Aus der Abteilung Urologie (Prof. Dr. med. L. Trojan) im Zentrum Chirurgie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Molekularpathologie seltener Sarkomentitäten des Urogenitaltraktes

INAUGURAL - DISSERTATION zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Alina Volland geb. Schulz

> aus Berlin

Göttingen 2013

Dekan:Prof. Dr. rer. nat. H. K. KroemerI. Berichterstatter:PD Dr. rer. nat. P. ThelenII. Berichterstatter:Prof. Dr. med. P. Ströbel

Tag der mündlichen Prüfung: 20. November 2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1. Einleitung	5
1.1 Bedeutung des Themas im Kontext zum aktuellen Stand der Forschung	5
1.2 Weichteilsarkome	6
1.3 Die Familie der Ewing-Tumoren	.10
1.4 Rhabdomyosarkome	. 13
1.5 Molekularpathologie der Ewing-Tumoren und Rhabdomyosarkome	. 15
1.6 Die Bedeutung molekularpathologischer Erkenntnisse für Fortschritte in	
der Therapie der Weichteilsarkome	.21
1.7 Fragestellung	. 22
2. Material und Methoden	.23
2.1 Materialien	.23
2.2 Verwendete Gewebeproben und Zellkultur- RNA	. 27
2.3 RNA- Isolation	. 29
2.4 Messung der RNA- Konzentration und – Qualität	. 31
2.5 Umschreibung der RNA in cDNA mittels RT	. 33
2.6 Polymerasekettenreaktion (Real Time- quantitative PCR)	. 34
2.7 DNA- Aufreinigung	.45
2.8 Sequenzierung	.46
2.9 Herstellung eines positiven Standards	.46
2.10 Prüfung der PCR- Effizienz	.48
3. Ergebnisse	. 50
3.1 Überprüfung der RNA- Qualität und – Konzentration	. 50
3.2 Ergebnisse zur qRT- PCR	. 55
3.3 Herstellung eines positiven Standards	.71
3.4 Ergebnisse zur Prüfung der PCR- Effizienz	.73
3.5 Ergebnisse im Überblick	.75
4. Diskussion	.76
4.1 Molekularpathologische Untersuchungen mittels qRT-PCR sind auch an	
degradierter RNA aus Formalin-fixierten, Paraffin-gebetteten Geweben	
möglich	.76

	4.2 Die unterschiedlichen Translokationen sind spezifisch in den Ewing-	
	Tumoren und Rhabdomyosarkomen des Urogenitaltraktes nachweisbar	. 83
	4.3 Eine eindeutige Klassifizierung der Weichteilsarkome als wichtige	
	Grundlage für eine gezielte Therapiestrategie	. 87
5.	Zusammenfassung	.90
6.	Anhang	.92
	6.1 Abkürzungsverzeichnis	. 92
	6.2 Abbildungsverzeichnis	. 94
	6.3 Tabellenverzeichnis	. 95
7.	Literaturverzeichnis	.96

1. Einleitung

1.1 Bedeutung des Themas im Kontext zum aktuellen Stand der Forschung

Mit der Einführung multimodaler interdisziplinärer Therapiestrategien in der modernen Tumortherapie mit einer Kombination aus chirurgischen Maßnahmen, medikamentöser Therapie und Radiotherapie konnten einige Erfolge in der Behandlung maligner Erkrankungen erzielt werden.

Obwohl die moderne Medizin bisher viele Fortschritte in der Therapie maligner Erkrankungen erlangt hat, stellt die Therapie der sehr seltenen Weichteilsarkome (WTS) in urogenitaler Lage bisher immer noch eine Herausforderung dar. Diese Tumoren sind charakterisiert durch ein sehr aggressives Verhalten mit rapidem lokalem Wachstum, verbunden mit einer infausten Prognose. Eine schnelle Diagnosefindung zur Einleitung einer gezielten Therapiestrategie ist somit von enormer Bedeutung (AL-NAJAR et al. 2009; JIMENEZ et al. 2002; ODA und TSUNEYOSHI 2009).

Der Weg zur genauen Diagnosefindung und Klassifizierung der WTS birgt jedoch oft Schwierigkeiten. Einige WTS- Subtypen, wie z.B. das Rhabdomyosarkom (RMS) und die Ewing-Tumoren, gehören aufgrund ihres histologischen Erscheinungsbildes zu der heterogenen Gruppe der klein-, rund- und blauzelligen Tumoren. Trotz ähnlicher Histologie differiert jedoch ihre Prognose und ihr Therapieansprechen, weshalb eine eindeutige Diagnosestellung und Differenzierung dieser Tumoren einmal mehr unabdingbar ist (LEWIS TB et al. 2007). Genau dies gestaltet sich jedoch via konservativer Histologie sehr schwierig und in den meisten Fällen ist daher eine immunhistochemische Untersuchung mit histopathologischer Referenzbegutachtung angezeigt (CORMIER und POLLOCK 2004). Die Notwendigkeit objektiver molekularer und biochemischer Marker für eine Verbesserung in Diagnosefindung und Klassifizierung der Tumoren ist definitiv gegeben (CORMIER und POLLOCK 2004). Dies wird einmal mehr darin bestärkt, dass besonders die Differentialdiagnose der Ewing-Tumoren von anderen klein-, rund- und blauzelligen Tumoren des Kindesund Jugendalters, wie z.B. dem Neuroblastom, dem Rhabdomyosarkom, von Non-Hodgkin- Lymphomen, desmoplastischen klein- und rundzelligen Tumoren und schlecht differenzierten Synovialsarkomen oft Schwierigkeiten bietet (BURCHILL 2003).

Die Identifikation chromosomaler Translokationen und ihrer spezifischen Fusionstranskripte liefert zum einen einen gewaltigen Fortschritt für die Klassifizierung und Diagnose der WTS- Subtypen, zum anderen besitzen sie einen starken prognostischen Wert (BURCHILL 2003; ODA und TSUNEYOSHI 2009). Des Weiteren ist diese Methode sehr effektiv in der Auffindung von Mikrometastasen sowie beim Monitoring einer minimal residuellen Erkrankung (DE ALAVA und PARDO 2001).

Von besonderer Bedeutung, v.a. auch im Hinblick auf zukünftige wissenschaftliche Untersuchungen, sind die so erhaltenen Informationen über den Einfluss der Fusionsgene auf die biologischen Funktionsabläufe in den Tumorzellen. Diese Einblicke in die Biologie der WTS liefern wiederum einen Angriffspunkt für die Innovation spezifischer neuer therapeutischer Ansätze, einer sogenannten modernen "targeted therapy" (BURCHILL 2003; ODA und TSUNEYOSHI 2009).

Durch Integration dieser neuen molekularen Therapiestrategien in das Standard-Therapiekonzept könnten in Zukunft steigende Erfolge in der Behandlung dieser seltenen aggressiven Tumoren erzielt werden (CORMIER und POLLOCK 2004).

1.2 Weichteilsarkome

Weichteilsarkome sind eine heterogene Gruppe mesenchymaler, extraskelettaler maligner Neubildungen (CASANOVA et al. 2007). Aufgrund der histologischen Morphologie einiger WTS- Subtypen, wie z.B. der Rhabdomyosarkome, der desmoplastischen klein- und rundzelligen Tumoren, der Ewing-Tumoren und der schlecht differenzierten Synovialsarkome, gehören diese zu den so genannten klein-, rund- und blauzelligen Tumoren und sind somit schwer durch eine konventionelle Histologie zu klassifizieren (LEWIS TB et al. 2007; CORMIER und POLLOCK 2004). Derzeit sind mehr als 50 verschiedene Subtypen von WTS beschrieben worden (TSCHOEP et al. 2007). Ihre Unterteilung und Bezeichnung erfolgt je nach gewebstypischer Differenzierungsrichtung. Zu den häufigsten WTS- Subtypen gehören das maligne fibröse Histiozytom (28%), das Liposarkom (15%), das Leiomyosarkom (12%), und das Synovialsarkom (10%) (CORMIER und POLLOCK 2004).

Inzidenz und Vorkommen

Weichteilsarkome sind insgesamt seltene Tumoren und machen nur ca. 1% aller malignen Erkrankungen für Erwachsene aus (SEGAL et al. 2003). Im Kindes- und Jugendalter hingegen sind die WTS für rund 8% aller malignen Neubildungen verantwortlich. Das Rhabdomysarkom ist mit 50-60% hierbei das häufigste Weichteilsarkom dieser Altersgruppe (CASANOVA et al. 2007).

WTS können prinzipiell überall im Körper vorkommen. Zu den bevorzugten Lokalisationen gehören jedoch die Extremitäten (59%), der Körperstamm (19%), das Retroperitoneum (15%) und der Kopf- Hals- Bereich (9%) (CORMIER und POLLOCK 2004).

Fernmetastasen entwickeln 40 bis 50% der Patienten mit Weichteilsarkomen (ITALIANO et al. 2011). Welches Zielorgan primär befallen ist, hängt jedoch mit der Lokalisation des Primärtumors zusammen. Das am häufigsten von Metastasen befallene Organ bei Weichteilsarkomen der Extremitäten ist die Lunge (LEWIS JJ und BRENNAN 1996). Retroperitoneale und viszerale WTS hingegen metastasieren bevorzugt in die Leber (JAQUES et al. 1995); hochgradige retroperitoneale WTS zusätzlich auch in die Lunge (PISTERS und O'SULLIVAN 2002).

Regionale Lymphknotenmetastasen hingegen sind selten mit weniger als 5%. Ausnahmen bilden die Subtypen Synovialsarkom, Epitheloidsarkom, Klarzellsarkom, Rhabdomyosarkom und Angiosarkom mit einer 10%igen bis 20%igen Inzidenz für regionäre Lymphknotenmetastasen (CORMIER und POLLOCK 2004).

Ätiologie

Die Ätiologie von Weichteilsarkomen ist weitgehend ungeklärt. Als einer der am besten untersuchten Risikofaktoren für die Entwicklung von Weichteilsarkomen gilt die vorausgegangene Strahlentherapie (FROEHNER und WIRTH 2001; CORMIER und POLLOCK 2004). Die mediane Latenzzeit beträgt hierbei ca. 10 Jahre (CORMIER POLLOCK und 2004). Auch der frühere Einsatz des Röntgenkontrastmittels Thorotrast soll die Entstehung von Weichteilsarkomen begünstigen. Diskutiert wird zudem der Einfluss bestimmter Hormone und chronischer Reparaturprozesse als Risikofaktoren für die Entstehung von WTS (FROEHNER und WIRTH 2001).

Klinik

Da WTS prinzipiell in allen Kompartimenten des Körpers auftreten können, gibt es keine spezifische oder einheitliche Symptomatik (CASANOVA et al. 2007). WTS präsentieren sich meist als asymptomatische, ausgedehnte Raumforderung. Die Größe des Tumors zum Zeitpunkt der Diagnosestellung hängt von dessen Lokalisation ab. Tumoren der distalen Extremitäten werden zumeist schon bei kleinerem Ausmaß entdeckt, wohingegen retroperitoneal gelegene Tumoren in der Regel erst spät symptomatisch werden und somit bei deren Entdeckung meist schon weit fortgeschritten sind (CORMIER und POLLOCK 2004; PISTERS und O'SULLIVAN 2002). WTS wachsen meist verdrängend gegenüber umgebenden Strukturen und rufen daher als Symptome hauptsächlich Schwellung, Ödeme, Schmerzen oder neurologische Symptome hervor, z.B. im Zuge lumbaler oder sakraler Nervenkompressionen (CORMIER und POLLOCK 2004). Retroperitoneale Tumoren des Urogenitaltraktes werden zudem durch urologische Symptome wie Flankenschmerz und Makrohämaturie auffällig (HABERMANN et al. 2003; ANGEL et al. 2010; CHARNY et al. 2000).

Diagnose

Eine Tumorbiopsie dient der histologischen Diagnosesicherung. Eine alleinige histologische Untersuchung des Tumorgewebes ist meist nicht ausreichend für eine exakte Diagnosestellung und Unterscheidung der WTS- Subtypen. In 25% bis 40% der Fälle werden WTS nicht richtig diagnostiziert oder klassifiziert. Dies macht die Notwendigkeit objektiver molekularer Marker zur genaueren differentialdiagnostischen Unterscheidung der einzelnen WTS-Subtypen deutlich (CORMIER und POLLOCK 2004).

Therapie

Die verschiedenen therapeutischen Ansätze in der Behandlung von WTS haben eine historische Entwicklung hinter sich. Einhergehend mit neuen Erkenntnissen im Einsatz der Radiotherapie, in chirurgischen Strategien, sowie im Staging und im Ausbau pathologischer Definitionen konnte zwischen 1970 und 1990 ein erster Fortschritt in der Therapie der WTS erlangt werden. Molekularpathologische Fortschritte mit der Identifikation der spezifischen Translokationen, sowie neue Erkenntnisse in der Immunhistochemie brachten zwischen 1990 und 2000 einen weiteren Aufschwung für das therapeutische Vorgehen (BORDEN et al. 2003).

Um eine geeignete primäre Therapiestrategie auszuwählen, ist eine exakte präoperative histologische Diagnose unabdingbar (CORMIER und POLLOCK 2004). Mit der Einführung einer interdisziplinären, multimodalen Therapiestrategie konnten bereits deutliche Fortschritte in der Therapie der WTS erreicht werden (HAJDU 1981). Doch trotz multimodaler Therapieansätze entwickeln ca. 1/3 aller Patienten mit Weichteilsarkom Rezidive mit nur einem mittleren rezidivfreien Intervall von rund 18 Monaten (LEWIS JJ und BRENNAN 1996). Eine Zuweisung der Patienten an ein spezialisiertes Zentrum sollte daher bedacht werden (GUSTAFSON et al. 1994).

Obwohl durch moderne chirurgische Verfahren in Verbindung mit einer Strahlentherapie enorme Erfolge für die Prognose lokalisierter WTS erzielt werden konnten, bleibt die Gesamtprognose für fortgeschrittene metastasierte Hochrisiko-WTS trotz multimodaler Therapiekonzepte weiterhin schecht (CORMIER und POLLOCK 2004). Neue Erkenntnisse über die histologischen Subtypen der WTS weisen auf Unterschiede im Ansprechen auf die verschiedenen Chemotherapeutika hin (BLAY und CESNE 2009). Die Hoffnung liegt auf der Entwicklung neuer Therapiestrategien, wie z.B. der "targeted therapy", also einer zielgerichteten Therapie, die über weitere Erkenntnisse in den biologischen Funktionsabläufen der WTS erlangt werden können (BURCHILL 2003; ODA und TSUNEYOSHI 2009).

Prognose

WTS haben im Allgemeinen eine ungünstige Prognose. Die 5- Jahres Überlebensrate für alle Stadien liegt bei nur 50% bis 60% (CORMIER und POLLOCK 2004). Das Auftreten von Fernmetastasen und, in einigen Lokalisationen, so z.B. bei retroperitonealen Tumoren, das Auftreten von Lokalrezidiven hat den größten Einfluss auf das Gesamtüberleben (COINDRE et al. 2001). Je nach Lokalisation der Tumoren hat hier der eine oder der andere Faktor einen größeren Einfluss auf das Überleben. Eine lokale Kontrolle ist bei WTS der Extremitäten meist gut zu erreichen. Hier hat eine Fernmetastasierung den größten Einfluss auf das Überleben. Bei retroperitonealen und intraabdominellen Tumoren hingegen ist aufgrund der engen anatomischen Verhältnisse das lokale Management schwieriger und Lokalrezidive bestimmen hier überwiegend das Gesamtüberleben (BORDEN et al. 2003; CORMIER und POLLOCK 2004; HESLIN et al. 1997).

Verschiedene Faktoren mit Einfluss auf die Prognose dieser Tumorerkrankung wurden bereits untersucht. Stets wird das histologische Grading als wichtigster Prognosefaktor für WTS genannt (OLIVEIRA und NASCIMENTO 2001; COINDRE et

al. 1996; CORMIER und POLLOCK 2004). Das Grading hat einen besonderen Einfluss auf das Risiko für Fernmetastasierung, wohingegen die R0- chirurgische Resektion, insbesondere bezüglich der retroperitonealen WTS, den größten Einfluss auf Lokalrezidive hat (STOECKLE et al. 2001; COINDRE et al. 2001). Die metastatische Tendenz wird bei niedriggradigen, gut differenzierten Tumoren mit 5% bis 10% und bei hochgradigen, schlecht differenzierten Tumoren mit 50% bis 60% angegeben (CORMIER und POLLOCK 2004). Insgesamt treten in 80% der Fälle Fernmetastasen innerhalb der ersten 2-3 Jahre nach Primärdiagnose auf (CORMIER und POLLOCK 2004).

Auch molekulare Marker besitzen prognostische Relevanz. Dies wird im Kapitel 1.5 behandelt.

1.3 Die Familie der Ewing-Tumoren

Erstmals 1921 wurde das heute bekannte Ewing-Sarkom durch den Pathologen James Ewing als "Diffuse endothelioma of bone" beschrieben und exakt von anderen Tumoren als eigene Tumorentität abgegrenzt (EWING 1972).

Das Ewing-Sarkom gehört zusammen mit dem Askin- Tumor und dem peripheren primitiven neuroektodermalen Tumor (pPNET) zu der Familie der Ewing-Tumoren ("Ewing's sarcoma family of tumors", ESFT) (AL-NAJAR et al. 2009). Alle zu dieser Familie gehörenden Tumoren werden aufgrund ihres histologischen Erscheinungsbildes zu der heterogenen Gruppe der malignen klein-, rund- und blauzelligen Tumoren gezählt (KAVALAR et al. 2009).

Ewing-Sarkome und pPNET weisen einen unterschiedlichen Grad neuraler Differenzierung auf mit einer vermehrten Expression neuraler Marker in den pPNET im Vergleich zu den Ewing-Sarkomen (PAULUSSEN et al. 2001).

ESFT stellen 10-15% aller primären malignen Knochentumoren dar (BURCHILL 2003) und haben eine jährliche Inzidenz von 1-3 pro 1 Mio. Einwohner. Das männliche Geschlecht ist dabei etwas häufiger betroffen (RIGGI und STAMENKOVIC 2007). Erwähnenswert ist hierbei auch eine geringere Inzidenz unter Asiaten und Schwarzafrikanern (WORCH et al. 2010).

Das Ewing-Sarkom ist der zweithäufigste primäre maligne Knochentumor nach dem Osteosarkom im Kindes- und Jugendalter mit einem Altersgipfel um das 15. Lebensjahr (KENNEDY et al. 2003; RIGGI und STAMENKOVIC 2007). 20- 30% der

Fälle ereignen sich jedoch bereits in der ersten Lebensdekade und auch ein Vorkommen im höheren Alter wurde beschrieben (BERNSTEIN et al. 2006).

Ewing-Tumoren können prinzipiell überall im Körper vorkommen. Unterschieden wird zwischen ossären und extraossären Ewing-Tumoren (RIGGI und STAMENKOVIC 2007). Die häufigste Lokalisation der ossären Ewing-Sarkome befindet sich in den Diaphysen der langen Röhrenknochen, wie z.B. der Tibia, des Femur und des Humerus (KENNEDY et al. 2003). Ebenfalls häufig betroffen sind Becken und Brustwand (BERNSTEIN et al. 2006) (siehe Abb. 1).



Extraossäre Ewing-Tumoren sind mit ca. 15% selten (RIGGI und STAMENKOVIC 2007). Sehr selten wird ein Vorkommen im Urogenitalsystem, wie z.B. in der Niere, in der Harnblase, in den Hoden oder in den Ureteren beschrieben (HABERMANN et al. 2003; ANGEL et al. 2010; BADAR et al. 2010; HEIKAUS et al. 2009; CHARNY et al. 2000). Besonders in dieser Lokalisation zeigen die Tumoren ein sehr aggressives Verhalten mit schnellem Wachstum und früher Metastasierung (BADAR et al. 2010). Im Allgemeinen sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei bereits 20-30% der Patienten mit Ewing-Tumoren Mikrometastasen in Blut oder Knochenmark auffindbar (SCHLEIERMACHER et al. 2003). ESFT sind sehr aggressive Tumoren, die zu früher hämatogener Metastasierung in Knochen, Lunge und Knochenmark neigen. Eine Metastasierung in Leber und Hirn, sowie lymphogene Metastasen sind hingegen eher selten (RIGGI und STAMENKOVIC 2007).

Die Ätiologie der Ewing-Tumoren ist bislang ungeklärt. Sie präsentieren sich als undifferenzierte klein-, rund- und blauzellige Tumoren, die kaum Rückschlüsse auf eine Ursprungszelle ziehen lassen (TOOMEY et al. 2010). Bis zum heutigen Stand der Erkenntnis wird jedoch von einer mesenchymalen Ursprungszelle ausgegangen, die für den Menschen bisher nicht näher definiert wurde (RIGGI et al. 2005).

Die Expression neuraler Marker lässt jedoch auch auf einen neuroektodermalen Ursprung schließen (OSUNA und DE ALAVA 2009). In murinen Zellreihen konnten bereits mesenchymale Progenitorzellen des Knochenmarks als Ursprungszelle für die Entwicklung eines Ewing-Sarkoms identifiziert werden (RIGGI et al. 2005).

Zur differenzialdiagnostischen Unterscheidung der Ewing-Tumoren von anderen klein-, rund- und blauzelligen Tumoren ist eine Biopsie des Tumors zur Anfertigung einer Histologie und immunhistochemischer Untersuchungen notwendig (KENNEDY et al. 2003). Histologisch erscheinen die Ewing-Tumoren als eine Masse dicht gepackter homogener, runder, kleiner Zellen mit klar abgrenzbarem Zytoplasma und in der Regel PAS- positiven intrazytoplasmatischen Glykogenablagerungen (RIGGI und STAMENKOVIC 2007) (siehe Abb. 2). Trotz klinisch sehr aggressivem, schnellem Wachstum weisen die Ewing-Tumoren nur eine geringe mitotische Aktivität auf (DELATTRE et al. 1994).



Abb. 2: Histologisches Korrelat eines klein-, rund- und blauzelligen ESFT, HE x128 (übernommen aus HABERMANN et al. 2003, S.321)

Immunhistochemisch stehen verschiedene Marker zur weiteren Differenzierung zur Verfügung. Über 90% der Ewing-Sarkome exprimieren das Membranglykoprotein CD99. Es wird durch das MIC2- Gen kodiert und hat eine Größe von ca. 32kDa. Ihm

wird eine Funktion in Zelladhäsionsprozessen zugeschrieben. Eine Expression des CD99 ist nicht spezifisch, da auch rund 15% der alveolären RMS, 90% der lymphoblastischen Lymphome, sowie einige Normalgewebe eine signifikante Reaktion auf CD99- Antikörper zeigen können (KAVALAR et al. 2009).

Je nach Grad der neuroektodermalen Differenzierung zeigen die Ewing-Tumoren eine unterschiedlich ausgeprägte Expression neuraler Marker, wie z.B. der Neuronen spezifischen Enolase (NSE), des Synaptophysins, des CD57- Proteins und des S-100- Proteins (RIGGI und STAMENKOVIC 2007).

Aufgrund der geringen Spezifität dieser immunhistochemischen Marker sind jedoch auch zusätzliche molekularpathologische Untersuchungen für eine definitive Diagnose erforderlich (RIGGI und STAMENKOVIC 2007).

1.4 Rhabdomyosarkome

Rhabdomyosarkome sind eine heterogene Gruppe maligner Tumoren mesenchymaler Herkunft mit unterschiedlichem Grad an Differenzierungsmerkmalen quergestreifter Muskulatur (DAVICIONI et al. 2006). Sie können in zwei histologische Hauptgruppen unterteilt werden: embryonale RMS und alveoläre RMS. Diese wiederum sind je nach histologischem Erscheinungsbild weiter unterteilt in botryoideund spindelzellige RMS, beides Varianten des embryonalen RMS, alveoläre RMS, pleomorphe RMS und undifferenzierte RMS (DAVICIONI et al. 2009; FERRARI et al. 2003). Nach ihrem morphologischen Erscheinungsbild gehören die RMS ebenfalls in die Gruppe der klein-, rund-, und blauzelligen Tumoren (LEWIS TB et al. 2007).

