispiel einer Gel-Elektrophorese

Rechts ist ein Längenstandard aufgetragen, der Fragmente von 100-1000 BP enthält. In Spur 1 sind zwei Banden zu erkennen, die eine Länge von um die 550 bp aufweisen. Auf Spur 2 erkennt man eine Bande, bei ca. 300 bp und ein sehr langes Fragment.

Quelle: Eigene Darstellung

3.1.4 Random Priming mit direkt markierten Nukleotiden

Nach Denaturierung der Tumor- und Referenz-DNA in ihre Einzelstränge bindet ein Random Primer, bestehend aus wenigen Nukleotiden, an die entstandenen Einzelstränge. Für die anschließende DNA-Polymerisation wurde das MiniElute DNA-Extraction-Kit (Quiagen) ver-

wendet. Während der DNA-Polymerisation kommt es zur Bindung von mit Farbstoff markierten Nukleotiden an die Tumor- und Referenz-DNA. Dazu wurden 1µg DNA mit Aqua dest. auf ein Volumen von 24ml verdünnt und 20µl Random Primer (Polymerase) hinzugegeben und kurz an zentrifugiert. Zur Denaturierung wurde der Ansatz für fünf Minuten in einem 95°C heißen Wasserbad inkubiert. Um den Vorgang zu beenden, wurde der Ansatz sofort auf Eis gestellt. Im Dunkeln wurden 5µl direkt markierte dNTPS und 1µl DNA Klenow Fragment Polymerase hinzugegeben. Der Ansatz wurde kurz an zentrifugiert, in Alufolie eingepackt und im Brutschrank über Nacht bei 37°C inkubiert.

Um die Polymerisation zu stoppen, wurde den Proben am nächsten Morgen 5µl Stop-Puffer zugegeben. Durch die Zugabe von Aqua dest. und wiederholte Zentrifugierung bei 13.000 upm wurden die Proben von ungebundenen gefärbten Nukleotiden befreit. Auf diese Weise wurden 50µl markierte Tumor- bzw. Referenz-DNA gewonnen.

3.1.5 Hybridisierung

Es wurden je 50 µl (1µg) Random primed Tumor-DNA, gegengeschlechtliche Random primed Referenz-DNA, 30µl (300µg) Cot-1-DNA (zur Bindung am Zentromer), 420µl Ethanol (100% -20°C) sowie 13µl Natriumacetatpuffer (3M, ph 4,8) zunächst gevortext, dann in Alufolie verpackt und dann für mindestens 30 Minuten bei -80°C gefällt. Nachfolgend wurde der Ansatz für 30 Minuten bei 4°C und 14.000 upm zentrifugiert und der Überstand abpipettiert.

Der entstandene Pellet wurde dann in 800µl Ethanol (70%) für 45 Minuten im Thermomixer bei 1.400 upm und 45°C für zehn Minuten inkubiert. Der Überstand wurde abpipettiert. Dann wurde der Pellet für ca. 30 Minuten unter dem Abzug getrocknet. Anschließend wurden dem Pellet 6µl deionisiertes Formamid hinzugegeben und bei 14.000 upm und 37° C an zentrifugiert. Die Hybridisierung der CGH-Sonden erfolgte auf Metaphase-Objektträgern (OT), die zunächst denaturiert werden mussten. Bestandteile der Denaturierungslösung waren:

- 5ml 20 x SSC Puffer (ph7),
- 5ml NaH₂P0₂ (ph7),
- 5ml Aqua bidest,
- 35ml deionisiertes Formamid

Die Denaturierungslösung wurde mittels 2molarer HCL auf einen ph-Wert von 7 eingestellt und im entsprechenden Objektträgergefäß im Wasserbad auf eine Temperatur von 69°C er-

hitzt. Die OT wurden für zwei Minuten in die Denaturierungslösung gegeben und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70% bis 100% und einer Temperatur von -20°C für jeweils fünf Minuten dehydriert. Um die CGH-Sonden zu dehydrieren, wurden die Proben für sechs Minuten bei 78°C mit $7\mu\text{l}$ Master Mix (30%) erhitzt und danach im Brutschrank bei 37°C für 30 Minuten hybridisiert und anschließend zentrifugiert. $13\mu\text{l}$ des DNA-Mixes wurden auf markierte Kästchen eines OT zur Hybridisierung aufgetragen. Das entsprechende Feld wurde dann mit einem Deckgläschen bedeckt und mit Fixogum verschlossen, um ein Verdunsten zu verhindern. Dann wurden die OTs für drei Tage bei 37°C im Dunkeln in einer feuchten Kammer inkubiert.

3.1.6 Waschen

Zunächst wurden zwei Küvetten mit Lösung A (75 ml 50-prozentiges Foramid, 15ml 20-fach SSC Puffer, 60 ml Aqua bidest, ph 7) und vier Küvetten mit Lösung B (40ml 20-fach SSC Puffer, 360 ml Aqua bidest, ph7), im Wasserbad auf 42°C erwärmt. Das Fixogum wurde dann durch zweiminütiges Einweichen in Waschlösung B entfernt. Anschließend wurden die OT für je 3x5 Minuten in Waschlösung A gespült. Nach Entfernung der Deckgläschen wurden die OT für je 3x5 Minuten mit Waschlösung C (60ml 20-fach SSC (Sodium Citrat Standard) Puffer, 240 ml Aqua bidest, $300\mu\text{l}$ Tween 20, ph7), die ebenfalls nach Erwärmen im Wasserbad eine Temperatur von 42°C erreicht hatte, gespült. Anschließend wurden die OT für 20 Minuten bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss getrocknet. Zum Sichtbarmachen der Zellkerne wurden ein Tropfen ($20\mu\text{l}$) DAPI-Antifade (4',6-Diamin-2-phenylindol) pro Feld aufgetragen und mit einem Deckglas versehen. Die Fotodokumentation erfolgte innerhalb von zwei Wochen. Bis dahin wurden die OT im Dunkeln bei 4°C gelagert.

3.1.7 Auswertung der CGH

Die Auswertung der CGH erfolgte an einem speziellen Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Zeiss Jena) mit Hilfe der ISIS-3-Software, einem digitalen Bildanalyseystem.

Zum Aufsuchen gut erkennbarer Metaphasenchromosomen wurde zunächst eine 10-20-fache Vergrößerung und der Dapi Filter gewählt. Als geeignet galten Metaphasen, deren Chromosomen sich nicht überlagerten und die eine gleichmäßig intensive Anfärbung der drei Farbstoffe (Dapi, Rot und Grün) aufwiesen. Ferner sollte der Hintergrund gleichmäßig fluoresziert sein. Anschließend wurde eine 100-fache Vergrößerung eingestellt und zum Sichtbarmachen der Fluoreszenzfarbstoffe nacheinander die Filter (Rot, Grün und Dapi) gewählt. Mit Hilfe der

an das Mikroskop gekoppelten CCD-Kamera wurde jeweils ein Bild pro Filter aufgenommen und gespeichert. Zur besseren Identifizierung der Banden wurde eine inverse Darstellung gewählt und das Dapi-Bild digital in Graustufen umgewandelt. Nach Begradigung und Trennung der Chromosomen sowie entsprechender Hintergrundkorrektur erfolgte für jede Metaphase eine Karyotypisierung mit Hilfe des Dapi-Filters. Pro Fall wurden 20 Metaphasen analysiert und zu einem Summenkaryogramm gemittelt. Dann wurde für jedes Chromosom ein CGH-Profil erstellt und ein Ratioprofil errechnet. Als Kontrolle wurde pro Fall eine zur Tumor-DNA gegengeschlechtliche Referenz-DNA für die CGH gewählt und beide gegeneinander hybridisiert. Bei erfolgreicher CGH leuchtete, dem Geschlecht der Referenz-DNA entsprechend, entweder das X- oder das Y-Chromosom rot.

Von der Auswertung und Beurteilung ausgeschlossen war die Zentromerregion, die Telomerregion und die p Arme der akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21, 22 und Y.

In der nachfolgenden Abbildung 4 ist ein CGH-Profil mit errechnetem Ratio-Profil eines untersuchten Falles beispielhaft erklärt.

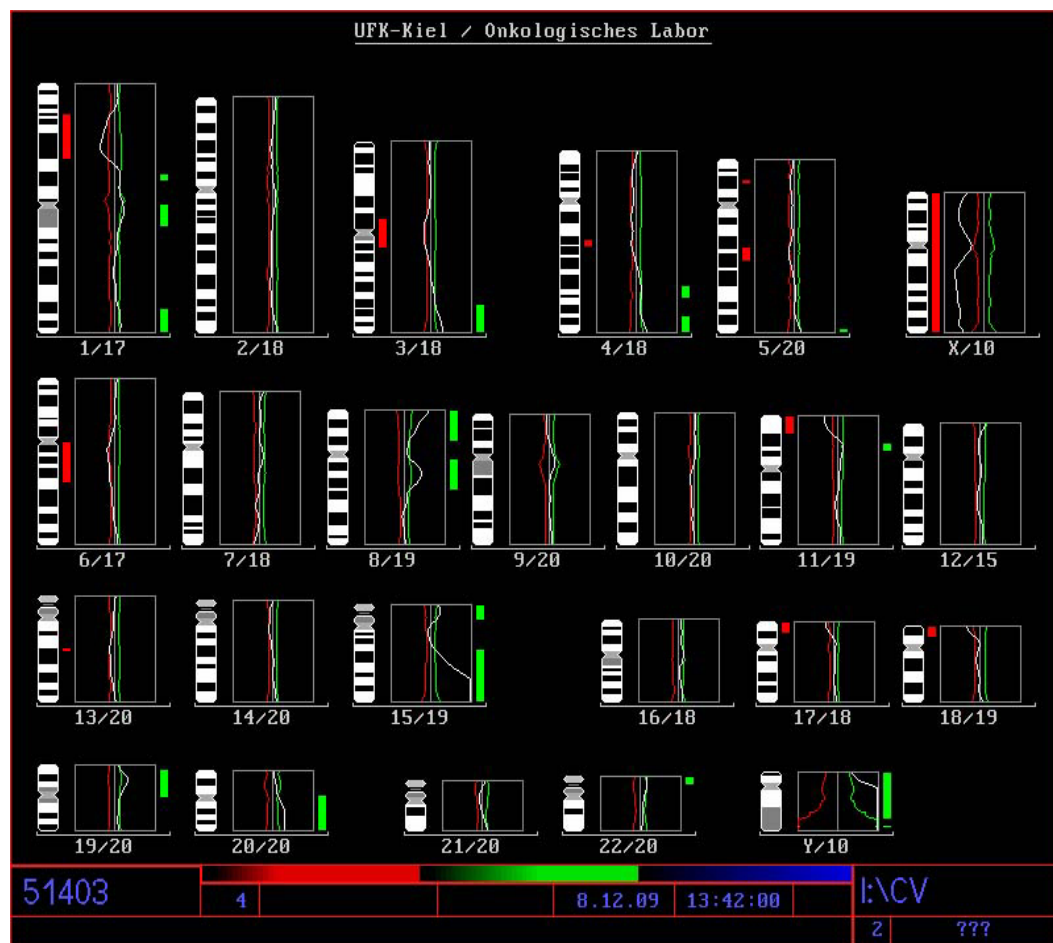


Abbildung 4: Darstellung eines CGH-Profiles

Die erste Zahl im CGH-Profil steht für die Chromosomennummerierung, die zweite Zahl für die Anzahl der Chromosomen, die aus den 20 Metaphasen auswertbar waren. Rechts neben dem Bandenmuster der Chromosomen ist das Grün/Rot-Ratio-Profil des jeweiligen Chromosoms durch eine Kurve dargestellt. Die vertikale graue Linie stellt ein Gleichgewicht des roten und grünen Fluoreszenzfarbstoffes und somit der Tumor- und Referenz-DNA dar und gibt den Ratiowert von 1,0 an.

Die grüne Linie gibt den Ratiowert von 1,25 und die rote Linie den Ratiowert von 0,75 an. Bei Unterschreiten des Ratiowertes liegt ein Verlust von Tumor-DNA vor. Dabei wird die rote Linie durch die Kurve überschritten und im entsprechenden Chromosomenbereich wird ein roter Balken angezeigt. Bei Überschreiten des Ratiowertes liegt ein Zugewinn von Tumor-DNA vor. Hier wird die grüne Linie durch die Kurve überschritten und im entsprechenden Chromosomenbereich wird ein grüner Balken angezeigt. Eine Amplifikation liegt vor, wenn der Ratiowert von 1,5 überschritten wird.

