

Abteilung für Humanbiologie und Humangenetik  
der Technische Universität Kaiserslautern  
Leiter: Prof. Dr. Dr. H. Zankl

Zytogenetische und molekularbiologische Untersuchungen  
an humanen Leukämien und Meningeomen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrads der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Diplom-Biologe

Taleb Mohammed Ali

Kaiserslautern, 2006

**D386**

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 12.10.2006

Prüfungskommission:

Vorsitz: Prof. Dr. J. A. Cullum

Betreuer: Prof. Dr. Dr. H. Zankl

Korreferent: Prof. Dr. W. Henn

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. H. Zankl, Leiter der Abteilung für Humanbiologie und Humangenetik, sehr herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas und freundschaftliche Betreuung bedanken.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Evelyne Fauth für die außerordentlich freundliche Zusammenarbeit und hilfsbereite Unterstützung bei Korrekturlesen meiner Arbeit.

Bei allen Mitgliedern unsere Abteilung insbesondere Frau Vera Fritzingler und Frau Gaby Seidel bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. W. Henn, Institut für Humangenetik, Homburg/Saar, danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Herrn Dr. Hisham Bassiouni, Oberarzt in der Klinik für Neurochirurgie des Westpfalzkrankenhauses, möchte ich mich für das zur Verfügung gestellte frische Biopsiematerial von Meningeomen und für die klinischen Informationen über die Patienten herzlich bedanken.

Herrn Dr. Hans-Jochen Foth und Herrn Dipl.-Phys. Dirk Hüttenberger danke ich für die gute Zusammenarbeit, insbesondere für die technische Unterstützung am SKY-System.

Herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. Bernhard Thiele und Frau Dipl.-Biol. Anette Wodsack von Institut für Immunologie und Genetik, für die zur Verfügung gestellten von Leukämiezellen bedanken.

Einen herzlichen Dank auch an meine Frau und Freunde, die mich während dieser Arbeit unterstützt haben.

## Inhaltverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung und theoretische Grundlagen.....</b>	<b>1</b>
1.1.	Geschichtliche Entwicklung der zytogenetischen und molekularzytogenetischen Techniken.....	1
1.2.	Meningeome .....	3
1.2.1.	Allgemeines.....	3
1.2.2.	Inzidenz und Epidemiologie .....	4
1.2.3.	Molekularbiologie .....	5
1.2.4.	WHO-Klassifikation der Meningeome.....	6
1.2.5.	Zytogenetische Klassifikation von Meningeomen.....	6
1.3.	Leukämie .....	7
1.3.1.	Zytogenetik der Leukämien .....	7
1.4.	Das Wachstumssuppressorprotein p53: Ein historischer Überblick .....	10
1.4.1.	P53-Gen .....	11
1.4.2.	Wie wirkt das p53-Gen in der gesunden Zelle?.....	11
1.4.3.	Regulation von p53-Funktion und Expressionsspiegel in normalen und transformierten Zellen.....	12
1.5.	Zielsetzung.....	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>16</b>
2.1.	Meningeome .....	16
2.1.1.	Primärzellkultur der Meningeome.....	16
2.1.2.	Mediumwechsel.....	17
2.1.3.	Einfrieren und Auftauen von Tumormaterial .....	17
2.1.4.	Chromosomenpräparation.....	18
2.1.5.	GTG-Bänderungs-Methode:.....	22
2.2.	Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH):.....	24
2.3.	Spectral Karyotyping (SKY): .....	25
2.4.	p53-Sonde .....	36
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>43</b>
3.1.	FISH-Analyse mit der p53-Sonde .....	43
3.2.	SKY-Ergebnisse.....	53
3.2.1.	SKY-Chromosomenanalyse .....	53
3.2.2.	Ergebnisse der SKY-Chromosomenanalysen .....	53
3.3.	Ergebnisse der zytogenetischen und molekularzytogenetischen Untersuchungen an Meningeombiopsiematerial .....	99
3.3.1.	Fall Nr. 1.....	99
3.3.2.	Fall Nr. 2.....	107
3.3.3.	Fall Nr. 3.....	110
3.3.4.	Fall Nr. 4.....	114
3.3.5.	Fall Nr. 6.....	115
3.3.6.	Fall Nr. 7.....	118
3.3.7.	Fall Nr. 8.....	125
3.3.8.	Fall Nr. 9.....	126
3.3.9.	Fall Nr. 11.....	131
3.3.10.	Fall Nr. 12.....	135

3.3.11	Fall Nr. 13	143
3.3.12	Fall Nr. 15	145
3.3.13	Fall Nr. 16	148
3.3.14	Fall Nr. 18	149
3.3.15	Fall Nr. 19	154
3.3.16	Fall Nr. 20	157
3.3.17	Fall Nr. 22	158
3.3.18	Fall Nr. 24	161
3.3.19	Fall Nr. 25	162
3.3.20	Fall Nr. 26	166
3.3.21	Fall Nr. 27	170
3.3.22	Fall Nr. 28	172
3.3.23	Fall Nr. 29	175
3.3.24	Fall Nr. 5	176
3.3.25	Fall Nr. 10	177
3.3.26	Fall Nr. 14	177
3.3.27	Fall Nr. 23	179
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>181</b>
4.1	p53-Gendeletion bei Leukämien	181
4.1.1	Allgemeines zum p53-Tumorsuppressorgen	181
4.1.2	p53-Gendeletion bei lymphatische Leukämien	182
4.1.3	p53-Gendeletion bei myeloische Leukämien	183
4.2	Chromosomenanalyse mittels Spektraler Karyotypisierung (SKY) bei Leukämien	184
4.2.1	SKY-Analyse bei MDS-Patienten	185
4.2.2	SKY-Analyse bei AML-Patienten	186
4.3	Zytogenetik der Meningeome	188
4.3.1	Arealuntersuchungen	189
4.3.2	Karyotyp und Lokalisation des Tumors	197
4.3.3	Verlust des Y-Chromosoms bei Meningeomen	198
4.3.4	Klonale Entwicklung bei Meningeomen	199
4.3.5	Atypische und anaplastische Meningeome	200
4.3.6	Aberrante Chromosomen 7 bei Meningeomen	200
4.3.7	Aktivitätsverlust der alkalische Phosphatase (ALPL) bei Meningeomen	201
4.3.8	Neurofibromatose Typ 2 Gen (NF2) bei Meningeomen	202
4.3.9	Rolle des p53-Gens bei Meningeomen	202
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>206</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>208</b>
<b>7.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>220</b>
<b>8.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>223</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A.dest	Destilliertes oder deionisiertes Wasser (Aqua dest)
Abb.	Abbildung
add	Addition
ALPL	alkalische Phosphatase
AML	Akute myeloische Leukämie
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CA	Chromosomenaberration
CCD	charge-coupled device
CGH	comparative genomic hybridization
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
cm	Zentimeter
CML	chronische myeloische Leukämie
DAL-1	differentially expressed in adenocarcinoma of the lung
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
del	Deletion
der	Derivatchromosom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleisäure
EtOH	Ethanol
FDG	Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

FKS	Foetales Kälberserum
g	Gramm
G	Giemsa
G	Guanin
geb	geboren
GL	Gebrauchslösung
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen Colony stimulation factor
GTG-Banden	Giemsa-Trypsin-Giemsa banding
h	Stunde
i	Isochromosom
I-FISH	Interphase Fluoreszenz in situ Hybridisierung
ins	Insertion
inv	Inversion
k	Kilo
kb	kilobasenpaare
L	Liter
LSI	Locus Specific Identifier DNA Probes
m	männlich
M	Molar
mar	Markerchromosom
Mb	Megabasen
MDS	Myelodysplastische Syndrom
MEM	Minimum Essential Medium
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter

mm	Millimeter
NF2	Neuro fibromatose Typ2
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
OPD	Optical path difference
OT	Objektträger
p	kurzer Arm eines Chromosoms
p53	TP53-Tumorsuppressorgenprodukt
PCR	Polymerase chain reaction
Ph	Philadelphia-Chromosom
pH	Potentia Hydrogenii
PHA	Phytohämagglutinin
q	Langer Arm eines Chromosoms
RGB	Rot/grün/blau
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SKY	Spectral Karyotyping
SSC	Saline-Sodium-Citrat
SSCP	single strand conformation polymorphism
ST	Stammlösung
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
t-AML	therapie-resistente AML
TPA	12-0-tetradecanoylphorbol 13-acetate
Upm	Umdrehungen pro Minute
W	weiblich



WHO	World health organisation (Weltgesundheitsorganisation)
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
%	Prozent
μl	Mikroliter
°C	Grad Celsius
μ	Mikro

## **1. Einleitung und theoretische Grundlagen**

### **1.1. Geschichtliche Entwicklung der zytogenetischen und molekularzytogenetischen Techniken**

**Präparation.** Mit der Untersuchung von Chromosomen wurde vor über 100 Jahren begonnen. Besondere Schwierigkeiten bestanden dabei darin, Säugetierchromosomen in guter Qualität darzustellen. Es wurde erst 1956 von Tjio und Levan über die richtige Anzahl von Human-Chromosomen berichtet (Tjio und Levan, 1956).

In den sechziger Jahren wurde durch die Zugabe von Phytohaemagglutinin zu Blutlymphozytenkulturen die Zellteilung stimuliert. Dadurch wurde die Anzahl der Metaphasen signifikant erhöht (Moorhead et al, 1960; Nowell, 1960). Diese Entdeckung verbesserte die Analyse von humanen Chromosomen wesentlich und führte dazu dass, die Durchführung von diagnostischen Chromosomenanalysen klinische Routine wurde. Nowell und Hungerford haben im Jahre 1960 das Philadelphia Chromosom bei Patienten mit Chronischer Myeloischer Leukämie beschrieben (Nowell und Hungerford, 1960). Mit der Entdeckung des Philadelphia Chromosoms, das mit Chronischer Myeloischer Leukämie (CML) assoziiert ist, wurde das Feld der Tumorzytogenetik eröffnet (Rowley, 1973).

**Färbetechniken.** In den siebziger Jahren des 20 Jahrhunderts gelang die Einführung und erfolgreiche Anwendung verschiedener Färbetechniken, die den Chromosomen ein Bandenmuster verleihen, welches die Genauigkeit der Chromosomenanalyse außerordentlich steigert (Caspersson, 1970; Seabright, 1971). Solche Bänderungsmuster ermöglichen die Analyse der subchromosomalen Regionen. Die hochauflösende Bandenmethode hat auch die Detektion kleinere chromosomale Deletionen und Translokationen möglich gemacht (Yunis, 1976). Bis zur Einführung von molekularzytogenetischen Techniken in den achtziger Jahren war die Chromosomenanalyse auf die chromosomale Bandentechnik angewiesen. Dabei war es häufig schwer zu erkennen, welche Chromosomen in chromosomalen Rearrangements wie z.B. Translokationen involviert waren.

#### **Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)**

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) wurde in den achtziger Jahren des

20. Jahrhunderts entwickelt. Die modernen Zytogenetiktechniken haben die Diagnose chromosomaler Aberrationen verbessert. Als Ergänzung zur klassischen Chromosomenbänderung wird die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) zum Nachweis chromosomaler Veränderungen in der prä- und postnatalen sowie der tumorzytogenetischen Diagnostik eingesetzt. FISH-Sonden eignen sich für die Detektion spezifischer Regionen der DNA. Dadurch können DNA-Abnormalitäten auch auf Genebene nachgewiesen werden. Mittels FISH-Sonden kann eine spezifische Nukleinsäuresequenz sogar in nicht-teilenden Zellen (den Interphasekernen, daher die Bezeichnung „Interphasezytogenetik“) festgestellt werden. Die molekularzytogenetischen Techniken, die sich auf Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) beziehen, sind ein unschätzbares Hilfsmittel bei der Diagnose und Identifizierung zahlreicher chromosomaler Aberrationen, die mit neoplastischen Erkrankungen verbunden sind (McNeil and Ried, 2000).

### **Comparative(Vergleichende) Genomische Hybridisierung (CGH)**

Zum ersten Mal wurde 1992 über die CGH berichtet. Die CGH ist eine molekularzytogenetische Methode, die Gewinne und Verluste wie Amplifikationen, Deletionen und Unterschiede in der Kopienanzahl von Chromosomen im Genom identifizieren kann. Bei der CGH-Methode wird eine Tumor-DNA auf normale Metaphase-Chromosomen hybridisiert (Kallioniemi et al, 1992). Mittels CGH-Methode kann das gesamte Genom in nur einem Hybridisierungsansatz auf Gewinne und Verluste chromosomalen Materials untersucht werden. Mit Hilfe der CGH kann nur eine unbalancierte Chromosomen-Aberrationen nachgewiesen werden. Inversionen und balancierte Translokationen können aber nicht nachgewiesen werden.

Die Methode der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH) verwendet zwei Farben und zeigt so die Verhältnisse der Fluoreszenzintensität zwischen Tumor-DNA und Kontroll-DNA entlang normaler Referenzmetaphasechromosomen an. Dadurch wird die DNA-Kopienanzahl - also Veränderungen wie Gewinne oder Verluste von spezifischen chromosomalen Regionen oder auch Genamplifikationen – detektiert (McNeil et al, 2000).

### **Spektrale Karyotypisierung (SKY)**

Schröck und Mitarbeiter haben 1996 zum ersten Mal die SKY-Technik beschrieben. SKY ist eine Technik, die die konventionelle Chromosomenanalyse

mit der Spezifität von FISH kombiniert. SKY kann insbesondere verwendet werden, um die Zusammensetzung von Markerchromosomen aufzuklären und telomerische Translokationen, die manchmal mit der konventionellen Bänderungsanalyse schwer identifizierbar sind, zu identifizieren. Diese Technik hat bewiesen, dass sie bei der Aufklärung von komplexen Rearrangements vorteilhaft ist (Veldman et al, 1997; Ghadimi et al, 1999; Macville et al, 1999; Rowley, 1999; McNeil und Ried, 2000). Mit SKY können 24 unterschiedliche farbige Chromosomen in humanen Metaphasen kenntlich gemacht werden. Bei der SKY-Technik werden 24 Chromosomen painting Sonden verwendet. Die Sonden sind mit fünf verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die 24-Sonden werden zusammengemischt. Dadurch entsteht eine Mischung, die komplementär zu allen Regionen des humanen Genoms ist. Durch die verschiedenen Kombinationen der fünf verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe zeigen die unterschiedlichen Chromosomen ein spezifisches Spektralbild. Mithilfe eines Interferometers und einer Fouriertransformation werden die unterschiedlichen Lichtspektren gemessen. Dadurch wird die Diskriminierung der für das Auge nicht sichtbaren Variationen des Farbspektrums ermöglicht. Die Signale werden weiterbearbeitet und in so genannte Falschfarben umgewandelt. Die Falschfarben erlauben eine einfachere Unterscheidung der Chromosomen. Dadurch können die Zuordnung der Chromosomen und die Identifizierung von Translokationen relativ einfach vorgenommen werden (Schröck et al, 1996; Garini et al, 1999; McNeil und Ried, 2000).

### **1.2. Meningeome**

#### **1.2.1. Allgemeines**

Meningeome sind meist gutartige und langsam verdrängend wachsende Tumore. Sie gehen von den Häuten (Meningen) des Gehirns oder Rückenmarks aus und bilden nur in sehr seltenen Fällen Metastasen. Tübinger Forscher konnten nachweisen, dass das Meningeom bereits bei prähistorischen Menschen auftrat (Czarnetzki et al, 2003). Meningeome treten bevorzugt bei Frauen auf und kommen bevorzugt im Erwachsenenalter vor. Die Tumorstadiumsrate wird aber nicht vom Geschlecht beeinflusst (Nakamura M. et al, 2005). Meningeome erscheinen vor allem im Bereich der Granulationes arachnoides (Collins et al,

1990; Helseth et al, 1989; Winkler et al, 2004). Aufgrund ihres langsamen Wachstums, entwickeln sich Symptome häufig schleichend und spät. Patienten, können durch folgende Symptome auffällig werden: Hirndruckzeichen (Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen), epileptische Anfälle, Persönlichkeitsveränderungen, Sprach-, Seh-, Gefühls- und Gangstörung, Halbseitenlähmung, bis hin zu Bewußtseinsstörungen. Meningeome sind in der Regel gegenüber dem Hirngewebe glatt abgegrenzte Tumoren. Sie sind raumfordernd und gehen von der Dura aus (Winkler et al, 2004). Das Meningeom ist eines der am besten zytogenetisch untersuchten soliden Tumoren. Die charakteristischste Aberration bei Meningeomen ist der Verlust eines Chromosoms der Gruppe G (Zang und Singer, 1967), das 1972 als Chromosom 22 identifiziert werden konnte (Zankl und Zang, 1972; Mark et al, 1972). Allerdings hat sich dieses Merkmal als nicht relevant für die Prognose gezeigt (Zang, 1982). Rassistische und geographische Unterschiede schlagen sich bei Meningeomen in Umfang und Typ weiterer chromosomaler Abnormalitäten nieder (Mitelman et al, 1980; Al Saadi et al, 1987). Atypische und anaplastische Meningeome weisen üblicherweise multiple genomische Aberrationen auf, die Verlust, Gewinn und Amplifikation von verschiedenen Chromosomen beinhalten (Weber et al, 1997). Die Telomeraktivierung kann ein entscheidender Schritt in die Pathogenese von atypischen oder malignen Meningeomen sein. Der Anstieg der Telomerlänge birgt ein hohes Potential für malignes Verhalten (Chen et al, 2000). Meningeome sind faszinierende Tumoren, da sie verschiedene Hormonrezeptoren, z.B. für Progesteron, Estrogen und Androgen, exprimieren. Die Progesteronrezeptorexpression kommt häufiger bei Frauen als bei Männern vor (Black P et al, 1996).

### **1.2.2. Inzidenz und Epidemiologie**

13 bis 26% aller primären intrakraniellen Tumoren sind Meningeome. Die Inzidenz liegt bei 6/100.000 Einwohner pro Jahr (Presto-Martins, 1989; Simpson, 1957; Winkler, 2004). Die meisten Meningeome gehören nach der WHO-Klassifikation zum Typ I (World Health Organization, 2000). Frauen sind häufiger betroffen als Männer. Das Verhältnis zwischen Frauen und Männern liegt bei 2:1 (Helseth et al, 1989; Kepes, 1982; Rohringer et al, 1989; Winkler, 2004). Bei den spinalen

Meningeomen findet sich dagegen ein Verhältnis von 8:1 (Gautier-Smith 1970; Quest, 1978; Winkler, 2004). Atypische und anaplastische intrakranielle Meningeome sind selten und kommen mit einer Häufigkeit von 15-20 % und 1-2 %, respektive vor. (Perry et al, 1999).