Rhabdomyosarkome sind mit über 50% die häufigsten Weichteilsarkome im Kindesalter (HAYES-JORDAN und ANDRASSY 2009). Im Erwachsenenalter sind diese Tumoren eher selten (LITTLE et al. 2002). Kinder bis zum 6. Lebensjahr sind am häufigsten betroffen. Auf dieses Alter fallen ca. 65% der Fälle (DAGHER und HELMAN 1999). Es gibt eine Prädominanz des männlichen Geschlechts mit einer Ratio von männlich zu weiblich von 1,37 (OGNJANOVIC et al. 2009).

Die bevorzugten Lokalisationen der RMS variieren je nach Alter des Patienten, sowie je nach histologischem Subtyp. Die Rhabdomyosarkome des Erwachsenen betreffen am häufigsten die Extremitäten und sind meist vom alvelolären Subtyp, wohingegen nur 20% der kindlichen RMS in den Extremitäten lokalisiert sind (HAYES-JORDAN und ANDRASSY 2009; DAGHER und HELMAN 1999). Die bevorzugten

Lokalisationen bei Kindern sind der Kopf und der Nackenbereich, hier besonders orbitale Tumoren, die meist vom embryonalen Subtyp sind (DAGHER und HELMAN 1999). Urogenitale RMS machen ca. 26% aller primären RMS aus. Hier wird besonders ein Vorkommen in Harnblase, Prostata, sowie in paratestikulärer Lage beschrieben (HAYES-JORDAN und ANDRASSY 2009). Nahezu 80% der RMS in urogenitaler Lage sind embryonale RMS (DAGHER und HELMAN 1999).

Die Ätiologie der RMS ist noch nicht abschließend geklärt. Rhabdomyosarkome sind maligne Tumoren mit morphologisch typischen und unterschiedlich ausgeprägten Differenzierungsmerkmalen der quergestreiften Muskulatur. Ihre Lokalisation in Regionen ohne Vorkommen von quergestreifter Muskulatur lässt jedoch von einem primitiven mesenchymalen Ursprung mit gewisser Skelettmuskeldifferenzierung ausgehen (DAVICIONI et al. 2006).

Obwohl der Großteil der RMS sporadisch auftritt, stehen einige Fälle im Zusammenhang mit familiären Syndromen, wie z.B. der Neurofibromatose und dem Li- Fraumeni- Syndrom (DAGHER und HELMAN 1999).

Die klinische Symptomatik variiert je nach Lage und Größe des Tumors (DAGHER und HELMAN 1999). Meist werden die Patienten durch Verdrängung umliegender Strukturen infolge der Größenzunahme des Tumors symptomatisch (HAYES-JORDAN und ANDRASSY 2009). RMS der Extremiäten gehen meist mit einer schmerzhaften Schwellung und Rötung einher (DAGHER und HELMAN 1999). Urogenitale RMS treten je nach Lokalisation durch bestimmte Symptomatiken klinisch in Erscheinung. In paratestikulärer Lage zum Beispiel können sie als schmerzlose Schwellung des Hodens imponieren und mit verschiedenen Differentialdiagnosen, wie einer Hernie, Hydrozele oder Varicocele leicht verwechselt werden (HAYES-JORDAN und ANDRASSY 2009). Das Vorkommen in der Blase geht oft mit Hämaturie und Harnverhalt einher. RMS der Prostata können durch Harnunregelmäßigkeiten auffallen oder bei Fortschreiten als massive Raumforderung des kleinen Beckens auch Obstipationen hervorrufen (HAYES-JORDAN und ANDRASSY 2009; DAGHER und HELMAN 1999).

Zur weiteren Differenzierung stehen auch hier verschiedene immunhistochemische Marker zur Verfügung. Alveoläre RMS exprimieren ebenfalls CD99, jedoch, im

Unterschied zu den Ewing- Tumoren, auch Desmin, Myogenin und MyoD1 (RIGGI und STAMENKOVIC 2007). Zur exakten Abgrenzung gegenüber anderen klein-, rund- und blauzelligen Tumoren, wie z.B. der Ewing-Tumoren, können molekularpathologische Untersuchungen hilfreich sein (LEWIS TB et al. 2007).

RMS des Erwachsenen sind hochmaligne Tumoren, die mit einer schlechten Prognose einhergehen. Im Vergleich zu den RMS des Kindesalters mit einem Langzeitüberleben von 70- 80% liegt dieses im Erwachsenenalter bei nur 35- 45% (LITTLE et al. 2002).

Bezüglich der histologischen Subtypen können ebenso prognostische Aussagen getroffen werden. Die botryoiden, sowie die spindelzelligen RMS gehen mit einer sehr guten Prognose einher, gefolgt von den embryonalen RMS mit einer mittleren Prognose. Die alveolären- sowie die undifferenzierten RMS haben eine schlechte Prognose und im Vergleich zu den embryonalen RMS sind die alveolären RMS durch ein deutlich aggressiveres Verhalten mit früher Tendenz zur Metastasierung, bevorzugt in die Lunge, gefolgt von Knochen, Knochenmark und Lymphknoten, gekennzeichnet (DAVICIONI et al. 2009; DAGHER und HELMAN 1999; NEWTON et al. 1995; QUALMAN et al. 1998).

Auf molekularpathologischer Ebene können ebenfalls Aussagen bezüglich der Prognose dieser Tumorerkrankung getroffen werden (siehe Abschnitt 1.5).

1.5 Molekularpathologie der Ewing-Tumoren und Rhabdomyosarkome

Molekularpathologische Untersuchungen an Tumorgeweben erlangen immer mehr Bedeutung in der modernen Diagnostik von WTS. Sie helfen nicht nur bei differentialdiagnostischen Entscheidungen, sondern liefern auch wichtige Informationen für die Prognose und Therapie dieser Tumorerkrankung, sei es zum Auffinden einer minimal residuellen Erkrankung oder für die Innovation neuer zielgerichteter Therapiestrategien (CORMIER und POLLOCK 2004; LEWIS TB et al. 2007; DE ALAVA und PARDO 2001; ODA und TSUNEYOSHI 2009).

In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedenste zytogenetische Aberrationen der unterschiedlichen WTS- Subtypen identifiziert, so auch die Fusionsgene der Ewing-Tumoren und RMS. Zusätzlich zu den chromosomalen Translokationen gibt es noch weitere genetische Aberrationen in WTS. Einige Sarkome zeichnen sich durch einen sehr komplexen Karyotyp aus, andere sind charakterisiert durch Punktmutationen, wie z.B. die gastrointestinalen Stromatumoren (OSUNA und DE ALAVA 2009). Die Weichteilsarkome sind aus molekularpathologischer Sicht in zwei Gruppen einzuteilen: Chromosomale- Translokation- assoziierte Sarkome und Sarkome ohne spezifische chromosomale Translokation. Die genetischen Translokationen und ihre Fusionsgene sind spezifisch für die jeweiligen WTS- Subtypen (ODA und TSUNEYOSHI 2009).

Histologischer Subtyp	Chromosomale	Eusionsgon	
	Translokation	rusionsgen	
	t (11;22)(q24;q12)	EWS/FLI1	
Ewing-Sarkom/nPNET	t(21;22)(q22;q12)	EWS/ERG	
Ewing-Sarkon/printer	t(7;22)(p22;q12)	EWS/ETV1	
	t(17;22)(q12;q12)	EWS/E1AF	
	t(2;13)(q35;q14)	PAX3/FKHR	
Alveolates Mills	t(1;13)(q36;q14)	PAX7/FKHR	
		SS18/SSX1	
Synovialsarkom	t(X;18)(p11.2;q11.2)	SS18/SSX2	
		SS18/SSX4	
Myzoides/Rundzelliges Linosarkom	t(12;16)(q13;p11)	FUS/DDIT3	
Myxoldes/Adhuzelliges Liposarkom	t(12;22)(q13;q12)	EWS/DDIT3	
Klarzellsarkom	t(12;22)(q13;q12)	EWS/ATF1	
	t(2;22)(q34;q12)	EWS/CREB1	
Extraskelettales myxoides	t(9;22)(q22;q12)	EWS/NR4A3	
Chondrosarkom	t(9;17)(q22;q11)	RBP56/NR4A3	
Desmoplastischer klein- und rundzelliger Tumor	t(11;22)(p13;q12)	EWS/WT1	

Tab. 1: Chromosomale Translokationen in Weichteilsarkomen (modifiziert nach ODA und TSUNEYOSHI 2009, S. 202; OSUNA und DE ALAVA 2009, S. 16) blau: Fusionsgene der WTS- Subtypen, die in vorliegender Dissertation näher betrachtet werden sollen.

Mit rund 85% ist die Translokation EWS/FLI1 die am häufigsten vorkommende Translokation in den Ewing-Tumoren, von denen durch Fusion des Exons 7 des EWS- Gens mit Exon 6 des FLI- Gens ca. 60% Typ 1 und die restlichen 40% Typ 2 bilden, wobei in diesem Fall das Exon 7 des EWS- Gens mit Exon 5 des Fli1- Gens fusioniert (LEWIS TB et al. 2007) (siehe Abb. 3).



Die Translokation aus dem EWS- mit dem ERG- Gen stellt mit ca. 10% die zweithäufigste dar (LEWIS TB et al. 2007). Das FLI1- sowie das ERG- Gen gehören beide der ETS- Genfamilie an und deren EWS- Fusionsgene zeigen ein sehr ähnliches biologisches und klinisches Verhalten (GINSBERG et al. 1999). Das FLI1- Gen ist in seiner normalen Zellfunktion ein Transkriptionsfaktor (TRUONG und BEN-DAVID 2000).

Die verbleibenden 5% setzen sich zusammen aus den sehr seltenen Translokationen durch Fusion des EWS- Gens mit ETV1, E1AF oder FEV (BURCHILL 2003). In bis zu 20% der Fälle können diese spezifischen Translokationen nicht nachweisbar sein (DELATTRE et al. 1994).

Translokation	Fusionstranskript	Häufigkeit in ESFT
t (11;22)(q24;q12)	EWS/FLI1	85%
t(21;22)(q22;q12)	EWS/ERG	10%
t(7;22)(p22;q12)	EWS/ETV1	selten (<1%)
t(17;22)(q12;q12)	EWS/E1AF	selten (<1%)
t(2;22)(q33;q12)	EWS/FEV	selten (<1%)

<u>**Tab. 2:</u>** Die wichtigsten Translokationen der Ewing-Tumoren (modifiziert nach BURCHILL 2003, S. 97; RIGGI und STAMENKOVIC 2007, S.3)</u>

Selten wird auch ein Vorkommen komplexer chromosomaler Veränderungen beschrieben, die fraglich mit einem aggressiveren Tumorverhalten einhergehen sollen (BURCHILL 2003).

Immer mehr rücken die Zusammenhänge zwischen der Molekularpathologie der ESFT und der Tumorgenese/- biologie in den Vordergrund des Forschungsinteresses.

Als mögliche biologische Hintergründe einer verbesserten Prognose bei Vorliegen der EWS/FLI1 Typ 1- Translokation im Vergleich zu den anderen Translokationen wird eine geringere Proliferationsrate (DE ALAVA et al. 2000) und die Kodierung für einen weniger aktiven chimären Transkriptionsfaktor diskutiert (LIN et al. 1999).

Bezüglich der Tumorgenese der ESFT werden die Fusionsgene als auslösende primäre genetische Veränderung betrachtet, welche in Kombination mit weiteren sekundären genetischen Veränderungen schließlich zur Entwicklung des Tumorphänotyps führen (WEI et al. 2000; TOOMEY et al. 2010).

Die Möglichkeit einer onkogenen Transformation durch das Fusionsgen EWS/FLI1 wurde bereits 1993 beschrieben, beobachtet an murinen Fibroblasten (MAY et al. 1993). Die Arbeitsgruppe RIGGI et al. zeigte im Jahre 2005 in vitro eine durch das Fusionstranskript EWS/FLI1 induzierte onkogene Transformation von mesenchymalen Knochenmarks- Progenitorzellen zu einem Tumor mit typischen Charakteristiken (morphologisch, immunhistochemisch und molekularpathologisch) der ESFT.

Als onkogene Transkriptionsfaktoren fungierend, nehmen die spezifischen Fusionstranskripte in der Regel Einfluss auf Schlüsselfunktionen der Zelle wie Zellproliferation und Apoptose, was meist den Verlust der Zellzykluskontrolle und eine Induktion der Apoptose zur Folge hat (OSUNA und DE ALAVA 2009).

Ein wichtiger Kontrollpunkt im Ablauf des Zellzyklus ist der G1- Kontrollpunkt, an dem entschieden wird, ob die Zelle in die Synthese- Phase übergehen darf, um ihr genetisches Material zu kopieren. Die wichtigsten regulatorischen Proteine dieser Phase sind die Cyclin- abhängigen- Kinasen (CDKs), Cyclin D und E, das Retinoblastom- Protein, p53 und die Zyklininhibitoren p21, p16 und p27 (MAITRA et al. 2001). Über Regulation der Genexpression nehmen die Fusionsgene Einfluss auf einige dieser wichtigen G1- regulatorischen Proteine (MATSUMOTO et al. 2001) (siehe Abb. 4).

Folgende bereits untersuchte sekundäre genetische Veränderungen mit Einfluss auf den Zellzyklus und Apoptose werden für Tumorprogress und – proliferation verantwortlich gemacht (WEI et al. 2000).

Eine verminderte Expression des Tumorsuppressorproteins p21 duch negative Regulation des kodierenden Gens p21^{WAF1} über direkte Interaktion mit dem EWS/FLI1 Fusionsgen stellt eine der häufigsten molekularen Veränderungen in ESFT dar (NAKATANI et al. 2003; BURCHILL 2003; MAITRA et al. 2001). Der CDK-Inhibitor p21 kontrolliert den Übergang der G1- in die S- Phase über Bindung von Cyclin- CDK- Komplexen. Diese können, gebunden an p21, das Retinoblastom (Rb)-Gen nicht phosphorylieren, sodass der Transkriptionsfaktor E2F nicht frei wird und somit kein Übergang in die S- Phase stattfinden kann. Unkontrollierte Zellproliferation ist hier die Folge der verminderten Expression des p21- Proteins (SHERR 2000).

Der Verlust des INK4a- Gens, welches für einen weiteren CDK- Inhibitor, das Protein p16, kodiert, stellt einen negativ prognostischen Faktor dar. Als CDK- Inhibitor veranlasst auch dieses Tumorsuppressorprotein einen G1- Arrest durch fehlende Phosphorylierung des Rb- Proteins durch Cyclin- CDK- Komplexe (WEI et al. 2000). Ein Verlust des INK4a- Gens und somit ein Verlust des p16- Proteins führt auch hier zu einem Proliferationsvorteil (KOVAR et al. 1997).

Das p27- Tumorsuppressorprotein reguliert den Ein- und Austritt der G0- Phase. MATSUNOBU et al. beschreiben in ihrer Arbeit 2006 einen Mechanismus der ESFT, die physiologische Seneszenz (Wachstumseinstellung) der Zellen nach Durchlaufen mehrerer Mitosen zu umgehen und unbeschränkt weiter zu proliferieren. Durch vermehrten Abbau des p27- Tumorsuppressorproteins über Aktivierung des Ubiquitin- Proteasom- Mechanismus würde dies erreicht werden. Ein ungehindertes Tumorwachstum sei die Folge. In einer Untersuchung von MATSUNOBU et al. 2004 bezüglich des prognostischen Wertes von p27 konnte ein niedriges Expressionslevel dieses Proteins als negativer prognostischer Marker bewertet werden.



Die beiden Hauptgruppen der RMS, alveolär und embryonal, weisen eine unterschiedliche Molekularpathologie auf mit demnach unterschiedlichem Einfluss auf die Tumorgenese (DAGHER und HELMAN 1999).

Die meisten der alveolären RMS, mehr als 85%, sind durch die Expression einer der beiden spezifischen Fusionstranskripte charakterisiert. Die häufigste dieser genetischen Translokationen ist die des PAX3- mit dem FKHR- Gen (55%), gefolgt von einer Translokation des PAX7- mit dem FKHR- Gen (22%) (SORENSEN et al. 2002). In etwa 25% der Fälle können diese Fusionsgene jedoch komplett fehlen (DAVICIONI et al. 2009). Die embryonalen RMS hingegen weisen keine spezifischen chromosomalen Translokationen auf. Sie zeigen eine höhere genetische Instabilität mit komplexeren chromosomalen Veränderungen (DAVICIONI et al. 2009).

Auf molekularpathologischer Ebene können ebenfalls Aussagen bezüglich der Prognose dieser Tumorerkrankung getroffen werden. So korreliert die Expression des Fusionstranskripts PAX3/FKHR in metastasierten alveolären RMS mit einer schlechteren Prognose im Vergleich zu Tumoren mit Expression der Translokation PAX7/FKHR (SORENSEN et al. 2002).

<u>1.6 Die Bedeutung molekularpathologischer Erkenntnisse für Fortschritte in der Therapie der Weichteilsarkome</u>

Mit Hilfe molekularpathologischer Untersuchungen an Tumoren werden neue Erkenntnisse über Tumorgenese und – biologie erlangt mit Verfolgung zweier Hauptziele: Die Zuordnung der Patienten zu bestimmten Risikogruppen und dementsprechend eine Anpassung des Therapiemanagements, sowie die Entwicklung neuer zielgerichteter Therapiestrategien (BURCHILL 2003).

Fortschritte in der Detektion der spezifischen Fusionstranskripte, sowie deren Interaktion mit verschiedensten Genen, die zur Tumorgenese und –proliferation beitragen, liefern erste Ansatzpunkte für neue Therapiekonzepte (ODA und TSUNEYOSHI 2009).

Beispielsweise kann die Fusions- mRNA direkt als mögliches Target dienen, da diese für einen chimären onkogenen Transkriptionsfaktor kodiert, der ursächlich ist für Tumorgenese und –proliferation in den ESFT (OSUNA und DE ALAVA 2009). Eine Inhibition der Expression des EWS/FLI1 Fusionsgens durch Antisense Oligonukleotide gegen die chimäre Fusions- RNA bewirkte eine signifikante Reduktion der Tumorzellproliferation in vitro an humanen ESFT- Zelllinien, sowie in vivo an Mäusen (TANAKA et al. 1997). Ein reduziertes Tumorzellwachstum konnte auch über eine "small interfering RNA" (siRNA), zielgerichtet gegen die EWS/FLI1-Fusionstranskript- mRNA, erreicht werden (TOUB et al. 2006).

Das Transmembranprotein CD99 hat nicht nur Bedeutung in der Diagnostik der ESFT. Vielmehr stellt dessen molekulare Inhibition über anti- CD99 monoklonale Antikörper eine mögliche Therapieoption durch Induktion der Apoptose in Tumorzellen (SCOTLANDI et al. 2000), bzw. durch Blockierung der Differenzierung der Tumorzellen dar (ROCCHI et al. 2010).

Einer Studiengruppe um ERKIZAN et al. gelang 2009 über die Blockierung der Interaktion des EWS/FLI1 Fusionsgens mit der RNA Helicase A eine Inhibition des Tumorwachstums und eine Induktion der Apoptose in den Tumorzellen zu erzielen. Über ein "small molecule", also einen niedermolekularen Inhibitor, welches das EWS/FLI1 Fusionsprotein bindet und so eine Interaktion mit der RNA Helicase A verhindert, konnte dies erreicht werden. Diese Strategie wäre sogar eventuell auf andere Sarkomentitäten mit Expression bestimmter Fusionsproteine anwendbar (ERKIZAN et al. 2009).

In der Zukunft werden zahlreiche weitere wissenschaftliche Untersuchungen notwendig sein, um die bisherigen Erkenntnisse auszubauen und so eventuell neue Therapiestrategien zu entwickeln, die Fortschritte bringen können in der modernen Therapie dieser aggressiven Tumoren.

1.7 Fragestellung

- Die verschiedenen Sarkomentitäten weisen unterschiedliche Fusionstranskripte auf. Es sollte mit Hilfe der Real Time- quantitativen PCR untersucht werden, ob diese ebenfalls spezifisch in den Ewing-Tumoren und embryonalen Rhabdomyosarkomen des Urogenitaltraktes nachzuweisen sind mit Herstellung eines positiven Standards für eine dieser Translokationen.
- 2) Nachfolgend sollte geklärt werden, ob die Real Time- quantitative PCR eine geeignete und zuverlässige Methode zum Nachweis von Fusionstranskripten insbesondere in Formalin-fixierten, Paraffin-gebetteten Geweben, als Standard der Gewebeasservation, ist.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Geräte

Agilent Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Waldbronn	
Analysewaage, AT261 Delta Range®	Mettler- Toledo, Gießen	
elektrischer Homogenisator, Ultra- Turrax	IKA, Staufen	
Typ TP18/10, Janke und Kunkel		
Elektrophoresekammer horizontal mit	Biotec- Fischer, Reiskirchen	
Gelkamm und Begrenzungen		
Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer, Rodgau- Jügesheim	
Thermocycler My iQ™ Single Color Real	BioRad, München	
Time PCR Detection System		
Kühlplatte	Kunz Instruments A/S, Dänemark	
Mikroliterpipetten (2,5, 10, 100µl)	Eppendorf, Hamburg	
Mikrotom (Schlitten, HM430)	Microm, Walldorf	
Mikrotom- Klingen, A35	Pfm (Produkte für die Medizin AG), Köln	
Netzgerät Power-Pac 200	BioRad, München	
Photometer, Gene Quant II RNA/ DNA	Pharmacia Biotech, Freiburg	
Calculator		
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg	
UV- Transilluminator, E.A.S.Y. RH-3	Herolab, Wiesloch	
Video Copy Prozessor	Mitsubishi, Hong Kong (China)	
Videokamera, E.A.S.Y. 429K	Herolab, Wiesloch	
Vortexer, IKA® Works	IKA® Werke GmbH, Staufen	
Vortexer, MS1 Minishaker	IKA® Werke GmbH, Staufen	
Vortexer, Vortex Genie 2 ™	Bender& Hobein AG, Zürich (Schweiz)	
Zentrifuge, Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg	
Zentrifuge, Labofuge 400R Function Line	Heraeus, Hanau	
Zentrifuge, Omnifuge 2.0 RS	Heraeus, Hanau	

Gebrauchsmaterial

Handschuhe Peha- Soft, Größe M Optical Tape Parafilm® M

Petrischalen, Cellstar®, 60x15mm Pipettenspitzen mit Filter, Biosphere® Filter Tips 10µl, 100µl Pipettenspitzen, Biosphere® Quality Tips 10µl Pipettenspitzen, epT.I.P.S. 300µl Reagiergefäß, Microtube 0,5ml, 1,5ml, 2ml Reaktionsgefäß, Multiply®- Pro cup 0,2ml Reaktionsgefäße, 8x- Strip Tubes 0,2ml Röhrengefäß 13ml Skalpel, Techno Cut

Chemikalien

Aceton Agarose Chloroform 6x DNA- Loading Dye 1ml Ethanol 100% Ethanol 70% Ethanol 75% Ethidiumbromid

Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder Gene Ruler™ 50bp DNA Ladder Hot Star Taq™ Master Mix 0,85ml Isopropanol peqGOLD TriFastT^M Hartmann, Heidenheim BioRad, München American National Can Company, Chicago (USA) Greiner Bio- One, Frickenhausen Sarstedt, Nümbrecht

Sarstedt, Nümbrecht

Eppendorf/Gilson, Hamburg Sarstedt, Nümbrecht Sarstedt, Nümbrecht Biozym, Hess. Oldendorf Sarstedt, Nümbrecht HMD Healthcare Ltd, Horsham (Großbritannien)

Merck, Darmstadt Invitrogen, Karlsruhe Amresco, Cochran (USA) Fermentas, St. Leon- Rot Merck, Darmstadt Chemie- Vetrieb, Hannover Merck, Darmstadt Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg Fermentas, St. Leon- Rot Fermentas, St. Leon- Rot Quiagen, Hilden Merck, Darmstadt peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen Plus SYBR® Green I with fluoresceinEurogentec, KölnRandom Primer für cDNA- SyntheseInvitrogen, KarlsruheRNase- freies WasserSigma, DeisenhofenRNase InhibitorEppendorf, HamburgXylol, Isomerengemisch aus meta-, ortho-
und para- XylolMallinckrodt Baker B.V., Deventer
(Niederlande)

Puffer und Lösungen

Ethidiumbromid- Lösung 400ml destilliertes Wasser 400µl Ethidiumbromid

Ultra Pure ™ 10x TAE-Puffer, 1000ml Invitrogen, Karlsruhe 400mM Tris-Acetat 10mM EDTA → 1:10 verdünnt mit Reinstwasser (100ml 10x TAE- Puffer + 900ml H₂O) zu: 1x TAE- Puffer, 1000ml 40mM Tris- Acetat 1mM EDTA

Kit für die RNA- Isolation aus Formalin- fixiertem in Paraffin gebettetem Gewebe

RNeasy ® FFPE Kit

Qiagen, Hilden

- gDNA Eliminator Mini Spin Column
- RNeasy Min Elute Spin Column
- Collection Tubes 1,5ml, 2,0ml
- PKD- Puffer, Proteinase K- Verdaupuffer 15ml
- Proteinase K Lösung 6,0ml
- RBC- Puffer, FFPE- Bindungspuffer 45ml
- RPE- Puffer, Waschpuffer 11ml (Konzentrat)
- RNase- freies Wasser 10ml

Kit für die RNA- Konzentrations- und Qualitätsbestimmung

Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Waldbronn
-25 RNA Nano Chips	
- 2 Elektrodenreiniger	
- Agilent RNA 6000 Leiter	
- RNA Nano	
Fluoreszenzfarbstoffkonzentrat	
- Agilent RNA 6000 Nano Marker	
- Agilent RNA 6000 Nano Gelmatrix	
- 4 Spin Filtergefäße	
- Chip- Vorbereitungsstation	
- DNase/RNase- freie Eppendorf Gefäße	
Kit für die cDNA- Synthese	
Omniscript® RT Kit	Qiagen, Hilden
- RNase- freies Wasser	
- RT (Reverse Transkriptase)	
- RT- Puffer	
- dNTP Mix 5mMol	
Kit für die DNA- Aufreinigung	
QIA quick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIA quick PCR Purification Kit - PE- Puffer (Waschpuffer)	Qiagen, Hilden

- QIA quick Spin Columns
- Collection tubes (2ml)

Primer für die PCR

Housekeeping- Gen ARP (Antisense)	IBA, Göttingen
Housekeeping- Gen ARP (Sense)	
EWS/ERG (Antisense)	Eurofins MWG Synthesis GmbH,
	Ebersberg
EWS/FLI1 (Antisense)	
EWS/FLI1 (Sense)	
EWS/FLI1 Typ 1 (Nested-Primer)	

EWS/FLI1 Typ 2 (Nested-Primer) EWSmut Typ 2(Sense) (mutagener Primer) PAX3/FKHR (Antisense) PAX3/FKHR (Sense) PAX3/FKHR (Nested-Primer) PAX7/FKHR (Nested-Primer)

EDV

Agilent Bioanalyzer 2100 expert SoftwareAgilent Technologies, WaldbronnE.A.S.Y. Win32 GeldokumentationssystemHerolab, WieslochiQ5 Optical System Software 2.0BioRad, München

2.2 Verwendete Gewebeproben und Zellkultur- RNA

Die in vorliegender Arbeit verwendeten Gewebeproben wurden freundlicherweise durch das Zentrum Pathologie der Universität Göttingen zur Verfügung gestellt.