3.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die FISH dient dem Nachweis von spezifischen chromosomalen Veränderungen in Metaphase-Chromosomen und Interphasekernen (Andersen et al. 2001). So gelingt es mit dieser molekular-zytogenetischen Methode, spezifische DNA-Sequenzen sowohl auf chromosomaler als auch auf zellulärer Ebene zu identifizieren. Die FISH-Methode hat somit sowohl in der Chromosomendiagnostik als auch der zytogenetischen Diagnostik einen hohen Stellenwert (Ried et al. 1997). Prinzipiell können mit der FISH sowohl numerische Chromosomenaberrationen als auch strukturelle Veränderungen im Genom festgestellt werden. Zur Detektion der Imbalancen im Genom werden unterschiedliche FISH-Sonden eingesetzt, die an spezifischen Zielstrukturen binden. Repetitive Zentromersonden binden repetitive DNA-Sequenzen der Zentromere sowie heterochromatische Bereiche und sowohl Chromosomen als auch numerische Chromosomenaberrationen können identifiziert werden. Lokusspezifische FISH-Sonden binden gezielt an Genen oder DNA-Abschnitten und detektieren strukturelle Veränderungen. Dazu zählen u.a. Inversionen, Translokationen, Deletionen, Amplifikationen und Zugewinne. Im Gegensatz zur CGH dient die FISH nicht zur Detektion genetischer Veränderungen vom gesamten Genom (Kallioniemi et al. 1996), sondern es sollten bereits Informationen über vorhandene DNA-Veränderungen vorliegen, sodass die FISH nicht wie die CGH als Screeningverfahren eingesetzt wird. Wurden aber mittels der CGH Veränderungen im Genom nachgewiesen, können mit lokusspezifischen FISH-Sonden die entsprechenden Gene und Gen-

abschnitte weiter untersucht werden.

Bei der direkten FISH-Methode bindet eine einzelsträngige fluoreszenzmarkierte FISH-Sonde an eine komplementäre DNA-Sequenz. Bei der indirekten FISH ist nicht die Sonde fluoreszenzmarkiert, sondern es sind fluoreszenzmarkierte Antikörper an der Sonde gebunden. In der vorliegenden Dissertation kam ausschließlich das direkte Verfahren zum Einsatz.

Mit der FISH gelingt es, genetische Veränderungen in spezifischen Genen aufzudecken, da ein großer Vorteil der FISH darin besteht, dass sie eine sehr hohe Sensitivität schon für sehr kleine Aberrationen besitzt.

So werden mit lokusspezifischen FISH-Proben genetische Veränderungen in der Größenordnung von 40-200 kbp mittels FISH detektiert. Bei zehn oder weniger kBp versagt jedoch die Methode und die entsprechenden Aberrationen können nicht mehr dargestellt werden (Kallionemi et al. 1996).

In der nachfolgenden Abbildung 5 ist das Prinzip einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung schematisch dargestellt. Damit eine fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde an die Ziel-DNA binden kann, müssen sowohl die Ziel-DNA als auch die fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde einzelsträngig vorliegen.

Die Auftrennung einer doppelsträngigen DNA in ihre Einzelstränge gelingt mit Hilfe der Denaturierung, die thermisch oder proteolytisch erfolgen kann.

In der Abbildung 5 erkennt man, wie nach dem Prozess der Denaturierung die fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde komplementär an die DNA-Zielsequenz bindet. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops kann die erfolgte Hybridisierung im Anschluss nachgewiesen werden.

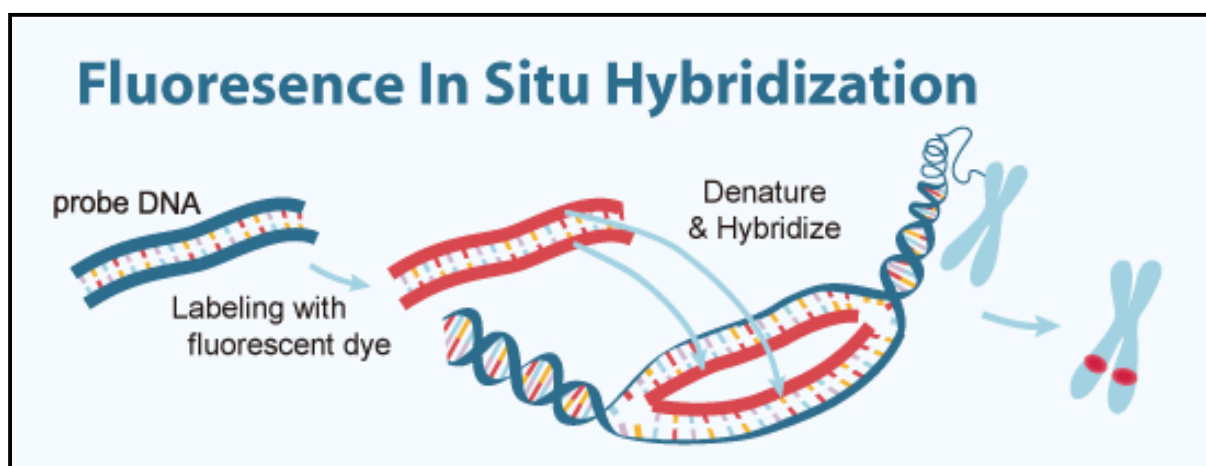


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Quelle: Firma Abnova (2015)

Mit freundlicher Genehmigung der Firma Abnova

3.2.1 Entparaffinierung und Rehydrierung

Zur Entparaffinierung wurden die TMA (Tissue Microarrays) Schnitte, die auf einem Objektträger fixiert waren, jeweils zweimal für 15 Minuten in Xylol inkubiert. Anschließend erfolgte eine Spülung in absteigender Alkoholreihe und eine Rehydrierung in Aqua dest. für jeweils fünf Minuten (2x Ethanol 100%, 1x Ethanol 96%, 1x Ethanol 70%, 1x Aqua dest.).

3.2.2 Thermische Antigendemaskierung

Für die thermische Antigendemaskierung mittels HIER (heat induced epitope retrieval) wurde ein Citratpuffer hergestellt. Hierzu wurden 2,1g Citronensäure-Monohydrat und 0,1g EDTA in 850ml Aqua dest. gelöst. Mittels 2-molarer Natronlauge (NaOH) wurde die Lösung auf einen pH-Wert von 6 eingestellt und mit Aqua dest. auf 1 Liter aufgefüllt. Anschließend wurden die Präparate mit Citratpuffer (pH6) für 20 Minuten in der Mikrowelle erhitzt, um die durch die Paraffinierung entstandenen Proteinquervernetzungen zu lösen.

3.2.3 Proteolytische Antigenmaskierung

Für die proteolytische Antigenmaskierung mittels PIER (proteolytic induced epitope retrieval) wurden die Proben in 1.000ml 0,1 (Einheit) molarer HCL-Lösung mit 10µl Proteinase K (Fermentas) bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte zunächst eine zweimalige Spülung mit Aqua dest. für jeweils fünf Minuten, mit anschließender Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe für ebenfalls jeweils fünf Minuten (1x Ethanol 70%, 1x Ethanol 96%, 3x Ethanol 100%). Dann wurden die Schnitte bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

3.2.4 Sondenanwendung und Hybridisierung

Da es sich bei den verwendeten Sonden der Firma Kreatech um lichtempfindliche Sonden handelt, erfolgte das weitere Vorgehen im Dunkeln. 2µl Sondenverdünnung (7µl Hybridisierungspuffer, 1µl Sonde, 2µl Aqua dest.) wurden auf die TMA-Schnitte aufgetragen. Das Areal wurde mittels Fixogum unter einem Deckgläschen versiegelt. Nach weiteren zehn Minuten und Erstarren des Fixogum erfolgte zur Aufschmelzung der Sonden eine Denaturierung für 10 Minuten bei 95°C. Die anschließende Hybridisierung der Sonden fand bei 37° C im Dunkeln in einer feuchten Kammer statt. Im Anschluss an die Hybridisierung wurde das betroffene Areal an der Unterseite des OT markiert. Nach Entfernung des Fixogum wurde das Deckgläschen vorsichtig abgehoben. Um überschüssige Sonden aus dem Gewebe zu entfernen, wurde

das Gewebe in SSC inkubiert. Dafür wurden die OT in einer Standkuvette für je eine Minute in entsprechender Waschlösung gespült. Zusammenfassend stellen sich die einzelnen Arbeitsschritte wie folgt dar:

- 2x SSC (2-fach konzentriert) bei Raumtemperatur^o für eine Minute
- 1x SSC (2-fach konzentriert) bei 72 °C für eine Minute
- 2x SSC (0,5-fach konzentriert) bei Raumtemperatur für eine Minute
- 2x deionisiertes Wasser bei Raumtemperatur für je eine Minute

Nachfolgend wurden die OT bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss getrocknet. Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurden die OT zuletzt mit VECTASHIELD[®] Mounting Medium with DAPI versehen, mit einem Deckglas bedeckt und bei 4°C unter Lichtausschluss gelagert.

3.2.5 Verwendete Sonden

In der vorliegenden Arbeit wurden für die FISH zwei Sonden verwendet, die beide von der Firma Kreatech (Niederlande) stammen. Zum einen ist das die lokusspezifische IGF1-R (15q26)/15q11 FISH-Probe und zum anderen die für Chr. 8 zentromerspezifische TM SE 8 (D8Z1) (Satellite Enumeration) FISH-Probe. Nachfolgend werden beide verwendeten Sonden näher beschrieben.

IGF1-R (15q26)/15q11 FISH-Probe

IGF1-R (15q26)/15q11 Dual Colour FISH-Probe der Firma Kreatech (Niederlande) bindet an Chromosom 15q26, der Region des IGF1 Rezeptors. Der Genlocus besteht aus 21 Exons und 100kB. Das Gen besteht aus 4.101 Nucleotiden und kodiert für ein Protein bestehend aus 1.361 Aminosäuren (LeRoith et al. 1995).

Bei der IGF1-R FISH-Probe handelt es sich um eine Dual Color Probe, die aus zwei Sonden besteht. Die IGF1-R (15q26) Sonde fluoresziert in rot und ist mit Platinum Bright^{™550} direkt markiert. Sie bindet am IGF1-R Gen auf Chromosom 15q26 und detektiert an diesem Genlocus Deletionen und Amplifikationen. Die IGF1-R 15q/11 Sonde bindet an Chromosom 15q11, fluoresziert in grün und ist mit Platium Bright^{™ 495} direkt markiert. Sie ist in der FISH-Probe enthalten, um die Identifikation des Chromosoms zu erleichtern. Beim Auftreten von zwei roten und zwei grünen Signalen (2R2G) handelt es sich um ein normales Chromosom 15q26 ohne nachzuweisende Amplifikationen oder Deletionen in dieser Region. Liegt

eine Amplifikation im IGF1-R Gen 15q26 vor, treten in der Region mehr als zwei rote Signale auf. In der Kontrolle auf Chromosom 15q11 zeigen sich zwei grüne Signale. Bei einer Deletion treten im Genlokus 15q26 weniger als zwei rote Signale auf. In der Kontrolle auf Chromosom 15q11 erscheinen zwei grüne Signale (1R2G). (Leica Biosystems ((2015)).

In der nachfolgenden Tabelle 4 sind die Signale und Interpretation der IGF1-R (15q26)/15q11 FISH-Probe zusammengefasst.