### 1.2.3. Molekularbiologie

Die genetischen Aberrationen, die für Meningeome typisch sind, sind eine Monosomie 22 und eine Mutationen des Neurofibromatose-Typ2-Gens (NF2), das auf Chromosom 22 lokalisiert ist (Winkler PA, 2004). Die Monosomie 22 wurde als erste zytogenetische Auffälligkeit in soliden Tumoren bzw. Meningeomen nachgewiesen. Das NF2-Gen ist oft in Meningeomen mutiert. Dies führt zu einem Defekt im Genprodukt Merlin (Schlegel et al, 2004). Merlin ist das Genprodukt von NF2. Der größte Teil der bösartige Meningeome weist einen Verlust von Merlin auf. Dies steht im Gegensatz zu gutartigen Meningeomen, die nur in seltenen Fällen einen Verlust dieses Genproduktes aufweisen ([www.uniklinik-saarland.de](http://www.uniklinik-saarland.de)). Wenn Merlin in aktivem Zustand ist, kann es die Teilung von Zellen hemmen (Helen Morrison et al, 2001). Das Aktin-Zytoskelett wird mit Zelloberflächenglykoproteinen durch die 4.1 Proteinfamilie verbunden. Zu dieser Familie gehört auch Merlin ([www.uniklinik-saarland.de](http://www.uniklinik-saarland.de)). Zur Familie der 4.1 Proteine gehört auch DAL-1 (differentially expressed in adenocarcinoma of the Lung). Das Gen von DAL-1 ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 18 (18p11.3) lokalisiert. 60% der sporadischen Meningeomen zeigen einen Verlust von DAL-1 (Gutmann, 2000). Die Inaktivierung des NF2 Tumorsuppressorgens stellt eine frühzeitige Abnormalität dar, die vermutlich zur Entstehung des Meningeoms vom Grad I führt (Ruttledge et al, 1994). Allelverlust an weiteren Stellen kann zur Tumorprogression beitragen, die zur Entwicklung von atypischen und anaplastischen Meningeomen führt (Rempel et al, 1993; Simon et al, 1995; Weber et al, 1997; Menon et al, 1997; Leone et al, 1999). In atypischen und anaplastischen Meningeomen kommt häufig ein allelischer Verlust von 1p vor (Ishino et al, 1998). Eine 1p-Deletion in Meningeomen ist mit einem erhöhten Rezidivrisiko und einer Tumorprogression verbunden (Ketter et al, 2001). Die Bedeutung der Progesteronrezeptor-Expression in Meningeomen ist unklar (Schlegel J et al, 1993). Bei atypischen und anaplastischen Meningeomen wird

der Progesteronrezeptor selten exprimiert (Ishino et al, 1998). Der Verlust von Chromosom 1p oder eine fehlende Progesteronrezeptor-Expression sind in benignen Meningeomen prognostisch ungünstig (Carroll et al, 1993). WHO Grad I Meningeome weisen zytogenetisch entweder einen normalen Karyotyp oder eine Monosomie 22 auf. Strukturelle Aberrationen kommen unregelmäßig vor. Der Verlust vom kurzen Arm von Chromosom 1 spielt bei der Tumorprogression eine entscheidende Rolle. Das Alkalische-Phosphatase-Gen, das auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 in der Region 1p36.1-p34 lokalisiert ist, ist ein Kandidat für ein Tumorsuppressor-Gen. Das Alkalische-Phosphatase-Enzym wird bei der Progression des Meningeoms inaktiviert. Das Alkalische-Phosphatase-Gen, das auf dem verbleibenden Chromosom 1 liegt, ist wahrscheinlich mutiert. Deswegen wird das translatierte Enzym inaktiv produziert (Niedermayer et al, 1997a).

### **1.2.4. WHO-Klassifikation der Meningeome**

Anhand der WHO-Gradierung werden die Tumore nach Ihrer Dignität klassifiziert, was sich in Rezidivneigung, invasivem Wachstum und Tendenz zur Ausbildung von Metastasen widerspiegelt. Der WHO-Grad I weist diesbezüglich ein niedriges Risiko auf. Die WHO-Grade II und III weisen dagegen ein erhöhtes Risiko auf. Die Überlebenszeit von Meningeompatienten korreliert mit dem histologischen Differenzierungsgrad (Schlegel et al, 2004). Ergänzend muss gesagt werden, dass die Rezidivrate entscheidend vom Ausmaß der Resektion bei der neurochirurgischen Operation mitbeeinflusst wird (Simpson, 1957)

### **1.2.5. Zytogenetische Klassifikation von Meningeomen**

Die Meningeome werden nach dem zytogenetischen Befund in vier Gruppen (0 bis 3) eingeteilt. In Gruppe 0 kommen nur normale Karyotypen vor. In Gruppe 1 werden Karyotypen eingeordnet, die lediglich eine Monosomie 22 zeigen. Der Gruppe 2 werden hypodiploide Zellen zugeteilt, die zusätzlich zum Verlust von Chromosom 22 noch weiteren Chromosomenverlust aufweisen. In Gruppe 3 werden Karyotypen eingestuft, die eine partielle Monosomie am kurzen Arm von Chromosom 1 zeigen. Zusätzlich zur Monosomie 22 und Deletion von Chromosom 1p weisen die Meningeomzellen in Gruppe 3 jedoch noch weitere chromosomale Aberrationen auf. Anhand der zytogenetischen Klassifikation von Meningeomen

kann eine Vorhersage über die Wahrscheinlichkeit von Rezidiven gemacht werden (Ketter et al, 2001).

### 1.3. Leukämie

Leukämie ist die Bezeichnung für „weißes Blut“. Diese Bezeichnung kommt aus der erhöhten Anzahl von weißen Blutkörperchen im Blut bei manchen Leukämieformen. Leukämie ist ein Begriff für Erkrankungen, die durch bösartige Veränderungen in einer oder mehrerer Arten von weißen Blutkörperchen in den blutbildenden Organen entstehen. Die Leukämiezellen vermehren sich ungehemmt. Sie können die Funktion gesunder Zellen aber nicht ausführen, da sie ihren Reifungsprozess noch nicht abgeschlossen haben ([www.medicineworldwide.de](http://www.medicineworldwide.de)). Nach ihrem Verlauf kann man chronische und akute Leukämien unterscheiden. Die chronische Leukämien werden durch einen schleichenden, symptomlosen Beginn und langsames Fortschreiten charakterisiert. Dagegen werden die akuten Leukämien durch rasche Entwicklung und in der Regel mit schweren Krankheitssymptomen und Fieber charakterisiert. Die Leukämie-Erkrankungen werden auch nach der Art der betroffenen Zellen zusätzlich in myeloische und lymphatische Formen eingeteilt. Es werden folglich die folgenden wesentlichen vier Leukämieformen unterschieden ([www.Krebsinformation.de](http://www.Krebsinformation.de)):

- **Akute Myeloische Leukämie (AML)**, auch: akute nicht Lymphatische Leukämie (ANLL)
- **Chronische Myeloische Leukämie (CML)**
- **Akute Lymphatische Leukämie (ALL)**
- **Chronische Lymphatische Leukämie (CLL)**

In Deutschland erkranken jährlich etwa 650 Kinder unter 15 Jahren an Leukämie. Davon entfallen 98% auf die akuten Leukämien (83% ALL, 15% AML) und nur 2% auf die chronisch-myeloischen Leukämien (Bender-Götze et al, 2003).

#### 1.3.1. Zytogenetik der Leukämien

##### **Akute myeloische Leukämie (AML)**

Die akuten myeloischen Leukämien (AML) sind eine Gruppe von



verschiedenartigen Erkrankungen. Anhand des Karyotyps wird die AML zur Zeit meist in drei prognostische Gruppen unterteilt (siehe Tabelle 1) (Schoch, 2004).

Die FAB-(French-American-British)-Klassifikation teilt die AML im Hinblick auf Zytomorphologie und Zytochemie in verschiedene Subgruppen ein (AML-M0, AML-M1, AML-M2, AML-M3, AML-M3v, AML-M4, AML-M4Eo, AML-M5a und AML-M5b, AML-M6, AML-M7).

<b>Günstig</b>	t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q12), inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)
<b>Intermediär</b>	Normaler Karyotyp, andere Chromosomenaberrationen
<b>Ungünstig</b>	-5/5q-, -7/7q-, 17p, 11q23 Anomalien, komplex aberranter Karyotyp

**Tabelle 1:** Die Tabelle zeigt die prognostischen Gruppen anhand des Karyotyps bei AML

### **Chronische myeloische Leukämie (CML)**

90% der chronisch-myeloischen Leukämiepatienten weisen ein Philadelphia-Chromosom (Ph) auf. Teile des Gens BCR (lokalisiert auf Chromosom 22) und des Gens ABL (lokalisiert auf Chromosom 9) bilden eine Translokation t(9;22). Dadurch werden sie umgelagert und auf den Chromosomen 9 und 22 fusioniert (Daley et al, 1990; Heinz, 2004). Die Inzidenz bei CML liegt bei 1/100.000 Einwohnern. Der Altersgipfel liegt im mittleren Lebensalter (5. bis 6. Lebensdekade) (Peschel et al, 2003).

### **Akute Lymphatische Leukämie (ALL)**

Ca. 70% der erwachsenen Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) besitzen klonale Chromosomenaberrationen. Die Häufigkeit von chromosomalen Aberrationen, die bei erwachsenen Patienten mit ALL vorkommen, werden in der Tabelle 2 angezeigt (Rieder, [www.knm1.ibe.med.uni-muenchen.de](http://www.knm1.ibe.med.uni-muenchen.de)).

Die ALL ist eine seltene neoplastische Krankheit. Ca. 1/100.000 Einwohner pro Jahr erkranken an ALL. Durchschnittsalter der erwachsenen Patienten liegt zwischen 30 und 40 Jahren, sie tritt aber in jedem Alter auf (Lipp et al, 2003).

<b>Chromosomenbefund</b>	<b>Häufigkeit</b>
klonal	68-85%
normal-diploid	15-33%
<b>Ploidiegruppen</b>	
- hypodiploid	4-8%
- niedrig hyperdiploid (47-50)	7-15%
- hoch hyperdiploid (51-68)	7-8%
- nahezu tri-/tetraploid	3-5%
<b>Strukturaberrationen</b>	
- t(9;22)(q34;q11)	11-29%
- t(4;11)(q21;q23)	3-7%
- t(8 ;14)(q24 ;q32)	2-5%
- t(1 ;19)(q23 ;p13)	1-3%
- t(10 ;14)(q24 ;q11)	1-3%
- dic(9 ;20)(p11 ;q11)	1%
- 9p-Aberrationen	5-15%
- 6q-Aberrationen	3-6%
- 12p-Aberrationen	2-5%

**Tabelle 2:** Die Tabelle zeigt die Häufigkeit chromosomaler Aberrationen bei der ALL Erwachsener

### Chronische Lymphatische Leukämie (CLL)

Unter chronisch-lymphatischer Leukämie versteht man das Vorliegen eines leukämischen Non-Hodgkin-Lymphoms der B-Zellreihe. Es erkranken jährlich 3/100.000 Einwohner an CLL. In den westlichen Ländern kommt die CLL als häufigste Leukämie des Erwachsenenalters vor. Durchschnittsalter der CLL-Patienten liegt zwischen 65 und 70 Jahren. Bei mehr als 80% der CLL-Patienten wurden chromosomale Aberrationen nachgewiesen. Die häufigste Aberration ist die Deletion von Chromosom 13q (siehe Tabelle 3) (Hallek et al, 2002).

Chromosomenaberration	Häufigkeit (%)
13q-Deletion	55
11q-Deletion	18
Trisomie 12	16
17-Deletion	7
6q-Deletion	6
Trisomie 8	5
Trisomie 3	3

**Tabelle 3:** Die Tabelle zeigt die häufigsten Chromosomenaberrationen bei der CLL

#### 1.4 Das Wachstumssuppressorprotein p53: Ein historischer Überblick

Zuerst (1979) wurde P53-Protein im Komplex mit einem viralen Tumorantigen des Affenvirus SV40 gefunden. Damals nahm man an, dass es ein virales Protein sei. Später wurde geklärt, dass das P53-Protein kein virales Protein ist. Dann erhielt es den Namen NVT (nicht-Virales Tumorantigen). Anfang der 80er Jahre wurde das p53-Gen auf Chromosom 17p13.1 lokalisiert. Das p53-Gen wird als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (Götz und Montenarh, 1998).

### 1.4.1 P53-Gen

Das p53-Gen wurde nach dem Molekulargewicht seines Proteinprodukts bezeichnet. Beim Menschen ist das p53-Gen vermutlich das wichtigste Gen, das mit Krebserkrankungen assoziiert ist. Das p53-Gen ist ein Tumorsuppressorgen, das ungefähr bei der Hälfte aller Krebserkrankungen des Menschen mutiert ist. Das p53-Protein beteiligt sich an folgenden drei grundsätzlichen Mechanismen: (1) an der Zellzykluskontrolle, (2) an der Apoptose und (3) an der Erhaltung der genetischen Stabilität. Man findet in den meisten Körperzellen unter normalen Verhältnissen sehr wenig p53-Protein. Wenn p53 inaktiv ist, können die folgenden Gefahren auftreten: Fehlerhafte oder mutierte Zellen können den Zellzyklus durchlaufen, die Zellen werden der Apoptose entkommen und das Genom wird instabil. Durch diese Faktoren kommt es zu einer Kumulation krebsfördernder Mutationen in den Zellen (Alberts et al, 2004).

### 1.4.2 Wie wirkt das p53-Gen in der gesunden Zelle?

Vor ungefähr 20 Jahren konnte man sich noch nicht vorstellen, wie Krebszellen entstehen. Heute weiß man, dass bei der Krebsentstehung viele Mutationen an ganz bestimmten Genen eine Rolle spielen. Der Wächter des Genoms p53 kann in der normalen Zelle die Weitergabe eines DNA-Schadens bei der Zellteilung an die Tochterzellen verhindern. Normalerweise befinden sich im Zellkern nur wenige p53 Moleküle. Wenn das Genom aber geschädigt wird, wird p53 aktiv und alarmiert weitere Moleküle. Nach der Zellschädigung wird die Zellteilung gestoppt. Dann leitet p53 zelluläre Reparaturmechanismen ein, um die Schäden zu beseitigen. Danach darf sich die Zelle weiter teilen. Wenn die Reparatur nicht möglich ist, leitet p53 den zellulären Selbstmord (die Apoptose) ein. Man weiß schon seit 1990, dass der zelluläre Wächter p53 in ungefähr 60% aller menschlichen Tumoren verloren gegangen ist. Dies geschieht, wenn das p53-Gen selbst mutiert ist. Danach wird das p53-Protein verändert und kann nicht mehr wie gewöhnlich an die DNA binden, um die Zellvermehrung zu stoppen (Deppert W, 1997). Die Entstehung von Tumoren ist ein vielstufiger Prozess, der je nach Genmutation in zwei Klassen eingeteilt werden kann: Zum einen können Onkogene aktiviert, zum anderen Tumorsuppressorgene inaktiviert werden (Albrecht et al, 1999). Die Tumorsuppressorfunktionen von p53 werden durch

Mutationen im p53-Gen inaktiviert. Etwa 90% der Mutationen im p53-Gen sind Punktmutationen, die zu mutierten p53-Protein führen. Die Selektion von solche Mutationen und die starke Überexpression von mutierten p53-Genen fördert die Hypothese, dass ein mutiertes p53 nicht nur ein inaktivierter Tumorsuppressor ist, sondern auch Onkogenfunktionen haben kann, die bei der Tumorentstehung eine wichtige Rolle spielen können (Deppert, 1996; Will et al, 1998).

### **1.4.3 Regulation von p53-Funktion und Expressionsspiegel in normalen und transformierten Zellen**

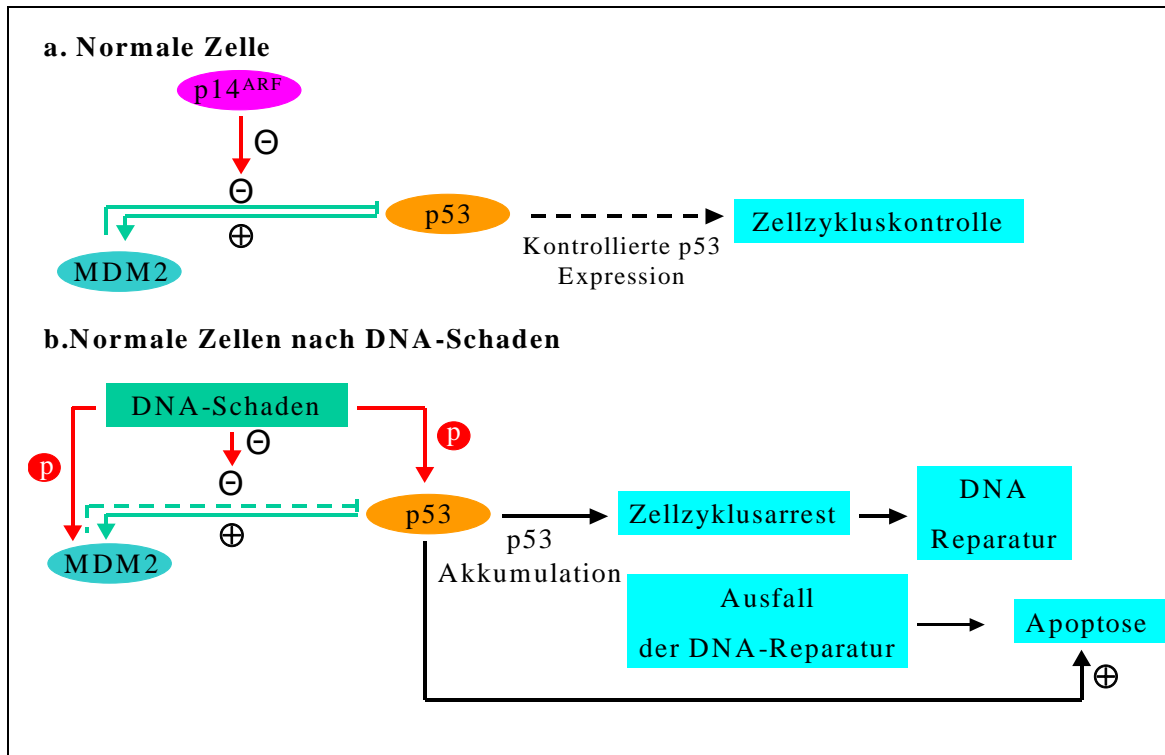
Normale Körperzellen weisen eine feine Regulation des Zellzyklus auf. An der Regulation sind mehrere verschiedene Proteine beteiligt. Eines dieser Proteine ist p53, das den Zellzyklusarrest und die Apoptose einleiten kann. Unter normalen Umständen liegt p53 nur in sehr niedriger Konzentration vor, wogegen das MDM2-Protein in hoher Konzentration vorliegt. Das MDM2-Protein vermittelt den proteosomalen Abbau von p53 und hemmt seine Funktion als transkriptionaler Aktivator. MDM2 wird von p53 hochreguliert. Dadurch wird ein negativer autoregulatorischer Kreislauf gebildet. Außerdem wird p53 von p14<sup>ARF</sup> stabilisiert. Durch das Zusammenspiel von MDM2 und p14<sup>ARF</sup> wird der p53-Spiegel in stabilem Zustand gehalten.