Bei diesen handelt es sich um 20 Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete Tumorgewebsstücke der Tumorentitäten embryonales Rhabdomyosarkom und Ewing-Tumor. Zusätzlich wurde eine Frischgewebsprobe der Tumorentität Ewing-Sarkom verwandt. Im Datenarchiv der Pathologie des Universitätsklinikums Göttingen wurden Patienten mit Weichteilsarkom des Urogenitaltraktes der Jahre 1997 bis 2009 rekrutiert. Die Frischgewebsprobe stammt aus dem Jahr 2010.

Eine Zellkultur- RNA stammt aus den Beständen des urologischen Forschungslabors. Diese, sowie die RNA einer weiteren Frischgewebsprobe aus der Pathologie, wurden zum Vergleich der RNA- Qualität herangezogen und somit lediglich zur RNA- Qualitätsmessung im Agilent Bioanalyzer 2100 verwendet. Für weitere Versuche wurden sie ausgeschlossen.

Es lagen von jedem Patienten mehrere Paraffinblöcke vor mit Tumorgewebe aus verschiedenen Anschnitten und Bereichen des Tumors. Um einen Paraffinblock mit ausreichend gut erhaltenem Tumorgewebe ausfindig zu machen, wurden HE-Schnitte der entsprechenden Blöcke unter dem Auflichtmikroskop von einem Pathologen begutachtet. Für jeden Patienten wurden so je zwei Paraffinblöcke ausgewählt.

Dationt	Drobonnummor	Tumorontitöt	Jahr der	
Fallent	Probennummer	Tumorentitat	Materialgewinnung	
	1 A	Embryonales	1007	
I	1 B	Rhabdomyosarkom	1997	
	2 A	Embryonales	1000	
	2 B	Rhabdomyosarkom	1999	
	3 A	Embryonales	1000	
	3 B	Rhabdomyosarkom	1999	
IV	4 A	pPNFT	1999	
	4 B	priver		
v	5 A	nPNFT	2001	
-	5 B	p		
VI	6 A	pPNFT	2001	
	6 B	priver	2001	
VII	7 A	pPNFT	2005	
	7 B	priter	2000	
VIII	8 A	pPNFT	2007	
• • • •	8 B	priter	2001	
IX	9 A	pPNFT	2008	
	9 B	priver	2000	
x	10 A	Embryonales	2009	
	10 B	Rhabdomyosarkom	2000	
XI	Frischgewebe (F)	Ewing-Sarkom	2010	

<u>**Tab. 3**</u>: Verwendete Gewebeproben mit Zuordnung zu Tumorentität und Jahr der Probenasservation

Herkunft der RNA	Probenname		Herkunft
Zellkultur	LNCaP	(menschliche	Lymphknotenmetastase
	Zelllinie)		(links supraklavikulär)
			eines Prostatakarzinoms
Frischgewebsprobe	F 2		normales Nierengewebe

Tab. 4: Herkunft der RNA zum Vergleich der RNA- Qualität

2.3 RNA- Isolation

2.3.1 RNA- Isolation aus Formalin- fixierten in Paraffin gebetteten Gewebeproben

Anfertigung der Schnitte

Von jedem Paraffinblock wurden zehn 10µm dicke Schnitte als Röllchen angefertigt und in einem 1,5ml Reaktionsgefäß gesammelt.

Dafür wurden die Blöcke zunächst für eine halbe Stunde auf einer Kälteplatte bei -20°C inkubiert, um eine Verfestigung des Paraffins zu erreichen und so gute Bedingungen für das anschließende Schneiden zu schaffen.

Um eine Kontamination zu vermeiden wurden der gesamte Arbeitsplatz, das Mikrotom und die Klingen sowohl vor Benutzung, als auch nach jedem Wechsel des Blockes mit Aceton gereinigt.

RNA- Isolation

Nach Fertigstellung der Schnitte wurde die RNA- Isolation mit Hilfe des RNeasy® FFPE Kits der Firma Qiagen durchgeführt.

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde der gesamte Arbeitsbereich zuvor mit 70%igem Ethanol gereinigt.

Zunächst wurde 1ml Xylol zu den Paraffinröllchen gegeben und für 10sek gemischt. Anschließend wurde das Gemisch für 10min bei Raumtemperatur inkubiert, drei Minuten bei 13.000U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Diese Schritte wurden wiederholt, um eine vollständige Lösung des Paraffins zu erreichen. Um das Xylol wieder herauszuwaschen, folgten im Anschluss zwei Waschschritte mit 100% igem Ethanol. Hierfür wurde jeweils 1ml Ethanol zu den Proben gegeben, 10sek gemischt, 5min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich drei Minuten bei 13.000U/min zentrifugiert, mit anschließendem jeweiligem Verwerfen des Überstandes. Das Pellet wurde nun bei geöffnetem Reaktionsgefäß im Thermomixer bei 55°C für 15min getrocknet. Jede Probe wurde mit 160µl eines Gemisches von 10µl Proteinase K und 150µl PKD- Puffer resuspendiert. Nach gründlichem Mischen auf dem Vortexer erfolgte eine Inkubation im Thermomixer für 15min bei 55°C und anschließenden 15min bei 80°C, jeweils mit geschlossenem Reaktionsgefäß. Im Anschluss daran wurden zu jeder Probe 320µl RBC- Puffer gegeben und gemischt.

Nun wurde das Gemisch auf eine gDNA- Eliminator- Säule pipettiert und diese für 30sek bei 10.000U/min zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen, der Durchfluss weiterverarbeitet.

720µl 100%iges Ethanol wurden nun hinzugegeben und nur durch Resuspendieren vermischt. Von der Probe wurden anschließend 600µl auf eine RNeasy® Min Elute-Säule pipettiert, 15sek bei 10.000U/min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dieser Schritt wurde so lange wiederholt, bis das gesamte Volumen zentrifugiert war. Nun wurde zweimal mit je 500µl RPE- Waschpuffer gewaschen und danach beim ersten Waschschritt für 15sek bei 10.000U/min zentrifugiert und beim zweiten Schritt für 2min. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen.

Die Säule wurde nun in ein neues 2ml Sammelgefäß gestellt, der Säulendeckel abgeschnitten und zum Trocknen der Säulenmembran für 5min bei 13.000U/min zentrifugiert. Das Sammelgefäß mit verbliebenem Durchfluss wurde verworfen und die Säule in das endgültige 1,5ml Reaktionsgefäß eingesetzt. Zum Eluieren der RNA wurde anschließend 15µl RNase- freies Wasser direkt auf den Filter pipettiert und für eine Minute bei 13.000U/min zentrifugiert. Im Gefäß befand sich danach die isolierte RNA. Sie wurde bei -20°C gelagert.

Die Proben 4A, 4B, 6A und 6B wiesen bei der initialen Isolation eine so geringe Menge an RNA auf, dass in der Folge die dreifache Menge (3x 10 10µm dicke Schnitte) dieser Proben zur RNA- Isolation verwandt wurde.

2.3.2 RNA- Isolation aus Frischgewebe

Ein kleines Gewebsstück der Frischgewebsprobe wurde nach Ankunft in der Pathologie in ein 1,5ml Reaktionsgefäß mit 0,7ml RNA-Later überführt.

Für eine vollständige Lyse des Gewebes wurde dieses in Petrischalen mit dem Skalpel zerkleinert. In einem 2ml Reaktionsgefäß wurden schließlich etwa 50- 100mg Gewebe mit 1ml TriFast Lysepuffer homogenisiert, d.h. nicht mehr als 10% des verwendeten Puffervolumens. Anschließend wurde die Probe mit dem Homogenisator elektrisch suspendiert, 5min ruhen gelassen und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 0,2ml Chloroform wurde die Probe für 15sek kräftig geschüttelt und 7min bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Zentrifugation bei 13.000U/min für 5min führte zur Trennung des Homogenats in 3 Phasen: Eine untere rote Phenol- Chloroform- Phase, eine Interphase und eine obere farblose wässrige Phase.

Die RNA ist in der wässrigen Phase angereichert; die anderen Phasen enthalten DNA und Proteine. Die wässrige Phase wurde nun in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und zur Präzipitation der RNA mit 0,5ml Isopropanol versetzt. Die Probe wurde gemischt und für 13min bei Raumtemperatur inkubiert. Aus der anschließenden Zentrifugation für 10min bei 13.000U/min und 4°C ging das weißlich, gelartige RNA- Präzipitat hervor, welches sich am Boden des Gefäßes befand. Der Isopropanolüberstand wurde vorsichtig abgezogen und das Pellet zweimal mit 1ml 75%igem Ethanol durch Vortexen und anschließender Zentrifugation (10min bei 13.000U/min und 4°C) gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde das Ethanol stets verworfen.

Zum Lösen der RNA wurde das Pellet kurz an der Luft trocknen gelassen und die RNA durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit der Pipette in 30µl RNAse- freiem Wasser gelöst. Die RNA wurde bei -20°C gelagert.

2.4 Messung der RNA- Konzentration und – Qualität

2.4.1 Einführung

Mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers ist es möglich, die Gesamt- RNA auf ihre Integrität und Konzentration zu prüfen. Die einzelnen Fraktionen der Gesamt- RNA werden bei ihrer Durchwanderung in Gel gefüllten Kapillaren elektrophoretisch nach ihrer größenabhängigen Wanderungsgeschwindigkeit aufgetrennt. Zusätzlich bindet ein Fluoreszenzfarbstoff spezifisch an die Nukleinsäuren. Dieser sorgt für ein Fluoreszenzsignal sowie die RNA- Fraktionen beim Durchwandern der Glaskapillare einen Laser passieren. Ein Leiter läuft in einem separaten Kanal zur Größen- und Quantitätsstandardisierung mit (SODOWICH et al. 2007).

Proben mit intakter Gesamt- RNA zeigen in der gelektrophoretischen Darstellung ein typisches Muster mit zwei deutlichen Banden, die den in großen Mengen vorhandenen 28S- und 18S- Untereinheiten der ribosomalen RNA (rRNA) entsprechen (FLEIGE und PFAFFL 2006). Andere Banden werden von niedermolekularen RNA- Spezies gebildet (SCHROEDER et al. 2006).

In einer Darstellung mit Auftragung der Fluoreszenzintensität gegen die Durchwanderungsgeschwindigkeit in der Glaskapillare zeigt sich ebenfalls ein typisches Muster. Hier bringen die beiden Fraktionen der 28S- und 18S- ribosomalen RNA zwei deutliche Maxima hervor. Ein kleinerer Peak entspricht kleinen rRNA Fragmenten, wie die 5S- RNA (FLEIGE und PFAFFL 2006) (siehe Abb. 5).

Eine Degradation der Gesamt- RNA zeichnet sich in einer kontinuierlichen Tendenz in Richtung kleinerer Fragmente aus (SCHROEDER et al. 2006). Sowohl in der Darstellung als Gel, als auch im Elektropherogramm ist dann nur eine Bande bzw. ein Maximum im Größenbereich kleiner Fragmente sichtbar. Eine Abnahme des Fluoreszenzsignals ist Ausdruck der durch die Degradation zerstörten Bindungsstellen des Fluoreszenzfarbstoffes an den Nukleinsäuren (FLEIGE und PFAFFL 2006) (siehe Abb. 5).



Zur vereinfachten Interpretation des Elektropherogramms dient die Bestimmung der RNA integrity number (RIN). Diese klassifiziert die Gesamt- RNA von 1, maximal degradiert, bis 10 als maximal intakte RNA (SCHROEDER et al. 2006). FLEIGE und PFAFFL beschreiben 2006 eine RIN von größer 5 als gute RNA- Qualität und eine RIN von größer 8 als perfekte Qualität der Gesamt- RNA.

2.4.2 Durchführung der Messung

Die Messung der Gesamt- RNA wurde mit Hilfe des Agilent RNA 6000 Nano Kits der Firma Agilent Technologies durchgeführt.

Präparation des Gels

Zur Präparation des Gels wurden zunächst 550µl der RNA 6000 Nano Gelmatrix in ein Spin- Filtergefäß pipettiert und bei 4.300U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert.

65µl des Durchflusses wurden anschließend in ein 0,5ml Reaktionsgefäß überführt. Das Gel konnte innerhalb von 4 Wochen verwendet werden.

Präparation des Gel- Fluoreszenzfarbstoff- Mixes

Das RNA 6000 Nano Fluoreszenzfarbstoff- Konzentrat wurde für 30min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend gemischt und 1µl davon auf das gefilterte Gel gegeben. Das Gemisch wurde nun erneut gut gemischt und für 10min bei 13.000U/min zentrifugiert. Der präparierte Gel- Fluoreszenzfarbstoff- Mix wurde innerhalb eines Tages verwendet.

Beladung des Kapillarchips

Zu Beginn wurde ein RNA 6000 Nano Chip in die Chip- Vorbereitungsstation eingesetzt. 9,0µl des Gel- Mixes wurden in die dafür vorgesehene Öffnung auf dem Chip pipettiert, die Vorbereitungsstation geschlossen und die daran befestigte Fertigspritze mit 1ml enthaltender Luft entleert. Um den Gel- Mix so in allen Gängen des Chips zu verteilen, wurde anschließend für genau 30sek gewartet. Um erneut 9,0µl des Gel- Mixes in zwei andere dafür vorgesehene Gefäße des Chips einzubringen, wurde die Vorbereitungsstation erneut geöffnet.

Im Anschluss daran wurden je 5µl des RNA 6000 Nano Markers in alle 12 Probenöffnungen und in die Öffnung des Leiters pipettiert, bevor schließlich je 1µl der isolierten Gesamt- RNA- Proben, bzw. 1µl des Leiters, dazugegeben wurde.

Nun wurde der fertig beladene Chip im IKA® Vortexer für 1 Minute bei 2.400U/min gründlich gerüttelt und anschließend im Agilent 2100 Bioanalyzer positioniert und gemessen.

2.5 Umschreibung der RNA in cDNA mittels RT

2.5.1 Funktionsprinzip

Um für die folgende quantitative Real Time- PCR ein geeignetes Substrat vorliegen zu haben, das von der DNA- Polymerase zur Amplifikation erkannt wird, muss zunächst die RNA durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden. Dies geschieht bei der reversen Transkription. Von an die RNA gebundenen Primern ausgehend, die von der Reversen Transkriptase erkannt werden, beginnt die cDNA- Synthese (LÖFFLER 2005).

2.5.2 Durchführung

Für die Durchführung der reversen Transkription wurde die isolierte RNA mit Hilfe eines Gene Amp PCR Systems 2400 der Firma Perkin Elmer mittels RT in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde das Omniscript® RT Kit der Firma Qiagen verwendet. Das Omniscript® RT Kit ist ausgelegt für eine eingesetzte RNA- Menge von 50ng bis 2µg. Es wurde die für dieses Kit zulässige Höchstmenge an RNA, 2µg, eingesetzt.

Da diese Menge nicht bei allen Proben erreicht werden konnte, wurde bei den entsprechenden vier Proben (4 A, 4 B, 6 A und 6 B) eine gleiche RNA- Menge von 350ng eingesetzt. Für die cDNA- Synthese wurden insgesamt 20µl Volumen eingesetzt, welches sich zusammensetzte aus 5,8µl Master Mix und auf 14,2µl eingestelltem RNA- Volumen.

Die eingesetzte Menge von 2µg Gesamt- RNA wurde ausgehend von der im Agilent 2100 Bioanalyzer gemessenen Konzentration errechnet. Die Proben wurden auf Eis schonend aufgetaut. Die für jede Probe errechnete Menge RNase- freien Wassers wurde in mit der Probennummer beschriftete kleine 2µl Reagiergefäße pipettiert und anschließend die errechnete Menge an RNA direkt dazu gegeben. Die Proben wurden nun für 5min bei 65,0°C und für 10min bei 4,0°C im Cycler inkubiert. In der Zwischenzeit wurde der Master Mix für die errechnete Probenmenge vorbereitet. Dieser setzte sich zusammen aus je 2µl RT- Puffer und dNTP- Mix (Desoxyribonukleosidtriphosphat), 0,5µl Random- Primer, 1µl Reverse Transkriptase und 0,3µl RNase Inhibitor.

Der fertige Master Mix wurde gründlich gemischt und auf Eis gestellt.

Nach abgelaufener Inkubationszeit wurden jeweils 5,8µl des Master Mixes zu den Proben gegeben. Nun folgte eine Inkubation bei 25,0°C für 10min und anschließend für 60min bei 37,0°C. Dann wurden die Proben auf 93,0°C für 5min erhitzt und schließlich folgte eine Abkühlung auf 4,0°C mit Beendigung des Synthesevorgangs. Die fertige cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.6 Polymerasekettenreaktion (Real Time- quantitative PCR)

2.6.1 Einleitung und Funktionsprinzip

Das Verfahren der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde erstmals 1984 von Mullis und Faloona entwickelt (SAIKI et al. 1985; LÖFFLER 2005).

Die erste Dokumentation einer Real Time- PCR war wiederum 1993 (HIGUCHI et al. 1993). Sie ist eine Methode zur exponentiellen Amplifizierung einer spezifischen Sequenz der DNA sowie deren direkter und für jeden durchlaufenen Zyklus zeitgetreuer Erkennung und Messung (GINZINGER 2002).

So dient sie der quantitativen Bestimmung der Genexpression in Gewebeproben, die dabei hochspezifisch und –sensitiv untersucht werden können (HEID et al. 1996; BUSTIN 2000).

Das Prinzip einer PCR beruht auf der Eigenschaft von DNA- Polymerasen kurze, einsträngige, an einen DNA- Strang hybridisierte Oligonucleotidprimer zu erkennen und von dieser Stelle ausgehend den Komplementärstrang mittels Anbau von Nukleotiden neu zu synthetisieren. Es werden dabei zwei Oligonukleotidprimer verwendet, die an dem zu synthetisierenden DNA-Abschnitt jeweils komplementär zum 3'-Ende hybridisieren. So lassen sich bei Kenntnis der flankierenden Sequenzen eines spezifischen DNA- Abschnittes Milliarden Kopien der bestimmten Zielsequenz herstellen, wobei der DNA-Abschnitt zwischen den beiden Primern in jedem Zyklus der PCR verdoppelt wird (LÖFFLER 2005) (siehe Abb. 6).

Eine klassische PCR gliedert sich in drei Phasen, die während jedem durchlaufenen Zyklus wiederholt werden: Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung. Für die Denaturierung der DNA- Doppelstränge werden die Proben auf 95°C erhitzt. für Anschließend wird die Temperatur auf die die entsprechenden Oligonukleotidprimer optimale Anlagerungstemperatur herabgesetzt, damit diese sequenzspezifisch an die DNA hybridisieren können. Für den Verlängerungsschritt wird die Temperatur um 72°C gehalten, was dem Temperaturoptimum der DNA-Polymerase für die den Primern ausgehende Synthese von des Komplementärstranges entspricht (KUBISTA et al. 2006). Durch den Einsatz einer thermostabilen DNA- Polymerase, der üblicherweise aus dem hitzestabilen Bakterium Thermus aquaticus stammenden Taq- Polymerase, können diese Schritte mehrfach wiederholt werden, ohne dass einzelne Reagenzien nach jedem Zyklus neu hinzugegeben werden müssen (SAIKI et al. 1988).



Um die Produktion der amplifizierten Produkte während jeden Zyklus der PCR-Reaktion kontrollieren zu können, werden Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die an doppelsträngige DNA sequenzunabhängig binden (GINZINGER 2002). HIGUCHI et al. machten sich 1993 Ethidiumbromid dafür zu nutze; heute wird bevorzugt SYBR Green I[™] verwendet (GINZINGER 2002; SMITH und OSBORN 2009). Diese Farbstoffe interkalieren in doppelsträngige DNA und können nur in diesem gebundenen Zustand durch Licht einer bestimmten Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt werden. In ungebundenem Zustand bleibt dies aus (GINZINGER 2002) (siehe Abb. 7).


Auf diese Weise kann das Fluoreszenzsignal während der PCR kontinuierlich am Ende der Elongation in jedem Zyklus gemessen werden (SMITH und OSBORN 2009).

Die Amplifikation der DNA kann in drei Phasen eingeteilt werden. In Abbildung 8 sind exemplarisch zwei Fluoreszenzkurven dargestellt; die Fluoreszenzintensität ist gegen die Zeit (PCR- Zyklen) aufgetragen (KUBISTA et al. 2006).

Während der ersten PCR-Zyklen übersteigt zunächst noch die Hintergrundfluoreszenz des unspezifisch an doppelsträngige cDNA gebundenen Farbstoffes die Fluoreszenzintensität des spezifisch an das PCR- Produkt gebundenen Farbstoffes (SMITH und OSBORN 2009). Anschließend nimmt die Fluoreszenzintensität entsprechend der Amplifikation des PCR- Produktes exponentiell zu und steigt so signifikant über die Hintergrundfluoreszenz an. Ein Fluoreszenzsignal, das oberhalb dieser Schwelle detektiert wird, kann als spezifisches Signal identifiziert werden und definiert den Schwellenwert- Zyklus, auch Ct- Wert (Cycle Threshold) genannt (GINZINGER 2002).