Tabelle 4: Signale der IGF1-R (15q26)/15q11 FISH-Probe

Quelle: Leica Biosystems (2015)

	Normales Signal	Amplifikation 15q26	Deletion 15q26
Erwartete Signale	2R2G	3+R2G	1R2G

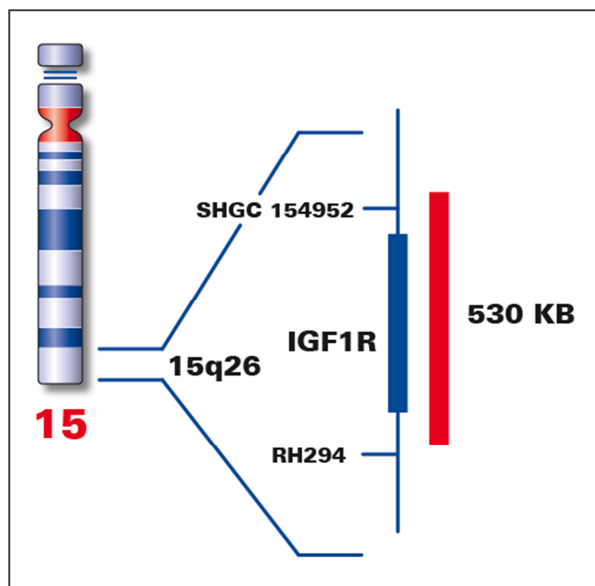


Abbildung 6: Prinzip der Kreatech IGF1-R (15q26)/15q11 FISH-Probe

Quelle: Leica Biosystems (2015)

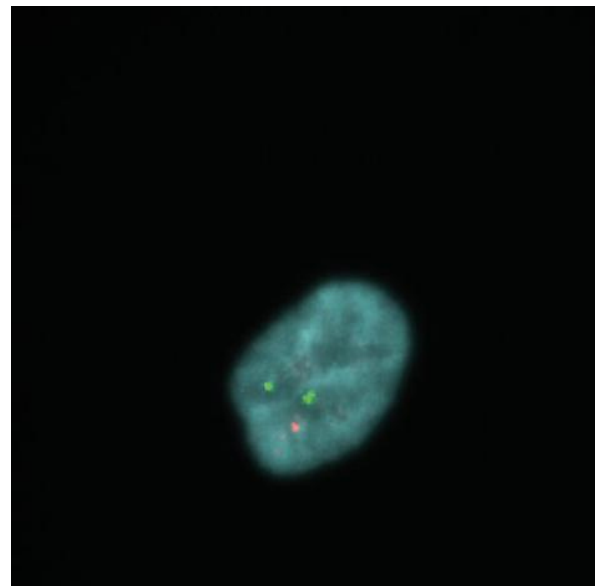


Abbildung 7: Beispielbild der Kreatech IGF1-R (15q26)/15q11 FISH-Probe

Quelle: Leica Biosystems (2015)

Mit freundlicher Genehmigung der Firma Leica Biosystems

Abbildung 6 demonstriert das Prinzip der IGF1-R (15q26)/15q11 FISH-Probe. Auf der Abbildung ist zu erkennen, dass die Sonde im Bereich des IGF1-R Gens auf Chromosom 15q26 bindet und die Sondengröße 530 KB beträgt. Abbildung 7 stellt eine Deletion in der IGF1-R Genregion 15q26 dar. Es sind ein rotes und zwei grüne Signale zu erkennen.

Kreatech™ SE 8 (D8Z1) (Satellite Enumeration) FISH-Probe

Die SE-8-Probe Spectrum green der Firma Kreatech (Niederlande) besteht aus einer markierten Satelliten DNA-Sequenz von Chromosom 8 und Yp12 und detektiert repetitive Sequenzen im perizentrischen Heterochromatin von Chromosom 8 und Yp12 durch Hybridisierung an der Zentromerregion. Als Satelliten bezeichnet man spezielle repetitive Sequenzen, die für die Zentromerregion charakteristisch sind. Die Sonde fluoresziert in grün und ist mit Platinum Bright™⁴⁹⁵ direkt markiert. Beim normalen weiblichen Geschlecht erscheinen sowohl auf den Autosomen als auch auf beiden X-Chromosomen zwei Signale. Beim normalen männlichen Geschlecht dagegen ist neben den zwei Signalen auf den Autosomen nur ein Signal auf dem X-Chromosom und ein Signal auf dem Y-Chromosom vorhanden (Leica Biosystems 2015).

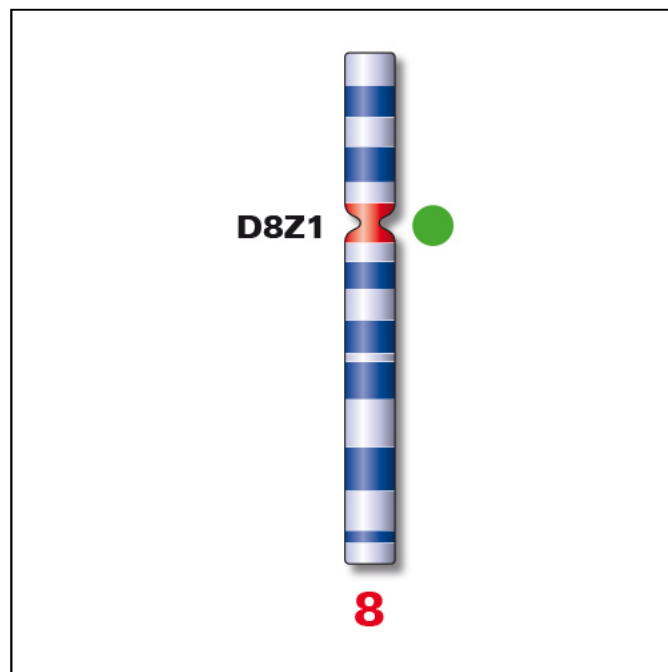


Abbildung 8: Prinzip der Kreatech™ SE 8 (D8Z1) (Satellite Enumeration) FISH-Probe

Quelle: Leica Biosystems (2015)

Mit freundlicher Genehmigung der Firma Leica Biosystems

Abbildung 8 demonstriert das Prinzip der SE 8 (D8Z1) (Satellite Enumeration) FISH-Probe. Zu erkennen ist, dass die Sonde im Bereich der Zentromerregion von Chromosom 8 bindet.

3.2.6 Auswertung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Mithilfe der FISH wurden die Fälle weiter untersucht, bei denen mit Hilfe der CGH für uns relevante genetische Veränderungen festgestellt worden sind. Von besonderem Interesse war, ob sich durch die FISH ein Zugewinn von Chromosom 8 und die Amplifikation auf dem IGF-1-R Gen von Chromosom 15 nachweisen ließ.

Die OT wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 Imaging (Fa. Zeiss, Jena) betrachtet. Es wurde zunächst ein Objektiv mit 10-20-facher Vergrößerung gewählt, um mit Hilfe des Dapi-Filters gut erkennbare Zellkerne aufzusuchen.

Für die weitere Auswertung wurde dann die 100-fache Vergrößerung gewählt und zusätzlich Immersionsöl aufgetragen. Hierzu wurde eine Region im Präparat ausgewählt, in der die Tumorzellkerne sich möglichst nicht überlappten, die weitgehend frei von Zytoplasmaresten war und in der sich die Zellkerngrenzen gut abgrenzen ließen. Zudem sollten geringe Hintergrundsignale und eine gleichmäßige Hybridisierung vorliegen. Die Signale sollten gut voneinander abgrenzbar sein und eine möglichst gleiche Größe und Intensivität haben.

Es wurden von jeder Hybridisierung 100 Zellkerne ausgewertet. Die Signale der SE 8 (D8Z1) (Satellite Enumeration) FISH-Probe und der IGF1-R (15q26) / 15q11 FISH-Probe wurden getrennt voneinander betrachtet. Die Zentromersignale der SE 8 (D8Z1) (Satellite Enumeration) FISH-Probe leuchteten grün und wurden in jedem Zellkern ausgezählt. Wenn mehr als zwei Zentromersignale pro Tumorzellkern vorlagen, handelte es sich definitionsgemäß nach Angaben des Herstellers um einen Zugewinn von Chromosom 8.

Da es sich bei der IGF1-R (15q26)/15q11 FISH-Probe um eine Dual Colour Probe handelt, existierten für die beiden Sonden auch zwei Signale. Die 15q26 Sonde leuchtete rot und die 15q11 Sonde grün. Es erfolgte eine Auszählung des grünen und roten Signals in jedem Zellkern. Definitionsgemäß handelt es sich bei Auftreten von zwei roten und zwei grünen Signalen um einen Normalbefund. Eine Amplifikation im IGF1-R Gen 15q26 liegt vor, wenn mehr als zwei rote Signale für das IGF1-R Gen und zwei grüne Signale für das 15q11 Gen pro Zellkern auftreten (vgl. mit Tabelle 4). Um als Amplifikation gewertet zu werden, musste das Verhältnis vom 15q26 Signal zum 15q11 Signal mindestens bei 2.2 ($\text{Ratio } 15q26:15q11 \geq 2.2$) liegen.

4 Ergebnisse

4.1 Komparative genomische Hybridisierung (CGH)

Die Tumor-DNA der 16 PPB wurde mittels CGH auf genetische Veränderungen untersucht. In den untersuchten PPBs konnten bei allen Proben Chromosomenaberrationen festgestellt werden. Es wurden Zugewinne, Deletionen und Amplifikationen gefunden. Die Häufigkeit der Aberrationen war bei den einzelnen PPBs unterschiedlich und lag zwischen ein bis zwölf pro Fall.

4.1.1 Aberrationen beim weiblichen und männlichen Geschlecht

Von den 16 Proben wurden acht dem männlichen Geschlecht und acht dem weiblichen Geschlecht zugeordnet. Bei allen acht männlichen Proben konnten Zugewinne detektiert werden. Sechs der männlichen Proben wiesen zusätzlich zu den Zugewinnen Deletionen auf. Bei zwei der untersuchten Proben konnten neben Zugewinnen und Deletionen auch Amplifikationen festgestellt werden.

Auch bei allen acht weiblichen Proben konnten Zugewinne detektiert werden. Bei sieben der weiblichen Proben konnten neben den Zugewinnen zusätzlich Deletionen nachgewiesen werden. Bei zwei der untersuchten weiblichen Fälle wurden neben den Zugewinnen und Deletionen auch Amplifikationen identifiziert.

In der nachfolgenden Tabelle 5 und 6 sind nochmals die detektierten Zugewinne, Deletionen und Amplifikationen bezogen auf das männliche und weibliche Geschlecht aufgelistet.

Tabelle 5: Aberrationen beim männlichen Geschlecht

Fälle ♂		Zugewinne	Deletionen	Amplifikationen
1	♂	X	X	X
2	♂	X		
3	♂	X	X	
4	♂	X	X	
5	♂	X		
7	♂	X	X	
10	♂	X	X	
13	♂	X	X	X

Tabelle 6: Aberrationen beim weiblichen Geschlecht

Fall ♂		Zugewinne	Deletionen	Amplifikationen
6	♂	X	X	
8	♂	X	X	
9	♂	X		
11	♂	X	X	
12	♂	X	X	
14	♂	X	X	
15	♂	X	X	X
16	♂	X	X	X

4.1.2 Aberrationen der Typ II und Typ III PPBs

Vier der 16 PPBs waren dem Typ 2 PPB und zwölf der 16 PPBs dem Typ 3 PPB zuzuordnen. Sowohl beim Typ II PPB als auch beim Typ III PPB wurden Zugewinne und Deletionen identifiziert. Hingegen wurden ausschließlich beim Typ III PPB Amplifikationen nachgewiesen. In den untersuchten Typ II und Typ III PPBs gab es Unterschiede bzgl. der Anzahl der nachgewiesenen Aberrationen. Bei Typ II PPBs lag die Anzahl der Aberrationen bei durchschnittlich 4,1 Veränderungen pro Fall (1-7 Veränderungen/pro Fall) und bei Typ III PPBs bei durchschnittlich 5,2 Aberrationen pro Fall (2-12 Veränderungen/Fall).

In der Tabelle 7 sind die identifizierten Aberrationen der Typ II PPBs und in der Tabelle 8 die Aberrationen der Typ III PPBs aufgelistet. Zu erkennen sind die detektierten Zugewinne, Deletionen und Amplifikationen sowie die Anzahl der nachgewiesenen Aberrationen pro Fall.

Tabelle 7: Aberrationen der Typ II PPBs

Fälle Typ II PPBs	Zugewinne	Deletionen	Amplifikationen	Anzahl der Aberr.
6	16p(+), 19(+), 20q(+)	4q(-), 5(-)		5
9	8p(+)			1
10	17q21qter(+), 20q(+)	6q16qter(-), 11p14(-), 11q14q22(-)		5
16	2p(+), 7p(+), 8(+), 20q(+)	4(-), 5q(-), 13q(-)		7

Tabelle 8: Aberrationen der Typ III PPBs

Fälle Typ III PPBs	Zugewinne	Deletionen	Amplifikationen	Anzahl der Aberr.
1	8p(+), 8q12q21.2(+), 20(+)	1p31p34.2 (-)	15q8 Amp.	5
2	2(+), 8(+)			2
3	10p(+)	5q31qter(-), 6q21qter(-), 11p12pter(-)		4
4	6p(+), 7p(+), 16p(+), 19(+), 20q (+)	13q12q23(-)		6
5	8p (+), 11q21q13(+), 16p (+), 17(+), 19(+), 20(+)			6
7	16p(+), 20q(+)	6q11q231(-)		3
8	1p(+) 6p21.1p22(+), 11q11q13(+), 15q(+), 16(+), 17(+), 19(+), 20q(+)	4q12q28(-), 5q14q23(-), 6q11q24(-), 13q12q31(-)		12
11	16p(+)	5q(-)		2
12	8(+), 12p(+), 16p(+), 17p(+), 19 (+)	12q13q15(-), 15p(-), 18q(-)	15q Amp.	9
13	2p(+), 7(+), 8(+)	4(-)	1p33p36,2 Amp. 15q24qter Amp.	6
14	8(+), 11q23(+), 18q(+)	10q22qter(-)	15q21qter Amp.	5

Fälle Typ III PPBs	Zugewinne	Deletionen	Amplifikationen	Anzahl der Aberr.
15	8p(+)		10q(-)	2

4.1.3 Häufigkeiten der Chromosomenaberrationen

Zugewinne:

Insgesamt wurden bei den 16 untersuchten PPBs 50 Zugewinne detektiert. Am häufigsten ließen sich Zugewinne in sieben von 16 Fällen (44%) von Chr. 20q, in sechs von 16 Fällen (37,5%) von Chr.16p, in fünf von 16 Fällen (31%) von Chr. 8 und Chr.19 finden.