Nach DNA-Schäden oder durch andere Stresssignale muss die Zelle ihren Zellzyklus anhalten, um eine DNA-Reparatur auszuführen. DNA-Schäden veranlassen die Phosphorylierung von MDM2, was die Hemmung der p53-Funktion unterdrückt. Ähnlich veranlassen Stresssignale die Phosphorylierung von p53. Die Phosphorylierung schützt das p53 vor Degradierung und deshalb wird p53 akkumuliert. Infolge des erhöhten p53-Levels werden die Zellen nicht in den Zellzyklus eintreten, bis der DNA-Schaden repariert worden ist. Wenn die Reparatur versagt, löst p53 schließlich die Apoptose aus (siehe Abb. 1) (Theobald et al, 2003).

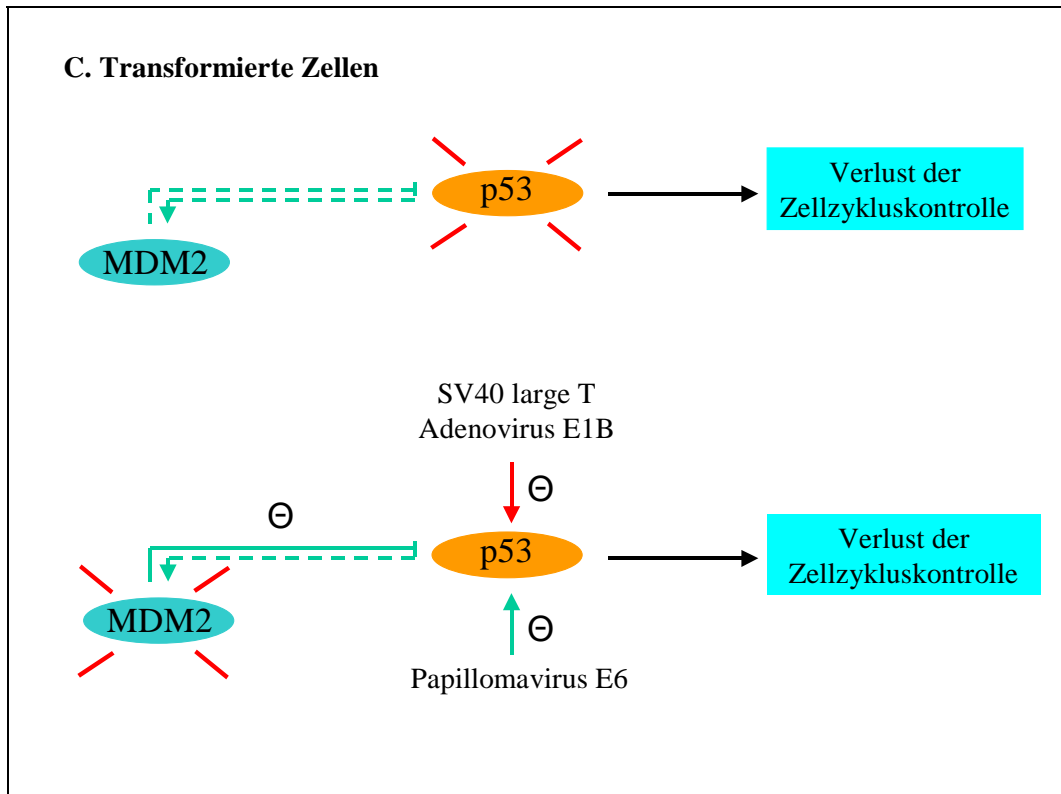
In den transformierten Zellen hat jede abnorme Regulierung der p53-Funktion einen schwerwiegenden Effekt durch den Verlust der Zellzykluskontrolle. So kann z.B. ein mutiertes p53-Gen nicht mehr den Zellzyklus und die Apoptose einleiten. Weitere Mutationen in p53 können die Bindung von p53 an MDM2 verhindern. Dadurch kann p53 nicht mehr von MDM2 degradiert werden. Tumoren weisen

häufig eine Überexpression von MDM2 auf, was den p53-Level konstitutiv unterdrückt. Deswegen werden der Zellzyklusarrest und die Apoptose verhindert. Expression von p14<sup>ARF</sup> ist in Tumorzellen häufig nicht nachweisbar. Dadurch wird der p53-Level konstitutiv durch MDM2 unterdrückt. Darüber hinaus können die viralen Onkoproteine SV40 Large T-Antigen und Adenovirus E1B durch Binden an p53 und/ oder durch Erhöhung der Phosphorylierung von p53 die regulatorische Funktion vom Wildtyp p53 inaktivieren. Als Folge induzieren die transformierten Zellen schnell eine hohe Konzentration an p53-Protein, das aber nicht funktionsfähig ist.

Das humane Papillomavirus E6 Onkoprotein kann p53 durch eine sehr starke Erhöhung der Degradation von p53-Protein inaktivieren, so ähnlich wie bei MDM2 (siehe Abb. 2) (Theobald et al, 2003).



**Abb. 1:** Regulation der p53 Funktionen bei normalen Zellen (modifiziert nach Theobald et al, 2003)



**Abb. 2:** Regulation der p53 Funktionen bei transformierten Zellen (modifiziert nach Theobald et al, 2003).

## 1.5 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte **Knochenmarksmaterial von Leukämiepatienten** mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) auf eine Deletion im p53-Gen untersucht werden, um einen Überblick über die Häufigkeit von p53-Gen-Deletionen bei Leukämien zu erhalten. Untersucht wurden sowohl Interphasezellkerne als auch Metaphasen. Die FISH wurde mit einer **p53-Sonde** der Firma Vysis durchgeführt.

Zusätzlich wurden Knochenmarkszellen auch mittels **Spectral Karyotyping (SKY)** untersucht. Die relativ neue SKY-Technik wird ergänzend zur klassischen Karyotypisierung eingesetzt. Dabei kann das Material aller Chromosomen eines Karyotyps simultan unter Anwendung einer speziellen Art von Fluoreszenz in situ Hybridisierungstechnik (FISH) untersucht werden, da jedes Chromosom eine charakteristische Anfärbung erhält. Vorteil der SKY ist, dass auch komplex aberrante Karyotypen untersucht sowie Marker-Chromosomen identifiziert werden können. Diese Möglichkeiten spielen in der Tumorzytogenetik eine besonders wichtige Rolle.

Ein weiterer Abschnitt dieser Arbeit befasst sich mit zytogenetischen und molekularzytogenetischen Untersuchungen mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) und Spectral Karyotypisierung (SKY) an **Meningeomen**. Ziel dabei ist die Identifizierung von numerischen und strukturellen Chromosomenaberrationen, insbesondere die Erfassung klonaler Unterschiede in verschiedenen Arealen eines Tumors. Darüber hinaus werden einige Meningeome mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) auch auf eine Deletion im p53-Gen untersucht.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Meningeome

Für die vorliegende Arbeit wurden 164 Proben frischen Biopsiematerials aus 29 Meningeomen, die prospektiv in den Jahren 2003 bis 2005 in der Klinik für Neurochirurgie des Westpfalz-Klinikums operiert wurden, ausgewertet. Es handelt sich um 19 weibliche und 10 männliche Patienten. Das Geschlechterverhältnis war somit 1,9:1. Das Alter der Patienten lag zwischen 33 und 83 Jahren, das Durchschnittsalter der weiblichen und der männlichen Patienten betrug jeweils 61,6 bzw. 64 Jahren.

#### 2.1.1 Primärzellkultur der Meningeome

Die Gewebeentnahme unmittelbar nach der Operation erfolgte noch im Operationssaal unter sterilen Bedingungen. Es wurden Tumorproben von verschiedenen Arealen des Tumors für die zytogenetischen und pathologischen Untersuchungen entnommen. Alle für die Zellkultur vorgesehenen Gewebeproben wurden sofort in isotonische NaCl-Lösung überführt werden, um die Vitalität der Zellen zu erhalten. Das Material wurde in einem sterilen 50 ml Falconröhrchen mit 10 bis 15 ml isotonischer NaCl-Lösung zum Labor transportiert. Während des Transports und der Vorbereitung des Arbeitsplatzes bis zum Beginn der Präparation wurden die Proben bei Raumtemperatur gelagert. Alle bei der Präparation verwendeten Lösungen und Materialien waren steril. Das verwendete Nährmedium (EARLE'S MEM 1x) wurde vor Anwendung auf 37°C erwärmt. EARLE'S Minimum Essential Medium wurde mit 10% foetalem Kälberserum (FKS) (v/v) und 1% Penicillin-Streptomycin-Gemisch (v/v) ergänzt.

Das Penicillin-Streptomycin-Gemisch soll eine Besiedlung der Kultur mit Bakterien und Pilzen verhindern. Das Nährmedium enthält als Grundlage unter anderem Zucker, Salze, Spurenelemente, Vitamine und fetales Kälber Serum, welches wichtige Wachstumsfaktoren beinhaltet.

Proteine, die als Signale von einer Zelle auf eine zweite übertragen werden, werden als Wachstumsfaktoren bezeichnet. Wachstumsfaktoren sind in folgende sechs große Familien unterteilt: FGF-Familie (Fibroblast growth factor), TGF-Familie (Transforming growth factor), hedgehog, Wingless, Delta und Serrate , Ephrine ( [www.de.wikipedia.org](http://www.de.wikipedia.org)).

Voraussetzung für das Anlegen einer Primärkultur ist das Lösen der Zellen aus ihrem Zellverband. Die Dissoziation der Zellen wurde auf mechanischem Wege erzielt.

Zu Beginn der Präparation erfolgte das Waschen der Gewebeprobe mit Nährmedium, um vor allem vorhandenes Blut gründlich zu entfernen. Das Gewebe wurde in eine sterile Petrischale mit ca. 2ml Nährmedium gegeben und dort sorgfältig mit einem Skalpell in möglichst kleine Teile zerlegt. Die dadurch erhaltenen Gewebestücke sollten möglichst eine Größe von 1 bis 2 mm<sup>3</sup> haben, da dies die Wachstumschance wesentlich erhöht. Die Gewebestücke wurden mit Nährmedium mittels Pipette resuspendiert. Von der auf diese Weise erhaltenen Zellsuspension wurden 2ml in eine Kulturflasche (25 cm<sup>2</sup>, Firma Sarstedt) mittels einer Pipette überführt und die Zellsuspension auf dem Boden der Kulturflasche gleichmäßig verteilt und im Brutschrank bei 37°C und bei einer CO<sub>2</sub>-Atmosphäre von 5% (v/v) und mindestens 90% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Von jedem Areal wurde eine Zellkultur angesetzt. Bei den verwendeten Kulturflaschen sowie Petrischalen handelte es sich um steril verpackte Einmalartikel. Alle Arbeiten fanden unter Sterilbankbedingungen bei laminarem Luftstrom statt.

Die Kulturflaschen wurden 24 Stunden nach dem Einsetzen unter dem Umkehrmikroskop bezüglich Zellwachstum beobachtet und jeweils weitere 3ml auf 37°C erwärmtes Nährmedium zugegeben und weiter im Brutschrank inkubiert.

### **2.1.2 Mediumwechsel**

Die Zellen wurden bis zum Erreichen der gewünschten Konfluenz (ca. 70%) weiterkultiviert, wobei die Kultivierung durchschnittlich 4 bis 8 Tage dauerte.

Nachdem die Zellen zunächst unter dem Umkehrmikroskop bezüglich Konfluenz begutachtet worden waren, wurde das Medium nach vorsichtigem Schwenken der Kulturflasche abpipettiert und durch frisches, auf 37°C erwärmtes Medium ersetzt. Dies dient zur Stimulation des Zellwachstums. Dadurch wurde die Ausbeute an Metaphasen zum Zeitpunkt des Aberntens erhöht.

### **2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Tumormaterial**

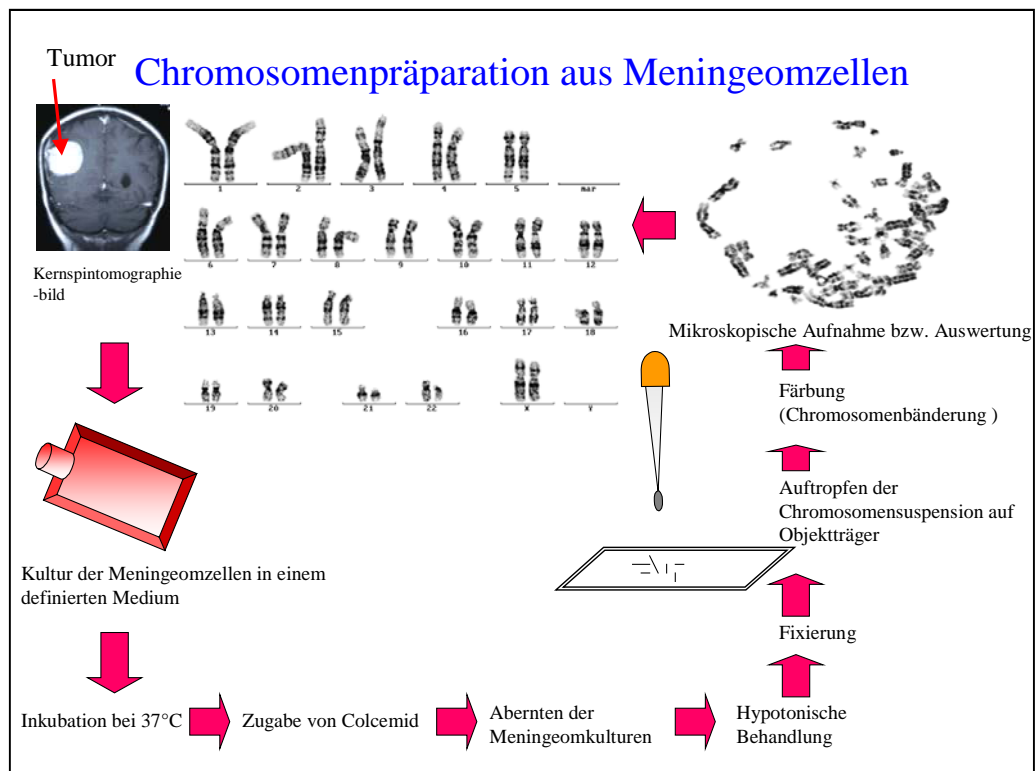
Das einzufrierende Tumormaterial wurde in kleinen Stücken gesammelt und in nicht erwärmtem (RT) Kulturmedium mit 10% DMSO aufgenommen. Jeweils 1ml wurde in ein Einfrierröhrchen (Cryovial-Röhrchen 2ml, Firma ROTH) überführt. Die

einzufrierenden Einfrierröhrchen wurden schrittweise abgekühlt, 1h im Kühlschrank (4°C), 3 bis 4 Stunden bei -20°C, über Nacht bei -70°C und zum Schluss in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert.

Für einige Proben wurde die Anzuchtung der Zellen mehrfach wiederholt. Die Einfrierröhrchen wurden aus dem flüssigen Stickstoff genommen und in einem auf 37°C erwärmten Wasserbad aufgetaut. Sofort wurden die Gewebestücke in eine sterile Petrischale mit ca. 3ml auf 37°C erwärmtes Kulturmedium gegeben. Danach erfolgte das Waschen der Gewebeprobe mit Nährmedium, um DMSO zu entfernen. Dann wurde die Anzuchtung der Zellen wie im Abschnitt 2.1.1 durchgeführt.

### **2.1.4 Chromosomenpräparation**

Für die zytogenetischen und molekularzytogenetischen Untersuchungen aus Meningeomtumoren wurden Metaphasepräparate benötigt, deren Herstellung im Folgenden beschrieben und in Abb. 3 schematisch dargestellt ist. Die Meningeomzellen wurden nach der Kultivierung zur Chromosomenpräparation verwendet, indem die Zellsuspension zunächst in eine hypotone Lösung überführt wurde. Dann wurden die Zellen nach dem Fixieren auf einen Objektträger aufgetropft, getrocknet und gefärbt.



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der Chromosomenpräparation aus Meningeomzellen

### Herstellung von Metaphasenpräparaten

Reagenzien:

EARLE'S MEM (PAA) mit folgenden Zusätzen:

1% Penicillin/Streptomycin

10% FKS

Colcemid 10 µg/ml (SERVA)

0,075 M KCl (Merck)

Fixans-Lösung: Methanol/Eisessig, 3:1, Vol:Vol

### Abernten der Meningeomkulturen:

Einen Tag vor dem geplanten Aberntetermin wurde das Medium durch frisches, auf 37°C erwärmtes Medium ersetzt.

Colcemid Behandlung:

- 2 bis 4 Stunden vor Abernten wurde 0,2ml Colcemidlösung zugegeben und weiter im Brutschrank inkubiert.
- Medium aus Kulturflasche in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (Firma Sarstedt)

überführen.

Trypsin-Behandlung:

- 5 ml auf 37°C vorgewärmte Trypsin-EDTA-Lösung (1 Teil 0,25%iges Trypsin + 4 Teile 0,02%ige EDTA-Lösung) 1 bis 2 min auf Zellrasen einwirken lassen, im Umkehrmikroskop kontrollieren, Kulturflasche gegen Handballen klopfen.
- Trypsin-EDTA-Lösung in Zentrifugenröhrchen überführen.
- Mit 4ml frischem Medium Zellrasen spülen und diese 4 ml Medium auch in Zentrifugenröhrchen überführen. Nach der Inkubation mit Trypsin wurde die proteolytische Aktivität mittels Nährmedium geblockt, um eine mögliche Zellschädigung zu vermeiden.
- 4ml frisches Medium in die Kulturflasche pipettieren und weiter im Brutschrank inkubieren.
- Die Zentrifugenröhrchen wurden austariert und 10 min bei 1200U/min. zentrifugiert.

Hypotonie-Behandlung:

- Überstand wurde bis ca. 0,5 cm Überstand abpipettiert und auf 5ml mit auf 37°C vorgewärmte 0,075 M KCl aufgefüllt.
- Nach gründlicher Suspendierung wurden die Zentrifugenröhrchen im Wasserbad bei 37°C für 6 min inkubiert.
- Die Zentrifugenröhrchen wurden 10 min bei 1200 U/min. zentrifugiert.
- Überstand wurde bis ca. 0,5 cm Überstand abpipettiert.

Fixierung:

- Unter Schräghalten des Zentrifugenröhrchens wurde tropfenweise kalte, frisch hergestellte Fixierlösung (Methanol/Eisessig 3:1) zugegeben und resuspendiert.
- Mindestens 30 min wurde im Kuhlsschrank (4°C) fixiert.
- Die Zentrifugenröhrchen wurden 10 min bei 1200 U/min. zentrifugiert.
- Überstand wurde bis ca. 0,5 cm Überstand abpipettiert.
- Die Zentrifugenröhrchen wurden mit Fixans-Lösung auf 5 ml aufgefüllt und

resuspendiert.

- Die Zentrifugenröhrchen wurden 10 min bei 1200 U/min. zentrifugiert.
- Überstand wurde bis ca. 0,5 cm Überstand abpipettiert.
- Bis ca. 1ml wurde das Pellet mit Fixans-Lösung aufgenommen und resuspendiert.
- Bis zum Auftropfen wurden die Proben im Kühlschrank gelagert.

### **Präparation:**

#### **a. Heizplattenverfahren**

Für die GTG-Bänderungs-Methode wurden die Objektträgern auf der Heizplatte bei 55°C getrocknet.