Der Schwellenwert- Zyklus ist demnach definiert als der PCR- Zyklus, in dem das spezifische Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz übersteigt (SMITH und OSBORN 2009), wobei diese Schwelle das 10fache der Anfangsfluoreszenz darstellt. Der Ct- Wert entspricht so der Anzahl an PCR- Zyklen, die benötigt werden,

um diesen Schwellenwert zu erreichen (KUBISTA et al. 2006). Der während der exponentiellen Phase der Amplifikation bestimmte Schwellenwert ist umgekehrt proportional zur eingesetzten Anzahl an DNA- Molekülen. Das bedeutet, dass eine geringe Anfangskonzentration einer cDNA mehr PCR- Zyklen benötigt um eine Amplifikation in einen mit Fluoreszenz nachweisbaren Bereich zu bringen, was mit einem größeren Ct- Wert zum Ausdruck kommt. Auf diese Weise kann auch ein quantitativer Vergleich zwischen den einzelnen Proben im Hinblick auf die initiale Anzahl an DNA- oder RNA- Molekülen gezogen werden (GINZINGER 2002).

Im Anschluss an die exponentielle Amplifikation wird ein Plateau erreicht. Dieses ist einerseits Ausdruck des Verbrauchs eines oder mehrere der eingesetzten Reagenzien, wie z.B. der Primer oder der dNTPs, andererseits behindern nun während der Reaktion entstandene Produkte ihren weiteren Ablauf (KUBISTA et al. 2006).



Es empfiehlt sich eine anschließende Spezifizierung der enstandenen PCR-Produkte via Schmelzkurvenanalyse und Agarosegelelektrophorese vorzunehmen, da unspezifische PCR- Produkte und Primer- Dimere ebenfalls ein Fluoreszenzsignal erzeugen. Dies resultiert aus der Eigenschaft des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I[™], jegliche doppelsträngige DNA Moleküle zu binden (GINZINGER 2002; SMITH und OSBORN 2009).

Eine genauere Beschreibung der Schmelzkurvenanalyse, sowie der Agarosegelelektrophorese ist unter den Abschnitten 2.6.3 bzw. 2.6.4 zu finden.

2.6.2 Durchführung der Real Time- quantitativen PCR

Die PCR wurde an einem speziellen PCR- Arbeitsplatz durchgeführt und erfolgte mit Hilfe eines Thermocyclers der Firma BioRad. Die verwendeten Primer wurden auf eine gewünschte Konzentration von 20pmol/µl verdünnt.

Die Anlagerungstemperaturen sowie die Sequenzen der verwendeten Primer sind in der Tabelle 5 verzeichnet. Angaben über die Verwendung der spezifischen Primer und die Basenpaarlänge (BPL) der Produkte sind in Tabelle 6 zu finden.

Primer	Sequenz (5'-3') und Länge	Anlagerungs- temperatur (°C)
ARP	5'- CGACCTGGAAGTCCAACTAC-3'	60.0
(Sense)	(20)	00,0
ARP	5'- ATCTGCTGCATCTGCTTG-3'	60.0
(Antisense)	(18)	00,0
EWS/ERG	5'- TCCAGGAGGAACTGCCAAAG-3'	50.4
(Antisense)	(20)	59,4
EWS/FLI1	5'- CCAAGTCAATATAGCCAACAG-3'	55.0
(Sense)	(21)	55,9
EWS/FLI1	5'- GGCCAGAATTCATGTTATTGC-3'	55.9
(Antisense)	(21)	55,9
EWS/FLI1 Typ 1	5'- ACGGGCAGCAGA / ACCCTTCTTAT-3'	62.4
(Nested-Primer)	(23)	02,4
EWS/FLI1 Typ 2	5'- ACGGGCAGCAGA / GTTCACTGCT-3'	64.0
(Nested-Primer)	(22)	04,0
EWSmut Typ2	5'-CCAAGTCAATATAGCCAACAGAGCAG	
(Sense)	CAGCTACGGGCAGCAGAGTTCACTGCT-3	50,0
	(53)	

PAX3/FKHR	5'- CCGACAGCAGCTCTGCCTAC-3'	63.5	
(Sense)	(20)	00,0	
PAX3/FKHR	5'- TGAACTTGCTGTGTAGGGACAG-3'	60.3	
(Antisense)	(22)	00,0	
PAX3/FKHR	5'- CCTCTCACCTCAG /		
(Nested-Primer) AATTCAATTCGTCA-3		63,4	
	(27)		
PAX7/FKHR	5'- ACGGCCTGTCTCCTCAG /		
(Nested-Primer)	AATTCAATT-3'	63,2	
	(26)		

<u>Tab. 5</u>: Verwendete Primer mit Sequenz und Anlagerungstemperatur

	Trans- lokation	Nested- Primer bzw. Sense- Primer	Antisense- Primer	BPL des Pro- dukt es
ARP	/	CGACCTGGAAGTCCAACT AC	ATCTGCTGCATCTG CTTG	109
Ewing- Sarkom- Familie	EWS/FLI1 Typ1	ACGGGCAGCAG /ACCCTTCTTAT	GGCCAGAATTCAT GTTATTGC	69
	EWS/FLI1 Typ2	ACGGGCAGCAGA /GTTCACTGCT	GGCCAGAATTCAT GTTATTGC	135
	EWS/ERG	CCAAGTCAATATAGCCAA CAG	TCCAGGAGGAACT GCCAAAG	154
Rhabdo- myo- sarkom	PAX3/ FKHR	CCTCTCACCTCAG /AATTCAATTCGTCA	TGAACTTGCTGTGT AGGGACAG	53
	PAX7/ FKHR	ACGGCCTGTCTCCTCAG /AATTCAATT	TGAACTTGCTGTGT AGGGACAG	57

<u>**Tab.**</u> 6: Zusammen verwendete spezifische Primer und Basenpaarlängen der Produkte (entsprechend COX et al. 2003; LEWIS TB et al. 2007)

Zunächst erfolgte mit jeder Probe eine PCR zum Nachweis des Haushaltsgens, in diesem Fall das ARP (acidic ribosomal phosphoprotein), um eine Intaktheit der Proben- RNA bzw. - cDNA festzustellen. Dies erfolgte in Einfachbestimmung, da die Probenkapazität der Paraffinblöcke und somit die cDNA- Menge begrenzt war.

Die PCR mit den spezifischen Primern wurde mit jeder Probe in Duplikaten gemessen. Das Reaktionsvolumen betrug stets 20µl.

Die cDNA wurde zunächst mit 80µl RNase- freiem Wasser auf ein Verhältnis von 1:5 verdünnt und aufgetaut. Währenddessen wurde ein Ansatz für die errechnete Probenmenge pipettiert, der sich aus folgenden Bestandteilen zusammensetzte:

10µl Plus SYBR Green I mit Fluorescein

0,2µl Sense- Primer

0,2µl Antisense- Primer

4,6µl RNase- freies Wasser.

Alle Bestandteile wurden zuvor gründlich gemischt, der fertige Ansatz und die cDNA-Proben ebenfalls. Es wurden jeweils 5µl cDNA verwendet und mit 15µl des oben genannten Ansatzes versetzt.

Als Negativkontrolle wurde in eines der Reaktionsgefäße RNase- freies Wasser anstelle der cDNA eingesetzt. So konnten eventuell vorhandene DNA-Verunreinigungen der Reagenzien ausgeschlossen und Primer- Dimere besser erkannt werden.

Die Reaktionsgefäße wurden mit einem selbstklebenden PCR- Film verschlossen, der fest angedrückt wurde um eine Verdunstung im heißen Thermoblock zu vermeiden. Die Proben wurden nun für 5min bei 1.500U/min zentrifugiert, um den gesamten Inhalt am Boden des Gefäßes zu sammeln. Anschließend erfolgte die Inkubation im iCycler wie nachfolgend beschrieben mit beispielhafter Anlagerungstemperatur für die ARP- PCR.

Segment 1 (1 Zyklus)

10 Minuten 95°C → Denaturierung der DNA

Segment 2 (60 Zyklen)

30 Sekunden 95°C

und 1 Minute 60,0°C

→ Denaturierung neu synthetisierter DNA- Stränge
→ Anlagerung der Primer und Verlängerung des
Komplementärstrangs durch die DNA- Polymerase

Segment 3 (81x) Jeweils 15 Sekunden 55°C- 95°C

→ Schmelzkurvenanalyse (siehe Abschnitt 2.6.3)

<u>Segment 4 (1x)</u>	
Abkühlung auf 20,0°C	\rightarrow Hold

Nach Durchführung der PCR wurden die verwendeten Proben bei -20°C für weitere Versuche gelagert.

Ausgewertet wurden die Ergebnisse mit der iQ5 Optical System Software 2.0 der Firma BioRad.

Die Spezifität der PCR-Produkte wurde nach der Durchführung der quantitativen PCR mit einer Schmelzkurvenanalyse und einer Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.6.3 Schmelzkurvenanalyse

Die Schmelzkurvenanalyse erfolgte sofort im Anschluss an die qRT- PCR. Dabei wurden die PCR- Produkte kontinuierlich alle 15sek in 0,5°C- Schritten von 55°C auf 95°C erhitzt, während stets eine Messung der Fluoreszenzintensität stattfand. Solange eine Temperatur herrscht, bei der die PCR- Produkte doppelsträngig vorliegen, ist der Fluoreszenzfarbstoff gebunden und fluoresziert (siehe Abb. 7).

Sobald die Temperatur erreicht wird, bei der die doppelsträngige DNA des PCR-Produktes denaturiert, wird der Fluoreszenzfarbstoff frei und die gemessene Fluoreszenzintensität fällt rapide ab (RIRIE et al. 1997). Diese besagte Temperatur wird als Schmelztemperatur, T_m, bezeichnet und ist abhängig von der Größe und der Basenzusammensetzung des Produktes. Schon bei dieser Methode zur Spezifizierung der PCR- Produkte können eventuell entstandene Primer- Dimere ausfindig gemacht werden (KUBISTA et al. 2006). Jedes PCR- Produkt und auch Primer- Dimere haben ihr eigenes Maximum in der Schmelzkurvenanalyse. Da Primer- Dimere in der Regel kürzer sind als die spezifischen PCR- Produkte, setzen diese schon bei geringerer Temperatur den Fluoreszenzfarbstoff frei (KUBISTA et al. 2006; WILHELM und PINGOUD 2003). In Abbildung 9 sind exemplarische Schmelzkurvenanalysen eines PCR- Produktes und eines Primer- Dimers dargestellt.



Abbildung 10 zeigt die gleiche Schmelzkurvenanalyse als erste Ableitung der Fluoreszenzintensität nach der Temperatur. Auf der Ordinate ist hierbei statt der Fluoreszenzintensität die Änderung der Fluoreszenzintensität aufgetragen. So ist der bei Denaturierung des PCR- Produkts entstehende Abfall in der Fluoreszenzintensität hier als Maximum dargestellt und entspricht dem Schmelzpunkt des Produktes (KUBISTA et al. 2006).



2.6.4 Gelelektrophorese

Als zweite Methode zur weiteren Spezifizierung der PCR- Produkte wurden diese nach der Schmelzkurvenanalyse in eine Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Auf diese Weise können auch unterschiedliche PCR-Produkte, die eine ähnliche Schmelztemperatur haben, getrennt dargestellt werden. Bei erwarteter Produktlänge von über 100bp (EWS-FLI1 Typ2 und EWS-ERG) wurde ein 1,5%iges Gel und ein 100bp DNA- Leiter verwendet. Um eine optimale Auftrennung der kleineren PCR-Produkte (EWS-FLI1 Typ1, PAX3-FKHR und PAX7-FKHR) im Bereich von 50-100bp zu erreichen, wurde für diese ein 2,5%iges Gel und ein 50bp DNA- Leiter verwendet. Die angelegte Spannung betrug 100V bei 2mA elektrischer Stromstärke, die Laufzeit betrug 105min.

Für die Durchführung der Agarosegelelektrophorese wurde ein 1,5%iges Gel aus 100ml TAE- Puffer und 1,5g Agarose, sowie, entsprechend einem 2,5%igem Gel, mit 2,5g Agarose und 100ml TAE- Puffer, hergestellt. Hierfür wurden die Bestandteile abgewogen, bzw. abgemessen, und zusammen in einem 250ml Becherglas in einer Mikrowelle vorsichtig erhitzt. Die schlierenfreie, klare Flüssigkeit wurde anschließend in eine horizontale Gelkammer gegossen. Nach 20min Wartezeit war das Gel verfestigt und konnte nun in eine Elektrophoresekammer eingesetzt werden. Die

Kammer wurde mit TAE- Puffer aufgefüllt bis das Gel komplett damit bedeckt war. Auf einem Parafilm wurden nun je 2µl des DNA- Ladungsfarbstoffes pipettiert und mit 5µl des DNA- Leiters bzw. 8µl des PCR- Produktes versetzt. Die Gemische wurden nacheinander mit einer Pipette aufgenommen und in die Taschen des Gels gesetzt. Anschließend konnte das Netzgerät Power- Pac 200 mit den oben genannten Einstellungen angeschlossen und eingeschaltet werden. Jede Messung enthielt eine Negativkontrolle.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA- Fragmente wurde das Gel zum Anfärben der Nukleinsäuren für 15min in eine Ethidiumbromid- Lösung gelegt und anschließend für 10min in destilliertes Wasser getaucht, um überschüssiges Ethidiumbromid aus dem Gel zu entfernen und so einen besseren Kontrast zwischen den angefärbten Banden und dem restlichen Gel zu schaffen. Die DNA- Fragmente wurden nun mit UV- Licht durch das fluoreszierende, interkalierte Ethidiumbromid detektiert. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte auf einem UV- Transilluminator.

Mit einer Videokamera wurde ein digitalisiertes Bild erzeugt, auf dem die hell aufleuchtenden Banden auf dem Agarosegel zu erkennen waren.

Die Dokumentation, sowie die Auswertung der Gele, erfolgte mit dem E.A.S.Y. Win32 Geldokumentationssystem von Herolab.

2.7 DNA- Aufreinigung

Für die darauffolgende Sequenzierung ausgewählter PCR- Produkte wurden diese zunächst aufgereinigt, um sie von Primerresten, verbliebener DNA- Polymerase und anderen während der Reaktion entstandenen Nebenprodukten zu befreien, da diese den Ablauf der Sequenzierung stören könnten.

Die Aufreinigung der PCR- Produkte wurde mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits der Firma Qiagen durchgeführt. Zunächst wurden 100µl des Bindungspuffers zu den Proben gegeben und das gesamte Volumen auf eine Filtersäule pipettiert, die zuvor in ein 2ml Sammelgefäß gesetzt wurde. Um die DNA nun im Filter zu binden wurden die Gefäße für eine Minute bei 13.000U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 750µl des Waschpuffers auf die Säule gegeben. Zwei weitere einminütige Zentrifugationsschritte bei 13.000U/min folgten, wobei zwischendurch der Durchfluss jeweils verworfen wurde, um ein vollständiges Trocknen des Filters zu erreichen. Anschließend wurde der Filter in ein neues 1,5ml Sammelgefäß gesetzt. Zum Eluieren der im Filter gebundenen DNA wurden 50µl RNAse- freies Wasser direkt auf den Filter pipettiert ohne diesen zu berühren. Nach einer anschließenden Zentrifugation für eine Minute bei 13.000U/min befand sich im Durchfluss die aufgereinigte PCR- Probe. Sie wurde bei -20°C gelagert.

2.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung der in der qRT- PCR entstandenen Produkte stellt die absolute Identifikation des gesuchten Produktes dar.

Hierfür wurden 3,5µl der aufgereinigten Proben mit 2µl RNAse freiem Wasser und 1,5µl eines 10pmol Primeransatzes versetzt und in durchnummerierte kleine 0,2ml Reaktionsgefäße pipettiert.

Diese wurden an das Seqlab (Sequence Laboratories) in Göttingen verschickt und dort sequenziert. Ein elektronisches Abrufen der Ergebnisse war anschließend über das Internet möglich.

2.9 Herstellung eines positiven Standards

2.9.1 Einleitung

Die Herstellung eines positiven Standards des großen 166bp Fusionstranskriptes der Translokation EWS/FLI1 Typ 2 erfolgte via Standard- PCR mit einem mutagenen Primer, dessen Sequenz in Abbildung 11 aufgeführt ist. Ausgehend vom Nested-Primer- PCR- Produkt der Frischgewebsprobe für die Translokation EWS/FLI1 Typ 2 wurde die Synthese durchgeführt.



2.9.2 Durchführung

Die Herstellung des großen 166bp Fusionsproduktes der Translokation EWS/FLI1 Typ 2 erfolgte über eine Standard- PCR. Diese gleicht vom Prinzip und vom Ablauf der Reaktion einer qRT- PCR, jedoch fehlt hierbei die direkte und für jeden durchlaufenen Zyklus zeitgetreue Erkennung und Messung der amplifizierten Produkte und somit fehlt auch der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I[™].

Der Entschluss, die Herstellung des Standards auf diese Weise anzugehen, beruhte auf der Überlegung durch Weglassen des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs optimale PCR- Bedingungen zu schaffen.

Die Standard- PCR erfolgte mit Hilfe des Gene Amp PCR Systems 2400 der Firma Perkin Elmer. Der mutagene Primer wurde als Sense- Primer verwendet und auf eine gewünschte Konzentration von 20pmol/µl verdünnt. Als Antisense- Primer wurde der normale EWS/FLI1- Antisense- Primer, wie aus den anderen Reaktionen bekannt, eingesetzt.

Für die Durchführung der Standard- PCR wurde das PCR- Produkt der Frischgewebsprobe in einem Verhältnis von 1:10.000 mit RNAse freiem Wasser verdünnt.

Die Herstellung des Master Mixes erfolgte wie unter Abschnitt 2.6.2 beschrieben, jedoch wurde anstelle des Plus SYBR Green I der Firma Eurogentec der Hot Star Taq[™] Master Mix der Firma Qiagen verwendet. Anschließend wurden 5µl des

verdünnten PCR- Produktes mit 15µl des fertigen Master Mixes versetzt. Das Reaktionsvolumen insgesamt betrug somit 20µl. Eine Negativkontrolle, bei der 5µl RNAse- freies Wasser anstatt der Probe eingesetzt wurde, lief bei jeder PCR unter den gleichen Bedingungen mit. Die fertigen Ansätze wurden anschließend für 30sek bei 1.500U/min zentrifugiert. Ihre Inkubation erfolgte mit Hilfe des Gene Amp PCR System 2400 nach dem gleichen Ablauf wie unter dem Abschnitt 2.6.2 beschrieben. Eine geringe Anlagerungstemperatur von 50°C wurde gewählt.

Nach der Standard- PCR wurde die Probe ebenfalls in eine Agarosegelelektrophorese eingesetzt, um die Größe des hergestellten mutagenen Produktes zu kontrollieren. Die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgte wie unter Abschnitt 2.6.4 beschrieben.

Das hergestellte mutagene Produkt wurde nun ebenfalls aufgereinigt und anschließend einer Sequenzierung unterzogen. Dies erfolgte wie unter Abschnitt 2.7 und 2.8 beschrieben.

2.10 Prüfung der PCR- Effizienz

Das große mutagen hergestellte 166bp- Produkt der Translokation EWS/FLI1 Typ 2 wurde in eine Verdünnungsreihe von vier Verdünnungsschritten eingesetzt zur Überprüfung der Effizienz und Fehlerfreiheit der quantitativen Real- Time PCR.

Hierzu erfolgte zunächst eine Messung der Konzentration der aufgereinigten Probe im Photometer. Anschließend wurde das Molekulargewicht bestimmt (siehe Abb. 12) und die Molarität errechnet. Die Proben wurden auf eine gerundete Molarität von 100nMol verdünnt und diese für die PCR zur Effizienzprüfung eingesetzt.

Die Verdünnungsschritte reichten von 1:1.000 bis 1:1Mio und wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Durchführung der qRT- PCR erfolgte wie unter 2.6.2 beschrieben.

Molekulargewicht = $(A_n \times 331,2) + (T_n \times 287,2) + (C_n \times 288,2) + (G_n \times 328,2) + 79,0$

<u>Abb. 12</u>: Rechnung zur Bestimmung des Molekulargewichts von einzelsträngiger DNA gemäß Promega BioMath Calculators (http://www.promega.com/techserv/ tools/biomath/calc11.htm).

(<u>Erklärung:</u> A_n, T_n, C_n und G_n sind die Anzahl der Basen. Für den komplementären Strang müssen die jeweils komplementären Basen eingesetzt werden und anschließend beide Ergebnisse addiert werden. So erhält man das Molekulargewicht der doppelsträngigen DNA.)

Die Auswertung der PCR- Effizienzprüfung fand mit Hilfe von Microsoft Excel statt. Aus den aus der Doppelbestimmung hervorgehenden Ct- Werten wurde der Mittelwert gebildet und dieser zur Effizienzbestimmung in eine lineare Regressionsanalyse mit Auftragung des Ct- Wertes gegen die logarithmische initiale Templatemenge eingesetzt.

Hierbei wurde die Formel zur Effizienzbestimmung gemäß GINZINGER 2002 gewählt (siehe Abb. 13).

E= (10 ^(1/-S) – 1)* 100

Abb. 13: Formel zur PCR- Effizienzbestimmung (E: Effizienz, S: Steigung) gemäß GINZINGER 2002, S. 507

3. Ergebnisse

3.1 Überprüfung der RNA- Qualität und – Konzentration

In der vorliegenden Arbeit wurde die RNA von 20 Formalin-fixierten, in Paraffin gebetteten Gewebeproben von 10 verschiedenen Patienten, sowie von einer Frischgewebsprobe, isoliert und im Agilent Bioanalyzer 2100 im Hinblick auf RNA-Konzentration und -Qualität analysiert. Zusätzlich wurde eine Messung von Zellkultur- RNA und einer weiteren Frischgewebsprobe zum Vergleich der RNA-Qualität herangezogen.

Die Angabe der RIN dient als Indikator für die Qualität der vorliegenden RNA mit einer Einteilung von 1 als maximal degradiert bis zu 10 als maximal intakte RNA. Weitere Informationen zur RIN finden sich im Abschnitt 2.4.1.

Im Folgenden werden in den Tabellen 7.1 und 7.2 die Ergebnisse der RNA- Analyse dargestellt. Die Abbildungen 14.1 und 14.2 veranschaulichen die Ergebnisse zur RNA- Qualität. Für die Abbildung 14.1 wurde hierzu jeweils eine Paraffinprobe mit der besten (2,5) und die Probe mit der schlechtesten (1,0) RIN verwandt, unter Hinzunahme der Frischgewebsprobe (F).

Probennummer	RNA-Konzentration (ng/µl)	RIN
1 A	1.610	2
1 B	1.130	2,4
2 A	413	2,5
2 B	321	2,5
3 A	516	2,4
3 B	780	2,4
4 A	35	1,4
4 B	27	2
5 A	3.371	2,2
5 B	2.343	2,2
6 A	86	1,0
6 B	71	1,2

7 A	488	2,5
7 B	391	2,4
8 A	1.460	2,3
8 B	1.220	2,4
9 A	245	2,4
9 B	247	2,4
10 A	385	2,5
10 B	488	2,4
Frischgewebe (F)	81	2,3

<u>Tab.</u> 7.1: RNA-Konzentration und -Qualität der untersuchten Proben (blau: embryonales RMS; grün: Ewing-Tumor; rot: Frischgewebsprobe Ewing- Sarkom)

Herkunft der RNA	Probenname	RNA- Konzentration (ng/µl)	RIN
Zellkultur	LNCaP	227	10
Nierenfrischgewebe	F 2	199	7,4

<u>Tab. 7.2</u>: RNA-Konzentration und -Qualität der beiden zusätzlichen Proben zum Vergleich der RNA-Qualität

Das Hauptaugenmerk bei der Auswertung der RNA- Analyse sollte in vorliegender Arbeit auf die RNA-Qualität, d.h. auf die RIN fallen. Die RNA-Konzentration variiert sehr zwischen den einzelnen Proben, jedoch war sie stets ausreichend für die cDNA-Synthese.