In vier von 16 Fällen (25%) wurden Zugewinne von Chr.8p und in drei von 16 Fällen im Bereich des Chr. 11q nachgewiesen (19%).

In zwei von 16 Fällen (12,5 %) wurden Zugewinne von Chr. 17, Chr. 7p, Chr. 6p und Chr. 2p detektiert.

In einem von 16 Fällen (0,6 %) wurden Zugewinne von Chr. 20, Chr. 18q, Chr. 17q, Chr. 17p, Chr. 16, Chr. 15q, Chr. 12p, Chr. 10p, Chr. 8q, Chr. 7 und Chr.1p identifiziert.

Deletionen:

Insgesamt wurden bei den 16 untersuchten PPBs 25 Deletionen detektiert. Die häufigsten Deletionen traten in vier von 16 Fällen im Bereich des Chr. 6q (25%) und Chr. 5q (25%) auf. Ferner wurden Deletionen in drei von 16 Fällen im Bereich des Chr. 13q (19%) und in zwei von 16 Fällen (12,5%) im Bereich des Chr. 11p, Chr. 10q, Chr. 4 und Chr. 4q nachgewiesen.

In einem von 16 Fällen (0,6%) wurden Deletionen von Chr. 18q, Chr. 15p, Chr. 12q, Chr. 5, Chr. 11q und Chr. 1 identifiziert.

Amplifikationen:

Insgesamt wurden bei den 16 PPBs fünf Amplifikationen detektiert. In vier von 16 Fällen (25%) wurde auf dem Chr. 15q eine Amplifikation detektiert. Im Detail handelte es sich dabei um: 15q8, 15q21qter, 15q24qter und 15q. In einem von 16 Fällen (6,25%) wurde außerdem eine Amplifikation auf Chr. 1p33p36,2 identifiziert.

In der nachfolgenden Tabelle 9 sind die Häufigkeiten der durch die CGH detektierten Aberrationen bezogen auf die betroffenen Chromosomen dargestellt.

Tabelle 9: Aberrationen der einzelnen Chromosomen

Chr.	Zugewinne	Deletionen	Amplifikationen	Anzahl der Aberr.
1p	1	1 (1p31p34.2)	1 (1p33p36,2)	3
2p	2			3
2	1			
4q		1 1 (4q12q28)		4
4		2		
5		1		
5q		2 1 (5q31qter) 1 (5q14q23)		5
6p	1 1 (6p21.1p22)			
6q		1 (6q21qter) 1 (6q11q231) 1 (6q11q24) 1 (6q16qter)		6
7	1			3
7p	2			
8	5			
8p	4			10
8q	1 (8q12q21.2)			
10p	1			
10q		1 1 (10q21qter)		3
11p		1 (11p12pter) 1 (11p14)		
11q	1 (11q21q13) 1 (11q11q13)	1 (11q14q22)		6

Chr.	Zugewinne	Deletionen	Amplifikationen	Anzahl der Aberr.
	1 (11q23)			
12p	1			2
12q		1 (12q13q15)		
13q		1 1 (13q12q23) 1 (13q12q31)		3
15p		1		6
15q	1		1 (15q8) 1 (15q) 1 (15q24qter) 1 (15q21qter)	
16	1			
16p	6			
17	2			4
17p	1			
17q	1 (17q21qter)			
18q	1	1		2
19	5			5
20	1			8
20q	7			

4.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die Fälle, bei denen mittels CGH ein Zugewinn von Chromosom 8 und eine Amplifikation im IGF-1R Gen festgestellt worden ist, wurden anschließend mit der FISH-Methode weiter untersucht, um die detektierten genetischen Veränderungen näher zu untersuchen.

4.2.1 Amplifikation des IGF1-R Gens (15q26)

In vier von 16 Fällen (25%) wurden Amplifikationen mittels CGH auf Chromosom 15q8, 15q, 15q21qter und 15q24qter detektiert. Anschließend wurden alle vier Fälle mit der IGF1-R

(15q26)/15q11 FISH-Probe der Firma Kreatech untersucht. In allen untersuchten Fällen konnte eine Amplifikation auf Chromosom 15q26 dem Genlokus des IGF1-R Gens bestätigt werden. Bei der Auswertung der FISH IGF1-R (15q26)/15q11 FISH-Probe wurden alle Fälle mit einer Ratio (15q26/15q11) von ≥ 2.2 als Amplifikation gewertet. Die kleinste Ratio lag mit 3,8 bei Fall 14 und die größte mit 20 bei Fall 14.

Alle Tumore mit einer Amplifikation auf dem IGF1-R Gen 15q26 waren Typ III PPBs. Zwei der bestätigten Amplifikationen waren dem männlichen Geschlecht und zwei dem weiblichen Geschlecht zuzuordnen.

Bei allen untersuchten Fällen bei denen eine Amplifikation im IGF1-R Gen identifiziert worden ist, lag auch ein Zugewinn von Chromosom 8 vor. Bei den Fällen mit bestätigter Amplifikation im IGF1-R Gen 15q25 variierte die Gesamtzahl der Aberrationen pro Fall. So lag die Anzahl der Aberrationen durchschnittlich bei 6,2 Veränderungen pro Fall (5-9 Veränderungen/pro Fall). Die höchste Anzahl an Veränderungen lag mit neun Aberrationen bei Fall 12 und die niedrigste Anzahl an Veränderungen mit fünf Aberrationen bei Fall 1 und 14.

In der nachfolgenden Tabelle 10 sind die Fälle aufgelistet, bei denen durch die FISH eine Amplifikation im IGF1-R Gen bestätigt werden konnte. In der Tabelle sind zudem das Geschlecht, der Tumortyp, die FISH-Ratio und die CGH-Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 10: Amplifikation des IGF1-R Gens 15q26

Fall	♂/♀	PPB	FISH Amplifikation im IGF1-R Gen	FISH Ratio	CGH	Anzahl der Aberr.
1	♂	Typ 3	15q26	4,05	8p(+), 8q12q21.2(+), 20q(+), 1p31p34.2(-), 15q8 Amp.	5
12	♀	Typ 3	15q26	6,5	8(+), 12p(+), 16p(+), 17p(+), 19(+), 15qAmp. , 12q13q15(-), 15p(-), 18q(-)	9
13	♂	Typ 3	15q26	>20	2p(+), 7(+), 8(+), 1p33p36,2 Amp., 15q24qter Amp. , 4(-)	6

Fall	♂/♀	PPB	FISH Amplifikation im IGF1-R Gen	FISH Ratio	CGH	Anzahl der Aberr.
14	♀	Typ 3	15q26	3,8	8(+), 11q23(+), 18q(+), 15q21qter Amp. , 10q22qter(-)	5

4.2.2 Zugewinn von Chromosom 8

In sieben von 16 Fällen (44%) wurden Zugewinne des Chromosoms 8 mittels FISH-Technik nachgewiesen. Durch die CGH wurde zuvor in einem von 16 Fällen ein Zugewinn auf Chromosom 8q, (0,6%), in vier von 16 Fällen Zugewinne von Chromosom 8p (25%) und in fünf von 16 Fällen (31%) Zugewinne von Chromosom 8 detektiert. Der Fall mit dem Zugewinn auf Chromosom 8q zeigte parallel einen Zugewinn des kurzen Arms von Chromosom 8 (Chr.8p). So konnte insgesamt in neun Fällen Zugewinne von Chromosoms 8, 8p und 8q mittels CGH nachgewiesen werden. Im Anschluss an die CGH wurden die neun Fälle mit der Zentromersonde (FISH-Probe SE 8 (D8Z1) der Firma Kreatech weiter untersucht. In sieben der untersuchten Fälle konnten Zugewinne von Chromosom 8 bestätigt werden. Bei den zwei übrigen Fällen (Fall 11 und Fall 7) war kein Fluoreszenzsignal für die entsprechende Sonde sichtbar. Bei der Auswertung der SE 8 (D8Z1) (Satellite Enumeration) FISH-Probe lag bei Vorhandensein von mehr als zwei Zentromersignalen pro Tumorzellkern definitionsgemäß ein Zugewinn von Chromosom 8 vor.

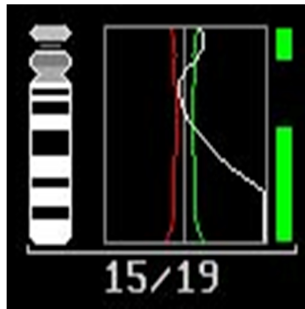
Sechs der sieben untersuchten PPBs waren Typ III PPBs und eines der sieben der untersuchten PPBs war ein Typ II PPB. Drei der PPBs waren dem männlichen Geschlecht und vier dem weiblichen Geschlecht zuzuordnen, was einem Verhältnis von 3:4 entspricht. Bei den Fällen mit bestätigtem Zugewinn von Chromosom 8 variierte die Gesamtzahl der Aberrationen pro Fall. So lag die Anzahl der Aberrationen durchschnittlich bei 5,14 Veränderungen pro Fall (2-9 Veränderungen/pro Fall). So lag die höchste Anzahl an Veränderungen mit neun Aberrationen bei Fall 12 und die geringste Anzahl an Veränderungen mit zwei Aberrationen bei Fall 2 und Fall 15.

In der nachfolgenden Tabelle 11 sind die Fälle aufgelistet, bei denen durch die FISH ein Zugewinn von Chromosom 8 bestätigt werden konnte. In der Tabelle sind zudem das Geschlecht, der Tumortyp, die FISH-Ratio und die CGH-Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 11: Zugewinn von Chromosom 8

Fall	♂/♀	PPB	FISH Zugewinn Chr. 8	Signal	CGH	Anzahl der Aberr.
1	♂	Typ 3	8	2,15	8q12q21.2(+), 8(+), 20q(+), 1p31p34.2(-), 15q8 Amp.	5
2	♂	Typ 3	8	2,75	2(+), 8(+)	2
12	♀	Typ 3	8	3,38	8(+), 12p(+), 16p(+), 17p(+), 19(+), 15qAmp, 2q13q15(-), 15p(-), 18q(-)	9
13	♂	Typ 3	8	5,85	2p(+), 7(+), 8(+), 1p33p36,2 Amp., 15q24qter Amp., 4(-)	6
14	♀	Typ 3	8	2,5	8(+), 11q23(+), 18q(+), 15q21qter Amp., 10q22qter(-)	5
15	♀	Typ 3	8	5,4	8p(+), 10q(-)	2
16	♀	Typ 2	8	4,6	2p(+), 7p(+), 8(+), 20q(+), 4(-), 5q(-), 13q(-)	7

a)



**Abbildung 9: CGH-Profil
Chromosom 15**

b)

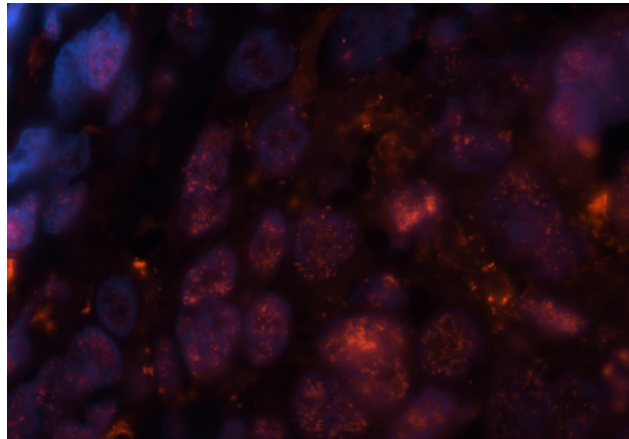
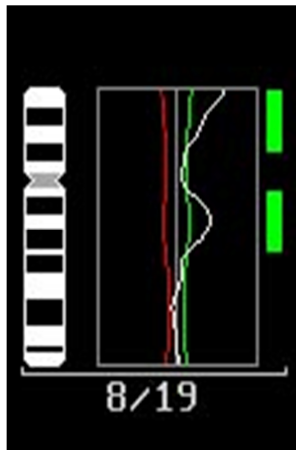