- Sauberen, fettfreien Objektträger in A.dest. (RT) einstellen
- Direkt vor dem Auftropfen einen Objektträger herausnehmen und kurz senkrecht stellen, bis nur noch ein dünner Flüssigkeitsfilm den Objektträger bedeckt, dann aus ca. 30 cm Höhe 2-3 Zellsuspensionstropfen nebeneinander auftropfen
- Objektträger (OT) kurz senkrecht stellen, bis nur noch ein dünner Flüssigkeitsfilm den OT bedeckt, dann kurz auf der Heizplatte bei 55°C trocknen.
- OT im Umkehrmikroskop kontrollieren und entscheiden, ob die Zellsuspension verdünnt werden muss und die Qualität der Metaphasen kontrollieren. Die Metaphasen waren von guter Qualität, wenn sie ausreichenden Abstand voneinander hatten und die Chromosomen homogen dunkel und frei von Zytoplasmaresten vorlagen und nicht glänzten. Dies war die notwendige Voraussetzung für die Fortsetzung der Bearbeitung der Präparate.

#### **b. Wasserdampfverfahren**

Die Metaphasenpräparation wurde über Wasserdampf durchgeführt, da dadurch bessere Präparatequalität erreicht werden konnte, die für die FISH-Methode besser geeignet ist.

- Wasserbad bis 80°C erhitzen; zwei Metallstäbe als Träger für die Objektträger quer über das Wasserbad legen

- Direkt vor dem Auftropfen einen Objektträger herausnehmen und kurz senkrecht stellen, bis nur noch ein dünner Flüssigkeitsfilm den Objektträger bedeckt dann aus ca. 30 cm Höhe 2-3 Zellsuspensionstropfen nebeneinander auftropfen
- OT sofort für 2 min auf die Träger über dem Wasserbad legen
- Die Rückseite der OT abwischen und kurz auf der Heizplatte (55°C) trocknen
- OT im Umkehrmikroskop nach Metaphasen durchsuchen.

### **2.1.5 GTG-Bänderungs-Methode:**

GTG-Bänderung (Giemsa-Trypsin-Giemsa-Bänderung) ist eine Methode zur detaillierten Darstellung von Chromosomen. Durch die Behandlung der Chromosomen mit Trypsin werden einige Proteine abgebaut, die an die Chromosomen binden. Anschließend werden die Chromosomen mit Giemsa gefärbt. Der Farbstoff lagert sich in den Chromosomen unterschiedlich an, sodass man die Chromosomen nach einem hell-dunkel Bandenmuster unterscheiden kann. Die Banden sind Erkennungsmerkmale von Chromosomen. AT-reiche Bereiche färben sich stärker an als GC-reiche. Das Bandenmuster ist für jedes Chromosom spezifisch. Daher können die einzelnen Chromosomen individuell identifiziert werden. Die Anzahl der Chromosomen einer Zelle und strukturelle Veränderungen wie z.B. Inversionen, Translokationen und Deletionen werden mit Hilfe der GTG-Banden-Methode charakterisiert. Diese Bänderungsmethode wird standardmäßig zur Karyotypisierung, insbesondere von humanen Chromosomensätzen eingesetzt (Seabright, 1971).

### **Material:**

- 2 Küvetten mit isotonischer NaCl-Lösung (0,9%)
- Trypsinlösung: Küvette mit 70 ml isotonischer NaCl-Lösung und 0,5 ml Bactotrypsin, auf 37°C vorwärmen.
- 1 Küvette mit Giemsa-Lösung
- 1 Küvette mit A. dest.

**Reagenzien:**

**Giemsa-Lösung:**

- 7 ml Giemsa und 30 ml Sörensen-Puffer (pH6,8), auf 100 ml mit A. dest auffüllen.

Sörensen-Puffer (pH6,8):

- 100 ml Stammlösung A (4°C) + 100 ml Stammlösung B (4°C) + 800 ml A. dest.

Stammlösung A (4°C):

- 45,36g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1000 ml Aqua dest.

Stammlösung B (4°C):

- 59,33g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O in 1000 ml A.dest. oder 119,38g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 1000 ml A. dest.

**Durchführung:**

Am Tag der Präparation werden die Präparate über Nacht bei 55°C auf die Heizplatte zur Alterung gelegt. Der Alterungsprozess ist sehr wichtig, um eine gute Bänderung der Chromosomen zu erhalten. Dann wird die Trypsinierungszeit bestimmt. Die Trypsinierungszeiten variierten von Fall zu Fall. Sie betragen erfahrungsgemäß bei Präparaten aus Meningeomzellen zwischen 41s und 44s.

- OT 41s bis 44s in auf 37°C erwärmte Trypsinlösung schwenken.

- OT 2x in isotonischer NaCl (RT) schwenken.

- OT in Giemsa-Lösung 9 min färben.

- OT kurz in A. dest schwenken.

- Bänder im Lichtmikroskop beurteilen.

Nach Feststellung der bestmöglichen Trypsinierungszeit diese Trypsinierungszeit auf alle weiteren Objektträger des gleichen Probanden anwenden.

**Metaphasenauswertung:**

Die giemsagebänderten Präparate wurden im Hellfeldlichtmikroskop ausgewertet. Für jedes Areal wurden die numerischen und strukturellen Aberrationen erfasst. Die Bestimmung der einzelnen Aberrationstypen erfolgte nach der ISCN-Nomenklatur (Mitelman 1995).

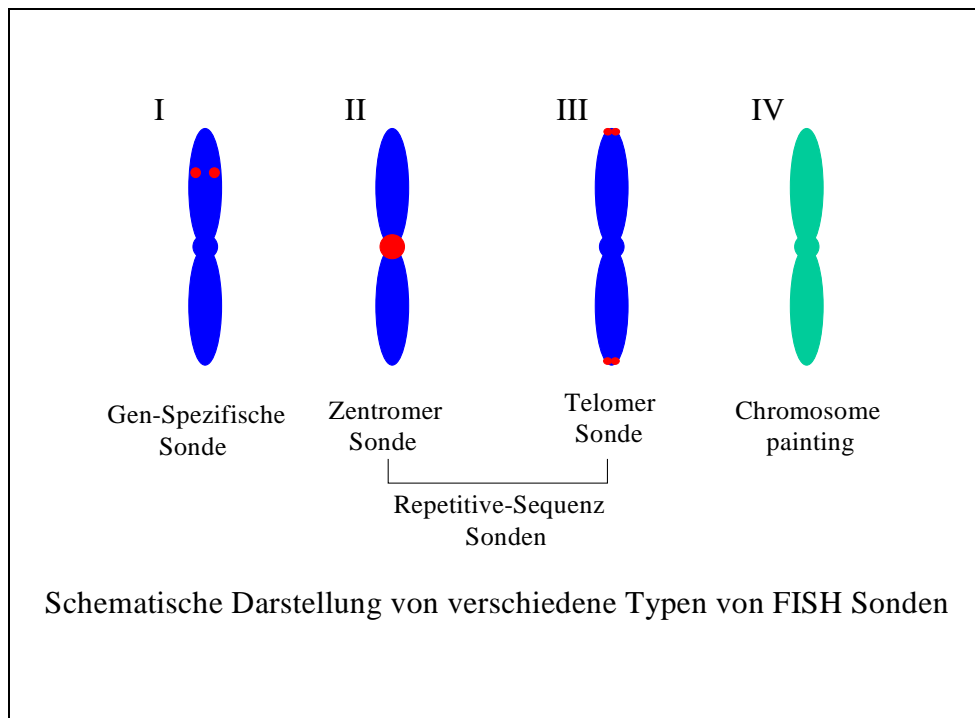


Die Karyotypisierung der Metaphasen wurde mittels Ikaros-System durchgeführt. Für jedes Areal wurden zwischen 5 und 20 Metaphasen karyotypisiert. Mithilfe des Ikaros-Systems kann die Durchführung aller Schritte einer Karyotyp-Analyse auf dem Bildschirm gemacht werden. Dadurch wird viel Zeit gespart. Die Bilder liegen in digitaler Form vor. Deswegen können sie als elektronische Datei archiviert werden.

### **2.2 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH):**

Die FISH-Technik beruht auf der Entdeckung der Hybridisierung von markierter ribosomaler RNA auf akrozentrischen Chromosomen (Gall JG et al, 1969; John HA, 1969). Zunächst wurden radioaktive Isotope verwendet. Aber die Fluorochrome sind sicherer, benötigen kürzere Reaktionszeit und erlauben verschiedene Farben. FISH beinhaltet eine markierte DNA-Sonde, die auf genomische DNA Sequenz hybridisiert und für die Untersuchung einer spezifischen Stelle auf einem Chromosom verwendet werden kann. In Abb. 4 werden die verschiedenen Sondentypen schematisch dargestellt.

Man unterscheidet I) Gen-spezifische Sonden, die spezifische Nukleinsäure-Sequenzen auf einem Chromosom erfassen. II) Zentromer-Sonden, die auf repetitive Sequenzen binden, die für die Zentromer-Regionen spezifisch sind. III) Telomerische Sonden, die die repetitive Sequenz TTAGGG erkennen und alle Telomere gleichzeitig sichtbar machen können. IV) Chromosom-Painting-Sonden bestehen aus mehreren kleinen chromosomenregionsspezifischen Sonden (McNeil und Ried, 2000).



**Abb. 4:** Eine schematische Darstellung von verschiedenen Typen von FISH Sonden

Die erste Bedingung für die FISH ist die Verfügbarkeit einer DNA-Sonde. Reine DNA wird zuerst isoliert und dann in einer Markierungsreaktion mit einem Fluorochrom verbunden. DNA-Sonden können durch ein enzymatisches Verfahren, wie Nick-Translation, Random Priming oder Polymerasekettenreaktion (PCR), markiert werden. Während der Nick-Translation verursacht die Exonuclease-Aktivität von DNA-Polymerase einen Einzelstrangbruch (nick) in der DNA, durch Entfernung eines Nukleotids (d.h. Adenin, Guanin, Thymin oder Cytosin). Anschließend wird ein spezifisches fluoreszenzmarkiertes Nukleotid in die Bruchstelle durch DNA-Polymerase eingebaut, die die DNA- Sequenz vom nicht genickten (non-nicked) Strang als Matrize (template) verwendet. Wird eine Sonde von genomischer DNA hergestellt, wird Humane Cot-1 DNA hinzugefügt. Humane Cot-1 DNA besteht aus repetitiven Sequenzen des Genoms. Humane Cot-1 DNA wird benutzt, um die Hybridisierung von repetitiven Sequenzen zu unterdrücken und die unspezifische Hybridisierung zu vermeiden (McNeil N und Ried T, 2000).

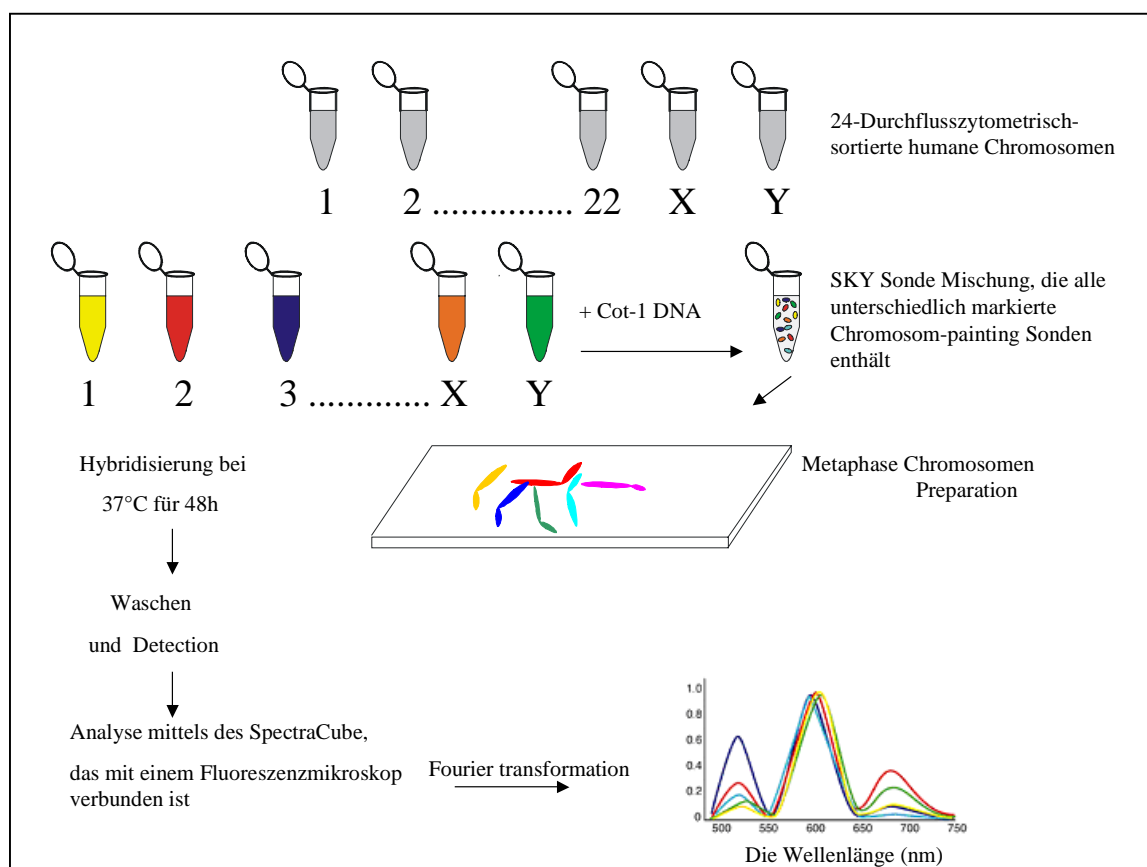
### 2.3 Spectral Karyotyping (SKY):

SKY ist eine neue molekulare zytogenetische Technik, die auf einer Modifikation

der FISH Technik beruht. Mit SKY Technik kann man alle humanen Chromosomen und Mausechromosomen farbig darstellen und so karyotypisieren (Liyange et al, 1996; Schröck et al, 1996). SKY kann alle Chromosomen gleichzeitig sichtbar machen und färbt jedes Paar von Chromosomen mit unterschiedlichen Farben. SKY hat großen Erfolg bei der Aufklärung von vielen komplexen Karyotyprearrangements (Ried et al, 1998; Coleman et al, 1999).

### SKY Methode:

SKY beruht auf der gleichzeitigen Hybridisierung von 24 Chromosomen mit spezifisch gemischten Sonden (siehe Abb.5).



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der zytopenetischen Analyse mittels Spectral Karyotyping (SKY) (modifiziert nach McNeil und Ried, 2000)

Spezifische Chromosomenspektren entstehen bei Markierung jedes Chromosoms entweder mit einzelem Fluorochrom oder mit einer bestimmten Kombination von mehreren Fluorochromen. Fluorochrome können über DNA-Sonden an bestimmte Basensequenzen von Chromosomen binden und diese sichtbar machen. Die DNA-Sonden wurden mit drei verschiedenen Fluorochromen direkt und mit zwei weiteren indirekt markiert (Tabelle 4).

<b>Fluorochrome</b>	<b>Absorptionmaximum (nm)</b>	<b>Emissionsmaximum (nm)</b>
<b>A-Rhodamine</b>	<b>550</b>	<b>570</b>
<b>B-Texas-Red</b>	<b>596</b>	<b>620</b>
<b>C-Cy5</b>	<b>650</b>	<b>670</b>
<b>D-FITC</b>	<b>495</b>	<b>525</b>
<b>E-Cy5.5</b>	<b>675</b>	<b>694</b>

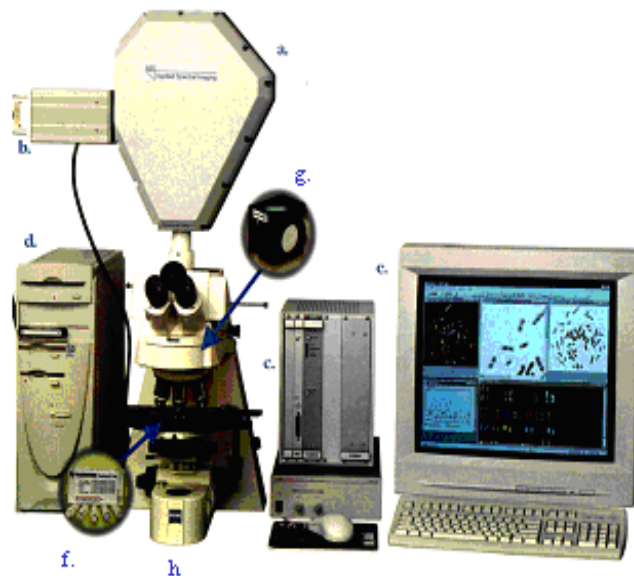
**Tabelle 4:** Fluorochrome des Sonden-Kits und ihre optischen Eigenschaften (SKY-Kit-Hersteller ASI)

Die Anwendung folgender Kombinationen von fünf verschiedenen Fluorochromen liegt der SKY-Technik zugrunde (siehe Tabelle 5).

Eine DOP-PCR (degenerate oligonucleotide primer-polymerase chain reaction) Markierungsreaktion wird verwendet, um die Fluorochrome an die DNA zu verbinden. Die Chromosome-Painting-Sonden werden mit Überschuss von humaner Cot-1 DNA gemischt und auf die Metaphasechromosomen hybridisiert. Die humane Cot-1 DNA dient dabei der Absättigung hochrepetitiver DNA-Sequenzen im Bereich des Heterochromatins. Nach 48-72 Stunden Inkubation bei 37°C wurden die Detektionsschritte durchgeführt, um die Fluorochrome sichtbar zu machen und die restlichen Sonden zu entfernen. Die Bilderfassung erfolgt über ein Interferometer, welches an eine CCD-Kamera angeschlossen ist (siehe Abb. 6).