Eine genügende RNA- Ausgangsmenge für die cDNA- Synthese zu erhalten, war die alleinige Intention zur Bestimmung und Anführung der RNA-Konzentration.

Die RNA- Analyse aus Tab. 7.1 zeigt anhand der RIN eine stark degradierte Gesamt-RNA für alle untersuchten Proben ohne Unterschied zwischen Paraffin- gebettete Proben und Frischgewebsprobe. Die Proben 4 A, 6 A und 6 B weisen jedoch eine schlechtere RIN auf als alle anderen Proben. Die RIN dieser drei Proben befindet sich bei 1,0- 1,4, wohingegen die RIN der anderen Proben zwischen 2,0 und 2,5 anzusiedeln ist.

Die Auswertung der beiden RNA- Messungen aus Tab. 7.2 lässt erkennen, dass sowohl die Zellkultur-, als auch die Frischgewebs- RNA (F 2) eine optimale RIN von 10, bzw. eine gute RIN von 7,4 aufweisen. Dies entspricht einer intakten RNA.









Die Auswertung der graphischen Darstellung der Ergebnisse aus Abb. 14.1 zeigt sowohl im Elektropherogramm als auch in der Darstellung als Gel ein für degradierte RNA typisches Muster. Bei der gelelektrophoretischen Darstellung ist nur eine breite Bande im Größenbereich kleiner Fragmente sichtbar (bei einer RIN von 2,5 bei 25sek; bei einer RIN von 1,0< 25sek). Auch im Elektropherogramm ist die für die Degradation der RNA typische Tendenz zur Verteilung in Richtung kleinerer Fragmente zu erkennen mit einem breiten Maximum bei 25sek bei einer RIN von 2,5 und bei 23sek bei einer RIN von 1,0. Auch die Frischgewebsprobe mit einer RIN von 2,3 zeigt ein ähnliches Bild.

Die visualisierten Ergebnisse der beiden zusätzlichen Proben aus Abb. 14.2 lassen das typische Muster einer intakten Gesamt- RNA erkennen. Auf dem Gel liegen bei einer RIN von 10 bei 41sek und bei 47sek zwei deutliche Banden vor.

In der Darstellung mit Auftragung der Fluoreszenzintensität gegen die Durchwanderungsgeschwindigkeit zeigt sich ebenfalls ein typisches Muster bei Vorliegen einer intakten Gesamt- RNA. Die beiden Fraktionen der 28S- und 18S- ribosomalen RNA bringen, entsprechend des Gels, zwei deutliche Maxima bei 41sek und bei 47sek hervor; ein kleinerer Peak liegt bei 23sek.

Die Fuoreszenzintensität der RNA- Probe aus Zellkultur mit einer RIN von 10 liegt deutlich über derjenigen der degradierten RNA- Proben mit einem Maximum bei 79FU.

3.2 Ergebnisse zur qRT- PCR

3.2.1 Ergebnisse der qRT- PCR für das Haushaltsgen ARP

In vorliegender Arbeit wurden 20 Formalin-fixierte in Paraffin gebettete Proben, sowie eine Frischgewebsprobe auf das Vorliegen von 5 verschiedenen Translokationen hin untersucht. Vor der Real- Time PCR mit den spezifischen Primern wurde jede Probe auf das Haushaltsgen ARP hin untersucht, um die Brauchbarkeit der cDNA zu überprüfen, da diese zunächst nach Betrachtung der sehr degradierten RNA fraglich schien. Die Ergebnisse werden in Tab. 8 aufgeführt.

Patient	Probennummer	Ct- Wert	Schmelzpunkt (°C)
	1A	27,7	78.5
I	1B	31,3	78,0
	2A	34,0	79,0
11	2B	33,7	79,0
	3A	30,3	79,0
111	3B	28,8	79,0
11/	4A	44,5	79,0
IV	4B	/	/
V	5A	27,3	79,0
v	5B	27,0	78.5
M	6A	27,6	78,0
VI	6B	26,5	78,5
VII	7A	31,8	78,5
	7B	30,7	78,5
1/111	8A	29,5	78,5
VIII	8B	29,1	78,5
IV	9A	35,0	78,5
	9B	31,8	79,0
v	10A	29,2	78,5
^	10B	30,5	78,5
XI	Frischgewebe (F)	22,7	78,5
neg. Kontrolle	MM	1	/

Tab. 8: Real- Time PCR Ergebnisse für das Haushaltsgen ARP

Eine Analyse der ARP- PCR erlaubt die Aussage, dass alle Proben, mit Ausnahme der Probe 4 B, das Haushaltsgen exprimieren. Alle Produkte weisen den für das ARP- Produkt spezifischen Schmelzpunkt von 78,0- 79,0°C auf.

Die Ct- Werte der Proben liegen in einem Bereich von 22,7 bis 35,0 Zyklen mit Ausnahme der Probe 4 A, welche mit einem Schwellenwertzyklus von 44,5 aus dem Rahmen fällt.

Die Frischgewebsprobe, im Vergleich zu den Paraffinproben, hat einen Ct- Wert von 22,7. Dieser liegt um 3,8 Zyklen unter dem niedrigsten Wert der Paraffin- gebetteten Proben von 26,5 Zyklen. Dies entspricht einer 2^{3,8} fach, also in etwa 14fach, höheren cDNA- Menge im Ausgangtemplate, wenn von einer Verdopplung des Templates pro PCR- Zyklus ausgegangen wird.

3.2.3 Überprüfung der Proben auf das Vorliegen der spezifischen Translokationen

Aus der Überlegung heraus, dass bei vorliegender degradierter RNA als Ausgangsmaterial Produkte mit kleinerer Basenpaarlänge mit höherer Wahrscheinlichkeit detektiert werden können, wurden zur Durchführung der Real-Time PCR mit den spezifischen Primern Nested- Primer als alternative Sense-Primer verwandt, die, eingebettet in das gesuchte Transkript, Produkte von geringer Basenpaarlänge erzeugen. Die PCR erfolgte jeweils in Doppelbestimmung. Die Ergebnisse wurden nach untersuchtem Gen und Tumorentität geordnet. In vorliegender Arbeit war eine deskriptive Analyse mit besonderem Augenmerk auf die Auswertung der Agarosegele und Sequenzierungsergebnisse von vorrangiger Bedeutung. Zur vollständigen Darlegung der Untersuchungen sind die Ergebnisse zur PCR jedoch mit angegeben.

Im Folgenden werden für jede Tumorentität vier exemplarische Proben abgebildet, d.h. jeweils die Ergebnisse für zwei verschiedene Patienten. Die Ergebnisse der Frischgewebsprobe werden stets mit angeführt.

Ergebnisse der qRT- PCR für die Translokation EWS/FLI1 Typ 1



Ewing- Tumor- Familie

Patient	Probennummer	Ct- Wert	Ct- Wert	Schmelzpunkt	Schmelzpunkt
		1	2	1 (°C)	2 (°C)
V	5 A	39,31	40,26	76,50	77,00
V	5 B	37,65	40,34	76,50	76,50
IX	9 A	39,96	44,75	76,50	76,50
	9 B	45,62	43,85	76,50	76,50
neg. Kontrolle	MM	41,50		74,00	

Frischgewebsprobe (F)



Patient	Probennummer	Ct- Wert 1	Ct- Wert 2	Schmelzpunkt 1 (°C)	Schmelzpunkt 2 (°C)
XI	Frischgewebe (F)	30,10	30,43	76,50	76,50
neg. Kontrolle	MM	38,15		75,00	

embryonales Rhabdomyosarkom



Patient	Probennummer	Ct- Wert	Ct- Wert	Schmelzpunkt	Schmelzpunkt
		1	2	1 (°C)	2 (°C)
	3 A	37,02	37,60	77,00	77,00
111	3 B	38,26	35,78	76,50	77,00
I	1 A	38,51	38,42	76,50	76,50
	1 B	40,00	41,69	77,00	76,50
neg. Kontrolle	MM	46,21		74,00	

Das gesuchte Fusionsprodukt der Ewing- Tumor- spezifischen Translokation EWS/FLI1 Typ 1 hat eine Größe von 69bp.

Alle Proben, sowohl die Ewing-Tumoren, als auch die embryonalen Rhabdomyosarkome, zeigen ein Produkt, welches der gesuchten Größenordnung entspricht.

Aufgrund dessen wurden weitere Spezifizierungen für diese PCR- Produkte vorgenommen. Je eine exemplarische Probe für die Ewing-Tumoren und für die embryonalen Rhabdomyosarkome, sowie die Frischgewebsprobe wurde aufgereinigt und sequenziert.

Die Sequenz des gesuchten Fusionstranskriptes ist in Abb. 16 gezeigt.

In Abb. 17.1, 17.2 und 17.3 sind die Sequenzierungsergebnisse für die Translokation EWS/FLI1 Typ 1 abgebildet.



<u>Abb. 16</u>: Darstellung der Basenpaarsequenz des Fusionstranskriptes der Translokation EWS/FLI1 Typ 1 (69bp bei Detektion mit Nested- (Sonden-) Primer; 100bp hat großes Fusionsprodukt)







Die Auswertung der Sequenzierung lässt erkennen, dass bei keiner der Proben das gesuchte Fusionsprodukt der Translokation EWS/FLI1 Typ 1 nachzuweisen war.

Zur weiteren Überprüfung der Proben auf das Vorliegen des Fusionstranskriptes ergab eine qRT- PCR der Proben- cDNA mit dem Sense- und Antisense- Primer für EWS/FLI1 nie das in diesem Falle gesuchte große Fusionsprodukt der Translokation EWS/FLI1 Typ 1 von 100bp.

Da alle untersuchten Proben ähnliche PCR- Ergebnisse aufwiesen und stets die gleiche Produktgröße auf dem Gel darboten ist die verallgemeinernde negative Aussage über alle Proben wahrscheinlich. Dies bedeutet, dass in keiner der untersuchten Proben das Fusionstranskript für EWS/FLI1 Typ1 von 69bp oder das große Fusionsprodukt von 100bp vorlag und somit alle Proben negativ für diese Translokation waren.

Ergebnisse der qRT- PCR für die Translokation EWS/FLI1 Typ 2



Ewing- Tumor- Familie

Patient	Probennummer	Ct- Wert	Ct- Wert	Schmelzpunkt	Schmelzpunkt
rationt		1	2	1 (°C)	2 (°C)
V	5 A	49,81	/	75,00	/
v	5 B	/	40,25	1	79,50
N/I	6 A	43,15	47,49	66,50; 74,50	76,50
VI	6 B	42,78	53,17	74,50	75,50
neg. Kontrolle	MM	49,66		66,50; 75,00	

Frischgewebsprobe (F)



Patient	Probennummer	Ct- Wert 1	Ct- Wert 2	Schmelzpunkt 1 (°C)	Schmelzpunkt 2 (°C)
XI	Frischgewebe (F)	49,72	43,16	79,00	79,00
neg. Kontrolle	MM	36,80		75,00	

embryonales Rhabdomyosarkom



Patient	Drohonnummor	Ct- Wert	Ct- Wert	Schmelzpunkt	Schmelzpunkt
	FIODEIIIIUIIIIIEI	1	2	1 (°C)	2 (°C)
V	10 A	/	46,56	/	73,50
^	10 B	39,10	/	73,00	/
II	2 A	55,72	/	67,50;76,00	/
	2 B	38,72	/	73,00	/
neg. Kontrolle	MM	40,91		73,50	

Das gesuchte Fusionsprodukt der Translokation EWS/FLI1 Typ 2 hat eine Größe von 135bp. Die Probe 5 B sowie die Frischgewebsprobe zeigen ein Produkt von gesuchter Größe mit deutlicher Bande auf entsprechender Basenpaarhöhe. Die Frischgewebsprobe zeigte in der Doppelbestimmung stetig das gesuchte Produkt, wohingegen in der Probe 5 B in der Doppelbestimmung nur einmal das gesuchte Produkt gefunden wurde.

Alle weiteren untersuchten Proben wiesen nicht ein Produkt gesuchter Basenpaarlänge auf und waren folglich negativ für die gesuchte Translokation.

Zur weiteren Spezifizierung der positiven Proben wurde eine Sequenzierung der PCR- Produkte von Probe 5 B und von der Frischgewebsprobe vorgenommen.

Abbildung 19 zeigt die komplette Sequenz des Fusionstranskriptes der Translokation EWS/FLI1 Typ 2. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in den Abbildungen 20.1 und 20.2 angegeben.







Die Auswertung der Sequenzierung lässt erkennen, dass sowohl die Probe 5 B, als auch die Frischgewebsprobe exakt die gesuchte Sequenz des Fusionstranskriptes aufweisen und somit positiv sind für die Translokation EWS/FLI1 Typ 2.

Eine zusätzliche Überprüfung dieser Proben auf Vorliegen des großen 166bp-Fusionsproduktes der Translokation EWS/FLI1 Typ 2 mittels Sense- und Antisense-Primer für EWS/FLI1 ergab jedoch in keinem der Fälle ein Produkt dieser Basenpaarlänge.

Zusammenfassend bedeutet dies, dass zwei der untersuchten 21 Proben positiv sind für die Translokation EWS/FLI1 Typ 2, jedoch nur das kleine 135bp-Fusionstranskript nachzuweisen war.

Ergebnisse der qRT- PCR für die Translokation EWS/ERG



Ewing- Tumor- Familie

Patient	Drohonnummor	Ct- Wert	Ct- Wert	Schmelzpunkt	Schmelzpunkt
	FIODEIIIIUIIIIIEI	1	2	1 (°C)	2 (°C)
V	5 A	43,31	42,92	66,00;72,00;76,00	72,50
	5 B	41,37	42,05	72,50	72,50
IX	9 A	45,33	43,95	72,50	72,50
	9 B	41,89	43,76	72,50	72,50
neg. Kontrolle	MM	/		1	

Frischgewebsprobe (F)



Patient	Probennummer	Ct- Wert 1	Ct- Wert 2	Schmelzpunkt 1 (°C)	Schmelzpunkt 2 (°C)
XI	Frischgewebe (F)	1	1	1	/
neg. Kontrolle	MM	1		1	

embryonales Rhabdomyosarkom



Patient	Drohonnummor	Ct- Wert	Ct- Wert	Schmelzpunkt	Schmelzpunkt
	FIODEIIIIUIIIIIIEI	1	2	1 (°C)	2 (°C)
v	10 A	43,28	44,87	72,50	72,50
^	10 B	35,37	34,40	72,50	72,50
II	2 A	40,59	43,12	73,50	72,50;75,50
	2 B	43,14	41,17	73,00;76,00	73,50
neg. Kontrolle	MM	53,86		76,00	

Das Fusionsprodukt der Translokation EWS/ERG hat eine Größe von 154bp.

Keine der Proben, weder die Ewing-Tumoren, noch die embryonalen Rhabdomyosarkome, wies ein Produkt dieser Größe auf. Folglich waren alle 11 untersuchten Tumoren negativ für diese Translokation.

Ergebnisse der qRT- PCR für die Translokation PAX3/FKHR



Ewing- Tumor- Familie

Detient	Drobonnummor	Ct- Wert	Ct- Wert	Schmelzpunkt	Schmelzpunkt
Falleni	FIODEIIIIUIIIIIIEI	1	2	1 (°C)	2 (°C)
V	5 A	28,87	29,21	72,00	72,00
V	5 B	27,60	28,54	72,00	72,00
IX	9 A	28,04	28,57	72,00	72,00
	9 B	27,72	28,13	72,00	72,00
neg. Kontrolle	MM	41,86		73,00	

Frischgewebsprobe (F)



Patient	Probennummer	Ct- Wert 1	Ct- Wert 2	Schmelzpunkt 1 (°C)	Schmelzpunkt 2 (°C)
XI	Frischgewebe (F)	30,42	30,39	72,00	72,00
neg. Kontrolle	ММ	34,85		72,50	

embryonales Rhabdomyosarkom



Patient	Drobonnummor	Ct- Wert	Ct- Wert	Schmelzpunkt	Schmelzpunkt
	FIODEIIIIUIIIIIIEI	1	2	1 (°C)	2 (°C)
v	10 A	28,41	27,63	72,00	72,00
^	10 B	28,71	29,41	72,00	72,00
	3 A	28,87	28,59	72,00	72,00
	3 B	28,59	29,32	72,00	72,00
neg. Kontrolle	MM	40,16		72,50	

Das gesuchte Fusionsprodukt der Translokation PAX3/FKHR hat eine Größe von 53bp.

Weitere Informationen bezüglich der Auswertung dieser Ergebnisse sind den Ergebnissen für die Translokation PAX7/FKHR zu entnehmen.

Ergebnisse der qRT- PCR für die Translokation PAX7/FKHR



Ewing- Tumor- Familie

Dationt	Drobonnummor	Ct- Wert	Ct- Wert	Schmelzpunkt	Schmelzpunkt
Falleni	FIODEIIIIUIIIIIIEI	1	2	1 (°C)	2 (°C)
V	5 A	42,63	42,68	74,00	74,00
V	5 B	39,21	43,80	74,00	74,00
VIII	8 A	40,53	37,55	74,50	74,50
	8 B	38,70	35,69	74,50	74,50
neg. Kontrolle	MM	40,76		75,50	

Frischgewebsprobe (F)



Patient	Probennummer	Ct- Wert 1	Ct- Wert 2	Schmelzpunkt 1 (°C)	Schmelzpunkt 2 (°C)
XI	Frischgewebe (F)	34,82	34,68	75,50	75,00
neg. Kontrolle	MM	33,28		75,00	

embryonales Rhabdomyosarkom



Dationt	Drobonnummor	Ct- Wert	Ct- Wert	Schmelzpunkt	Schmelzpunkt
Falleni	FIODEIIIIUIIIIIIEI	1	2	1 (°C)	2 (°C)
V	10 A	36,47	38,46	73,50	73,50
^	10 B	44,93	37,77	73,50	74,00
II	2 A	46,85	55,21	73,50	73,50
	2 B	46,80	41,47	73,50	74,00
neg. Kontrolle	MM	38,65		75,50	

Das gesuchte Fusionsprodukt der Translokation PAX7/FKHR hat eine Größe von 57bp.

Die qRT-PCR zum Nachweis der Fusionstranskripte PAX3/FKHR und PAX7/FKHR zeigte jeweils in allen untersuchten Proben, sowohl in den Ewing-Tumoren, als auch in den embryonalen Rhabdomyosarkomen, ein Produkt auf dem Agarosegel, bei dem aufgrund der sehr geringen Größe des jeweiligen Produktes, sowie des gesuchten Fusionstranskriptes von nur 53bp für PAX3/FKHR und von nur 57bp für PAX7/FKHR, schwer auszumachen war, ob das gesuchte Produkt vorlag, oder ob es sich hierbei um Primer-Dimere oder unspezifische Produkte handelte, die sich ebenfalls oftmals in diesem Größenbereich des Agarosegels abbilden lassen. Auf allen Gelen waren lediglich sehr schwache, uneinheitliche Banden knapp über 50bp zu erkennen. Bei Betrachtung der PCR- Ergebnisse war bei allen Proben kaum ein

Unterschied zwischen der Negativkontrolle und den Proben zu erkennen, weder im Schmelzpunkt, der nur um 0,5°C bis 1°C differierte, noch auf dem Agarosegel. Die Ergebnisse der Frischgewebsprobe sowie der Probe 5 B unterschieden sich nicht grundlegend von denen der übrigen Proben. Für diese beiden Proben wurde jedoch bereits eindeutig ein Vorliegen der Ewing- Tumor- spezifischen Translokation EWS/FLI1 2 nachgewiesen. Ein aleichzeitiges Vorliegen Tvp einer für Rhabdomyosarkome spezifischen Translokation scheint äußerst fragwürdig bis unmöglich. Daher ist abschließend von einem negativen Ergebnis aller Proben für die Translokationen PAX3/FKHR und PAX7/FKHR auszugehen.

Zur Überprüfung der Ergebnisse wurden exemplarisch die Proben 3 B, 5 B, 9 A und 10 B auf das Vorliegen des jeweiligen großen Fusionsproduktes, mittels Sense- und Antisense- Primer für PAX3/FKHR, hin untersucht. Für die Translokation PAX3/FKHR hätte dies ein Produkt von 171bp ergeben müssen; für die Translokation PAX7/FKHR ein Produkt von 159bp. In keiner der untersuchten Proben waren diese Fusionstranskripte nachweisbar.

3.3 Herstellung eines positiven Standards

Zwei der untersuchten 21 Proben waren positiv für die Ewing- Tumor- spezifische Translokation EWS/FLI1 Typ 2 und wiesen das 135bp große Fusionstranskript auf. Das große 166bp- Fusionsprodukt konnte jedoch in keiner der Proben nachgewiesen werden.

Zur Herstellung eines für zukünftige Diagnostik zur Verfügung stehenden positiven Standards für das 166bp Produkt, der anschließend ebenfalls zur Überprüfung der PCR- Effizienz eingesetzt werden sollte, erfolgte die Synthese des großen 166bp-Fusionsproduktes via Standard- PCR mit einem mutagenen Primer.

Die Synthese erfolgte ausgehend vom 135bp- Produkt für die Translokation EWS/FLI1 Typ 2 der Frischgewebsprobe F (siehe Abb. 20.2). Die Durchführung dieser Methode ist unter dem Abschnitt 2.9.2 zu finden.



Das große Fusionstranskript der Translokation EWS/FLI1 Typ 2 hat eine Größe von 166bp.

Die Standard- PCR mit dem mutagenen Primer ergab ein Produkt von gesuchter Größe (Abb. 21 Probe 1). Zur Überprüfung des Ergebnisses wurde dieses Produkt erneut in eine Standard- PCR mit üblichem Sense- und Antisense- Primer für EWS/FLI1, sowie mit Nested- Primer für EWS/FLI1 Typ 2 eingesetzt und ergab erneut beide Fusionsprodukte von entsprechender Basenpaarlänge (Abb. 21 Probe 3 und 4).

Die Probe 3 der Abb. 21 wurde aufgereinigt und mit Sense- und Antisense- Primer für EWS/FLI1 sequenziert.

Unter Abb. 19 ist zur Überprüfung die Basenpaarsequenz des Fusionstranskriptes der Translokation EWS/FLI1 Typ 2 abgebildet.

Das Ergebnis der Sequenzierung ist in Abb. 22 zu sehen.


Die Auswertung der Sequenzierung lässt erkennen, dass das große Fusionstranskript von 166bp vorliegt und die Herstellung eines positiven Standards somit erfolgreich war.

3.4 Ergebnisse zur Prüfung der PCR- Effizienz

Die Prüfung der PCR- Effizienz gibt Aufschluss über die Fehlerfreiheit der Methode und die Sensitivität der Reaktion. Das mutagen hergestellte große Fusionsprodukt der Translokation EWS/FLI1 Typ 2 wurde für die PCR- Effizienzprüfung in vier Verdünnungsschritten eingesetzt. Die Ausgangsmolarität der Lösung betrug 100nMol.

Für die lineare Regressionsanalyse wurde der Mittelwert der jeweiligen Ct- Werte bestimmt.

Die Abbildungen 23.1 und 23.2 zeigen die Ergebnisse zur PCR- Effizienz.





Steigung (S): -3,471 <u>PCR- Effizienz</u> E= $(10^{(1/-S)} - 1)^* 100 = 94\%$

<u>Abb. 23.2</u>: Lineare Regressionsanalyse zur PCR- Effizienzbestimmung mit Auftragung des Ct- Wertes gegen die logarithmische initiale Templatemenge

Die Auswertung der Abbildungen 23.1 und 23.2 lässt eine PCR- Effizienz von 94% erkennen.

3.5 Ergebnisse im Überblick

Zusammenfassend liegen aus sämtlichen Versuchen folgende Ergebnisse vor:

1. Alle verwendeten in Paraffin gebetteten Gewebeproben weisen eine RNA-Qualität geringer Güte auf, die mittels RNA-Qualitätsprüfung im Agilent Bioanalyzer 2100 unter Verwendung der RIN, als Indikator für die Qualität der vorliegenden RNA, ermittelt worden ist.