Abbildung 10¹: FISH-Amplifikation Chromosom 15q26

c)



**Abbildung 11: CGH-Profil
Chromosom 8**

d)

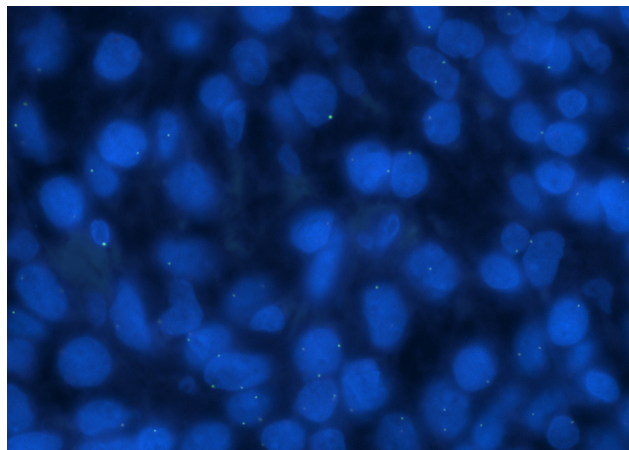


Abbildung 12²: FISH-Zugewinn Chromosom 8

*In Abbildung 9-11 sind die CGH- und FISH-Ergebnisse von Fall 1 dargestellt. Man erkennt das CGH-Profil und die zugehörige FISH-Fluoreszenzaufnahme von Chromosom 15q und Chromosom 8. **a)** durch die CGH detektierte Amplifikation auf Chromosom 15q8, **b)** durch die FISH bestätigte Amplifikation des IGF1-R Gens auf Chromosom 15q26, **c)** durch die CGH detektierte Zugewinn von Chromosom 8p und 8q12q21.2, **d)** durch die FISH bestätigter Zugewinn des Zentromers von Chromosom 8.*

¹ Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 Imaging (Fa. Zeiss, Jena), 100fache Vergrößerung

² Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 Imaging (Fa. Zeiss, Jena), 100fache Vergrößerung

5 Diskussion

5.1 Detektierte genetische Aberrationen

In der vorliegenden Arbeit wurden 16 PPBs genetisch untersucht und es konnten verschiedene Chromosomenaberrationen identifiziert werden. Mittels CGH wurden häufige Zugewinne auf Chromosom 20q, 16p, 8 und 19 und häufige Verluste auf Chromosom 6q, 5q und 13q detektiert. Amplifikationen wurden in fünf Fällen beobachtet, vier auf Chromosom 15q (15q8, 15q21qter, 15q24qter, 15q) und eine auf Chromosom 1p. Durch die anschließend erfolgte FISH-Untersuchung konnten in sieben von 16 Fällen Zugewinne von Chromosom 8 (7/16, 44%) und in vier von 16 Fällen Amplifikationen auf dem IGF1-R Gen 15q26 (4/16 25%) bestätigt werden. Alle PPBs mit IGF1-R Amplifikationen waren Typ III PPBs, ein PPB mit Zugewinn von Chromosom 8 war ein Typ II PPB und sechs PPBs waren Typ III PPBs. Die Tatsache, dass alle PPBs mit einer IGF1-R Amplifikation Typ III PPBs waren, lässt vermuten, dass es sich dabei um eine Veränderung im späteren Tumorstadium handelt. Hingegen wurden Zugewinne von Chromosom 8 sowohl bei PPB Typ II als auch bei PPB Typ III festgestellt, was darauf hinweist, dass es sich dabei wahrscheinlich um eine Veränderung im früheren Tumorstadium handelt.

Auffällig war auch, dass alle Fälle mit einer Amplifikation im IGF1-R Gen zusätzlich einen Zugewinn von Chromosom 8 aufwiesen. Im Verlauf der Tumorprogression von Typ II zu Typ III scheint möglicherweise bereits beim PPB Typ II ein Zugewinn von Chromosom 8 vorzuliegen, dem dann im weiteren Progress zum PPB Typ III die Amplifikation auf dem IGF-1R Gen folgt. Auch zeigen die von uns erhobenen Ergebnisse, dass sich die Anzahl der detektierten Aberrationen zwischen Typ II und III PPBs unterscheiden. Bei Typ II PPBs lag die Anzahl der Aberrationen bei durchschnittlich 4,1 Veränderungen pro Fall (1-7 Veränderungen/pro Fall) und bei Typ III PPBs bei durchschnittlich 5,2 Aberrationen pro Fall (2-12 Veränderungen/Fall). Dieses Ergebnis zeigt, dass es im Rahmen des Tumorprogresses auch zu einer Zunahme der genetischen Veränderungen kommt.

Im Prozess der Tumorprogression kommt es zu Veränderungen der Morphologie der PPBs. So kommt es im Verlauf der Tumorerkrankung zu einer Progression vom polyzystischen Typ I PPB über das Typ II PPB, welches einen zystischen und soliden Anteil aufweist, bis letztendlich zum rein soliden Typ III PPB (Dehner et al. 2015).

Typ I PPBs sind prognostisch günstig und metastasieren nicht. Hingegen sind Typ II und III PPBs aggressive Tumore, die mit Metastasierung und einer schlechten Prognose assoziiert sind. Für die Prognose von entscheidender Bedeutung ist, ob es sich um ein PPB Typ II oder

III handelt. Denn in der Arbeit von Messinger et al. (2015) hatten Patienten mit einem Typ II PPB eine signifikant höhere Überlebenschance als Patienten mit einem Typ III PPB. So lag die 5-Jahres-Überlebensrate von Typ II PPBs bei 71% und bei Typ III PPBs hingegen nur bei 53%. Nach Aussagen des Autors sind der PPB-Typ sowie der Metastasierungsgrad zum Zeitpunkt der Diagnosestellung neben der Therapie die wichtigsten Prognosefaktoren.

5.2 Publierte genetische Veränderungen beim PPB

Aufgrund der Seltenheit der Tumore gibt es bisher nur eine limitierte Anzahl von genetischen Untersuchungen. Trotz der wenigen Fälle, die bis heute untersucht worden sind, konnten komplexe genetische Veränderungen nachgewiesen werden. Hill et al. (2009) haben in elf Fällen des familiären PPB Syndroms erstmals eine Mutation im DICER1 Gen auf Chromosom 14q beschrieben. In einer von Pugh et al. (2014) veröffentlichten Studie konnte mittels Exom Sequenzierung von 12 PPBs eine Keimbahnmutation, in drei Fällen eine somatische „loss-of-function“-Mutation und in allen 15 Fällen eine somatische missense Mutation der RNase IIb Domäne im DICER1 Gen nachgewiesen werden. Die Mutation im DICER1 Gen gilt bislang als die häufigste detektierte genetische Veränderung beim PPB. Zu den ebenfalls häufig detektierten Chromosomenaberrationen zählen Trisomien von Chromosom 2 (Sciot et al. 1994, Yang et al. 1997), Zugewinne von Chromosom 8 (Priest et al. 1996, Vargas et al. 2001), häufig ebenfalls durch eine Trisomie verursacht (Taube et al. 2006, Kelsey et al. 1997, Barnard et al. 2000), und Verluste von Chromosom 17p (Vargas et al. 2001, Kelsey et al. 1997). Analog zu den aufgeführten bekanntesten genetischen Veränderungen beim PPB konnten wir durch die CGH in neun Fällen Zugewinne von Chromosom 8 (fünf Fälle mit Zugewinn von Chromosom 8, 3 Fälle mit Zugewinn von Chromosom 8p, ein Fall mit einem Zugewinn von Chromosom 8 und 8q12q21.2) und in drei Fällen Zugewinne von Chromosom 2 (ein Fall mit Zugewinn von Chromosom 2, zwei Fälle mit Zugewinn von Chromosom 2p) nachweisen. Verluste des kurzen Arms von Chromosom 17 (17p) ließen sich in dieser Arbeit nicht identifizieren. In der Arbeit von Taube et al. (2006) wurden die häufigsten nachgewiesenen Chromosomenaberrationen von 17 PPBs zusammengefasst und bewertet. Die Ergebnisse stammen aus der Arbeit von Taube et al (2006) und aus weiteren zytogenetischen Untersuchungen publizierter Studien. Neben der Trisomie von Chromosom 2, dem Zugewinn von Chromosom 8/8q und dem Verlust von Chromosom 17p wurden u.a. auch Zugewinne von 1q (Taube et al. 2006, Roque et al. 2004) und 7q (Taube et al. 2006) festgestellt. Es wurden Verluste von 6q (Taube et al. 2006, Krijger et al. 2007), 10 (Taube et al. 2006, Quilichini et al.

2006, Hong et al. 2003, Priest et al. 2006), 10q (Taube et al. 2006, Roque et al. 2004), 18p (Taube et al. 2006), X/Xp (Taube et al. 2006, Kelsey et al. 1997) und Rearrangements von 11p (Taube et al. 2006) nachgewiesen. Außerdem wurden in genetischen Untersuchungen weiterer publizierter Studien auch Verluste von 11p (Krijger et al. 2007, Quilichini et al. 2006) und 9p, Zugewinne von 20q und Amplifikationen auf 5p33-34, 11q22.2ter, 15q25ter und 19p11-13,2 festgestellt (Krijger et al. 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit ließen sich einige der aufgeführten genetischen Veränderungen ebenfalls feststellen. Verluste ließen sich in vier Fällen auf Chromosom 6q, in drei Fällen auf 11p, in einem Fall auf 10q21qter und in einem Fall von 10q nachweisen Zugewinne von 20q wurden in 7 Fällen und Amplifikationen auf 15q in 4 Fällen nachgewiesen.

Einige der detektierten genetischen Veränderungen beim PPB wurden auch bei einer Reihe anderer Tumoren detektiert. Beispielsweise ließen sich Verluste von Chromosom 6q auch beim Prostatakarzinom (Visakorpi et al. 1995) und dem Magenkarzinom nachweisen (Seruca et al. 1993). Zugewinne von Chromosom 1q wurden u.a. beim Hepatoblastom (Weber et al. 2000), dem Wilms-Tumor (Hing et al. 2001), dem Ewingsarkom (Armengol et al. 1997), dem Neuroblastom (Hirai et al. 1999) und bei kindlichen Keimzelltumoren (Bussey et al. 1999) detektiert. In zwei von 16 Fällen (12,5 % der Fälle) wurden von uns Verluste auf Chromosom 11p detektiert (11p12ter und 11p14). Im benachbarten Genlokus von Chromosom 11p14 auf 11p15.5 der Region des Wilms Tumor Gen 2 (WT2) wurde von Priest et al. (1997) eine „loss of heterozygosity“ (LOH)-Mutation beim PPB vermutet. Eine LOH-Mutation auf 11p15.5 wurde auch beim Hepatoblastom (Montagna et al. 1994), dem embryonalen Rhabdomyosarkom und dem Wilms-Tumor nachgewiesen. Auch wird die Entstehung des Wilms-Tumors mit dem WT1 Gen auf Chromosom 11p13 und dem WT2 Gen auf Chromosom 11p15.5 in Verbindung gebracht (Besnard-Guerin et al. 1996). Der Wilms-Tumor, das embryonale Rhabdomyosarkom und das Hepatoblastom zählen gemeinsam mit dem PPB zu den dysontogenetischen Tumoren (Travis et al. 2004). Dass bestimmte embryonale Tumoren im Kindesalter ähnliche genetische Veränderungen besitzen, ist schon länger bekannt. Sciot et al. haben bereits (1994) in ihrer Arbeit beschrieben, dass das PPB, das embryonale Rhabdomyosarkom und das Hepatoblastom als gemeinsame Chromosomenaberration eine Trisomie von Chromosom 2 aufweisen.

Wie schon erwähnt zählen Verluste von Chromosom 17p und Zugewinne von Chromosom 8 zu den häufig detektierten Chromosomenaberrationen beim PPB.

Die Proto-Oncogene MYC (myelocytomatosis oncogene) und DDEF1 (development and differentiation enhancing factor1) auf Chromosom 8q24 und das Proto-Oncogen MOS auf

Chromosom 8q11 könnten möglicherweise eine zentrale Rolle in der Tumorgenese des PPB spielen (Krijger et al. 2007). Auch die Verluste von Chromosom 17p (Vargas et al. 2001, Kelsey et al. 1997) haben die Autoren die Vermutung treffen lassen, dass womöglich auch das Tumorsuppressorgen p53 (Tumorprotein p53) auf Chromosom 17p13 für die Tumorprogression des PPB von entscheidender Bedeutung sein könnte. Eine Mutation des p53 Gens ist bis heute bei diversen Tumoren nachgewiesen worden. Insbesondere wurden Mutationen von p53 auch beim embryonalen Rhabdomyosarkom, dem Hepatoblastom und dem Wilms-Tumor festgestellt (Steehan et al. 2000). Eine Expression bzw. Überexpression vom MOS Proto-Oncogen wurden u.a. beim Astrozytom (Perunovic et al. 2002) und dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom nachgewiesen (Zacharatos et al. 2001).