Chromosom	Markierung	Chromosom	Markierung	Chromosom	Markierung
1	BCD	9	ADE	17	C
2	E	10	CE	18	ABD
3	ACDE	11	ACD	19	AC
4	CD	12	BE	20	A
5	ABDE	13	AD	21	DE
6	BCDE	14	B	22	ABCE
7	BC	15	ABC	X	AE
8	D	16	BD	Y	CDE

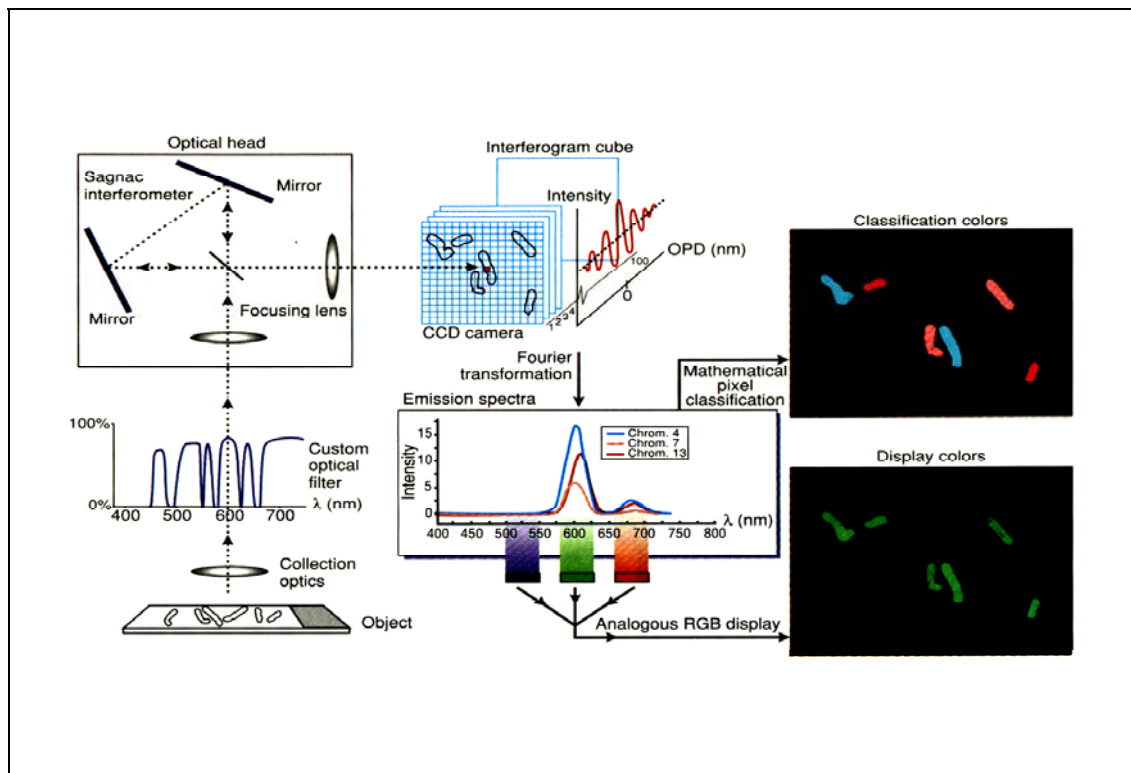
**Tabelle 5:** Fluorochrommarkierung der humanen Chromosomen (SKY-Kit-Hersteller ASI)



**Abb. 6:** Bestandteile eines Spectral karyotyping (SKY)-Arbeitsplatzes; a. Spectra Cube, b. CCD-Kamera, c. Kamera Steuerungssystem, d. Computer, e. Monitor, f. SKY-Kit, g. SKY-Filterblock, h. Fluoreszenzmikroskop

Die hybridisierte Stelle wird mit Licht, welches über einen Triple Bandpass Filter

geleitet wird, zur Fluoreszenz angeregt. Diese Fluoreszenz wird mit einem Mikroskop beobachtet. Das Fluoreszenzlicht wird mit einem Sagnac-Interferometer spektral zerlegt. Mit Hilfe einer CCD-Kamera und Bildverarbeitungssoftware kann von jedem Bildpunkt das dazugehörige Spektrum ausgelesen werden. Das Sagnac-Interferometer besteht aus einem drehbaren Strahlteiler und zwei in einem Winkel von  $45^\circ$  zueinander justierten Spiegeln. Durch die CCD Kamera wird ein Interferenzbild dargestellt und die Intensität der resultierenden Lichtwellen ermittelt. Mittels Fouriertransformation wird das Emissionsspektrum erfasst und an einem Computer bearbeitet. Bei der Fourieranalyse werden diskrete oder analoge Signale mit Hilfe der sogenannten Fouriertransformation in ihr Frequenzspektrum transformiert (umgerechnet) und im Spektralraum analysiert (siehe Abb. 7).



**Abb. 7:** SKY-Prinzip nach Schröck et al. (1996)

$\lambda$  = Wellenlänge, OPD = „optical path difference“

Das Emissionsspektrum enthält die ganze spektrale Information eines Bildpunktes zwischen 400nm und 800nm. Mithilfe der SKY-Software kann die Pixelklassifizierung des RGB-Bildes der Metaphase ausgeführt werden (Abb. 2.7). Alle Emissionsspektren der chromosomenspezifischen Fluorochromkombinationen

werden im Computer gespeichert und eine charakteristische Falschfarbe wird jeder dieser Kombinationen zugeordnet. Diese Messtechnik ist die Basis für die Chromosomen Klassifikation durch Bestimmung aller Pixel, die die gleiche Farbe haben (Malik Z et al, 1996; Garini Y et al; McNeil N et al, 2000).

### **SKY als diagnostisches Hilfsmittel**

Die Anwendung von SKY für die Identifizierung von chromosomalen Aberrationen, ist vielfältig. SKY ist vor allem für die Identifizierung von kleinen chromosomalen Aberrationen geeignet, wie z.B. die Translokation von Telomerkromatin, die mittels Bänderungstechnik schwer zu erkennen ist und der Identifizierung von Marker Chromosomen, die nach der konventionellen Bänderungsanalyse schwer fassbar sind (Haddad et al, 1998; Phelan et al, 1998).

### **Verwendete Reagenzien**

- 0,01M HCl Lösung: 0,5ml 1M HCl + 49,5ml Aqua dest
- Pepsin- Stammlösung (10%): 100mg/ml Pepsin in sterilem Wasser lösen, komplett gelöste Stammlösung aliquotieren und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  einfrieren
- PBS-Stammlösung (10xPBS/Liter; pH 7,4): 75,98g NaCl + 12,46g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 4,14g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
- 1x PBS/MgCl<sub>2</sub> Lösung: 2,5 ml 1M MgCl<sub>2</sub> + 47,5ml 1xPBS
- 1% Formaldehyd: 2,7ml 37% Formaldehyd + 97,3ml 1x PBS/MgCl<sub>2</sub>
- Ethanol Verdünnung Reihe (EtOH vergällt): 70%, 80% und 100%
- Denaturierung Lösung: 35ml Formamid + 10ml A. dest + 5ml 20xSSC, pH 7
- Waschlösung I: 15ml 20xSSC + 60ml A.dest + 75ml Formamid; pH 7,0
- Waschlösung II: 12,5ml 20xSSC + 237,5ml A.dest
- Waschlösung III: 100ml 20xSSC + 400ml A.dest + 0,5ml Tween 20
- 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) (Serva) in Vectashield 1:1000 [1mg DAPI /1ml A.dest.; 1 $\mu\text{l}$  DAPI-Stammlösung in 1000 $\mu\text{l}$  Vectashield]
- SSC (20x):
  - 175,3g NaCl
  - 88,2g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

- in 800 ml A.dest. lösen
- pH mit HCl auf 7,0 einstellen
- A.dest. ad. 1l

### **Herstellung der Präparate**

#### **Waschen der Zellsuspension**

Silikonisierte Glaspasteurpipetten wurden zum Pipettieren benutzt.

- Fixierte Zellsuspension 10 min bei 1200Upm zentrifugieren
- Überstand abpipettieren
- Zellpellet in 10 ml Fixans aufnehmen und resuspendieren und 10 min bei 1200 Upm zentrifugieren
- Überstand abziehen
- Zellpellet in etwa 0,5 ml Fixans aufnehmen und resuspendieren

#### **Auftropfen auf Objektträger**

- Wasserbad bis 80°C erhitzen; zwei Metallstäbe als Träger für die Objektträger quer über das Wasserbad legen
- Sauberen, fettfreien Objektträger in A.dest. (RT) einstellen
- Direkt vor dem Auftropfen einen Objektträger herausnehmen und kurz senkrecht stellen, bis nur noch ein dünner Flüssigkeitsfilm den Objektträger bedeckt, dann aus ca. 30 cm Höhe 3-5 Zellsuspensionstropfen nebeneinander auftropfen
- OT sofort auf die Träger über dem Wasserbad für 2 min legen
- Die Rückseite der OT abwischen und kurz auf der Heizplatte (55°C) trocknen
- OT im Umkehrmikroskop nach Metaphasen durchsuchen und eine geeignete Hybridisierungsstelle auf der Rückseite mit einem Diamantstift markieren; die Metaphasen wurden mit guter Qualität bezeichnet, wenn die Metaphasen ausreichenden Abstand voneinander hatten und die Chromosomen homogen dunkel und frei von Zytoplasmaresten vorlagen. Dies war die notwendige Voraussetzung für die Fortsetzung der Bearbeitung der Präparate.
- OT nicht altern lassen, sondern am selben Tag hybridisieren



### **SKY Hybridisierung:**

#### **Objektträgervorbehandlung**

- OT 2 min in einer auf 37°C vorgewärmte Pepsin/HCl-Lösung (50ml 0,01N HCl mit 10µl einer 10%igen Pepsin-Stammlösung) inkubieren, um die Zytoplasmareste zu verdauen, damit die Chromosomen für die Sonde leichter zugänglich werden.
- OT 2x5 min in 1xPBS bei RT waschen
- OT 5 min in 1xPBS/MgCl<sub>2</sub> bei RT waschen
- OT 10 min in 1%igen Formaldehydlösung (Formaldehyd+1xPBS/MgCl<sub>2</sub>) bei RT inkubieren, um die Chromosomen zu härten
- OT 5 min in 1xPBS bei RT waschen
- OT für jeweils 2 min in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80% und 100% EtOH) bei RT dehydrieren
- OT lufttrocknen lassen und bis zur weiteren Verwendung im RT aufbewahren.

#### **Denaturierung der Chromosomen**

- Auf ein Deckglas (60x24mm) 100µl einer Denaturierungslösung (70% Formamid, 2xSSC, pH 7,0) verteilen und den OT blasenfrei auf das Deckglas legen und bei 80°C für 2 min auf dem Heizblock denaturieren
- Deckglas abrutschen lassen und OT für jeweils 2 min in einer eisgekühlten aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80% und 100% EtOH) bei RT dehydrieren
- OT lufttrocknen lassen

#### **Denaturierung der Sonden**

- Tube #1 vom ASI-Sonden-Kit kurz homogenisieren und kurz zentrifugieren
- 3µl Sondenmix entnehmen und für 7 min bei 80°C im Heizblock denaturieren.
- Sondenmix kurz zentrifugieren

#### **Prähybridisierung der Sonden**

Die Sonden stammen aus einer genomischen Bibliothek und es finden sich in den DNA-Fragmenten neben den Einzelkopien auch repetitive Sequenzen. Diese stören die spezifische Hybridisierung, da sie die repetitiven Sequenzen auf den Chromosomen detektieren und dadurch entstehen unspezifische Signale. Aus

diesem Grund ist es sehr wichtig, diese repetitiven Sequenzen in einer Prähybridisierungsreaktion (Preannealing) zu unterdrücken. Deswegen werden die Sonden mit Überschuss von humaner Cot-1 DNA vor der Hybridisierung für eine Stunde im Hybridisierungsschrank inkubiert. In dieser Zeit werden die hochrepetitiven Sequenzen mit humaner Cot-1 DNA hybridisiert und damit für die spätere spezifische Hybridisierung blockiert.

- Preannealing des Sondenmix: Denaturierten Sondenmix 1h im Brutschrank bei 37°C inkubieren. Dies dient dazu, unspezifische Fluoreszenzsignale zu verhindern.
- Kurz homogenisieren und kurz zentrifugieren.

### **Durchführung der Hybridisierung**

#### Material

Deckgläser

Fixogum

Hybridisierungskammer

Denaturierte und „preannealte“ Sonde

Vorbehandelte und denaturierte Chromosomenpräparate

#### Durchführung:

- 3µl Sondenmix auf markierte Hybridisierungsstelle auftragen und mit einem Deckglas blasenfrei abdecken
- Deckglasränder mit Fixogum verschließen.
- Fixogum trocknen lassen (ca. 10 min)
- OT für 40-48h in einer befeuchteten Hybridisierungskammer bei 37°C und 90% Luftfeuchtigkeit inkubieren. Dabei kann die markierte DNA-Sonde zur DNA der Chromosomen diffundieren. Dann wird mit komplementären DNA-Sequenzen hybridisiert.

#### **Stringenzwaschen:**

Nach der Hybridisierung werden die Präparate unter bestimmten Stringenzbedingungen gewaschen, um unspezifisch gebundene Sonden und nicht gebundene Sonden zu entfernen. Die spezifisch angelagerten Sonden werden

durch die Waschschritte nicht abgewaschen, da die vollständig gepaarten Doppelstränge stabil gebunden sind. Waschlösungen und Küvetten werden im Wasserbad vorgewärmt. Die Salzkonzentration und die Temperatur der Waschlösungen werden je nach der Sondenart entsprechend eingestellt. Sonden, die Einzelkopiensequenzen nachweisen, werden mit hoher Stringenz, d.h. mit niedrigem Salzgehalt und hoher Temperatur gewaschen. Dadurch werden alle unspezifischen Signale weitgehend verhindert.

### Material

Waschlösung I (50% Formamid/2x SSC):

15 ml 20xSSC

60 ml A. dest.

75 ml Formamid

pH 7,0

Waschlösung II (1x SSC):

12,5 ml 20x SSC

237,5 ml A. dest.

Waschlösung III (4x SSC/0,1% Tween 20) :

100 ml 20xSSC

400 ml A. dest

0,5 ml Tween 20

### Durchführung:

- Mit der Pinzette Fixogum von den Objektträger entfernen und Deckglas vorsichtig abrutschen lassen.

Wenn das Deckglas etwas fester an den Objektträger haftet, wird der Objektträger kurz in die vorbereitete Waschlösung I getaucht, dadurch kann das Deckglas nun leichter abrutschen.

- OT 3x 5 min in Waschlösung I bei 45°C im Wasserbad waschen
- OT 2x 5 min in Waschlösung II bei 45°C im Wasserbad waschen

- OT 2 min in Waschlösung III bei 45°C im Wasserbad waschen

### **Detektion**

Um die indirekt markierten Sonden sichtbar zu machen, wurden zwei Antikörper (Cy5 und Cy5.5) eingesetzt. DAPI-Farbstoff wurde als Hintergrundfärbung der Chromosomen verwendet. DAPI-Farbstoff wurde mit Antifadelösung vermischt, um die Präparate vor einem schnelleren Ausbleichen zu schützen.

### Material

Antikörperlösung 1:

4µl Cy5 + 400µl 4xSSC + 1%BSA

Antikörperlösung 2:

2µl Cy5.5 + 400µl 4xSSC + 1% BSA

Rinderserumalbumin-Lösung (BSA)(4xSSC / 1%BSA):

100mg BSA + 2ml 20xSSC + 8ml A.dest

Antifadelösung:

1mg DAPI / 1ml A. dest.; 1µl DAPI-Stammlösung in 1ml Vectashield

Durchführung:

Blockieren unspezifischer Bindungsstellen:

- auf Hybridisierungsstelle 20-30µl blocking reagent auftragen, mit einem Deckglas abdecken und für 30 min in der feuchten Kammer bei 37°C inkubieren
- OT herausholen und Deckglas vorsichtig abrutschen lassen
- OT 2 min in Waschlösung III bei 45°C waschen

Detektion der indirekt markierten Sonden:

- auf die Hybridisierungsstelle 20-30µl Cy5-staining reagent auftragen, mit einem Deckglas abdecken und für 45min in der feuchten Kammer bei 37°C inkubieren
- OT herausholen und Deckglas vorsichtig abrutschen lassen
- OT erneut 3x 3 min in Waschlösung III bei 45°C im Wasserbad waschen
- auf Hybridisierungsstelle 20-30µl Cy5.5-staining reagent auftragen, mit einem

Deckglas abdecken und für 45min in der feuchten Kammer bei 37°C inkubieren

- OT erneut 3x3 min in Waschlösung III bei 45°C im Wasserbad waschen
- OT in leere Küvette stellen und Wasser überlaufen lassen; ab und zu schütteln und leeren
- OT abtropfen lassen, Rückseite abwischen und Vorderseite trocken blasen, sofort mit DAPI-Lösung eindecken und mit Deckglas blasenfrei abdecken
- OT im Kühlschrank bei 4°C aufbewahren

### **Mikroskopische Auswertung**

Am technischen Mikroskop (Zeiss AxioTech), das mit dem SKY-System angeschlossen ist, wurde die mikroskopische Auswertung der Präparate durchgeführt. Bei der mikroskopischen Beobachtung wurden die Präparate zunächst mit schwacher Vergrößerung (16er Objektiv in Ölimmersion) im DAPI-Filter nach entsprechenden Stellen durchsucht und durch ein stärkeres Objektiv (63er Objektiv in Ölimmersion) durch Tripelband Pass-Filter (Chroma) wurde die hybridisierende Metaphase fotografisch dokumentiert. Das Mikroskop besitzt eine Xenon-Lampe (XBO 75W/2 OFR) für die gleichzeitige Anregung aller Fluorochrome. Für die Anregung aller Fluorochrome braucht man einen Tripelband Pass-Filter (Chroma), um eine Schwarz-Weiß-Aufnahme (DAPI-Banden) derselben Metaphase aufzunehmen, wird ein DAPI-Filter verwendet. DAPI-Banden entsprechen fast dem G-Bandenmuster. Eine SKY-Aufnahme und eine DAPI-Aufnahme wurde von jeder hybridisierte Metaphase gemacht. SkyView-Programm Version 1.6.1(ASI) wurde für die Bildbearbeitung verwendet.

### **2.4 p53-Sonde**

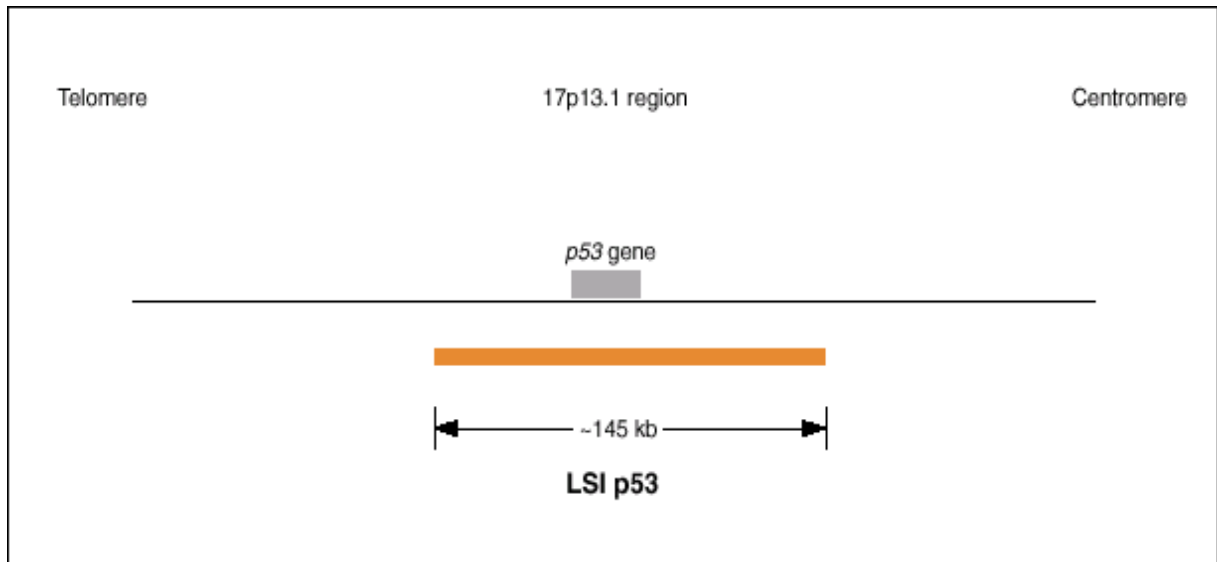
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zwischen 2002 und 2003 Knochenmarkmaterial von 110 Leukämiepatienten auf eine Deletion im p53-Gen mittels Fluoreszenz In situ Hybridisierung (FISH) untersucht, um einen Überblick über die Häufigkeit von p53-Gen-Deletionen zu erhalten. Bei der molekularzytogenetischen Untersuchung wird nicht das gesamte Erbmaterial (DNA) untersucht, sondern es wird gezielt nur ein bestimmter Abschnitt untersucht.