2. Von den fünf untersuchten spezifischen Translokationen konnte mittels qRT-PCR in nur zwei von insgesamt 21 Tumorgewebsproben das für Ewing-Tumore spezifische Fusionstranskript EWS/FLI1 Typ 2 mit einer Größe von 135bp nachgewiesen werden.

3. Die Herstellung eines positiven Standards für das große Fusionstranskript der Translokation EWS/FLI1 Typ 2 mit einer Größe von 166bp ist mittels Standard-PCR unter Verwendung eines mutagenen Primers gelungen.

4. Das Ergebnis der PCR-Effizienzprüfung liegt bei 94%.

4. Diskussion

<u>4.1 Molekularpathologische Untersuchungen mittels gRT-PCR sind auch an</u> <u>degradierter RNA aus Formalin-fixierten, Paraffin-gebetteten Geweben möglich</u>

Um die Biologie einer Vielzahl von Tumoren zu ergründen, sind in der Vergangenheit zahlreiche molekularpathologische Untersuchungen vorgenommen worden. Dies ist limitiert durch die Verfügbarkeit an gefrorenem Frischgewebe. Insbesondere für retrospektive Analysen ist dieses nur schwer zugänglich. Die Möglichkeit diese Untersuchungen auch an Formalin-fixierten, Paraffin-gebetteten Geweben vorzunehmen, welche meist in größerer Zahl vorhanden, unkompliziert zu Lagern und im klinischen Alltag schnell zugänglich sind, räumte daher einen großen Vorteil ein. Trotzalledem ist hier die Frage der RNA-Qualität für analytische Untersuchungen mittels qRT-PCR von großer Bedeutung (PENLAND et al. 2007; RENTOFT et al. 2012).

In vorliegender Arbeit wurden insgesamt 20 Formalin-fixierte, Paraffin-gebettete Tumorgewebsproben und eine Frischgewebsprobe der molekularpathologischen Analyse zur Detektion spezifischer Fusionstranskripte in Ewing-Tumoren und embryonalen Rhabdomyosarkomen des Urogenitaltraktes unterzogen.

Alle verwendeten Proben, die Frischgewebsprobe, sowie die in Paraffin eingebetteten Gewebeproben sind vor Verwendung in der qRT-PCR einer RNA-Qualitätsprüfung im Agilent Bioanalyzer 2100 unterzogen worden. Zusätzlich wurde eine Messung von Zellkultur- RNA und der RNA einer weiteren Frischgewebsprobe zum Vergleich der RNA- Qualität herangezogen.

Die Angabe der RIN dient als Indikator für die Qualität der vorliegenden RNA. Diese klassifiziert die Gesamt- RNA von 1, maximal degradiert, bis 10 als maximal intakte RNA, oder allgemeiner, eine RIN von größer 5 als gute RNA- Qualität und eine RIN von größer 8 als perfekte Qualität der Gesamt- RNA (FLEIGE und PFAFFL 2006). Eine RIN <3 kennzeichnet eine hochgradig degradierte RNA (FLEIGE et al. 2006).

Alle untersuchten in Paraffin gebetteten Gewebeproben wiesen eine degradierte RNA mit einer RIN von 1,0 bis 2,5 auf. Die Frischgewebsprobe (F) mit Tumormaterial zeigte eine RIN von 2,3, die Frischgewebsprobe (F2) mit normalem Nierengewebe eine gute RNA-Qualität mit einer RIN von 7,4 und die RNA der Zellkultur eine optimale RIN von 10. Diese Beobachtung wird ebenso in anderen Arbeiten mit Untersuchung an Formalin-fixierten in Paraffin gebetteten Geweben beschrieben, und zwar eine starke Degradation der RNA im Vergleich zur RNA aus gefrorenen Frischgewebsproben (SÁNCHEZ-NAVARRO et al. 2010; STEGMAIER et al. 2004). STEGMAIER et al. 2004 berichten in ihrer Arbeit über eine ausreichende Qualität der isolierten RNA in 60% der untersuchten Proben. In einer Arbeit von PENLAND et al. 2007 war sogar nur die isolierte RNA von 24% der untersuchten Proben von ausreichender Qualität.

Entscheidend für die Frage der Ursache der RNA- Degradation sind viele Faktoren von Isolationstechnik, über Lagerung und Behandlung der Proben, bis hin zur Zeit, die verstreicht, bis eine Einfrierung oder Formalin-Fixation der Proben erfolgt, da in dieser eine Autolyse des genetischen Materials durch RNAsen erfolgen kann (FLEIGE und PFAFFL 2006; FLEIGE et al. 2006). So ist es wahrscheinlich, dass auch in vorliegender Arbeit dies die ursächlichen Faktoren für die beobachtete Degradierung der verwendeten RNA sind. Dies kann ebenso durch das Vorliegen einer massiven Apoptose oder Nekrose im untersuchten Gewebe für eine RNA geringerer Güte begründet sein (FLEIGE und PFAFFL 2006). Um jedoch geeignete Tumoranschnitte mit wenig nekrotischem Material und viel erhaltenem Gewebe für die Analyse zu verwenden, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Gewebeproben zuvor durch einen Pathologen mikroskopiert und ausgewählt.

Es besteht, wie auch in vorliegender Arbeit untersucht, eine Abhängigkeit der RNA-Qualität vom Gewebetyp, aus dem die RNA isoliert wird. RNA aus Zellkulturen weist in der Regel eine optimale Qualität auf mit einer RIN um 9, so auch in vorliegender Arbeit nachgewiesen mit einer RIN von 10. Dies ist auf ein optimales und leichteres RNA-Isolationsverfahren zurückzuführen. Bei Untersuchungen an soliden Geweben können mehr störende Faktoren Einfluss nehmen, die insgesamt zu einer RNA-Degradation beitragen, so z.B. die Materialgewinnung, die Lagerung, der Transport und das Zeitmanagement bis zur Fixierung oder RNA-Extraktion. All dies ist ursächlich für eine durchschnittlich geringere RNA-Qualität mit einer RIN von 6-8 (FLEIGE und PFAFFL 2006). So zeigte auch in vorliegender Arbeit die zum Vergleich herangezogene Frischgewebsprobe F2 eine geringere RNA-Qualität im Vergleich zur RNA aus Zellkultur mit einer RIN von 7,4. Optimale Laborbedingungen, wie sie zur Gewinnung einer RNA aus Zellkulturen erreicht werden können, sind im Klinikbetrieb mit Gewebsischämien unter der Operation bei Gewinnung des Gewebes, Lagerung des Gewebes auf dem Operationstisch bis zum Transport in das Labor und Zeitdauer bis zur Gewebeasservation nicht zu erreichen. Bezeichnend ist jedoch auch, dass aus Gewebeproben, sofern entsprechende Vorkehrungen getroffen werden, trotzalledem hohe RNA-Qualitäten mit einer RIN von 6-8 erreicht werden können, im Vergleich zur RNA-Qualität geringer Güte aus Formalin-fixierten, Paraffin-gebetteten Geweben.

Weiterhin ist auch interessant zu betrachten, in wie weit das Alter der in Paraffin gebetteten Proben in Korrelation zur Qualität der RNA steht. In den hier untersuchten Proben wiesen die Proben 4 A, 6 A und 6 B eine schlechtere RIN auf als alle anderen Proben. Die RIN dieser drei Proben befand sich bei 1,0 bis 1,4, wohingegen die RIN der anderen Proben zwischen 2,0 und 2,5 anzusiedeln war. Die schlechtere RNA- Qualität dieser drei Proben korrelierte in vorliegender Untersuchung jedoch nicht mit dem Alter der Proben (siehe Tab. 3). Die Probe 4 A ist aus dem Jahre 1999, die Proben 6 A und 6 B aus dem Jahr 2001. Im Vergleich dazu ist zum Beispiel die Probe 1 B mit einer RIN von 2,4 aus dem Jahr 1997, trotz besserer RIN noch älter. In der Literatur wird jedoch, gegensätzlich zu dieser Beobachtung, eine RNA-Qualität geringerer Güte mit steigendem Alter der Gewebeproben beschrieben (STEWART et al. 2011; RENTOFT et al. 2012), möglicherweise resultierend aus einer längeren Lagerung der Proben mit folglich längerem Zeitraum in dem störende Einflüsse durch möglicherweise suboptimale Lagerungsbedingungen auf die Proben einwirken können (FLEIGE und PFAFFL 2006).

Die Diskussion bezüglich der RNA-Qualität lässt die Frage aufkommen, ob mit dieser Ausgangssituation, einer stark degradierten RNA, die Detektion spezifischer Fusionstranskripte mittels qRT-PCR überhaupt gelingen konnte.

Prinzipiell ist die qRT-PCR eine sehr sensitive und spezifische Methode zur Detektion und Amplifikation auch nur sehr geringer Mengen an Substrat. Eine degradierte RNA hat jedoch Auswirkungen auf die PCR-Performance und den Erfolg der Methode, ausgedrückt durch den Ct-Wert, nicht jedoch auf die PCR-Effektivität (FLEIGE und PFAFFL 2006; FLEIGE et al. 2006). Es sollte nach Möglichkeit eine PCR-Effizienz von 90% oder mehr erreicht werden (GINZINGER 2002). So konnte in vorliegender Arbeit eine angemessene PCR-Effizienz von 94% erbracht werden. Dies bedeutet, dass die PCR trotz eingeschränkter Ausgangssituation mit stark degradierter RNA eine hohe Sensitivität der Reaktion im Hinblick auf die DNA-Amplifikation zeigte, welche einer theoretisch bekannten Verdopplung pro Zyklus

entspricht. Der hier generierte Standard kann zum Vergleich bei kritischen Proben herangezogen werden.

Bezüglich der PCR-Performance ist zu erwähnen, dass alle Proben, mit Ausnahme einer Probe (4 B), trotz degradierter RNA das verwendete Haushaltsgen ARP exprimierten. Eine Überprüfung der Proben auf das Vorliegen des Haushaltsgens gibt Auskunft über Effizienz der RNA-Isolation und RNA-Qualität (DE KOK et al. 2005). Die Ct- Werte der Proben lagen in einem Bereich von 22,7 bis 35,0 Zyklen mit Ausnahme der Probe 4 A, welche mit einem Schwellenwertzyklus von 44,5 aus dem Rahmen fiel. Dieses Ergebnis korrelierte zumindest bei dieser Probe mit der zuvor in der RNA- Analyse festgestellten schlechteren RIN von 1,4. Die Frischgewebsprobe, im Vergleich zu den Paraffinproben, hat einen Ct- Wert von 22,7. Dieser liegt um 3,8 Zyklen unter dem niedrigsten Wert der Paraffin- gebetteten Proben von 26,5 Zyklen. Eine Korrelation zwischen der RIN und den Ct- Werten war, mit Ausnahme der weiter oben erwähnten Probe 4 A, in vorliegender Arbeit nicht zu erkennen. Dies zeigt sich besonders gut, wenn die Paraffinproben mit dem niedrigsten und dem höchsten Ct-Wert miteinander verglichen werden. Probe 6 B hat eine RIN von 1,2 und einen Ct-Wert für das Haushaltsgen von 26,5. Die Probe 9 A hingegen hat eine RIN von 2,4 und einen Ct- Wert von 35,0. Somit wird deutlich, dass eine höhere RIN nicht zuverlässig mit einem geringeren Schwellenwertzyklus einhergeht und umgekehrt. Entgegen dieser Beobachtung wird in der Literatur eine Korrelation zwischen RIN und Ct-Wert in umgekehrt proportionaler Weise beschrieben. Eine hohe RNA-Qualität würde demnach mit einem niedrigen Ct-Wert korrelieren und umgekehrt (FLEIGE et al. 2006; STEWART et al. 2011). In einer Arbeit von LEWIS TB et al. 2007 wurde anhand der Expression des Haushaltsgens auf die Probenqualität geschlossen und alle Proben mit einem Schwellenwertzyklus >35 von allen weiteren Versuchen mit den spezifischen Primern ausgeschlossen. Um jedoch eine ausreichende Aussagekraft des Haushaltsgens zu erhalten, ist ein vergleichbares Expressionsniveau von Haushaltsgen und Zielgen anzustreben.

Insgesamt ließ das Ergebnis der qRT-PCR mit dem Haushaltsgen ARP in vorliegender Arbeit auf eine für weitere Untersuchungen der spezifischen Gene brauchbare cDNA schließen, mit Ausnahme der Probe 4 B, die das Haushaltsgen nicht exprimierte, und der Probe 4 A, welche mit einem Schwellenwertzyklus von 44,5 aus dem Rahmen fiel. Trotzdem wurden, bei ohnehin geringer Probenanzahl, auch diese beiden Proben in die weiteren Versuche mit eingeschlossen.

Ob eine degradierte RNA ein geeignetes Substrat für die Durchführung einer qRT-PCR darstellt oder nicht ist unter Anderem auch abhängig von der Größe des gesuchten zu amplifizierenden Produktes.

In degradierter RNA können meist nur kurze Transkripte amplifiziert werden, in RNA mit optimaler Qualität spielt die zu detektierende Produktgröße jedoch keine Rolle (FLEIGE und PFAFFL 2006). Noch genauer ausgedrückt beschreiben FLEIGE und PFAFFL 2006, dass, sofern ein Produkt von einer Größe >400bp zu detektieren ist, dies stark von einer guten RNA-Qualität, die mindestens eine RIN von 5 haben sollte, abhängig ist. Kürzere qRT-PCR Produkte, mit einer Größe von 70-250bp, sind unabhängiger von der vorliegenden RNA-Qualität.

Die Produktgrößen der gesuchten Fusionstranskripte lagen in vorliegender Arbeit für die Translokation EWS/FLI1 Typ 1 bei 100bp, für EWS/FLI1 Typ 2 bei 166bp, für EWS/ERG bei 154bp, für PAX3/FKHR bei 171bp und für PAX7/FKHR bei 159bp.

Aus der Überlegung heraus, die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, die gesuchten Produkte von ≥ 100bp in vorliegender stark degradierter RNA trotzdem zu detektieren, wurden in dieser Arbeit Nested- Primer als alternative Sense- Primer verwandt, um möglichst kleine Produkte zu erhalten. Mit diesen besagten Nested-Primern reduzierte sich die Größe des Produktes für die Translokation EWS/FLI1 Typ 1 auf 69bp, für die Translokation EWS/FLI1 Typ 2 auf 135bp, für die Translokation PAX3/FKHR auf 53bp und für die Translokation PAX7/FKHR auf 57bp (siehe Tab. 9).

Translokation	BPL mit Sense- und	BPL mit Nested-Primer
	Antisense-Primer	
EWS/FLI1 Typ1	100bp	69bp
EWS/FLI1 Typ2	166bp	135bp
EWS/ERG	154bp	-
PAX3/FKHR	171bp	53bp
PAX7/FKHR	159bp	57bp

Tab. 9: Basenpaarlängen- Reduktion durch Verwendung von Nested- Primern

In Korrelation dazu zeigte eine durchgeführte Kontroll-PCR mit den Proben mit vorliegender, mittels Nested- Primer detektierter Translokation EWS/FLI1 Typ 2 mit den Sense- und Antisense- Primern für EWS/FLI1 für das große 166bp Produkt ein

negatives Ergebnis. Dies bedeutet, dass das große Fusionstranskript der Translokation EWS/FLI1 Typ 2 von 166bp in keiner der untersuchten Proben quantitativ vorlag und somit unter Verwendung der normalen Sense- und Antisense-Primer tatsächlich nicht hätte detektiert werden können. Dies korreliert mit der Angabe in der Literatur durch FLEIGE und PFAFFL 2006, dass in degradierter RNA Transkripte mit geringer Basenpaarlänge besser nachzuweisen sind als große Produkte, wobei die Autoren diese Schwierigkeit erst ab einer Produktlänge von >400bp beschreiben.

Zusammenfassend wird in der Literatur beschrieben. prinzipiell dass molekularpathologische Untersuchungen an Formalin-fixierten, in Paraffin gebetteten Geweben möglich sind (LEWIS TB et al. 2007; STEGMAIER et al. 2004), wenn auch nur begrenzt aufgrund der meist sehr geringen RNA-Qualität (VIERTLER et al. 2012; DOLESHAL et al. 2008; LI et al. 2007). PENLAND et al. 2007 berichten in ihrer Arbeit, dass trotz der nur geringen Anzahl an Paraffin-gebetteten Proben, die für die Analyse geeignet waren, eine molekularpathologische Untersuchung an diesen Geweben prinzipiell möglich, wenn auch schwieriger ist als an gefrorenen Frischgewebsproben, aufgrund des Unterschieds in der RNA-Qualität.

Neuere Untersuchungen bezüglich molekularpathologischer Analysen an Formalinfixierten, Paraffin-gebetteten Geweben haben stets die Intention ein einwandfreies Ausgangstemplate welches uneingeschränkt für zu erzeugen, molekularpathologische Untersuchungen mittels gRT-PCR eingesetzt werden kann, als Alternative zu dem nur limitiert verfügbaren gefrorenen Frischgewebe, welches bisher den Goldstandard für molekularpathologische Untersuchungen darstellt (VIERTLER et al. 2012). Die Routine der klinischen Gewebeasservation ist bisher nicht optimal für Nukleinsäureanalysen und eine Anpassung der routinemäßigen Gewebeasservation von Nöten. Ein RNA-Stabilisator, der eine nicht-toxische Gewebeasservation zum unmittelbaren Schutz der RNA vor Degradierung durch RNAsen darstellt, ist z.B. die Fixationslösung RNALater®. Gewebsfixierung in RNALater® führte zu vergleichbar guten RNA-Expressionsanalysen wie an frischen oder gefrorenen Gewebeproben (MUTTER et al. 2004). Auch nach sieben Tagen Lagerung bei Raumtemperatur in RNALater® konnte aus den asservierten Geweben eine RNA von hoher Qualität isoliert werden (GROTZER et al. 2000). Die Methode bietet eine vergleichsweise einfache und unkomplizierte Möglichkeit einer schnellen und gut verfügbaren Gewebeasservation unmittelbar nach derer Gewinnung im Operationssaal ohne aufwendiges Equipment, wie z.B. einen Behälter mit flüssigem Stickstoff, bereitstellen zu müssen (MUTTER et al. 2004). Durch diese logistische Erleichterung könnten weitgefasste routinemäßige Gewebeassevationen zukünftige wissenschaftliche Untersuchungen voranbringen (GROTZER et al. 2000).

Neue Formalin-freie Fixierungsmethoden werden aktuell untersucht, um weniger genauere gRT-PCR-RNA-Degradierung für Analysen zu erzielen. Eine Untersuchung mit dem PAXgene®- System, einer neuen Methode einer Formalinfreien Gewebsfixierung für histologische und molekularpathologische Untersuchungen, zeigte eine ähnlich hohe Quantität und Qualität der isolierten RNA wie von gefrorenem Frischgewebe (GROELZ et al. 2012; VIERTLER et al. 2012) und eignete sich ebenso gut für gRT-PCR-Analysen wie gefrorenes Frischgewebe, unabhängig von der zu amplifizierenden gesuchten Produktgröße (GROELZ et al. 2012). Molekularpathologische Untersuchungen an isolierter mikro-RNA, eine neue Klasse kleiner RNA-Moleküle, aus Paraffin-gebetteten Geweben zeigten unabhängig von Probenalter und RNA-Qualität robustere Ergebnisse in der gRT-PCR, die mit den Analysen an gefrorenem Frischgewebe besser korrelierten (DOLESHAL et al. 2008). Diese Beobachtung teilt ebenso LI et al. 2007. Die kleineren RNA-Moleküle der mikro-RNA scheinen weniger durch den Vorgang der Gewebsfixierung und Lagerung beeinflusst als normale RNA (LI et al. 2007). Somit stellt die mikro-RNA möglicherweise ein robusteres Ausgangstemplate für molekularpathologische Paraffin-gebetteten Untersuchungen Formalin-fixierten, Geweben dar an (DOLESHAL et al. 2008).

4.2 Die unterschiedlichen Translokationen sind spezifisch in den Ewing-Tumoren und Rhabdomyosarkomen des Urogenitaltraktes nachweisbar

Weichteilsarkome, insbesondere die Gruppe der klein-, rund- und blauzelligen Tumoren, sind histologisch oft nur sehr schwierig voneinander zu unterscheiden. Molekularpathologische Untersuchungen mit Nachweis spezifischer Translokationen dienen einer genauen Differenzierung zwischen den einzelnen Sarkomentitäten als Grundvoraussetzung zur exakten Diagnosefindung mit Einleitung einer spezifischen Therapiestrategie (CORMIER und POLLOCK 2004; LEWIS TB et al. 2007). Dies erklärt einmal mehr, weshalb molekularpathologische Untersuchungen an Weichteilsarkomen immer mehr an Bedeutung gewinnen.

In vorliegender Arbeit wurden 20 Formalin-fixierte, in Paraffin gebettete Tumorgewebsproben und eine Frischgewebsprobe auf das Vorliegen von fünf spezifischen Fusionstranskripten hin untersucht. Histologisch waren vier der untersuchten Tumoren als embryonale Rhabdomyosarkome, sechs der Tumoren als pPNET und die untersuchte Frischgewebsprobe als Ewing-Sarkom klassifiziert worden.

Mittels qRT-PCR konnte hier in zwei der untersuchten 21 Tumorgewebsproben das spezifische Fusionstranskript EWS/FLI1 Typ 2 nachgewiesen werden. Die Probe 5 B zeigte nur in einem der untersuchten identischen Ansätze das gesuchte Transkript, in Probe 5 A, vom gleichen Tumor ein anderer Paraffinblock, konnte hingegen nicht das gesuchte Produkt nachgewiesen werden. In der untersuchten Frischgewebsprobe war in beiden Probenansätzen stets die gesuchte Translokation nachzuweisen. Dies lässt die Überlegung aufkommen, weshalb in nur einem der ansonsten identischen Probenansätze der Probe 5 B die Translokation nachzuweisen war und weshalb in Probe 5 A die gesuchte Translokation nicht vorlag. Neben potenzieller Ungenauigkeiten in der Durchführung des Versuchs, kann hier auch eine zu geringe Menge an vorliegendem Ausgangssubstrat mit dadurch unregelmäßigem Nachweis des Transkriptes diskutiert werden. Diese Überlegung wird durch eine Untersuchung von PENLAND et al. 2007 unterstützt. Hier wurde gezeigt, dass nach qRT-PCR Analyse in den Proben aus Formalin-fixierten, in Paraffin gebetteten Geweben weniger Transkripte enthalten waren als in den Proben aus geforenem Frischgewebe. Bezüglich des fehlenden Nachweises in Probe 5 A ist auch ein geringeres Vorliegen erhaltenen Tumorgewebes im Paraffinblock mit mehr nekrotischem Material denkbar, obwohl die verwendeten Proben zuvor durch einen Pathologen auf entsprechende Eignung über Mikroskopie getestet wurden.

Die Translokation EWS/FLI1 ist nach gängigen Literaturangaben mit 85% die häufigste und eine für Ewing-Tumore spezifische Translokation (BURCHILL 2003; RIGGI und STAMENKOVIC 2007). Der in vorliegender Arbeit gezeigte Nachweis der Translokation EWS/FLI1 Typ 2 an zwei untersuchten Proben entspricht somit dieser Häufigkeitsverteilung.

Die Translokation EWS/FLI1 Typ 1 konnte weder in den untersuchten Ewing-Tumoren, noch in den embryonalen Rhabdomyosarkomen nachgewiesen werden. Bezüglich der embryonalen Rhabdomyosarkome korreliert diese Beobachtung mit den Angaben der Literatur, da dies ein spezifisch in den Ewing-Tumoren nachweisbares Fusionstranskript ist (BURCHILL 2003).