Der Zugewinn von Chromosom 8, der oftmals als Trisomie vorliegt, wurde nach Krijger et al. (2007) in 75-80% aller Fallstudien nachgewiesen (Priest et al. 1996, Sciote et al. 1994, Novak et al. 1997, Barnard et al. 2000, Vargas et al. 2001, Hong et al. 2003, Kelsey et al. 1997).

Nach Taube et al. (2006) scheint der Zugewinn von Chromosom 8 eine konsistente Aberration beim PPB zu sein, die jedoch nicht spezifisch, sondern auch bei diversen anderen Tumoren beschrieben worden ist. So konnte ein Zugewinn von Chromosom 8, häufig als Trisomie, u.a. beim Wilms-Tumor (Kondo et al. 1984), dem embryonalen Rhabdomyosarkom (Dietrich et al. 1993) und dem Hepatoblastom (Parada et al. 2000, Tomlinson et al. 2005) detektiert werden.

Zugewinne von Chromosom 8 konnten auch in benignen Tumoren festgestellt werden. Es ließen sich in der Arbeit von Mark et al. (1983) Zugewinne von Chromosom 8 in benignen Speisedrüsentumoren und (1986) in benignen Adenomen nachweisen, was Kelsey et al. (1997) die Vermutung treffen ließ, dass es sich um ein frühes Event in der Tumorgenese von einigen Tumoren zu handeln scheint.

5.3 Die Rolle des IGF-Systems und des IGF1 Rezeptors in Tumoren

Der Insulin-like growth factor 1 Rezeptor (IGF1-R) zählt zu der Familie der Wachstumsfaktoren und das entsprechende Gen, das IGF1-R Gen, befindet sich am Ende des langen Arms von Chromosom 15q25-26.3. Es ist u.a. für das Skelettwachstum, die Hirnentwicklung und den Kohlenhydratstoffwechsel von großer Bedeutung (Rudak et al. 2011).

Es ist Teil des komplexen IGF-Systems, das aus IGF1 (Insulin-like growth factor 1) und IGF2 (Insulin-like growth factor 2), dem IGF1-R, dem Insulin Rezeptor (I-R), dem Insulin-like growth factor II Rezeptor (IGF2-R) und den 6 IGF-Bindeproteinen (IGF-BP1-6) besteht (Samani et al. 2007). Die IGF Liganden und die sechs IGF-Bindeproteine beeinflussen durch

autokrine und parakrine Effekte Proliferation, Differenzierung sowie die Apoptose von Zellen (Dossus et al. 2008).

Der IGF1-R ist dem Insulinrezeptor strukturell sehr ähnlich, gehört ebenfalls zur Familie der Tyrosinkinase und der Wirkmechanismus fungiert als sekundärer Botenstoff (Rudaks et al. 2011). In der embryonalen und postnatalen Phase ist die IGF1-R mRNA in nahezu allen Geweben hoch exprimiert. Im Verlauf der Adoleszenz wird dann nach und nach die Expression von IGF1-R herabreguliert. Trotz dieses Prozesses ist IGF-1R in der Mehrzahl aller Geweben eines Erwachsenen zu finden (Khandwala et al. 2000).

Sowohl IGF1 als auch IGF2 binden an IGF1-R, wobei eine 15-20-fach höhere Affinität für IGF1 besteht (Rudaks et al. 2011). Durch Bindung der Liganden wird eine Aktivierung des IGF1-R erreicht und durch Aussenden eines mitogenen Signals werden Zellen vor der Apoptose bewahrt (Valentinis et al. 2001) und Zellwachstum und Proliferation angeregt.

Das IGF System spielt in der Pathogenese von Tumoren eine wichtige Rolle, denn eine Veränderung im Gleichgewicht im IGF-System kann die Entstehung von Tumoren begünstigen (Samani et al. 2007). Eine erhöhte Expression bzw. Überexpression von IGF1, IGF1-R und IGF2 oder in Kombination wurden bei verschiedenen Tumoren dokumentiert. Dazu zählen u.a. Mammakarzinome, Gliome, Astrozytome, Meningiome, Medulloblastome, Hepatozelluläre Karzinome, Magen- Kolon- und Pankreaskarzinome, Ovarialtumoren, Prostatakarzinome und Osteosarkome (Samani et al. 2007). Auch führt die gesteigerte Aktivität von IGF1-R in Tumoren zur erhöhten Verfügbarkeit der IGFs sowie deren autokriner und parakriner Wirkung (Khandwala et al. 2000).

Ein verbreiteter Mechanismus bei der Überexpression von Proto-Onkogenen ist die Gen-Amplifikation, die zu Zellveränderungen und Tumorprogression führen kann (Samani et al. 2007). Eine IGF1-R Amplifikationen wurden bspw. beim Mammakarzinom (Berns et al. 1992) und dem malignen Melanom (Zhang et al. 1993) nachgewiesen. Zu den Kindertumoren, bei denen ebenfalls eine Amplifikation von IGF1-R identifiziert werden konnte, zählt u.a. das embryonale Rhabdomyosarkom (Bridge et al. 2002). Offensichtlich bestehen zwischen dem pleuropulmonalen Blastom und dem Wilms-Tumor, dem Hepatoblastom und insbesondere dem embryonalen Rhabdomyosarkom eine Reihe ähnlicher genetischer Veränderungen. Neben den bereits bekannten Veränderungen wie der Trisomie auf Chromosom 2, dem Zugewinn auf Chromosom 8, der Mutation von p53 und dem DICER1 Gen, liegt mit der Amplifikation des IGF1-R Gens ein weiterer gemeinsamer molekularer Mechanismus der Tumorgenese zwischen dem Rhabdomyosarkom und dem PPB vor.

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde in der veröffentlichten Literatur eine Amplifikation des IGF1-R Gens auf Chromosom 15q25-15q26 beim PPB nur im Einzelfall beschrieben. Durch Krijger et al. (2006) konnte in einem Fall eine Amplifikation auf Chromosom 15q25-ter mittels CGH nachgewiesen werden.

In den von uns im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tumoren fanden sich in vier der untersuchten Fälle (25% aller untersuchten PPBs) eine Amplifikation auf dem Genlokus von IGF1-R. Alle Fälle mit Amplifikation des IGF1-R Gens auf Chromosom 15q25-26 waren Typ III PPBs.

Ergänzende molekulargenetische Untersuchungen in größerem Umfang sind in der Zukunft notwendig, um die Bedeutung der Signaltransduktion und Amplifikation von IGF1-R beim PPB weiter zu verstehen und zu interpretieren.

Bereits vor 20 Jahren wurde spekuliert, dass IGF1-R als Angriffspunkt in der Tumorthherapie eine wichtige Rolle spielen könnte (Gualberto et al. 2009 zitiert nach Pollak et al. 1987). Seitdem bestand ein zunehmendes Interesse daran, spezifische Moleküle und Antikörper, die gezielt am IGF1-R wirken, in die Therapiestrategien der Tumorbehandlung IGF1-R überexprimierender Tumoren aufzunehmen. Bereits in den späten 90er Jahren wurde an der Entwicklung von Medikamenten geforscht und seit 2006 befinden sich verschiedene IGF1-R spezifische Medikamente in klinischen Studien (Gualberto et al. 2009). Die erhobenen klinischen Daten deuteten damals schon an, dass IGF1-R einen hohen Stellenwert in der molekularen Therapiestrategie einnehmen könnte. Auch konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass eine Hemmung von IGF1-R bzw. des I-R die Proliferationsrate der Tumorzellen herabsetzt und den Zelltod erhöht (Salisbury et al. 2015).

Zum heutigen Zeitpunkt stehen für die Behandlung IGF1-R-(über-) exprimierender Tumore zwei Therapiestrategien zur Verfügung. Zum einen sind das monoklonale Antikörper (AK) und zum anderen Tyrosinkinase-Inhibitoren. Beide Therapiestrategien sollen die Signaltransduktion am IGF1-R verhindern.

Doch bei der Behandlung mit IGF1-R spezifischen AK können unerwünschte endokrine Effekte auftreten (Salisbury et al. 2015). Denn die Behandlung mit IGF1-R spezifischen AK kann zu einem Anstieg des Wachstumshormon-Spiegels (GH) und zu einer vermehrten Bildung von IGF1 führen, was zur Folge hat, dass sich eine Insulinresistenz sowie eine Hyperglykämie und Hyperinsulinämie entwickeln kann (Pollak et al. 2012). Auch ist die Wirksamkeit IGF1-R Antikörper durch eine bestehende Tumorresistenz begrenzt, die sich durch eine agonistische Wirkung der spez. Antikörper und eine Bindung von IGF1 an β 3-Rezeptoren der Tumorzellen erklären lässt. (Salisbury et al. 2015). So konnte in der Arbeit von Shin et al.

(2013) während der Behandlung mit dem IGF1-R Antikörper Cixutumumab eine Aktivierung des Signalwegs durch Bindung von IGF1 an den β 3-Rezeptoren der Tumorzellen bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches (HNSCC) und bei Nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) nachgewiesen werden. Durch Zheng et al. (2012) wurde gezeigt, dass der AK Figitumumab den Signalweg am IGF1-R von Ewing Sarkomen durch eine Aktivierung von beta Arrestin 1 auslöst und somit eine agonistische Wirkung entfalten kann.

Dennoch scheint die Hemmung der Signaltransduktion für die Bekämpfung von Tumoren mit IGF1-R Überexpression eine sinnvolle Therapiestrategie zu sein. Denn das Rezeptorprotein ist in vielen Tumoren überexprimiert und besitzt dadurch eine erhöhte Tyrosinkinase-Aktivität. Womöglich könnte in der Zukunft die Hemmung der Signaltransduktion des IGF1-R auch in der Tumorbehandlung von PPBs mit überexprimierten IGF1-R eine zusätzliche sinnvolle Therapiestrategie sein.

6 Ausblick

Die von uns erhobenen Ergebnisse lassen hoffen, dass die Hemmung der Signaltransduktion des IGF-1 Rezeptors womöglich ein neuer zusätzlicher Angriffspunkt in der Therapiestrategie des PPB darstellen könnte, die gegenwärtig abhängig vom Tumorstadium aus Tumorresektion, Chemotherapie und Bestrahlung besteht. Auch sollte dabei bedacht werden, dass es sich bei Tyrosinkinase-Inhibitoren und monoklonalen Antikörpern um Therapieformen handelt, die als ergänzende Therapieoption auch zu einer Verbesserung der Überlebenschancen der betroffenen Kinder beitragen könnten.

Doch da über die genetischen Veränderungen der PPBs bisher nur sehr wenig bekannt ist, sind weitere molekulargenetische Untersuchungen dringend erforderlich, um die molekularen Mechanismen der Tumorgenese besser zu verstehen.

7 Zusammenfassung

Das pleuropulmonale Blastom ist ein seltener maligner und aggressiver Tumor des frühen Kindesalters, der mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Es handelt sich um einen dysontogenetischen mesenchymalen Tumor, der typischerweise bei Kinder unter fünf Jahren auftritt. Histopathologisch wird der Tumor in drei Subtypen unterteilt. Typ I pleuropulmonale Blastome bestehen aus multiplen Zysten, Typ II pleuropulmonale Blastome aus einem zystischen und soliden Anteil und Typ III pleuropulmonale Blastome sind vollständig solide Tumore. Die Prognose des pleuropulmonalen Blastoms ist abhängig vom Tumorstadium. Über die genetischen Veränderungen des pleuropulmonalen Blastoms ist bis zum heutigen Zeitpunkt noch wenig bekannt. Es existiert nur eine limitierte Anzahl von publizierten genetischen Untersuchungen, bei denen komplexe genetische Veränderungen nachgewiesen werden konnten. Ziel dieser Arbeit war die genetische Charakterisierung der im Kindertumorregister archivierten pleuropulmonalen Blastome mittels CGH und FISH.