Zu diesem Zweck wurde die FISH-Methode nach entsprechender Präparation,

sowohl an Interphasezellkernen als auch an Metaphasen der Leukämiezellen durchgeführt. Die Untersuchung von 200 Interphasezellkernen und 5 bis 30 Metaphasen diente dazu, einen Überblick über die Kopienzahl der Allele des p53-Gens zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde für die FISH die p53-Sonde von der Firma Vysis gekauft. 55 Proben waren mit GM-CSF (Granulozyten Makrophagen Colony stimulation factor) und die andere Hälfte mit TPA (12-0-tetradecanoylphorbol 13-acetate) stimuliert. Bei 10 Proben wurden die lymphatische und myeloische Reihe mittels TPA und GM-CSF-stimulierten Zellen auf eine Deletion im p53-Gen untersucht. Das Untersuchungsmaterial stammte von 72 männlichen und 38 weiblichen Patienten, die mit dem Verdacht auf Leukämieerkrankung untersucht wurden. Die männlichen Patienten waren zwischen 23 und 80 Jahre alt, d.h. das Durchschnittsalter betrug 62 Jahre. Die weiblichen Patienten waren zwischen 22 und 82 Jahren alt und deren Durchschnittsalter betrug 64 Jahre.

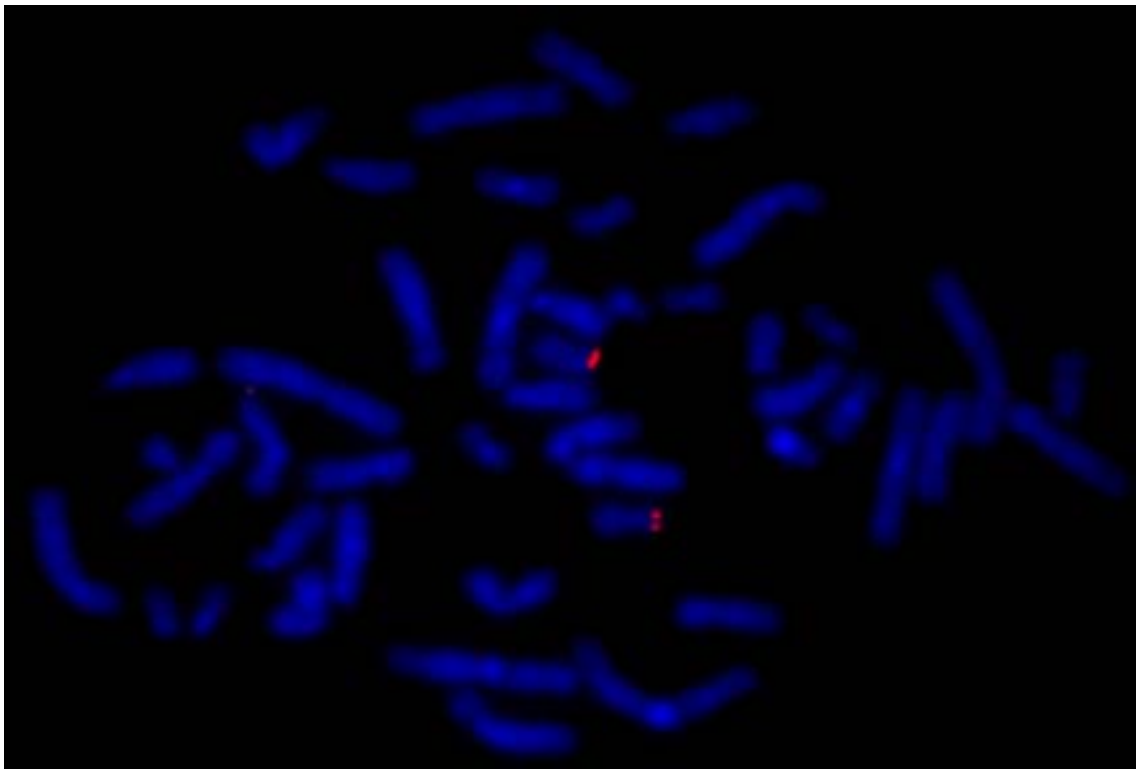
Die p53-Sonde hybridisiert auf der Bande 17p13.1 vom humanen Chromosom 17. Die hybridisierte Sonde fluoresziert mit klarer Intensität im Interphasekern und an Metaphasechromosomen. Im Interphasekern von normalen Zellen erscheint die Sonde generell als zwei eindeutige Signale. Gelegentlich könnte auch die p53-Sonde als drei oder vier Signale erscheinen. Dies variiert je nach Kondensation von DNA und der Distanz zwischen den Chromatiden. In einer normalen Metaphase können ein oder zwei Signale auf jedem Chromosom 17 erscheinen.

Die verwendete p53-Sonde ist eine direkte fluorochrommarkierte DNA-Sonde und überspannt die Region des p53-Gens mit 145kb (siehe Abb. 8).



**Abb. 8:** Schematische Darstellung der Region der p53-Gen-Sonde (Vysis)

Die Sonde wurde von der Firma Vysis gekauft. Um die hybridisierten Sondenmoleküle nachzuweisen (siehe Abb. 9), wurde sie direkt detektiert. Für die direkte Detektion ist nach der Hybridisierung und Stringenzwaschung kein zusätzlicher Arbeitsschritt notwendig. Die Präparate können umgehend untersucht werden.



**Abb. 9:** Das Bild zeigt normale Metaphasechromosomen nach der Hybridisierung mit der p53-Sonde. Rot = p53-Sonde auf dem Chromosom 17, Hintergrund = DAPI

### **Materialvorbereitung**

Die Präparate wurden aus in Methanol/Eisessig fixierten Zellsuspensionen hergestellt.

Die Patientenproben (Knochenmark) stammten von Patienten, die Verdacht auf Leukämie hatten. Die Herstellung der Präparate wurde wie im Abschnitt 2.5.5 durchgeführt.

### **Sondenansatz:**

Die Sondenmischung wurde in ein Eppendorf-Tube wie folgt angesetzt:

- 7µl LSI/WCP Hybridisation Buffer
- 2µl Aqua dest.
- 1µl Sonde (LSI DNA Sonde)

### **Denaturierung**

Für die durchgeführte Hybridisierung wurden Präparat und Sonde getrennt denaturiert.

#### Denaturierung der Sonde:

- Eppendorf-Tube kurz homogenisieren und kurz zentrifugieren.
- Sonde für 5 min bei 74°C im Heizblock denaturieren.
- Eppendorf-Tube kurz zentrifugieren.

#### Denaturierung der Chromosomen:

- Auf ein Deckglas (60x24 mm) 100µl einer Denaturierungslösung (70% Formamid, 2xSSC, pH7,0) verteilen und den OT blasenfrei auf dem Deckglas legen und bei 74°C für 2 min auf dem Heizblock denaturieren.
- Deckglas abrutschen lassen und OT in 2xSSC schwenken.
- OT abtropfen lassen und Rückseite abwischen und Vorderseite trocken blasen.

### **Hybridisierung:**

#### Material:

Deckgläser

Fixogum



Hybridisierungskammer

Denaturierte Sonde

Vorbehandelte und denaturierte Chromosomenpräparate

Durchführung:

- 2µl Sondenmix auf markierte Hybridisierungsstelle (1cm<sup>2</sup>) auftragen und mit einem Deckglas blasenfrei abdecken.
- Deckgläser mit Fixogum verschließen
- Fixogum trocknen lassen (ca. 10 min)
- OT über Nacht (4-16h) in einer befeuchteten Hybridisierungskammer bei 37°C und 90% Luftfeuchtigkeit inkubieren.

**Stringenzwaschen:**

Nach der Hybridisierung wurden die Präparate stringent, d.h. mit niedrigem Salzgehalt und hoher Temperatur gewaschen, um hier Einzelkopiesequenzen nachzuweisen. Durch die Waschschrirte wurden die unspezifisch gebundene Sonde und nicht gebundene Sonde entfernt. Aber alle spezifisch gebundenen Sonden wurden nicht entfernt, da sie vollständig gepaart und stabil gebunden sind. Damit wurden unspezifische Signale weitgehend verhindert.

Material:

Waschlösung I (0,4xSSC):

2 ml 20xSSC

98 ml A. dest.

100µl Tween 20

Waschlösung II (2xSSC):

10ml 20xSSC

90ml A.dest.

Durchführung:

- Mit der Pinzette Fixogum von den Objektträger entfernen
- OT kurz in die vorbereitete Waschlösung I tauchen, damit das Deckglas

leichter abrutschen kann

- Deckglas vorsichtig abrutschen lassen
- OT 30s in auf 74°C erwärmte Waschlösung I bei 74°C im Wasserbad waschen
- OT 1min in Waschlösung II bei RT waschen
- OT abtropfen lassen, Rückseite abwischen und Vorderseite trocken blasen und sofort mit 18-20µl DAPI-Lösung als Gegenfärbung eindecken und mit Deckglas blasenfrei abdecken. Durch DAPI-Fluoreszenzfarbstoff wurden die Chromosomen im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. DAPI verleiht den Chromosomen ein G-Banden-positives Muster.
- OT im Kühlschrank bei 4°C aufbewahren

### **Auswertung der Präparate am Fluoreszenzmikroskop**

Die mikroskopische Auswertung der Präparate wurde am Fluoreszenz Mikroskop (Axioskop der Firma Zeiss) durchgeführt, das mit vier Filtern (DAPI, FITC, Texas-Red und FITC/Texas-Red), einer 100 Watt Lampe, Kamera und Image-Analyse-System (ISIS-System) ausgestattet war. Mit Hilfe eines speziellen Fluoreszenzfilters konnten die Fluoreszenzsignale auf den Metaphasechromosomen und den Interphasekernen direkt betrachtet werden. Die Signale der verschiedenen Farbstoffe wurden mit einer hochempfindlichen Kamera aufgenommen, die in das Farb-Fluoreszenz-Bildsystem ISIS (Metasystem) integriert ist. Das ISIS-System erzeugt Farbbilder, indem die einzelnen Farbkomponenten nacheinander aufgenommen werden. Es wurden 200 Zellkerne von jeder Patientenprobe gezählt und jede im hybridisierten Bereich vorhandene Metaphase aufgenommen.

Um die Diagnostik zu normieren, wurde vor der Benutzung der p53-Sonde ein Cut-Off-Wert festgelegt, der bei 5% lag. d.h. ein Ergebnis von mehr als 5% aberranten Zellen wurde als positiv betrachtet. Dazu wurden periphere Blutzellen von fünf gesunden Probanden auf eine Deletion im p53-Gen untersucht. Die Objektträger wurden mit der p53-Sonde hybridisiert und anschließend die Häufigkeit der Deletionen in diesen Probepräparaten ermittelt. Der Durchschnittswert lag bei 5%, woraus sich der oben genannte Cut-Off-Wert ergab.

Die zytogenetischen Befunde und die Methanol-Eisessig fixierten

Knochenmarkszellen wurden freundlicherweise vom Labor Dr. Thiele zur Verfügung gestellt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 FISH-Analyse mit der p53-Sonde

In sieben der fünfundfünfzig untersuchten Fälle (13%), die mit GM-CSF stimuliert worden sind, konnte durch FISH-Untersuchung eine Allel-Deletion des p53-Gens nachgewiesen werden. Aber in keiner der untersuchten Proben, die mit TPA stimuliert worden waren, wurde eine Allel-Deletion des p53-Gens aufgedeckt. Stattdessen wurde ein Fall mit Trisomie 17 gefunden. Bei der Auswertung wurde die Anzahl der Signale für die p53-Sonde im Interphasekern und an Metaphasen ausgezählt. Wenn in der Zelle zwei normale homologe Chromosomen vorhanden sind, findet man zwei Fluoreszenzsignale im Kern oder am Metaphasechromosom. Die Knochenmarkszellen von Patient Nummer 1 wurden mit TPA und bei Patient Nummer 2 bis 8 mit GM-CSF stimuliert.

#### **Fall Nr. 1(A):**

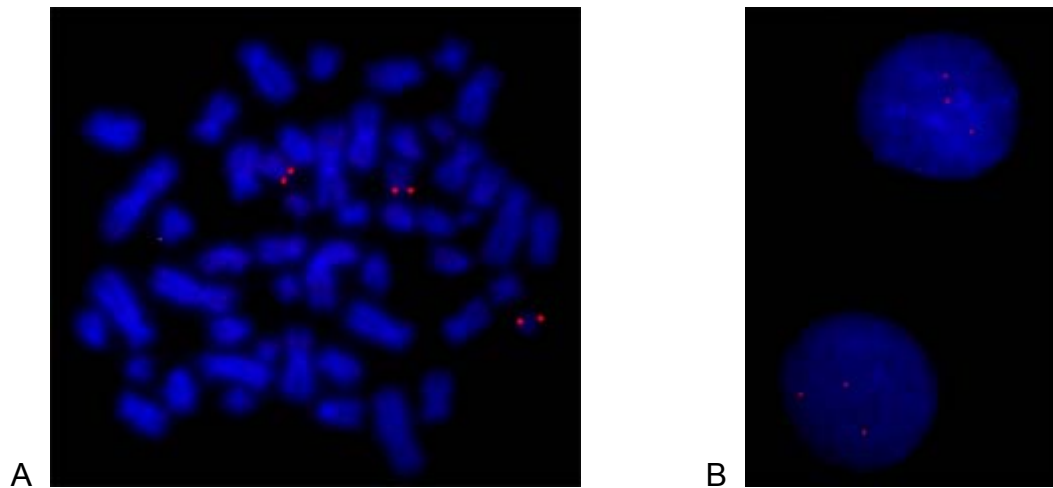
**Diagnose:** Hier handelte es sich um eine 72 jährige Patientin mit der Diagnose hochmalignes Lymphom vom B-Zelltyp.

#### **Konventionelle Zytogenetik**

Im zytogenetischen Befund wurde festgestellt, dass die stimulierten Knochenmarkszellen überwiegend stark aberrante Karyotypen im hyperdiploiden Bereich aufwiesen. Ein einheitlicher Karyotyp war nicht feststellbar, nur ein X-Verlust sowie eine Monosomie der Chromosomen 3,5,10 und 21 schienen durchgehend vorzuliegen. Die Anzahl der Marker-Chromosomen schwankte zwischen 9 und 11. Daneben lag auch ein kleinerer Zellklon mit einem normalen weiblichen Karyotyp 46,XX vor.

#### **Molekularzytogenetische Untersuchung:**

Die an Interphasekernen der mit TPA-stimulierten Knochenmarkszellen durchgeführte FISH-Analyse zeigte in 48% der ausgezählten Interphasekernen ein zusätzliches Signal (siehe Abb. 10 B). In 47% der ausgezählten Interphasekerne wurden nur zwei normale Signale gefunden. Dies weist darauf hin, dass die Knochenmarkszellen aus zwei Zellklonen bestehen.



**Abb. 10:** FISH mit der p53-Sonde von Vysis. Bild A zeigt eine Metaphase mit drei p53-Signalen. Bild B zeigt Interphasekerne mit drei p53-Signalen. Das p53-Gen ist als rotes Signal erkennbar.

Zusätzlich wurde in 5% der untersuchten Zellen nur ein Signal gefunden. Die niedrige Zahl von Kernen mit nur einem Signal (5%) wurde auf Artefakte zurückgeführt, da sie im Bereich vom Cut-Off-Wert von 5% lag.

Es konnten jedoch auch 36 Metaphasen der TPA stimulierten Knochenmarkszellen untersucht werden. 15 Metaphasen (42%) zeigten zwei normale Signale. 21 Metaphasen (58%) zeigten drei Signale (siehe Abb. 10 A).

Durch die untersuchten 36 Metaphasen wurden die resultierenden Ergebnisse der FISH-Analyse an Interphasekernen bestätigt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der Tabelle 6 zusammengefasst.

Fall Nr.	P53-Signal Zahl	I-Signal	II-Signal	III-Signal	Stimulationsmittel
<b>1(A)</b>	Metaphase Zahl	0	15	21	TPA
	Interphasezellkern Zahl	10	94	96	TPA
	Zytogenetischer Befund	<b>16x</b> 48-52,X numerische und strukturell stark aberranter Chromosomensatz mit bis zu 11 Marker-Chromosomen <b>5x</b> 46,XX diploider weiblicher Chromosomen-satz			
	Diagnose	Hochmalignes Lymphom vom B-Zelltyp			

**Tabelle 6:** Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der FISH-Untersuchung, den zytogenetischen Befund und die Diagnose.

**Fall Nr.2 (B):**

**Diagnose:** Hier handelte es sich um einen 65 jährigen Patient mit Verdacht auf AML.

**Konventionelle Zytogenetik**

Im zytogenetischen Befund wurde festgestellt, dass die mit GM-CSF stimulierten Knochenmarkszellen mindestens drei Zellklone aufwiesen, wobei der Karyotyp 51,XY, -2, der(7q), 3x +8, +9, -13,+15, -17, -20, +4marker am häufigsten vertreten war. Der kleinere Zellklon mit dem Karyotyp 50,XY, -2, 2x +8, +9, -13, +15, -17, -20, +4marker unterschied sich nur durch das Fehlen des (7q)-Chromosoms und einer Tetrasomie 8 anstelle einer Pentasomie 8. Wahrscheinlich lag auch ein kleiner normaler Zellklon vor, da eine Metaphase mit dem Karyotyp 46,XY vorhanden war.

**Molekularzytogenetische Untersuchung:**

Die Zellen des Knochenmarks wurden für 48 Stunden mit GM-CSF stimuliert. In den 200 ausgewerteten Interphasekernen des Knochenmarks zeigte sich in dem Bereich 17p13.1 in 184 Kernen nur ein Signal, so dass in 92% der Zellen eine Deletion 17p13.1 vorlag. Daneben wurden in 8% der ausgewerteten Interphasekerne des Knochenmarks zwei normale Signale gefunden.

In den 26 ausgewerteten Metaphasen des Knochenmarks wurden 21 (81%) Metaphasen mit nur einem Signal gefunden, in 5 (19%) der 26 ausgewerteten Metaphasen lagen zwei normale Signale vor.

In den untersuchten Interphasekernen und Metaphasen war erkennbar, dass in ca. 90% der untersuchten Zellen eine Deletion eines Allels des p53-Gens vorlag. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der Tabelle 7 zusammengefasst.