Die ebenso für Ewing-Tumore spezifische Tranlokation EWS/ERG konnte auch in keiner der untersuchten Proben, weder in den Ewing-Tumoren, noch in den embryonalen Rhabdomyosarkomen, nachgewiesen werden. Dieses Fusionstranskript hat eine Größe von 154 Basenpaaren. Der negative Nachweis in den untersuchten Ewing-Tumoren kann einerseits auf das seltene Vorkommen dieser Translokation mit nur 10% aller ESFT zurückgeführt werden (BURCHILL 2003), andererseits ist das Vorliegen einer stark degradierten RNA als ungünstiges Ausgangssubstrat zum Nachweis größerer Transkripte, wie unter 4.1 beschrieben, ursächlich in Betracht zu ziehen. In einer Arbeit von LEWIS TB et al. 2007 konnte diese seltene Translokation EWS/ERG, der Häufigkeitsverteilung entsprechend, in nur 7% der untersuchten Proben nachgewiesen werden, wohingegen die Fusionstranskripte EWS/FLI1 Typ 1 und Typ 2 mit insgesamt 90% am häufigsten vorlagen.

Die qRT-PCR zum Nachweis der Fusionstranskripte PAX3/FKHR und PAX7/FKHR zeigte jeweils in allen untersuchten Proben, sowohl in den Ewing-Tumoren, als auch in den embryonalen Rhabdomyosarkomen, ein Produkt auf dem Agarosegel, bei dem aufgrund der jeweils sehr geringen Größe der beiden gesuchten Fusionstranskripte, von 53bp für PAX3/FKHR bzw. von 57bp für PAX7/FKHR, eine eindeutige Zuordnung zu spezifischem gesuchtem Produkt oder unspezifischem Produkt, sowie Primer- Dimere, nicht ohne Weiteres möglich war. Die Ergebnisse der Frischgewebsprobe sowie der Probe 5 B, für die bereits eindeutig ein Vorliegen der Ewing-Tumor- spezifischen Translokation EWS/FLI1 Typ 2 nachgewiesen wurde,

unterschieden sich sowohl im PCR- Ergebnis, als auch auf dem Agarosegel nicht wesentlich von denen der übrigen Proben. Ein gleichzeitiges Vorliegen einer Translokation, die nach gängiger Literatur für das alveoläre Rhabdomyosarkom spezifisch ist (SORENSEN et al. 2002), scheint äußerst fragwürdig bis unmöglich. Daher ist abschließend von einem negativen Ergebnis aller Proben für die Translokationen PAX3/FKHR und PAX7/FKHR auszugehen. Entsprechend korreliert dieses Ergebnis mit den Angaben in der Literatur, dass diese beiden Translokationen spezifisch in den alveolären Rhabdomyosarkomen nachzuweisen sind (SORENSEN et al. 2009).

Zur Überprüfung der Ergebnisse wurden jeweils exemplarische Proben der Ewing-Tumoren und der embryonalen Rhabdomyosarkome auf das Vorliegen der jeweiligen großen Fusionstranskripte hin untersucht (siehe Tab. 9). In keiner der untersuchten Proben war das große 100bp-Fusionstranskript der Translokation EWS/FLI1 Typ 1 nachweisbar, ebenso nicht das 166bp-Produkt der Translokation EWS/FLI1 Typ 2 und weder das 171bp- Produkt von PAX3/FKHR noch das 159bp-Produkt von PAX7/FKHR. Dies kann einmal mehr auf das Vorliegen einer stark degradierten RNA zurückzuführen sein, durch die ein Nachweis größerer Transkripte erschwert ist (FLEIGE und PFAFFL 2006). Jedoch beschreiben FLEIGE und PFAFFL 2006 diesen erschwerten Nachweis erst ab einer Produktgröße von >400bp. Auch ist in vorliegender Arbeit an zwei Proben der Nachweis eines Produktes von 135bp, des Fusionstranskriptes EWS/FLI1 Typ 2, gelungen, wenn auch nur mit einem unstetigen Nachweis in Probe 5 B, trotz identischer Behandlung der doppelten Probenansätze. Ebenso konnte in allen untersuchten Gewebeproben, mit Ausnahme der Probe 4 B, das Haushaltsgen ARP nachgewiesen werden, welches eine Produktgröße von 109bp besitzt und somit größer ist als die mittels Nested- Primern untersuchten spezifischen Translokationen für EWS/FLI1 Typ 1, PAX3/FKHR und PAX7/FKHR (COX et al. 2003). Dies zeigt wie schwierig und empfindlich der Nachweis dieser spezifischen Fusionstranskripte an degradierter RNA ist. Trotz gelungenem Nachweis des EWS/FLI1 Typ 2- Fusionstranskriptes mit einer Größe von 135bp, konnte in den gleichen positiven Proben das größere 166bp-Produkt mit Sense- und Antisense- Primer für EWS/FLI1 nicht mehr nachgewiesen werden. Festzustellen ist demnach, dass die Grenze, ab welcher Produktgröße die gRT-PCR an degradierter RNA erschwert ist, nicht absolut gesehen werden kann.

verdeutlicht nocheinmal die Notwendigkeit, Dies unabhängig von dieser Unwägbarkeit das große 166bp-Produkt der Translokation EWS/FLI1 Typ 2 ausgehend von der für EWS/FLI1 Typ 2 positiven Frischgewebsprobe mittels mutagenem Primer und Standard-PCR herzustellen (siehe Abb. 22), zum Erhalt eines positiven Standards, der dazu dienen kann, technische Gegebenheiten zu und als Vergleich für Untersuchungen an analysieren kritischen Proben herangezogen zu werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in vorliegender Arbeit ein spezifischer Nachweis der untersuchten Fusionstranskripte gelungen ist, da weder eine für Ewing-Tumoren spezifische Translokation in den embryonalen RMS zu finden war, noch ein für alveoläre RMS spezifisches Fusionstranskript in den Ewing-Tumoren oder embryonalen RMS nachgewiesen wurde. Es ist jedoch nur ein positives Ergebnis mit Nachweis einer Ewing-Tumor- spezifischen Translokation an zwei der untersuchten Ewing-Tumoren gelungen. Wie weiter oben diskutiert, kann dies einmal an der geringen **RNA-Qualität** mit geringer Menge an brauchbarem Ausgangstemplate liegen, jedoch wird auch beschrieben, dass in bis zu 20% der Fälle diese spezifischen Translokationen in den Ewing-Tumoren nicht nachweisbar sein können (DELATTRE et al. 1994). OSUNA und DE ALAVA 2009 beschreiben einen erfolgreichen Nachweis spezifischer Fusionstranskripte aus Formalin-fixierten, Paraffin-gebetteten Geweben in nur 50% der Fälle, in Abhängigkeit von der Erfahrung des jeweiligen Untersuchers.

In vorliegender Arbeit wurden sehr seltene Tumoren in seltener Lokalisation, in urogenitaler Lage, betrachtet, was eine geringe Fallzahl mit geringer Anzahl an untersuchten Geweben bedeutete. Von daher ist eine verallgemeinernde Aussage bezüglich Funktionalität dieser Methode nur schwer zu treffen. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, ist eine genügend große Anzahl an untersuchten Gewebeproben aus einer großen Patientendatei für zukünftige Analysen von Nöten. Zudem erfordern Untersuchungen an problematischen Geweben eine Positivkontrolle um technische Probleme in den Griff zu bekommen.

4.3 Eine eindeutige Klassifizierung der Weichteilsarkome als wichtige Grundlage für eine gezielte Therapiestrategie

Aufgrund ihres histologischen Erscheinungsbildes klein-, rund- und blauzelliger Tumoren sind einige WTS-Subtypen, wie z.B. die Rhabdomyosarkome und Ewing-Tumoren, via konservativer Histologie oft nur schwer voneinander zu unterscheiden, wobei jedoch Prognose und Therapieansprechen stark differieren können (LEWIS TB et al. 2007). Sarkome werden in bis zu 25% bis 40% der Fälle falsch klassifiziert. Dies macht die Notwendigkeit einer objektiven und eindeutigen Methode zur Klassifizierung dieser seltenen Tumoren deutlich (CORMIER und POLLOCK 2004). Molekularpathologische Untersuchungen sind für eine eindeutige präoperative Diagnosestellung mit genauer Klassifizierung der WTS-Subtypen als Voraussetzung für die Einleitung einer spezifischen primären Therapiestrategie von großer Bedeutung (CORMIER und POLLOCK 2004). Zudem ist die Molekularpathologie der Weichteilsarkome auch von besonderem prognostischen Wert (BURCHILL 2003; ODA und TSUNEYOSHI 2009). Die multimodale Therapiestrategie zur Behandlung der Weichteilsarkome ist ein aggressives Vorgehen, welches mit vielen Nebenwirkungen, nicht zuletzt mit einem erhöhten Risiko für Zweitmalignome, einhergeht. Dies verdeutlicht einmal mehr die Signifikanz der Bestimmung prognostischer Parameter zur Klärung, ob diese aggressive Therapie zur Behandlung jedes Patienten mit Weichteilsarkom gerechtfertigt und geeignet ist (KAVALAR et al. 2009).

Formalin-fixierte, in Paraffin gebettete Gewebeproben sind meist in großer Anzahl verfügbar, unkompliziert zu lagern und für den klinischen Alltag schnell zugänglich. Molekularpathologische Untersuchungen sind prinzipiell an diesen Geweben möglich, jedoch durch oft stark degradierte RNA nur begrenzt aussagekräftig, was auch das Ergebnis in vorliegender Arbeit aktuell bekräftigt (RENTOFT et al. 2012; PENLAND et al. 2007). Bleibt demnach die Frage, ob diese wichtigen genetischen Analysen direkt in den klinischen Alltag integriert und stets unmittelbar an Tumorfrischgewebe vorgenommen werden sollten, um mit optimaler RNA-Qualität exakte, verlässliche Ergebnisse bezüglich der spezifischen Fusionstranskripte zu erlangen. Die Integration dieser molekularpathologischen Untersuchungen in den klinischen Alltag ist jedoch meist mit einem großen Aufwand bezüglich Personal und Laborkapazitäten verbunden und nicht zuletzt auch eine mit hohen Kosten verbundene Methode (ANTONESCU 2006). Eine mögliche schnelle und einfache

Strategie zur unmittelbaren Gewebsfixierung von Tumorfrischgewebe zum Schutz der RNA vor Degradierung stellt der RNA-Stabilisator RNALater® dar (GROTZER et al. 2000; MUTTER et al. 2004). Unter geringem logistischen Aufwand könnte eine Bereitstellung dieser im Operationssaal molekularpathologische Lösung Untersuchungen an RNA von hoher Qualität in breiterem Maße ermöglichen (GROTZER et al. 2000). Die direkte Verknüpfung an bestimmte Bedingungen unter denen stets eine molekularpathologische Untersuchung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung erfolgen sollte nennen OSUNA und DE ALAVA 2009. So z.B. bei Vorliegen eines ungewöhnlichen Patientenalters für die entsprechende Tumorentität oder eine ungewöhnliche Tumorlokalisation, wie z.B. Harnblase oder Niere, sowie bei ungewöhnlichen morphologischen Varianten in der klassischen histologischen Untersuchung (OSUNA und DE ALAVA 2009).

Die Analyse zu einem späteren Zeitpunkt an asservierten Formalin-fixierten, Paraffingebetteten Geweben ist zwar ebenso möglich, wird jedoch meist nur für retrospektive Analysen verwandt und stellt sich aufgrund der meist vorliegenden geringeren RNA-Qualität im Vergleich zu den gefrorenen Frischgewebsproben, wie auch der Vergleich in vorliegender Arbeit zeigt, schwieriger dar (PENLAND et al. 2007). Neue Methoden zur Gewebsfixierung, wie unter 4.1 bereits erwähnt, z.B. das PAXgene®-System oder die Isolierung robusterer mikro-RNA für Analysen an Paraffingebetteten Geweben, könnten hier Abhilfe schaffen und eventuell sogar als mögliche Methoden in den klinischen Alltag integriert werden (GROELZ et al. 2012; VIERTLER et al. 2012; DOLESHAL et al. 2008; LI et al. 2007). Auch kann die Entwicklung eines positiven Standards, wie in dieser Arbeit gelungen, den routinemäßigen Einsatz molekularpathologischer Untersuchungen durch direkten Vergleich der Ergebnisse vereinfachen und standardisieren.

Aktuell basieren noch relativ wenige Therapien auf Genprofilen von Tumoren. Wenn jedoch die Reproduktivität und Verlässlichkeit von Analysen an Formalin-fixierten, Paraffin-gebetteten Geweben steigt, könnten molekularpathologische Untersuchungen in den klinischen Alltag immer mehr Einzug finden (FARRAGHER et al. 2008).

Im Hinblick auf aktuelle und auch zukünftige wissenschaftliche Untersuchungen rücken molekularpathologische Untersuchungen an Tumorgeweben zum Erhalt von neuen Erkenntnissen bezüglich der Tumorbiologie immer mehr in den Vordergrund des Interesses, insbesondere zur Detektion von spezifischen Angriffspunkten in den biologischen Funktionsabläufen der Tumorzellen zur Entwicklung moderner zielgerichteter Therapieansätze (BURCHILL 2003; ODA und TSUNEYOSHI 2009). Weichteilsarkome mit Vorliegen spezifischer molekularer Aberrationen, wie z.B. der auch in vorliegender Arbeit untersuchten spezifischen Translokationen, sind für zielgerichtete Therapien da die Fusionstranskripte geeignet, mit Zellzyklusregulatoren in Interaktion treten und so einen geeigneten Angriffspunkt für innovative Therapien bieten (ODA und TSUNEYOSHI 2009). So konnte in einer Arbeit von ERKIZAN et al. 2009 über Blockierung der Interaktion zwischen dem EWS/FLI1 Fusionstranskript und der RNA Helicase A eine Inhibition des Tumorwachstums und eine Induktion der Apoptose in den Tumorzellen erzielt werden. Eine Inhibition des Transmembranproteins CD99 hingegen, über anti- CD99 monoklonale Antikörper, führte zur Induktion der Apoptose in den Tumorzellen (SCOTLANDI et al. 2000), bzw. zu einer Blockierung der Differenzierung der Tumorzellen (ROCCHI et al. 2010).

Eine klinisch bereits etablierte zielgerichtete Therapie ist die Verwendung des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib in c-Kit positiven gastrointestinalen Stromatumoren. Für andere Weichteilsarkom- Subtypen gewinnt u.a. die Blockierung des VEGF (vascular endothelial growth factor)/VEGF-Rezeptor Signalwegs über Tyrosinkinaseinhibitoren wie Sorafenib und Pazopanib für eine zielgerichtete Therapie immer mehr an Bedeutung in aktuellen wissenschaftlichen Untersuchungen (WARDELMANN et al. 2012; SILK und SCHUETZE 2012). Eine Vielzahl an klinischen Studien wird nötig sein, um die bisher erreichten Ansätze weiter auszubauen. Die Entwicklung moderner, spezifischer Therapieansätze kann neue Hoffnung zur Verbesserung der Behandlung dieser aggressiven Tumoren mit Benefit für die Patienten, insbesondere im metastasierten Tumorstadium, bringen. Die mediane Langzeitüberlebensrate von Patienten mit metastasierten Weichteilsarkomen ist in den letzten 20 Jahren um 50% gestiegen. Dies ist einmal mehr auf das Erlangen neuer Erkenntnisse in Tumorbiologie und Charakteristiken der einzelnen Subtypen zurückzuführen. Dieser bisher erreichte Erfolg sollte Anlass sein für zukünftige wissenschaftliche Arbeiten, um einen weiteren Progress in der Erkenntnis über die Tumorbiologie der Weichteilsarkome zu erlangen und so die Entwicklung neuer effektiver Therapiestrategien voranzubringen (ITALIANO et al. 2011; CORMIER und POLLOCK 2004).

5. Zusammenfassung

Trotz des Einsatzes multimodaler Therapiestrategien stellt die Behandlung, besonders metastasierter Weichteilsarkome in urogenitaler Lage, weiterhin eine Herausforderung dar. Das Vorkommen der Tumoren in dieser Lokalisation ist sehr selten, jedoch durch ein sehr aggressives Verhalten mit schnellem Tumorwachstum und früher Metastasierung geprägt. Die 5-Jahres Überlebensrate der Patienten mit Weichteilsarkom beträgt insgesamt, unabhängig vom Tumorstadium, nur 50-60%. Das Auftreten von Lokalrezidiven und Fernmetastasen hat den größten Einfluss auf das Gesamtüberleben. Unterschiede in Therapieansprechen und Prognose der einzelnen WTS-Subtypen, trotz Ähnlichkeit im histologischen Erscheinungsbild und damit schwieriger Diagnosestellung, machen die Notwendigkeit objektiver molekularer Marker deutlich. Eine schnelle Diagnosefindung mit genauer Klassifizierung der WTS-Subtypen ist für die unmittelbare Einleitung einer gezielten Therapiestrategie dieser aggressiven Tumoren unabdingbar. In den letzten Jahrzehnten sind molekularpathologische Untersuchungen mit Nachweis spezifischer Fusionstranskripte für viele der WTS-Subtypen etabliert worden.

Ziel dieser Arbeit war es, die spezifischen Translokationen EWS/FLI1 Typ 1 und Typ 2, EWS/ERG, PAX3/FKHR und PAX7/FKHR mittels qRT-PCR in den Ewing-Tumoren und embryonalen Rhabdomyosarkomen des Urogenitaltraktes an Formalinfixierten, Paraffin-gebetteten Geweben nachzuweisen. Im Verlauf der Analysen ergab sich die Notwendigkeit für die Herstellung eines positiven Standards für eine dieser Translokationen. Damit konnte stichhaltiger argumentiert werden, ob die qRT-PCR eine verlässliche Methode für molekularpathologische Untersuchungen an Formalin-fixierten, Paraffin-gebetteten Geweben darstellt.

vorliegender Arbeit war ein spezifischer Nachweis untersuchten In der Translokationen gelungen mit Erreichen eines positiven Ergebnisses in einer der untersuchten 20 Paraffin-gebetteten Gewebeproben, sowie in einer Tumorfrischgewebsprobe mit Nachweis des Fusionstranskriptes EWS/FLI1 Typ 2. Zudem konnte mit Hilfe eines mutagenen Primers via Standard-PCR ausgehend von der positiven Frischgewebsprobe für das 135bp- Fusionstranskript von EWS/FLI1 Typ 2 ein positiver Standard auch für das große 166bp-Produkt der EWS/FLI1 Typ 2-Translokation hergestellt werden.

Alle untersuchten Paraffinproben zeigten in der vorherigen Analyse der RNA-Qualität mittels Agilent Bioanalyzer 2100 eine stark degradierte RNA mit einer RIN von 1,0 bis

molekularpathologische 2,5. Arbeitsgruppen Zahlreiche haben bereits Untersuchungen an Paraffin-gebetteten Geweben vorgenommen, mit dem Ergebnis, dass die Analyse zwar prinzipiell möglich, jedoch häufig aufgrund einer RNA-Qualität geringer Güte, im Vergleich zu Analysen an gefrorenem Frischgewebe, eingeschränkt ist. Tumorfrischgewebe ist jedoch in der Regel nicht in solcher Vielzahl vorhanden wie die großen Archive an Paraffin-gebetteten Geweben und für den Einsatz im klinischen Alltag durch schwierige Lagerung und logistischen, sowie finanziellen Aufwand oft nicht verfügbar. Neue Methoden zum Erhalt eines höher qualitativen Ausgangstemplates für molekularpathologische Analysen an Formalinfixierten, Paraffin-gebetteten Geweben, z.B. über Isolierung einer mikro-RNA oder Formalin-freier Gewebsfixierung, stellen mögliche Verbesserungen für gleichwertige Analysen im Vergleich zu Untersuchungen an gefrorenem Frischgewebe dar, insbesondere vor dem Hintergrund betrachtet, molekularpathologische Untersuchungen an diesen Tumoren in den klinischen Alltag zu integrieren, um einerseits einen starken prognostischen Faktor zu erhalten und andererseits durch schnelle und exakte Diagnosestellung ein geeignetes Therapiekonzept festlegen zu können. So erhaltene weitere Erkenntnisse über die Tumorbiologie der Weichteilsarkome können zur Etablierung neuer molekularer, zielgerichteter Therapiestrategien verhelfen, mit Hoffnung auf steigende Erfolge in der Behandlung dieser seltenen aggressiven Tumoren.

<u>6. Anhang</u>

6.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ARP	acidic ribosomal phosphoprotein
bp	Basenpaare
BPL	Basenpaarlänge
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CDKs	Cyclin- abhängige Kinasen
Ct	Cycle Threshold (Schwellenwert-Zyklus)
d.h.	das heißt
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ESFT	Ewing's sarcoma family of tumors (Ewing-Sarkom-Familie)
et al.	und Mitarbeiter
FU	Fluoreszenzintensität
g	Gramm
kDa	Kilodalton
I	Liter
μ	Mikro
μm	Mikrometer
m	Milli
M/Mol/mol	Mol
min	Minuten
MM	Master Mix
mm	Millimeter
n	Nano
neg.	negativ
NSE	Neuronen-spezifische Enolase
р	Piko
PCR	Polymerasekettenreaktion
pPNET	peripherer primitiver neuroektodermaler Tumor

qRT-PCR	Quantitative Realtime-Polymerase Chain Reaction (quantitative Realtime
	Polymerasekettenreaktion)
Rb	Retinoblastom
RIN	RNA integrity number
RMS	Rhabdomyosarkome
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
S.	Seite
sek	Sekunden
siRNA	small interfering RNA
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v.a.	vor allem
VEGF	vascular endothelial growth factor
WTS	Weichteilsarkome
z.B.	zum Beispiel

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Lokalisationen der ossären Ewing- Sarkome	11
Abbildung 2	Histologisches Korrelat eines klein-, rund- und blauzelligen ESFT. HE x128	12
Abbildung 3	Darstellung der Translokationen EWS/FLI1 Typ 1 und Typ 2	17
Abbildung 4	Schematische Darstellung der Wirkung der Fusionstranskripte der Ewing-Tumoren auf die Zellzyklusregulation	20
Abbildung 5	Exemplarische Darstellung einer maximal intakten (RIN 10) und einer degradierten RNA (RIN 2) mit Auftragung der Fluoreszenzintensität gegen die Durchwanderungs-	32
Abbildung 6	Exemplarischer Ablauf eines PCR- Zyklus	36
Abbildung 7	Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I TM	37
Abbildung 8	Zwei beispielhafte DNA- Amplifikationskurven	38
Abbildung 9	Exemplarische Darstellung einer Schmelzkurvenanalyse mit Vergleich zwischen Primer- Dimer und PCR- Produkt	43
Abbildung 10	Exemplarische Darstellung einer Schmelzkurvenanalyse mit Vergleich zwischen Primer- Dimer und PCR- Produkt in der ersten Ableitung	44
Abbildung 11	Veranschaulichung der Basenpaarsequenz der Translokation EWS/FLI1 Typ 2, sowie Darstellung der	47
Abbildung 12	Rechnung zur Bestimmung des Molekulargewichts von einzelsträngiger DNA	49
Abbildung 13	Formel zur PCR- Effizienzbestimmung	49
Abbildung 14.1	Veranschaulichung der Ergebnisse zur RNA- Analyse der untersuchten Proben am Beispiel der Proben 7A. F und 6A	52/53
Abbildung 14.2	Veranschaulichung der Ergebnisse zur RNA- Analyse der Vergleichsproben LNCaP und F2	53/54
Abbildung 15	50bp- Leiter der Firma Fermentas, St. Leon- Rot	57,58
-		67-70
Abbildung 16	Darstellung der Basenpaarsequenz des Eusionstranskriptes der Translokation EWS/EL11 Typ 1	59
Abbildung 17.1	Sequenzierung der Probe 9A für die Translokation EWS/FLI1 Typ 1	59
Abbildung 17.2	Sequenzierung der Probe 3A für die Translokation EWS/FLI1 Typ 1	59
Abbildung 17.3	Sequenzierung der Frischgewebsprobe F für die Translokation EWS/FLI1 Typ 1	60
Abbildung 18	100bp- Leiter der Firma Fermentas, St. Leon- Rot	61-62
		65-66
Abbildung 19	DarstellungderBasenpaarsequenzdesFusionstranskriptes der Translokation EWS/FLI1 Typ 2	63