Es wurden insgesamt 16 pleuropulmonale Blastome aus dem Kindertumorregister der GPOH (Sektion für Kinderpathologie der Universität Kiel) untersucht. Von den 16 Tumoren waren zwölf Tumore dem pleuropulmonalen Blastom Typ II und vier Tumore dem PPB Typ III zuzuordnen. Alle 16 Tumore wurden mit Hilfe der CGH genetisch analysiert. Es wurden häufige Zugewinne auf Chromosom 20q, 16p, 8 und 19 und häufige Verluste auf Chromosom 6q, 5q und 13q detektiert. Amplifikationen wurden in fünf Fällen beobachtet, vier auf Chromosom 15q (15q8, 15q21qter, 15q24qter, 15q) und eine auf Chromosom 1p. Die gefundenen Veränderungen von Chromosom 8 und die Amplifikationen im Bereich 15q wurden anschließend mittels FISH validiert. In sieben von 16 Fällen bestätigten sich Zugewinne von Chromosom 8 (7/16, 44%) und in vier von 16 Fällen Amplifikationen auf dem IGF1-R Genlokus 15q26 (4/16 25%). Der Zugewinn auf Chromosom 8 wurde sowohl beim Typ II als auch beim Typ III pleuropulmonalen Blastom nachgewiesen und zählt zu den am meisten detektierten Aberrationen beim pleuropulmonalen Blastom. Hingegen ließ sich die Amplifikation des IGF1-R Gens ausschließlich beim Typ III pleuropulmonalen Blastom nachweisen. Alle Tumore mit einer identifizierten Chromosom 15q26 Amplifikation im IGF1-R Genlokus zeigten auch einen Zugewinn von Chromosom 8.

Zusammenfassend handelt es sich bei den nachgewiesenen Zugewinnen von Chromosom 8 möglicherweise um frühere Ereignisse in der Tumorprogression und bei Amplifikationen des IGF1R-Gens um später auftretende Veränderungen. Zusätzlich kann die IGF1R-Amplifikation möglicherweise therapeutisch im Rahmen einer Antikörpertherapie genutzt werden.

Literaturverzeichnis

Abnova Home/ Report/ Ressourcen

URL: <http://www.abnova.com/support/resources.asp?switchfunctionid=%7BB4285500-DB85-435D-BE02-2BF420D5C70D%7D> (abgerufen am 19.10.2016).

Andersen, C. L., Hostetter, G., Grigoryan, A., Sauter, G., & Kallioniemi, A. (2001). Improved procedure for fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cytometry*, 45(2), 83-86.

Armengol, G., Tarkkanen, M., Virolainen, M., Forus, A., Valle, J., & BÅ, T. (1997). Recurrent gains of 1q, 8 and 12 in the Ewing family of tumours by comparative genomic hybridization. *British journal of cancer*, 75(10), 1403.

Barnard, W. G. (1952). (Embryoma of lung. *Thorax*, 7(4), 299-301.

Barnard, M., Bayani, J., Grant, R., Teshima, I., Thorner, P., & Squire, J. (2000). Use of multi-color spectral karyotyping in genetic analysis of pleuropulmonary blastoma. *Pediatric and Developmental Pathology*, 3(5), 479-486.

Berns, E. M., Klijn, J. G., van Staveren, I. L., Portengen, H., & Foekens, J. A. (1992). Sporadic amplification of the insulin-like growth factor 1 receptor gene in human breast tumors. *Cancer research*, 52(4), 1036-1039.

Besnard-Guérin, C., Newsham, I., Winqvist, R., & Cavenee, W. K. (1996). A common region of loss of heterozygosity in Wilms' tumor and embryonal rhabdomyosarcoma distal to the D11S988 locus on chromosome 11p15. *Human genetics*, 97(2), 163-170.

Bridge, J. A., Liu, J., Qualman, S. J., Suijkerbuijk, R., Wenger, G., Zhang, J., ... & Barr, F. G. (2002). Genomic gains and losses are similar in genetic and histologic subsets of rhabdomyosarcoma, whereas amplification predominates in embryonal with anaplasia and alveolar subtypes. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 33(3), 310-321.

Bussey, K. J., Lawce, H. J., Olson, S. B., Arthur, D. C., Kalousek, D. K., Krailo, M., ... & Magenis, R. E. (1999). Chromosome abnormalities of eighty-one pediatric germ cell tumors:

Sex, age, site, and histopathology related differences - a Children's Cancer Group study. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 25(2), 134-146.

Dehner, L. P., J. Watterson, and J. Priest. (1995). "Pleuropulmonary blastoma. A unique intrathoracic-pulmonary neoplasm of childhood." *Perspectives in Pediatric Pathology* 18, 214-226.

Dehner, L. P., Messinger, Y. H., Schultz, K. A. P., Williams, G. M., Wikenheiser-Brokamp, K., & Hill, D. A. (2015). Pleuropulmonary Blastoma: Evolution of an Entity as an Entry into a Familial Tumor Predisposition Syndrome. *Pediatric and Developmental Pathology*, 18(6), 504-511.

Dietrich, C. U., Jacobsen, B. B., Starklint, H., & Heim, S. (1993). Clonal karyotypic evolution in an embryonal rhabdomyosarcoma with trisomy 8 as the primary chromosomal abnormality. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 7(4), 240-244.

Dossus, L., & Kaaks, R. (2008). Nutrition, metabolic factors and cancer risk. *Best practice & research clinical endocrinology & metabolism*, 22(4), 551-571.

du Manoir, S., Speicher, M.R., Joos, S., Schröck, E. Popp, S., Döhner, H., Kovacs, G., Nicaud, M.S., Lichter, S., Cremer, T. 1993 Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization, *Hum genet* 90, 590- 610.

du Manoir, S., Schröck, E., Bentz, M., Speicher, M. R., Joos, S., Ried, T., ... & Cremer, T. (1995). Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry*, 19(1), 27-41.

Gualberto, A., & Pollak, M. (2009). Emerging role of insulin-like growth factor receptor inhibitors in oncology: early clinical trial results and future directions. *Oncogene*, 28(34), 3009-3021.

Hing, S., Lu, Y. J., Summersgill, B., King-Underwood, L., Nicholson, J., Grundy, P., ... & Pritchard-Jones, K. (2001). Gain of 1q is associated with adverse outcome in favorable histology Wilms' tumors. *The American journal of pathology*, 158(2), 393-398.

Hill, D. A., Jarzembowski, J. A., Priest, J. R., Williams, G., Schoettler, P., & Dehner, L. P. (2008). Type I pleuropulmonary blastoma: pathology and biology study of 51 cases from the international pleuropulmonary blastoma registry. *The American journal of surgical pathology*, 32(2), 282-295.

Hill, D. A., Ivanovich, J., Priest, J. R., Gurnett, C. A., Dehner, L. P., Desruisseau, D., ... & Williams, G. (2009). DICER1 mutations in familial pleuropulmonary blastoma. *Science*, 325(5943), 965-965.

Hirai, M., Yoshida, S., Kashiwagi, H., Kawamura, T., Ishikawa, T., Kaneko, M., ... & Uchida, K. (1999). 1q23 gain is associated with progressive neuroblastoma resistant to aggressive treatment. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 25(3), 261-269.

Hong, B., Chen, Z., Coffin, C. M., Lemons, R., Issa, B., Brothman, A., & Zhou, H. (2003). Molecular cytogenetic analysis of a pleuropulmonary blastoma. *Cancer genetics and cytogenetics*, 142(1), 65-69.

Indolfi, P., Casale, F., Carli, M., Bisogno, G., Ninfo, V., Cecchetto, G., ... & Di Tullio, M. T. (2000). Pleuropulmonary blastoma. *Cancer*, 89(6), 1396-1401.

Indolfi, P., Bisogno, G., Casale, F., Cecchetto, G., De Salvo, G., Ferrari, A., ... & Di Tullio, M. T. (2007). Prognostic factors in pleuro-pulmonary blastoma. *Pediatric blood & cancer*, 48(3), 318-323.

International Pleuropulmonary Registry About/ Background & Purpose

URL: <http://www.ppbregistry.org/about/background-and-purpose> (abgerufen am 18.10.2016).

International Pleuropulmonary Registry Family/ treatment

URL: <http://www.ppbregistry.org/families/treatment> (abgerufen am 18.10.2016).

Joos, S., Scherthan, H., Speicher, M. R., Schlegel, J., Cremer, T., & Lichter, P. (1993). Detection of amplified DNA sequences by reverse chromosome painting using genomic tumor DNA as probe. *Human genetics*, 90(6), 584-589.

Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J. W., Waldman, F., & Pinkel, D. (1992). Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 258(5083), 818-821.

Kallioniemi, O. P., Kallioniemi, A., Piper, J., Isola, J., Waldman, F. M., Gray, J. W., & Pinkel, D. (1994). Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 10(4), 231-243.

Kallioniemi, A., Visakorpi, T., Karhu, R., Pinkel, D. and Kallioniemi, O.P. (1996). Gene Copy Number Analysis by Fluorescence in Situ Hybridization and Comparative Genomic Hybridization, A Companion to *Methods in Enzymology* 9 (0015), 113–121.

Khandwala, H. M., McCutcheon, I. E., Flyvbjerg, A., & Friend, K. E. (2000). The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocrine reviews*, 21(3), 215-244.

Kondo, K., Chilcote, R. R., Maurer, H. S., & Rowley, J. D. (1984). Chromosome abnormalities in tumor cells from patients with sporadic Wilms' tumor. *Cancer research*, 44(11), 5376-5381.

Kelsey, A. M., McNally, K., Birch, J., & Mitchell, E. L. D. (1997). Case of extra pulmonary, pleuro-pulmonary blastoma in a child: Pathological and cytogenetic findings. *Medical and pediatric oncology*, 29(1), 61-64.

de Krijger, R. R., Claessen, S. M., van der Ham, F., van Unnik, A. J., Hulsbergen-van de Kaa, C. A., van Leuven, L., ... & Speel, E. J. (2007). Gain of chromosome 8q is a frequent finding in pleuropulmonary blastoma. *Modern Pathology*, 20(11), 1191-1199.

leicabiosystems/ Home/ IHC, ISH, FISH/ ISH Probes/ Molecular PathologyKreatech FISH Probes/ Microdeletion IGF1R (15q26) /15q11 URL: http://www.leicabiosystems.com/fileadmin/img_uploads/kreatech/ifu/PI-KBI-40116_D1.1.pdf (abgerufen am 20.10.2016).

leicabiosystems/ Home/ IHC, ISH, FISH/ ISH Probes/ Molecular PathologyKreatech FISH Probes/ Microdeletion IGF1R (15q26) /15q11

URL: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish-fish/ish-probes-molecular-pathology/kreatech-fish-probes/microdeletion/products/igf1r-15q26-15q11/> (abgerufen am 20.10.2016).

leicabiosystems/ Home/ IHC, ISH, FISH/ ISH Probes/ Molecular PathologyKreatech FISH ProbesSatellite Enumeration /SE 8 (D8Z1)

URL: http://www.leicabiosystems.com/fileadmin/img_uploads/kreatech/ifu/PI-KBI-20001-20028_D1.1.pdf (abgerufen am 20.10.2016).

LeRoith, D., Werner, H., Beitner-Johnson, D., & ROBERTS JR, A. T. (1995). Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocrine reviews*, 16(2), 143-163.

Manivel, J. C., Priest, J. R., Watterson, J., Steiner, M., Woods, W. G., Wick, M. R., & Dehner, L. P. (1988). Pleuropulmonary blastoma the so called pulmonary blastoma of childhood. *Cancer*, 62(8), 1516-1526.

Mark, J., Dahlenfors, R., & Ekedahl, C. (1983). Cytogenetics of the human benign mixed salivary gland tumour. *Hereditas*, 99(1), 115-129.

Mark, J., & Dahlenfors, R. (1985). Cytogenetical observations in 100 human benign pleomorphic adenomas: specificity of the chromosomal aberrations and their relationship to sites of localized oncogenes. *Anticancer research*, 6(2), 299-308.

Messinger YH, Stewart DR, Priest JR, et al.(2015). Pleuropulmonary blastoma: a report on 350 central pathology-confirmed pleuropulmonary blastoma cases by the International Pleuropulmonary Blastoma Registry. *Cancer*;121:276–285.

Montagna, M., Menin, C., Chieco-Bianchi, L., & D'Andrea, E. (1994). Occasional loss of constitutive heterozygosity at 11p15.5 and imprinting relaxation of the IGFII maternal allele in hepatoblastoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 120(12), 732-736.

Murken J, Grimm T, Holinski- Feder E, Hrsg. 2006, Taschenlehrbuch Humangenetik, 7. Auflage Stuttgart: Thieme Verlag, S.155-156 und S. 101.

Perunovic, B., Athanasiou, A., Quilty, R. D., Gorgoulis, V. G., Kittas, C., & Love, S. (2002). Expression of mos in astrocytic tumors and its potential role in neoplastic progression. *Human pathology*, 33(7), 703-707.