Fall Nr.	P53-Signal Zahl	I-Signal	II-Signal	III-Signal	Stimulationsmittel
<b>2(B)</b>	Metaphase Zahl	21	5	0	GM-CSF
	Interphasezellkern Zahl	184	16	0	GM-CSF
	Zytogenetischer Befund	<b>6x</b> 51,XY, -2, der(7q), +3x 8, +9, -13, +15, -17, -20, +4mar <b>3x</b> 50,XY, -2, +2x 8, +9, -13, +15, -17, -20, +4mar <b>1x</b> 46, XY			
	Diagnose	Verdacht auf AML			

**Tabelle 7:** Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der FISH-Untersuchung, den zytogenetischen Befund und die Diagnose.

### Fall Nr.3 (C):

**Diagnose:** Hier handelte es sich um einen 59 jährigen Patienten mit der Diagnose einer akuten myeloischen Leukämie mit multilinearer Dysplasie. In der Weiterbehandlung wurde zytologisch die Diagnose eines myelodysplastischen Syndroms vom Typ der RAEB 2 gestellt.

### Konventionelle Zytogenetik

Der zytogenetische Befund zeigte, dass die mit GM-CSF stimulierten Knochenmarkszellen einen numerisch und strukturell aberranten Karyotyp mit vielen Marker-Chromosomen aufwiesen. Aber die Knochenmarkszellen, die mit TPA stimuliert wurden, wiesen einen normalen männlichen Karyotyp 46,XY auf.

### Molekularzytogenetische Untersuchung:

In den 200 ausgewerteten Interphasekernen des Knochenmarks zeigte sich in dem Bereich 17p13.1 in 179 Kernen nur ein Signal, sodass in 89,5% der Zellen eine Deletion eines Allels des p53-Gens vorlag. Dagegen wurden in ca. 10,5% der Kerne zwei normale Signale gefunden.

Es wurde in 18 (95%) der 19 ausgewerteten Metaphasen nur ein Fluoreszenzsignal gefunden und in einer Metaphase waren zwei normale Fluoreszenzsignale zu erkennen.

Die ausgewerteten Metaphasen und Interphasekerne zeigten, dass in etwa 92% der Knochenmarkszellen eine Deletion eines Allels des p53-Gens vorlag. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der Tabelle 8 zusammengefasst.

Fall Nr.	P53-Signal Zahl	I-Signal	II-Signal	III-Signal	Stimulationsmittel
<b>3(C)</b>	Metaphase Zahl	18	1	0	GM-CSF
	Interphasezellkern Zahl	179	21	0	GM-CSF
	Zytogenetischer Befund	<b>8x</b> 37-38, X, -Y, mit 13 bis 14 Marker-Chromosomen <b>1x</b> 33,X, -Y, mit vielen Marker-Chromosomen			
	Diagnose	einer akuten myeloischen Leukämie mit multilinearer Dysplasie. In der Weiterbehandlung wurde zytologisch die Diagnose eines myelodysplastischen Syndroms vom Typ der RAEB 2 gestellt.			

**Tabelle 8:** Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der FISH-Untersuchung, den zytogenetischen Befund und die Diagnose.

#### Fall Nr.4 (D):

**Diagnose:** Hier handelte es sich um eine 63 jährige Patientin mit der Diagnose Akute Myeloische Leukämie (AML).

#### Konventionelle Zytogenetik

Der zytogenetische Befund zeigte, dass die mit GM-CSF stimulierten Knochenmarkszellen durchgehend mehrere Aberrationen und Markerchromosomen aufwiesen, die aber nicht einheitlich waren. Eine Deletion 5q war allerdings regelmäßig vorhanden. Es lag in allen Metaphasen auch ein verlängertes Chromosom 21 vor, wie es bei der 8/21-Translokation auftritt. Außerdem fand sich häufig der Verlust beider Chromosomen 20.

#### Molekularzytogenetische Untersuchung:

Die Kerne der mit GM-CSF stimulierten Knochenmarkszellen zeigten für den Bereich 17p13.1 in 89% der Zellen nur ein Signal, sodass in einem großen Teil der Zellen eine Deletion eines Allels des p53-Gens vorlag.

Bei 8 von 11 ausgewerteten Metaphasen war nur ein Fluoreszenzsignal zu erkennen, sodass in 73% der Metaphasen eine Deletion eines Allels des p53-Gens vorlag. Die Interphasekerne und Metaphasen wiesen in etwa 81% der Zellen eine Deletion eines Allels des p53-Gens auf. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der Tabelle 9 zusammengefasst.



Fall Nr.	P53-Signal Zahl	I-Signal	II-Signal	III-Signal	Stimulationsmittel
<b>4(D)</b>	Metaphase Zahl	8	3	0	GM-CSF
	Interphasezellkern Zahl	178	22	0	GM-CSF
	Zytogenetischer Befund	<b>22x</b> 41-46, stark aberranter Chromosomensatz mit bis zu 5 Marker-Chromosomen			
	Diagnose	Akute Myeloische Leukämie (AML)			

**Tabelle 9:** Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der FISH-Untersuchung, den zytogenetischen Befund und die Diagnose.

#### Fall Nr.5 (E):

**Diagnose:** Hier handelte es sich um einen 74 jährigen Patienten mit Verdacht auf Megakaryozytäres Myelom.

#### Konventionelle Zytogenetik

Der zytogenetische Befund wies durchgehend mehrere numerische und strukturelle Aberrationen auf, die sehr einheitlich aussahen. Der Karyotyp war 46,XY, -1, -5, -17, +3mar, 12p+?, 20q-.

#### Molekularzytogenetische Untersuchung:

Die 200 ausgewerteten Interphasekerne zeigten in 97% der Fälle nur ein Fluoreszenzsignal, sodass in fast allen Zellen eine Deletion eines Allels des p53-Gens vorlag und auch in 14 Metaphasen wurde nur ein Fluoreszenzsignal detektiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der Tabelle 10 zusammengefasst.

Fall Nr.	P53-Signal Zahl	I-Signal	II-Signal	III-Signal	Stimulationsmittel
<b>5(E)</b>	Metaphase Zahl	14	0	0	GM-CSF
	Interphasezellkern Zahl	194	6	0	GM-CSF
	Zytogenetischer Befund	<b>10x</b> 46,XY, -1, -5, -17, +3mar, 12p+?, 20q-			
	Diagnose	Verdacht auf Megakaryozytäres Myelom			

**Tabelle 10:** Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der FISH-Untersuchung, den zytogenetischen Befund und die Diagnose.

**Fall Nr.6 (F):**

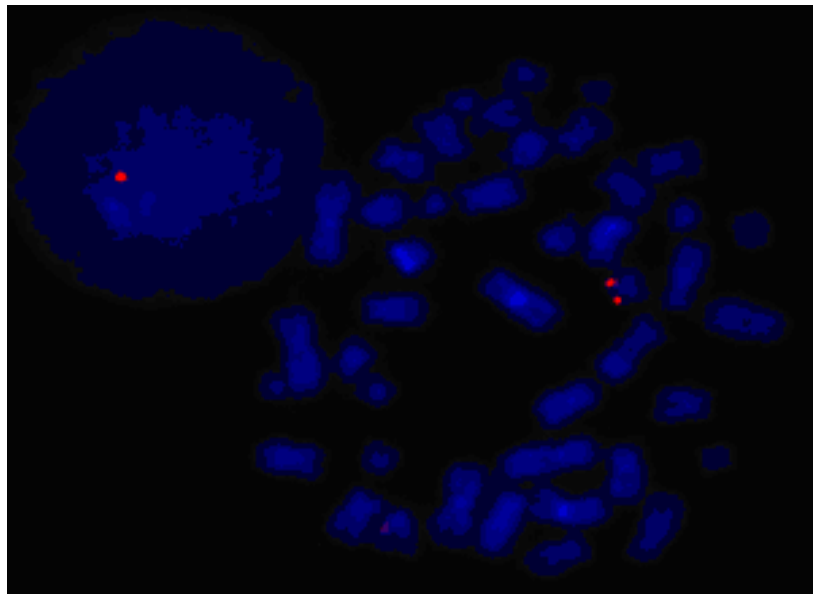
**Diagnose:** Hier handelte es sich um einen 64 jährigen Patienten mit der Diagnose AML mit dysplastischer Ausreifung sowie atypischen Promegakaryozyten.

**Konventionelle Zytogenetik**

Die stimulierten Knochenmarkszellen wiesen mehrere stark aberrante Karyotypen mit bis zu vier Marker-Chromosomen auf. Deshalb war anzunehmen, dass mehrere verschiedene Zellklone vorlagen.

**Molekularzytogenetische Untersuchung:**

Die 200 ausgewerteten Interphasekerne zeigten in 96,5% nur ein Fluoreszenzsignal, sodass in fast allen Zellen eine Deletion eines Allels des p53-Gens vorlag. In 33 von 34 ausgewerteten Metaphasen zeigte sich in dem Bereich 17p13.1 nur ein Fluoreszenzsignal, sodass in 97% der Metaphasen eine Deletion eines Allels des p53-Gens vorlag (siehe Abb. 11). Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der Tabelle 11 zusammengefasst.



**Abb. 11:** FISH mit der p53-Sonde zeigt eine Metaphase und einen Interphasekern jeweils mit nur einem Fluoreszenz-Signal. Das p53-Gen ist als rotes Signal erkennbar.

Fall Nr.	P53-Signal Zahl	I-Signal	II-Signal	III-Signal	Stimulationsmittel
6(F)	Metaphase Zahl	33	1	0	GM-CSF
	Interphasezellkern Zahl	193	7	0	GM-CSF
	Zytogenetischer Befund	<b>1x</b> 46,XY, 6p-? <b>3x</b> 44,X, -Y, -5, -11, -13, -15, -20, +4mar <b>1x</b> 43, X, -Y, -5, -11, -13, -17, -19, -20, +4mar <b>1x</b> 42,X, -Y, -5, -11, -13, -15, -17, -18, +3mar <b>1x</b> 41, -X, -Y, -5, -6, -11, -13, -15, -17, +3mar			
	Diagnose	AML mit dysplastischer Ausreifung sowie atypischen Promegakaryozyten.			

**Tabelle 11:** Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der FISH-Untersuchung, den zytogenetischen Befund und die Diagnose.

#### Fall Nr.7 (G):

**Diagnose:** Hier handelte es sich um eine 75 jährige Patientin mit der Diagnose Myelodysplastisches Syndrom vom Typ RAEB in Übergang zur sekundären AML.

#### Konventionelle Zytogenetik

Die stimulierten Knochenmarkszellen wiesen regelmäßig einen hypodiploiden Chromosomensatz mit mehreren strukturellen Umbauten und Marker-Chromosomen auf. Ein einheitlicher Karyotyp war nicht feststellbar.

#### Molekularzytogenetische Untersuchung:

Die Interphasekerne der Langzeitkultur (72 Stunden) wiesen in der Mehrzahl der Kerne (85%) nur ein Fluoreszenzsignal auf. Bei 25 von 27 ausgewerteten Metaphasen war auch nur ein Fluoreszenzsignal zu erkennen, sodass in 93% der ausgewerteten Metaphasen eine Deletion eines Allels des p53-Gens vorlag.

Wenn man die ausgewerteten Interphasekerne und Metaphasen zusammenfasst, kann man davon ausgehen, dass in etwa 90% der stimulierten Zellen eine Deletion eines Allels des p53-Gens vorlag. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der Tabelle 12 zusammengefasst.

Fall Nr.	P53-Signal Zahl	I-Signal	II-Signal	III-Signal	Stimulationsmittel
<b>7(G)</b>	Metaphase Zahl	25	2	0	GM-CSF
	Interphasezellkern Zahl	170	30	0	GM-CSF
	Zytogenetischer Befund	<b>11x</b> 41-42,XX hypodiploider Chromosomensatz mit mehreren Marker-Chromosomen			
	Diagnose	Myelodysplastisches Syndrom vom Typ RAEB in Übergang zur sekundären AML.			

**Tabelle 12:** Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der FISH-Untersuchung, den zytogenetischen Befund und die Diagnose.

### Fall Nr.8 (H):

**Diagnose:** Hier handelte es sich um eine 74 jährige Patientin mit der Diagnose Myelodysplastisches Syndrom vom Typ RAEB in Übergang in eine AML. Es bestand eine periphere Panzytopenie.

### Konventionelle Zytogenetik

Die mit GM-CSF-stimulierten Knochenmarkszellen wiesen einen numerisch und strukturell stark aberranten Chromosomensatz auf, wobei kein einheitlicher Karyotyp feststellbar war.

### Molekularzytogenetische Untersuchung:

Die mit GM-CSF-stimulierten Interphasekerne der Langzeitkultur (72 Stunden) wiesen in etwa 77% der Kerne nur ein Fluoreszenzsignal auf. Bei 10 der ausgewerteten Metaphasen war auch nur ein Fluoreszenzsignal zu erkennen, sodass in allen ausgewerteten Metaphasen eine Deletion eines Allels des p53-Gens vorlag. Obwohl bei den 10 ausgewerteten Metaphasen keine zwei normalen Fluoreszenzsignale gefunden wurden, wiesen ca. 23% der Interphasekerne zwei normale Fluoreszenzsignale auf. Dies ist auf die geringe Zahl der Metaphasen zurückzuführen.

Die mit TPA-stimulierten Knochenmarkszellen wiesen hingegen in den 200 ausgewerteten Interphasekernen und den 30 Metaphasen zwei normale Fluoreszenzsignale auf. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der Tabelle 13 zusammengefasst.

Fall Nr.	P53-Signal Zahl	I-Signal	II-Signal	III-Signal	Stimulationsmittel
<b>8(H)</b>	Metaphase Zahl	10	0	0	GM-CSF
	Interphasezellkern Zahl	154	46	0	GM-CSF
	Zytogenetischer Befund	<b>11x</b> 41-42,XX hypodiploider Chromosomensatz mit mehreren Marker-Chromosomen			
	Diagnose	Myelodysplastisches Syndrom vom Typ RAEB in Übergang in eine AML. Es bestand eine periphere Panzytopenie.			

**Tabelle 13:** Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der FISH-Untersuchung, den zytogenetischen Befund und die Diagnose.

## 3.2 SKY-Ergebnisse

### 3.2.1 SKY-Chromosomenanalyse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Knochenmarkszellen von 21 Patienten, die an hämatologischen Erkrankungen erkrankt waren, mittels spektraler Karyotypisierung (SKY) untersucht. Ziel der Untersuchung war die Identifizierung von numerischen und strukturellen Chromosomenaberrationen, die mittels konventioneller zytogenetischer Untersuchung nicht identifiziert werden konnten.

### 3.2.2 Ergebnisse der SKY-Chromosomenanalysen

Die SKY-Chromosomenanalysen wurden mit dem konventionellen zytogenetischen Befund verglichen. Die konventionellen zytogenetischen Befunde und fixiertes Sediment von der Chromosomenpräparation wurden freundlicherweise von Labor Dr. Thiele zur Verfügung gestellt. Die mittels SKY-Chromosomenanalyse karyotypisierten Metaphasen werden unten im Einzelfall beschrieben.

#### Fall Nr. 1:

**Diagnose:** Hier handelte es sich um einen 79 jährigen Patienten mit Verdacht auf Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) (jetzt Panzytopenie).

#### Konventionelle Zytogenetik:

Die mit GM-CSF-stimulierten Knochenmarkszellen wiesen durchgehend einen starken aberranten aber weitgehend einheitlichen Chromosomensatz mit 2-3 Marker-Chromosomen auf.

#### Chromosomenanalyse:

**45,XY**, der(3)t(3;?)(?q26), del(3)(?q26), -5, -15, del(16)(q22), -20, -21, +3mar [4]

**44,XY**, der(3)t(3;?)(?q26), del(3)(?q26), -5, -15, del(16)(q22), -20, -21, +2mar [1]

#### SKY-Chromosomenanalyse:

Es wurden sechs Metaphasen karyotypisiert.

#### Karyotypen:

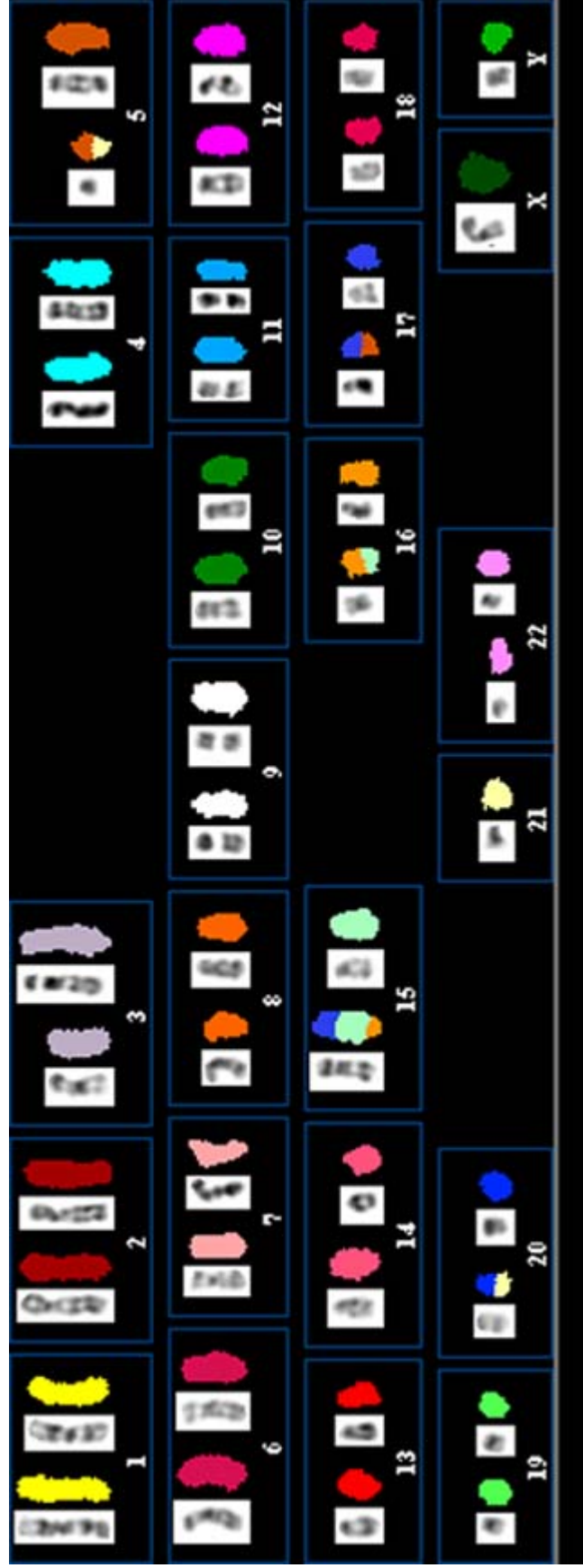
- **45,XY**, del(3)(q26), der(5)t(5;21)(?;?),  
der(15)del(15)(q25)t(15;17)(p10;q21)t(15;16)(q25;q11.2),  
der(16)t(15;16)(?;q10), der(17)t(5;17)(?;q21), der(20)t(20;21)(q10;q10), -21 [3]

- **44,XY**, del(3)(q26), der(5)t(5;21)(?;?),  
der(15)del(15)(q25)t(15;17)(p10;q21)t(15;16)(q25;q11.2) , -16,  
der(17)t(5;17)(?;q21), der(20)t(20;21)(q10;q10), -21 **[1]**
- **44,XY**, del(3)(q26), -5, +12,  
der(15)del(15)(q25)t(15;17)(p10;q21)t(15;16)(q25;q11.2) ,  
der(16)t(15;16)(?;q10), -17, der(20)t(20;21)(q10;q10), -21 **[1]**
- **42,XY**, del(3)(q26), -5, -14,  
der(15)del(15)(q25)t(15;17)(p10;q21)t(15;16)(q25;q11.2) , -16,  
der(17)t(5;17)(?;q21), der(20)t(20;21)(q10;q10), -21 **[1]**

Die SKY-Chromosomenanalyse hat die zytogenetische Untersuchung verfeinert, so dass hiermit auch die Marker-Chromosomen weitgehend identifiziert wurden. Die sechs SKY-Karyotypen zeigen alle eine partielle Deletion am langen Arm (q26) des Chromosoms 3, aber es wurde kein derivatives Chromosom 3 gefunden, sondern nur ein normales Chromosom 3. Es wurden fünf derivative Chromosomen {der(5)t(5;21)(?;?), der(15)t(15;16;17)(p10;q11.2;q21), der(16)t(15;16)(?;q10), der(17)t(5;17)(?;q21), der(20)t(20;21)(q10;q10)} gefunden, in denen zwei oder drei Chromosomen involviert waren (siehe Abb. 12). Drei von sechs Karyotypen zeigen einen einheitlichen aberranten Chromosomensatz. Die andere Hälfte der Karyotypen war mit zusätzlichen numerischen Aberrationen behaftet. Aber alle Karyotypen weisen einheitlich eine del(3)(q26), der(15)del(15)(q25)t(15;17)(p10;q21)t(15;16)(q25;q11.2), der(20)t(20;21)(q10;q10), -21 auf. Der wechselnde Chromosomenverlust ist vermutlich präparativ bedingt.