Abbildung 20.1	Sequenzierung der Probe 5B für die Translokation EWS/FLI1 Typ 2	63
Abbildung 20.2	Sequenzierung der Frischgewebsprobe F für die Translokation EWS/FLI1 Typ 2	64
Abbildung 21	Ergebnisse zur Herstellung eines positiven Standards des großen Fusionsproduktes der Translokation EWS/FLI1 Typ 2	72
Abbildung 22	Ergebnis der Sequenzierung des großen mutagen hergestellten Fusionstranskriptes der Translokation EWS/FLI1 Typ 2 (166bp)	73
Abbildung 23.1	Veranschaulichung des PCR- Ergebnisses zur Effizienzbestimmung	74
Abbildung 23.2	Lineare Regressionsanalyse zur PCR- Effizienzbestimmung mit Auftragung des Ct- Wertes gegen die logarithmische initiale Templatemenge	74

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Chromosomale Translokationen in Weichteilsarkomen	16	
Tabelle 2	Die wichtigsten Translokationen der Ewing-Tumoren	18	
Tabelle 3	Verwendete Gewebeproben mit Zuordnung zu Tumorentität und Jahr der Probenasservation	28	
Tabelle 4	Herkunft der RNA zum Vergleich der RNA- Qualität		
Tabelle 5	Verwendete Primer mit Sequenz und Anlagerungstemperatur	39/40	
Tabelle 6	Zusammen verwendete spezifische Primer und Basenpaarlängen der Produkte	40	
Tabelle 7.1	RNA- Konzentration und- Qualität der untersuchten Proben		
Tabelle 7.2	RNA- Konzentration und - Qualität der beiden zusätzlichen Proben zum Vergleich der RNA- Qualität	51	
Tabelle 8	Real- Time PCR Ergebnisse für das Haushaltsgen ARP	55	
Tabelle 9	Basenpaarlängen- Reduktion durch Verwendung von Nested- Primern	80	

7. Literaturverzeichnis

- Al-Najar A, Siggelkow M, Naumann C, Hamann M, Jünemann PK, van der Horst C (2009): Ewing's sarcoma of the urogenital tract. Int Urol Nephrol <u>41</u>, 13-17
- Angel J, Alfred A, Sakhuja A, Sells R, Zechlinski J (2010): Ewing's sarcoma of the kidney. Int J Clin Oncol <u>15</u>, 314-318
- Antonescu C (2006): The role of genetic testing in soft tissue sarcoma. Histopathology <u>48</u>, 13-21
- 4. Badar Q, Ali N, Abbasi N, Ashraf S, Karsan F, Hashmi R (2010): Ewing's Sarcoma/PNET of kidney in 13 year old girl. J Pak Med Assoc <u>60</u>, 314-315
- Bernstein M, Kovar H, Paulussen M, Randall R, Schuck A, Teot L, Juergens H (2006): Ewing's sarcoma family of tumors: current management. Oncologist <u>11</u>, 503-519
- 6. Blay J, Cesne A (2009): Adjuvant chemotherapy in localized soft tissue sarcomas: Still not proven. Oncologist <u>14</u>, 1013-1020
- Borden E, Baker L, Bell R, Bramwell V, Demetri G, Eisenberg B, Fletcher C, Fletcher J, Ladanyi M, Meltzer P (2003): Soft tissue sarcomas of adults: state of the translational science. Clin Cancer Res <u>9</u>, 1941-1956
- 8. Burchill S (2003): Ewing's sarcoma: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of molecular abnormalities. J Clin Pathol <u>56</u>, 96-102
- 9. Bustin S (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J Mol Endocrinol <u>25</u>, 169-193
- Casanova M, Meazza C, Gronchi A, Fiore M, Zaffignani E, Podda M, Collini P, Gandola L, Ferrari A (2007): Soft-tissue sarcomas of the extremities in patients of pediatric age. J Child Orthop <u>1</u>, 195-203

- Charny C, Glick R, Genega E, Meyers P, Reuter V, La Quaglia M (2000): Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor of the ureter: a case report and review of the literature. J Pediatr Surg <u>35</u>, 1356-1358
- Coindre JM, Terrier P, Bui N, Bonichon F, Collin F, Le Doussal V, Mandard AM, Vilain M-O, Jacquemier J, Duplay H (1996): Prognostic factors in adult patients with locally controlled soft tissue sarcoma. A study of 546 patients from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. J Clin Oncol <u>14</u>, 869-877
- Coindre JM, Terrier P, Guillou L, Le Doussal V, Collin F, Ranchère D, Sastre X, Vilain MO, Bonichon F, N'Guyen Bui B (2001): Predictive value of grade for metastasis development in the main histologic types of adult soft tissue sarcomas: a study of 1240 patients from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. Cancer <u>91</u>, 1914-1926
- Cormier J, Pollock R (2004): Soft tissue sarcomas. CA Cancer J Clin <u>54</u>, 94-109
- Cox O, Simpson D, Stitt A, Gardiner T (2003): Sources of PDGF expression in murine retina and the effect of short-term diabetes. Mol Vis <u>9</u>, 665-672
- Dagher R, Helman L (1999): Rhabdomyosarcoma: an overview. Oncologist <u>4</u>, 34-44
- Davicioni E, Graf Finckenstein F, Shahbazian V, Buckley J, Triche T, Anderson M (2006): Identification of a PAX-FKHR gene expression signature that defines molecular classes and determines the prognosis of alveolar rhabdomyosarcomas. Cancer Res <u>66</u>, 6936-6946

- Davicioni E, Anderson M, Graf Finckenstein F, Lynch J, Qualman S, Shimada H, Schofield D, Buckley J, Meyer W, Sorensen P (2009): Molecular classification of rhabdomyosarcoma—genotypic and phenotypic determinants of diagnosis: a report from the Children's Oncology Group. Am J Pathol <u>174</u>, 550-564
- 19. de Alava E, Pardo J (2001): Ewing tumor: tumor biology and clinical applications. Int J Surg Pathol <u>9</u>, 7-17
- de Alava E, Panizo A, Antonescu C, Huvos A, Pardo-Mindán F, Barr F, Ladanyi M (2000): Association of EWS-FLI1 type 1 fusion with lower proliferative rate in Ewing's sarcoma. Am J Pathol <u>156</u>, 849-855
- De Kok J, Roelofs R, Giesendorf B, Pennings J, Waas E, Feuth T, Swinkels D, Span P (2005): Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. Lab Invest <u>85</u>, 154-159
- Delattre O, Zucman J, Melot T, Garau X, Zucker J, Lenoir G, Ambros P, Sheer D, Turc-Carel C, Triche T (1994): The Ewing family of tumors--a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. N Engl J Med 331, 294-299
- Doleshal M, Magotra A, Choudhury B, Cannon B, Labourier E, Szafranska A (2008): Evaluation and validation of total RNA extraction methods for microRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. J Mol Diagn <u>10</u>, 203-211
- 24. Erkizan H, Kong Y, Merchant M, Schlottmann S, Barber-Rotenberg J, Abaan O, Chou T, Dakshanamurthy S, Brown M, Üren A (2009): A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma. Nat Med <u>15</u>, 750-756

- Ewing J (1972): Diffuse endothelioma of bone. CA Cancer J Clin <u>22</u>, 95-98, erneut gedruckt von dem ursprünglichen Bericht der New York Pathological Society (1921), <u>21</u>, 17-24
- Farragher S, Tanney A, Kennedy R, Paul Harkin D (2008): RNA expression analysis from formalin fixed paraffin embedded tissues. Histochem Cell Biol <u>130</u>, 435-445
- Ferrari A, Dileo P, Casanova M, Bertulli R, Meazza C, Gandola L, Navarria P, Collini P, Gronchi A, Olmi P (2003): Rhabdomyosarcoma in adults. A retrospective analysis of 171 patients treated at a single institution. Cancer <u>98</u>, 571-580
- Fleige S, Pfaffl M (2006): RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. Mol Aspects Med <u>27</u>, 126-139
- 29. Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl M (2006): Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. Biotechnol Lett <u>28</u>, 1601-1613
- Froehner M, Wirth MP (2001): Etiologic factors in soft tissue sarcomas.
 Onkologie <u>24</u>, 139-142
- 31. Ginsberg JP, de Alava E, Ladanyi M, Wexler LH, Kovar H, Paulussen M, Zoubek A, Dockhorn-Dworniczak B, Juergens H, Wunder JS (1999): EWS-FLI1 and EWS-ERG gene fusions are associated with similar clinical phenotypes in Ewing's sarcoma. J Clin Oncol <u>17</u>, 1809-1814
- 32. Ginzinger DG (2002): Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. Exp Hematol <u>30</u>, 503-512
- Groelz D, Sobin L, Branton P, Compton C, Wyrich R, Rainen L (2012): Nonformalin fixative versus formalin-fixed tissue: A comparison of histology and RNA quality. Exp Mol Pathol, im Druck

- Grotzer M A, Patti R, Geoerger B, Eggert A, Chou T T, Phillips P C (2000): Biological Stability of RNA Isolated From RNAlater-Treated Brain Tumor and Neuroblastoma Xenografts. Med Pediatr Oncol <u>34</u>, 438-442
- Gustafson P, Dreinhofer KE, Rydholm A (1994): Soft tissue sarcoma should be treated at a tumor center: A comparison of quality of surgery in 375 patients. Acta Orthop Scand <u>65</u>, 47-50
- Habermann H, Benesch M, Schips L, Pummer K, Ratschek M, Uggowitzer MM, Urban C, Hubmer G (2003): Findings and clinical course of a localized primitive peripheral neuroectodermal tumor of the kidney. Urol Int <u>71</u>, 319-321
- Hajdu SI (1981): Soft tissue sarcomas: classification and natural history. CA Cancer J Clin <u>31</u>, 271-280
- Hayes-Jordan A, Andrassy R (2009): Rhabdomyosarcoma in children. Curr Opin Pediatr <u>21</u>, 373-378
- 39. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996): Real time quantitative PCR. Genome Res <u>6</u>, 986-994
- Heikaus S, Schaefer KL, Eucker J, Hogrebe E, Danebrock R, Wai DH, Krenn V, Gabbert HE, Poremba C (2009): Primary peripheral primitive neuroectodermal tumor/Ewing's tumor of the testis in a 46-year-old man—differential diagnosis and review of the literature. Hum Pathol <u>40</u>, 893-897
- Heslin MJ, Lewis JJ, Nadler E, Newman E, Woodruff JM, Casper ES, Leung D, Brennan MF (1997): Prognostic factors associated with long-term survival for retroperitoneal sarcoma: implications for management. J Clin Oncol <u>15</u>, 2832-2839
- Higuchi R , Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993): Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology <u>11</u>, 1026-1030

- Italiano A, Mathoulin-Pelissier S, Le Cesne A, Terrier P, Bonvalot S, Collin F, Michels JJ, Blay JY, Coindre JM, Bui B (2011): Trends in survival for patients with metastatic soft-tissue sarcoma. Cancer <u>117</u>, 1049-1054
- 44. Jaques DP, Coit DG, Casper ES, Brennan MF (1995): Hepatic metastases from soft-tissue sarcoma. Ann Surg <u>221</u>, 392-397
- 45. Jimenez RE, Folpe AL, Lapham RL, Ro JY, O'Shea PA, Weiss SW, Amin MB (2002): Primary Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor of the kidney: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of 11 cases. Am J Surg Pathol <u>26</u>, 320-327
- Kavalar R, Pohar Marinsek Z, Jereb B, Cagran B, Golouh R (2009): Prognostic value of immunohistochemistry in the Ewing's sarcoma family of tumors. Med Sci Monit <u>15</u>, 442-452
- 47. Kennedy JG, Frelinghuysen P, Hoang BH (2003): Ewing sarcoma: current concepts in diagnosis and treatment. Curr Opin Pediatr <u>15</u>, 53-57
- 48. Kovar H, Jug G, Aryee D, Zoubek A, Ambros P, Gruber B, Windhager R, Gadner H (1997): Among genes involved in the RB dependent cell cycle regulatory cascade, the p16 tumor suppressor gene is frequently lost in the Ewing family of tumors. Oncogene <u>15</u>, 2225-2232
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L (2006): The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med <u>27</u>, 95-125
- Lewis JJ, Brennan MF (1996): Soft tissue sarcomas. Curr Probl Surg <u>33</u>, 820-872
- 51. Lewis TB, Coffin CM, Bernard PS (2007): Differentiating Ewing's sarcoma from other round blue cell tumors using a RT-PCR translocation panel on formalinfixed paraffin-embedded tissues. Mod Pathol <u>20</u>, 397-404

- 52. Li J, Smyth P, Flavin R, Cahill S, Denning K, Aherne S, Guenther SM, O'Leary JJ, Sheils O (2007): Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells. Biotechnol <u>7</u>, 1-6
- 53. Lin PP, Brody RI, Hamelin AC, Bradner JE, Healey JH, Ladanyi M (1999): Differential transactivation by alternative EWS-FLI1 fusion proteins correlates with clinical heterogeneity in Ewing's sarcoma. Cancer Res <u>59</u>, 1428-1432
- Little DJ, Ballo MT, Zagars GK, Pisters PWT, Patel SR, El-Naggar AK, Garden AS, Benjamin RS (2002): Adult rhabdomyosarcoma. Cancer <u>95</u>, 377-388
- 55. Löffler G: Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie, 6. Auflage; Springer Medizin Verlag Heidelberg 2005, 361-364
- 56. Maitra A, Roberts H, Weinberg AG, Geradts J (2001): Aberrant expression of tumor suppressor proteins in the Ewing family of tumors. Arch Pathol Lab Med <u>125</u>, 1207-1212
- 57. Matsumoto Y, Tanaka K, Nakatani F, Matsunobu T, Matsuda S, Iwamoto Y (2001): Downregulation and forced expression of EWS-Fli1 fusion gene results in changes in the expression of G 1 regulatory genes. Br J Cancer <u>84</u>, 768-775
- Matsunobu T, Tanaka K, Matsumoto Y, Nakatani F, Sakimura R, Hanada M, Li X, Oda Y, Naruse I, Hoshino H (2004): The prognostic and therapeutic relevance of p27kip1 in Ewing's family tumors. Clin Cancer Res <u>10</u>, 1003-1012
- Matsunobu T, Tanaka K, Nakamura T, Nakatani F, Sakimura R, Hanada M, Li X, Okada T, Oda Y, Tsuneyoshi M (2006): The possible role of EWS-Fli1 in evasion of senescence in Ewing family tumors. Cancer Res <u>66</u>, 803-811

- May WA, Lessnick SL, Braun BS, Klemsz M, Lewis BC, Lunsford LB, Hromas R, Denny CT (1993): The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. Mol Cell Biol <u>13</u>, 7393-7398
- Mutter G L, Zahieh D, Liu C, Neuberg D, Finkelstein D, Baker H E, Warrington J A (2004): Comparison of frozen and RNALater solid tissue storage methods for use in RNA expression microarrays. Genomics <u>5</u>, 1-7
- Nakatani F, Tanaka K, Sakimura R, Matsumoto Y, Matsunobu T, Li X, Hanada M, Okada T, Iwamoto Y (2003): Identification of p21 WAF1/CIP1 as a direct target of EWS-Fli1 oncogenic fusion protein. J Biol Chem <u>278</u>, 15105-15115
- 63. Newton Jr WA, Gehan EA, Webber BL, Marsden HB, van Unnik AJM, Hamoudi AB, Tsokos MG, Shimada H, Harms D, Schmidt D (1995): Classification of rhabdomyosarcomas and related sarcomas. Pathologic aspects and proposal for a new classification-an intergroup rhabdomyosarcoma study. Cancer <u>76</u>, 1073-1085
- 64. Oda Y, Tsuneyoshi M (2009): Recent advances in the molecular pathology of soft tissue sarcoma: Implications for diagnosis, patient prognosis, and molecular target therapy in the future. Cancer Sci <u>100</u>, 200-208
- Ognjanovic S, Linabery AM, Charbonneau B, Ross JA (2009): Trends in childhood rhabdomyosarcoma incidence and survival in the United States, 1975-2005. Cancer <u>115</u>, 4218-4226
- 66. Oliveira AM, Nascimento AG (2001): Grading in soft tissue tumors: principles and problems. Skeletal Radiol <u>30</u>, 543-559
- 67. Osuna D, de Alava E (2009): Molecular pathology of sarcomas. Rev Recent Clin Trials <u>4</u>, 12-26

- Paulussen M, Ahrens S, Dunst J, Winkelmann W, Exner GU, Kotz R, Amann G, Dockhorn- Dworniczak B, Harms D, Müller- Weihrich S (2001): Localized Ewing tumor of bone: final results of the cooperative Ewing's Sarcoma Study CESS 86. J Clin Oncol <u>19</u>, 1818-1829
- 69. Penland SK, Keku TO, Torrice C, He X, Krishnamurthy J, Hoadley KA, Woosley JT, Thomas NE, Perou CM, Sandler RS (2007): RNA expression analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tumors. Lab Invest <u>87</u>, 383-391
- 70. Pisters PWT, O'Sullivan B (2002): Retroperitoneal sarcomas: combined modality treatment approaches. Curr Opin Oncol <u>14</u>, 400-405
- 71. Promega BioMath Calculators: Molecular weight of single stranded DNA. http://www.promega.com/techserv/tools/biomath/calc11.htm
- Qualman SJ, Coffin CM, Newton WA, Hojo H, Triche TJ, Parham DM, Crist WM (1998). Intergroup Rhabdomyosarcoma Study: update for pathologists. Pediatr Dev Pathol <u>1</u>, 550-561
- 73. Rentoft M, Coates PJ, Laurell G, Nylander K (2012): Transcriptional profiling of formalin fixed paraffin embedded tissue: pitfalls and recommendations for identifying biologically relevant changes. PLoS One <u>7</u>, 1-8
- 74. Riggi N, Stamenkovic I (2007): The Biology of Ewing sarcoma. Cancer Lett <u>254</u>, 1-10
- 75. Riggi N, Cironi L, Provero P, Suvà ML, Kaloulis K, Garcia-Echeverria C, Hoffmann F, Trumpp A, Stamenkovic I (2005): Development of Ewing's Sarcoma from Primary Bone Marrow–Derived Mesenchymal Progenitor Cells. Cancer Res <u>65</u>, 11459-11468
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT (1997): Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Anal Biochem <u>245</u>, 154-160

- 77. Rocchi A, Manara MC, Sciandra M, Zambelli D, Nardi F, Nicoletti G, Garofalo C, Meschini S, Astolfi A, Colombo MP (2010): CD99 inhibits neural differentiation of human Ewing sarcoma cells and thereby contributes to oncogenesis. J Clin Invest <u>120</u>, 668-680
- 78. Sánchez-Navarro I, Gámez-Pozo A, González-Barón M, Pinto-Marín A, Hardisson D, López R, Madero R, Cejas P, Mendiola M, Espinosa E (2010): Comparison of gene expression profiling by reverse transcription quantitative PCR between fresh frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded breast cancer tissues. Biotechniques <u>48</u>, 351-356
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science <u>230</u>, 1350-1354
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science <u>239</u>, 487-491
- 81. Schleiermacher G, Peter M, Oberlin O, Philip T, Rubie H, Mechinaud F, Sommelet-Olive D, Landman-Parker J, Bours D, Michon J (2003): Increased risk of systemic relapses associated with bone marrow micrometastasis and circulating tumor cells in localized ewing tumor. J Clin Oncol <u>21</u>, 85-91
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T (2006): The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. Mol Biol <u>7</u>, 1-14
- Scotlandi K, Baldini N, Cerisano V, Manara MC, Benini S, Serra M, Lollini PL, Nanni P, Nicoletti G, Bernard G (2000): CD99 engagement: an effective therapeutic strategy for Ewing tumors. Cancer Res <u>60</u>, 5134-5142

- 84. Segal NH, Pavlidis P, Antonescu CR, Maki RG, Noble WS, DeSantis D, Woodruff JM, Lewis JJ, Brennan MF, Houghton AN (2003): Classification and subtype prediction of adult soft tissue sarcoma by functional genomics. Am J Pathol <u>163</u>, 691-700
- 85. Sherr CJ (2000): The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. Cancer Res <u>60</u>, 3689-3695
- Silk AW, Schuetze SM (2012): Histology-specific therapy for advanced soft tissue sarcoma and benign connective tissue tumors. Curr Treat Options Oncol <u>13</u>, 285-298
- 87. Smith CJ, Osborn AM (2009): Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. Microbiol Ecol <u>67</u>, 6-20
- Sodowich BI, Fadl I, Burns C (2007): Method validation of in vitro RNA transcript analysis on the Agilent 2100 Bioanalyzer. Electrophoresis <u>28</u>, 2368-2378
- 89. Sorensen PHB, Lynch JC, Qualman SJ, Tirabosco R, Lim JF, Maurer HM, Bridge JA, Crist WM, Triche TJ, Barr FG (2002): PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the children's oncology group. J Clin Oncol <u>20</u>, 2672-2679
- 90. Stegmaier S, Leuschner I, Aakcha-Rudel E, Münch P, Kazanowska B, Bekassy A, Treuner J, Koscielniak E (2004): Identification of various exon combinations of the ews/fli1 translocation: an optimized RT-PCR method for paraffin embedded tissue -- a report by the CWS-study group. Klin Padiatr <u>216</u>, 315-322

- 91. Stewart GD, Baird J, Rae F, Nanda J, Riddick ACP, Harrison DJ (2011): Utilizing mRNA extracted from small, archival formalin-fixed paraffinembedded prostate samples for translational research: assessment of the effect of increasing sample age and storage temperature. Int Urol Nephrol <u>43</u>, 961-967
- 92. Stoeckle E, Coindre JM, Bonvalot S, Kantor G, Terrier P, Bonichon F, Bui BN (2001): Prognostic factors in retroperitoneal sarcoma: a multivariate analysis of a series of 165 patients of the French Cancer Center Federation Sarcoma Group. Cancer <u>92</u>, 359-368
- 93. Tanaka K, Iwakuma T, Harimaya K, Sato H, Iwamoto Y (1997): EWS-Fli1 antisense oligodeoxynucleotide inhibits proliferation of human Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cells. J Clin Invest <u>99</u>, 239-247
- 94. Toomey EC, Schiffman JD, Lessnick SL (2010): Recent advances in the molecular pathogenesis of Ewing's sarcoma. Oncogene <u>29</u>, 4504-4516
- 95. Toub N, Bertrand JR, Tamaddon A, Elhamess H, Hillaireau H, Maksimenko A, Maccario J, Malvy C, Fattal E, Couvreur P (2006): Efficacy of siRNA nanocapsules targeted against the EWS-Fli1 oncogene in Ewing sarcoma. Pharm Res <u>23</u>, 892-900
- 96. Truong A H, Ben-David Y (2000): The role of Fli-1 in normal cell function and malignant transformation. Oncogene <u>19</u>, 6482-6489
- 97. Tschoep K, Kohlmann A, Schlemmer M, Haferlach T, Issels RD (2007): Gene expression profiling in sarcomas. Crit Rev Oncol Hematol <u>63</u>, 111-124
- 98. Viertler C, Groelz D, Gündisch S, Kashofer K, Reischauer B, Riegman PHJ, Winther R, Wyrich R, Becker KF, Oelmüller U (2012): A new technology for stabilization of biomolecules in tissues for combined histological and molecular analyses. J Mol Diagn <u>14</u>, 458-466

- 99. Wardelmann E, Chemnitz JM, Wendtner CM (2012): Targeted therapy of soft tissue sarcomas. Onkologie <u>35</u>, 21-27
- Wei G, Antonescu CR, de Alava E, Leung D, Huvos AG, Meyers PA, Healey JH, Ladanyi M (2000): Prognostic impact of INK4A deletion in Ewing sarcoma. Cancer <u>89</u>, 793-799
- 101. Wilhelm J, Pingoud A (2003): Real-time polymerase chain reaction. Chembiochem <u>4</u>, 1120-1128
- 102. Worch J, Matthay KK, Neuhaus J, Goldsby R, Dubois SG (2010): Ethnic and racial differences in patients with Ewing sarcoma. Cancer <u>116</u>, 983-988
Curriculum vitae

Der Lebenslauf ist in der elektronisch veröffentlichten Version leider nicht enthalten.