Pollak, M. N., Perdue, J. F., Margolese, R. G., Baer, K., & Richard, M. (1987). Presence of somatomedin receptors on primary human breast and colon carcinomas. *Cancer letters*, 38(1), 223-230.

Pollak, M. (2012). The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. *Nature Reviews Cancer*, 12(3), 159-169.

Pugh, T. J., Yu, W., Yang, J., Field, A. L., Ambrogio, L., Carter, S. L., ... & McKenna, A. (2014). Exome sequencing of pleuropulmonary blastoma reveals frequent biallelic loss of TP53 and two hits in DICER1 resulting in retention of 5p-derived miRNA hairpin loop sequences. *Oncogene*, 33(45), 5295-5302.

Priest, J. R., Watterson, J., Strong, L., Huff, V., Woods, W. G., Byrd, R. L., ... & Mahoney, D. H. (1996). Pleuropulmonary blastoma: a marker for familial disease. *The Journal of pediatrics*, 128(2), 220-224.

Priest, J. R., McDermott, M. B., Bhatia, S., Watterson, J., Manivel, J. C., & Dehner, L. P. (1997). Pleuropulmonary blastoma: a clinicopathologic study of 50 cases. *Cancer*; 80, 147–161.

Priest, J. R., Hill, D. A., Williams, G. M., Moertel, C. L., Messinger, Y., Finkelstein, M. J., & Dehner, L. P. (2006). Type I pleuropulmonary blastoma: a report from the International Pleuropulmonary Blastoma Registry. *Journal of clinical oncology*, 24(27), 4492-4498.

Priest, J. R., Magnuson, J., Williams, G. M., Abromowitch, M., Byrd, R., Sprinz, P., ... & Ashley Hill, D. (2007). Cerebral metastasis and other central nervous system complications of pleuropulmonary blastoma. *Pediatric blood & cancer*, 49(3), 266-273.

Priest, J. R., Williams, G. M., Hill, D. A., Dehner, L. P., & Jaffé, A. (2009). Pulmonary cysts in early childhood and the risk of malignancy. *Pediatric pulmonology*, 44(1), 14-30.

Ried, T., Liyanage, M., du Manoir, S., Heselmeyer, K. Auer. G., Schröck, M.M.E. (1997). Tumor cytogenetics revisited: comparative genomic hybridization and spectral karyotyping., *J Mol Med* 75, 801-814.

Quilichini, B., Andre, N., Bouvier, C., Chrestian, M. A., Rome, A., Intagliata, D., ... & Zattara, H. (2006). Hidden chromosomal abnormalities in pleuropulmonary blastomas identified by multiplex FISH. *BMC cancer*, 6(1), 1.

Roque, L., Rodrigues, R., Martins, C., Ribeiro, C., Ribeiro, M. J., Martins, A. G., ... & Fonseca, I. (2004). Comparative genomic hybridization analysis of a pleuropulmonary blastoma. *Cancer genetics and cytogenetics*, 149(1), 58-62.

Rudaks, L. I., Nicholl, J. K., Bratkovic, D., & Barnett, C. P. (2011). Short stature due to 15q26 microdeletion involving IGF1R: report of an additional case and review of the literature. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 155(12), 3139-3143.

Salisbury, T. B., & Tomblin, J. K. (2015). Insulin/Insulin-like growth factors in cancer: new roles for the aryl hydrocarbon receptor, tumor resistance mechanisms, and new blocking strategies. *Frontiers in endocrinology*, 6, 12.

Samani, A. A., Yakar, S., LeRoith, D., & Brodt, P. (2007). The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocrine reviews*, 28(1), 20-47.

Sciot, R., CIN, P., Brock, P., Moerman, P., DAMME, B., WEVER, I., ... & Desmet, V. (1994). Pleuropulmonary blastoma (pulmonary blastoma of childhood): genetic link with other embryonal malignancies?. *Histopathology*, 24(6), 559-563.

Seruca, R., Castedo, S., Correia, C., Gomes, P., Carneiro, F., Soares, P., ... & Sobrinho-Simões, M. (1993). Cytogenetic findings in eleven gastric carcinomas. *Cancer genetics and cytogenetics*, 68(1), 42-48.

Shin, D. H., Lee, H. J., Min, H. Y., Choi, S. P., Lee, M. S., Lee, J. W., ... & Lee, H. Y. (2013). Combating resistance to anti-IGFR antibody by targeting the integrin β 3-Src pathway. *Journal of the National Cancer Institute*, 105(20), 1558-1570.

Slade I, Bacchelli C, Davies H, Murray A, Abbaszadeh F, Hanks S et al. DICER1 syndrome: clarifying the diagnosis, clinical features and management implications of a pleiotropic tumour predisposition syndrome. *J Med Genet* 2011; 48: 273–278.

Speicher, M. R., Schoell, B., du Manoir, S., Schröck, E., Ried, T., Cremer, T., ... & Kovacs, G. (1994). Specific loss of chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, 17, and 21 in chromophobe renal cell carcinomas revealed by comparative genomic hybridization. *The American journal of pathology*, 145(2), 356.

Spencer H. (1961) Pulmonary blastoma. *J Pathol Bacteriol* ; 82, 161–165.

Steenman, M., Westerveld, A., & Mannens, M. (2000). Genetics of Beckwith Wiedemann syndrome associated tumors: common genetic pathways. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 28(1), 1-13.

Taube, J. M., Griffin, C. A., Yonescu, R., Morsberger, L., Argani, P., Askin, F. B., & Batista, D. A. (2006). Pleuropulmonary blastoma: cytogenetic and spectral karyotype analysis. *Pediatric and Developmental Pathology*, 9(6), 453-461.

Tomlinson, G. E., Douglass, E. C., Pollock, B. H., Finegold, M. J., & Schneider, N. R. (2005). Cytogenetic evaluation of a large series of hepatoblastomas: Numerical abnormalities with recurring aberrations involving 1q12–q21. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 44(2), 177-184.

Travis, W. D., & Harris, C. C. (2004). *Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart*. Feance: IARC Press, 2004.

Travis, W. D., Brambilla, E., Burke, A., Marx, A., & Nicholson, A. G. (Eds.). (2015). *WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart*.

Vargas, S. O., Nosé, V., Fletcher, J. A., & Perez-Atayde, A. R. (2001). Gains of chromosome 8 are confined to mesenchymal components in pleuropulmonary blastoma. *Pediatric and Developmental Pathology*, 4(5), 434-445.

Valentinis, B., & Baserga, R. (2001). IGF-I receptor signalling in transformation and differentiation. *Molecular Pathology*, 54(3), 133-133.

Visakorpi, T., Kallioniemi, A. H., Syvänen, A. C., Hyytinen, E. R., Karhu, R., Tammela, T., & Kallioniemi, O. P. (1995). Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer research*, 55(2), 342-347.

Weber, R. G., Pietsch, T., von Schweinitz, D., & Lichter, P. (2000). Characterization of genomic alterations in hepatoblastomas: a role for gains on chromosomes 8q and 20 as predictors of poor outcome. *The American journal of pathology*, 157(2), 571-578.

Yang, P., Hasegawa, T., Hirose, T., Fukumoto, T., Uyama, T., Monden, Y., & Sano, T. (1997). Pleuropulmonary blastoma: fluorescence in situ hybridization analysis indicating trisomy 2. *The American journal of surgical pathology*, 21(7), 854-859.

Zacharatos, P., Kotsinas, A., Tsantoulis, P., Evangelou, K., Kletsas, D., Asimacopoulos, P. J. & Kittas, C. (2001). Relationship of the K-ras/c-mos expression patterns with angiogenesis in non-small cell lung carcinomas. *Molecular Medicine*, 7(9), 590.

Zhang, J., Trent, J. M., & Meltzer, P. S. (1993). Rapid isolation and characterization of amplified DNA by chromosome microdissection: identification of IGF1R amplification in malignant melanoma. *Oncogene*, 8(10), 2827-2831.

Zheng, H., Shen, H., Oprea, I., Worrall, C., Stefanescu, R., Girnita, A., & Girnita, L. (2012). β -Arrestin-biased agonism as the central mechanism of action for insulin-like growth factor 1 receptor-targeting antibodies in Ewing's sarcoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(50), 20620-20625.

Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. I. Leuschner für die Überlassung des interessanten Themas und die freundliche und kompetente wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Christian Vokuhl, der mich in die Labormethoden einführte, die Ergebnisse mit mir auswertete und mich fachlich in den verschiedenen Phasen dieser Arbeit unterstützte.

Weiterhin danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Pathologischen Institutes, die mich bei der Durchführung und Erstellung dieser Arbeit jederzeit hilfsbereit und freundlich unterstützten.

Ferner gilt mein außerordentlicher Dank meiner Familie. Meinen Eltern Christel und Francisco de León, die mir das Medizinstudium und dieses Promotion ermöglicht haben und meinem Ehemann Timo. Danke für euer Vertrauen in meine Fähigkeiten, eure Geduld und eurer Verständnis. Euch und meinem Sohn David Matteo ist diese Arbeit gewidmet.

Lebenslauf

Name	Laura de León Escapini
Geburtsdatum	07.04.1982
Geburtsort	Koblenz
Eltern	Dr. med. Francisco de León Escapini, Pathologe Prof. Christel de León Braun, Psychologin

SCHULAUSBILDUNG

1988 – 2002	Grundschule und Gymnasium in Koblenz
-------------	--------------------------------------

03/2002	Allgemeine Hochschulreife
---------	----------------------------------

HOCHSCHULSTUDIUM

10/2003 – 06/2011	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (klinischer Abschnitt) und der Georg-August-Universität Göttingen (vorklinischer Abschnitt)
-------------------	---

09/2006	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
---------	--

06/2011	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
---------	--

2011 – 12/2016	Promotion Institut der Pathologie, Sektion Kinderpathologie, Universitätsklinikum Schleswig- Holstein, Campus Kiel
----------------	--

Thema: Molekulargenetische Charakterisierung
Pleuropulmonaler Blastome im Kindes- und Ju-
gendalter mittels komparativer genomischer
Hybridisierung und Fluoreszenz in situ Hybridi-
sierung

(Betreuer: Prof. Dr. med. I. Leuschner)

Praktisches Jahr

10/2010 – 01/2011

imland Klinik Rendsburg

Chirurgie, 3. Tertial des Praktischen Jahres

08/2010 – 10/2010

Royal North Shore Hospital Sydney, Australien

Innere Medizin, 2. Tertial des Praktischen Jahres

06/2010 – 08/2010

imland Klinik Rendsburg

Innere Medizin, 2. Tertial des Praktischen Jahres

02/2010 – 06/2010

Universitätsklinikum Kiel

Pädiatrie, 1. Tertial des Praktischen Jahres

Famulaturen

09/2009

Städtisches Krankenhaus Kiel

Gynäkologie/ Geburtshilfe

03/2009

Universitätsklinikum Kiel

Pädiatrie/ Kinderkardiologie

09/2008

Kath. Klinikum Marienhof, Koblenz

Innere Medizin/Kardiologie

09/2007

Kinderarztpraxis Dr. med. Kilger, Berlin

Pädiatrie

08/2007

Pathologisches Institut Koblenz

Pathologie

BERUFLICHE ERFAHRUNGEN

05/2015- heute	Elternzeit
Seit 10/2012	Assistenzärztin der Pädiatrie/Neuropädiatrie im HELIOS Klinikum Hohenstücken in Brandenburg an der Havel
01/2012 – 07/2012	Assistenzärztin der Inneren Medizin I im Evangelischen Waldkrankenhaus Berlin
09/2003 – 10/2003	Rettungssanitäterin beim Deutschen Roten Kreuz, Neuwied
06/2003 – 09/2003	Ausbildung zur Rettungssanitäterin beim Deutschen Roten Kreuz

Veröffentlichungen

C. Vokuhl, L.de León, S. Kirsch, E. Koscielniak, I. Leuschner

Genetic analysis of Pleuropulmonary Blastoma (PPB) by CGH and FISH

58.th Annual Meeting of the Paediatric Pathology Society, October 2012

Erklärung

Ich erkläre, dass meine Dissertation mit dem Titel „Molekulargenetische Charakterisierung pleuropulmonaler Blastome im Kindes- und Jugendalter mittels komparativer genomischer Hybridisierung und Fluoreszenz in situ Hybridisierung“ nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist.

Die Arbeit hat bisher in gleicher oder ähnlicher Form oder auszugsweise noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen. Dies ist mein erster Promotionsversuch.

Ratingen, 14. Dezember 2016

Laura de León

Laura de León Escapini