Abb. 12: Fall Nr.1

SKY-Chromosomenanalyse



**Karyotyp:** 45,XY, del(3)(q26), der(5)t(5;21)(?;?), der(15)del(15)(q25)t(15;17)(p10;q21)t(15;16)(q25;q11.2), der(16)t(15;16)(?;q10), der(17)t(5;17)(?;q21), der(20)t(20;21)(q10;q10), -21



**Fall Nr. 2:**

**Diagnose:** Hier handelte es sich um eine 75 jährige Patientin mit der Diagnose eines myelodysplastischen Syndroms vom Typ Refraktäre Anämie mit Exzeß von Blasten (RAEB) in Übergang zur sekundären Akute Myeloische Leukämie (AML).

**Konventionelle Zytogenetik:**

Die mit GM-CSF-stimulierten Knochenmarkszellen weisen regelmäßig einen hypodiploiden Chromosomensatz mit mehreren strukturellen Umbauten und Marker-Chromosomen auf. Ein einheitlicher Karyotyp war nicht feststellbar.

**Chromosomenanalyse:**

**41-42,XX [11]** hypodiploider Chromosomensatz mit mehreren Marker-Chromosomen

**SKY-Chromosomenanalyse:**

Es wurden sieben Metaphasen karyotypisiert.

**Karyotypen:**

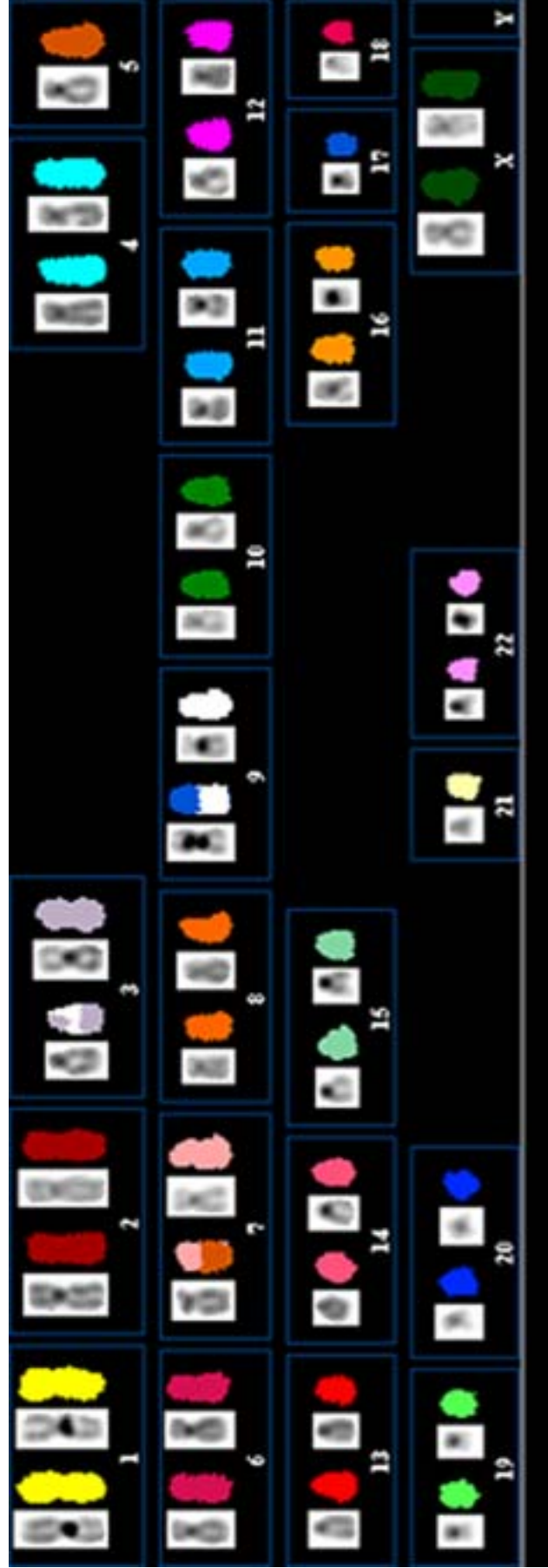
- **42,XX**, + der(3)del(3)(p10)ins(3;9)(q13q22;?), -5, der(7)t(5;7)(?q14;q21), -8, der(9)t(9;17)(p21;p10), -17, -18, -21 **[2]**
- **42,XX**, der(3)del(3)(p10)ins(3;9)(q13q22;?), -5, der(7)t(5;7)(?q14;q21), der(9)t(9;17)(p21;p10), -17, -18, -21 **[2]**
- **42,XX**, + der(3)del(3)(p10)ins(3;9)(q13q22;?), -5, der(7)t(5;7)(?q14;q21), der(9)t(9;17)(p21;p10), -11, -17, -18, -21 **[1]**
- **42,XX**, -5, der(7)t(5;7)(?q14;q21), der(9)t(9;17)(p21;p10), -17, -18, -21 **[1]**
- **41,XX**, der(3)del(3)(p10)ins(3;9)(q13q22;?), -5, der(7)t(5;7)(?q14;q21), der(9)t(9;17)(p21;p10), -17, -18, -20, -21 **[1]**

Durch die SKY-Chromosomenanalyse konnten die strukturellen Aberrationen fast vollständig aufgeklärt werden. Es konnten drei derivative Chromosomen identifiziert werden, die in allen karyotypisierten Metaphasen vorkommen. Die untersuchten Karyotypen besitzen einheitlich folgende Aberrationen: der(3)del(3)(p10)ins(3;9)(q13q22;?), -5, der(7)t(5;7)(?q14;q21), der(9)t(9;17)(p21;p10), -17, -18, -21 (siehe Abb. 13). Der wechselnde Chromosomen-verlust ist vermutlich präparativ bedingt oder es handelt sich um mehrere Zellklone, die sich aber nur durch zusätzlichen Chromosomenverlust unterscheiden. Sechs

Metaphasen besitzen entweder ein derivatives Chromosom 3 oder zwei normale Chromosomen 3 und zusätzlich ein derivatives Chromosom 3.

Abb. 13: Fall Nr.2

SKY-Chromosomenanalyse



**Karyotyp:** 42,XX, der(3)del(3)(p10)ins(3;9)(q13q22;?), -5, der(7)t(5;7)(?q14;q21), der(9)t(9;17)(p21;p10), -17, -18, -21

**Fall Nr. 3:**

**Diagnose:** Hier handelte es sich um einen 70 jährigen Patienten mit dem Verdacht auf Akute Myeloische Leukämie (AML).

**Konventionelle Zytogenetik:**

Die mit GM-CSF-stimulierten Knochenmarkszellen weisen überwiegend eine Monosomie 7 auf.

**Chromosomenanalyse:**

45,XY, -7 [17]

46,XY [2]

44,XY, -7, -18 [1]

**SKY-Chromosomenanalyse:**

Es konnten nur zwei Metaphasen karyotypisiert werden.

**Karyotypen:**

- 45,XY, -7 [1]
- 44,XY, -7, -15 [1]

Der zytogenetische Befund wurde durch die SKY-Chromosomenanalyse bestätigt. Es liegt eine Monosomie 7 vor (siehe Abb. 14). Der normale Zellklon wurde nicht mit erfasst, da nur zwei Metaphasen mit SKY karyotypisiert werden konnten. Der Verlust von Chromosom 15 ist vermutlich präparativ bedingt.

Abb. 14: Fall Nr.3

SKY-Chromosomenanalyse



Karyotyp: 45,XY,-7

**Fall Nr. 4:**

**Diagnose:** Hier handelte es sich um einen 68 jährigen Patienten mit dem Verdacht auf Akute Myeloische Leukämie (AML) M4.

**Konventionelle Zytogenetik:**

Ca. 70% der mit GM-CSF-stimulierten Knochenmarkszellen weisen einen stark aberranten Karyotyp auf. Daneben liegt aber auch noch ein Zellklon mit unauffälligem Karyotyp vor, der etwa 30% der Metaphasen umfasst.

**Chromosomenanalyse:**

**44,XY, -1, -2, -10, -14, -15, -17, -19, +5mar [13]**

**46,XY [7]**

**SKY-Chromosomenanalyse:**

Es konnten nur zwölf Metaphasen karyotypisiert werden.

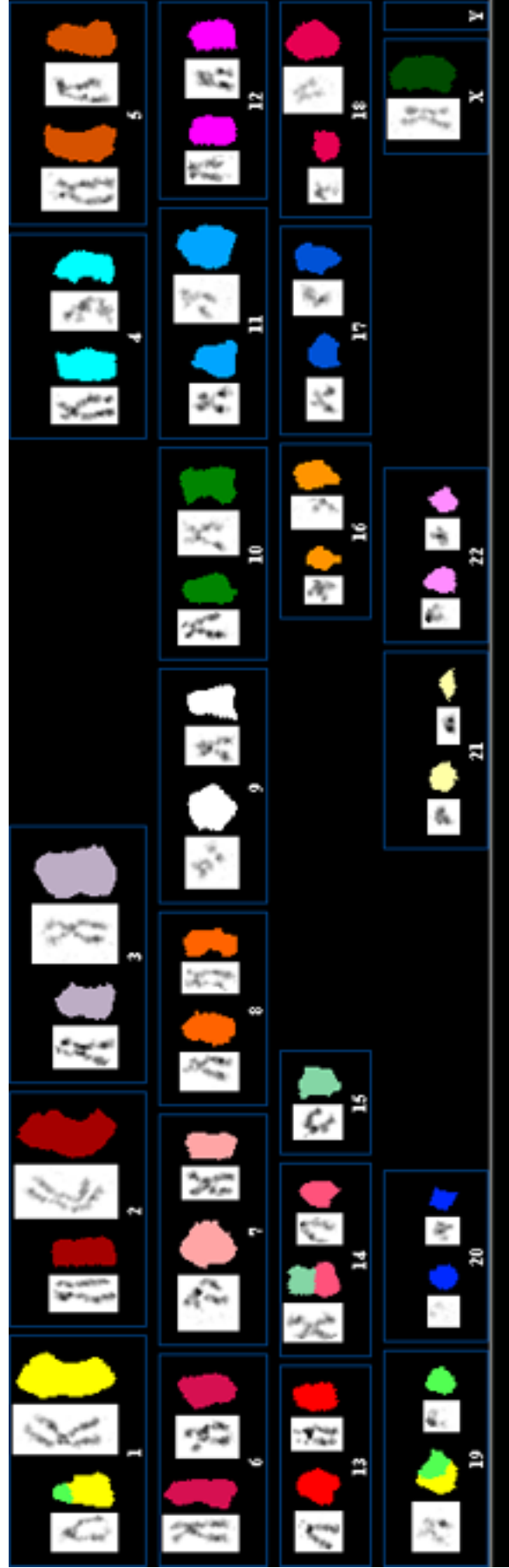
**Karyotypen:**

- **46,XY [2]**
- **45,XY, der(14;15)(q10;q10) [1]**
- **44,X, der(1)del(1)(p10)t(1;19)(p10;q13), del(2)(p22), der(14;15)(q10;q10), der(19)t(1;19)(?;q13), -Y [8]**
- **37,X, der(1)del(1)(p10)t(1;19)(p10;q13), del(2)(p22), -4, -5, -7, -8, der(14;15)(q10;q10), -17, -18, -19, -Y [1]**

8 von 12 (ca.67% ) der karyotypisierten Metaphasen weisen den stark aberranten Karyotypen 44,X, der(1)del(1)(p10)t(1;19)(p10;q13), del(2)(p22), der(14;15)(q10;q10), der(19)t(1;19)(?;q13), -Y auf (siehe Abb. 15). 2 von 12 Metaphasen hatten aber den unauffälligen Karyotyp 46,XY. Eine einzige Metaphase wies eine Robertson'sche Translokation auf, so dass die langen Arme von Chromosom 14 und 15 unter Verlust der kurzen Arme beider Chromosomen fusioniert waren. Die SKY-Chromosomenanalyse hat die G-Bänderungsanalyse verfeinert und teilweise korrigiert. Bei allen stark aberranten Metaphasen, die mit SKY analysiert worden sind, liegt ein Y-Chromosomenverlust vor. Aber bei G-Bänderungsanalyse schien immer das Y-Chromosom vorhanden zu sein.

Abb. 15: Fall Nr.4

SKY-Chromosomenanalyse



**Karyotyp:** 44,X, der(1)del(1)(p10)t(1;19)(p10;q13), del(2)(p22), der(14;15)(q10;q10), der(19)t(1;19)(?:q13), -Y

**Fall Nr. 5:**

**Diagnose:** Hier handelte es sich um einen 64 jährigen Patienten mit dem Verdacht auf Akute Myeloische Leukämie (AML).

**Konventionelle Zytogenetik:**

Durch die konventionelle zytogenetische Untersuchung der mit GM-CSF stimulierten Zellen wurde festgestellt, dass mindestens drei Zellklone vorliegen, wobei der Karyotyp 51,XY, -2, der(7q), +8, +8, +8, +9, -13, +15, -17, -20, +4mar am häufigsten vertreten war. Der zweithäufigste Zellklon war der Karyotyp 50,XY, -2, +8, +8, +9, -13, +15, -17, -20, +4mar. Der zweite Zellklon unterscheidet sich von dem ersten Zellklon nur durch das Fehlen des (7q)-Chromosoms und das Vorhandensein einer Tetrasomie 8 anstelle einer Pentasomie 8. Der dritte Zellklon hat wahrscheinlich einen normalen Karyotypen (46,XY).

**Chromosomenanalyse:**

**51,XY, -2, der(7q), +8, +8,+8, +9, -13, +15, -17, -20, +4mar [6]**

**50,XY, -2, +8, +8, +9, -13, +15, -17, -20, +4mar [3]**

**46,XY [1]**

**SKY-Chromosomenanalyse:**

Es konnten nur acht Metaphasen karyotypisiert werden.

**Karyotypen:**

- **46,XY [1]**
- **50,XY, der(2)del(2)(q12)t(2;17;20)(q12;q12;q12), der(7)t(7;13)(q21;q12), +3x 8, +9, -13, +15, der(17)t(7;17)(q21;q12), del(20)(q12) [2]**
- **49,XY, der(2)del(2)(q12)t(2;17;20)(q12;q12;q12), der(7)t(7;13)(q21;q12), +2x 8, +9, der (13)t(2;13)(q12;q12), +15, der(17)t(7;17)(q21;q12), del(20)(q12), -21 [1]**
- **51,XY, der(2)del(2)(q12)t(2;17;20)(q12;q12;q12), der(7)t(7;13)(q21;q12), +3x 8, +9, der (13)t(2;13)(q12;q12) , +15, der(17)t(7;17)(q21;q12), del(20)(q12) [2]**
- **50,XY, der(2)del(2)(q12)t(2;17;20)(q12;q12;q12), der(7)t(7;13)(q21;q12), +3x 8, +9, -12, der (13)t(2;13)(q12;q12) , +15, der(17)t(7;17)(q21;q12), del(20)(q12) [1]**
- **50,XY, der(2)del(2)(q12)t(2;17;20)(q12;q12;q12), der(7)t(7;13)(q21;q12), +3x 8, +9, der (13)t(2;13)(q12;q12) , +15, der(17)t(7;17)(q21;q12), del(20)(q12), -21 [1]**



Die SKY-Chromosomenanalyse hat die G-Bänderung insofern bestätigt, dass die mindestens drei Zellklone zumindest vorhanden sind. Die SKY konnte die G-Bänderungsanalyse jedoch noch verfeinern und die Marker-Chromosomen identifizieren. Der größte Teil der mit SKY karyotypisierten Metaphasen weisen den Karyotyp 51,XY, der(2)del(2)(q12)t(2;17;20)(q12;q12;q12), der(7)t(7;13)(q21;q12), +3x 8, +9, der (13)t(2;13)(q12;q12) , +15, der(17)t(7;17)(q21;q12), del(20)(q12) auf (siehe Abb. 16). Der kleinere Zellklon mit dem Karyotyp 50,XY, der(2)del(2)(q12) t(2;17;20)(q12;q12;q12), der(7)t(7;13)(q21;q12), +3x 8, +9, -13, +15, der(17) t(7;17)(q21;q12), del(20)(q12) unterscheidet sich nur durch das Fehlen des Chromosoms 13. Es wurde auch eine Metaphase mit dem unauffälligen Karyotyp 46,XY gefunden, die wahrscheinlich auf einen kleinen normalen Zellklon hindeutet.

Abb. 16: Fall Nr.5

SKY-Chromosomenanalyse



**Karyotyp:** 51,XY,  $\text{der}(2)\text{del}(2)(q12)t(2;17;20)(q12;q12;q12)$ ,  $\text{der}(7)t(7;13)(q21;q12)$ ,  $\text{der}(13)t(2;13)(q12;q12)$ ,  $+15$ ,  $\text{der}(17)t(7;17)(q21;q12)$ ,  $\text{del}(20)(q12)$

**Fall Nr. 6:**

**Diagnose:** Hier handelte es sich um einen 48 jährigen Patienten mit dem Verdacht auf Chronische Myeloische Leukämie (CML).

**Konventionelle Zytogenetik:**

Die mit GM-CSF stimulierten Knochenmarkszellen weisen durchgehend ein Philadelphia-Chromosom auf, so dass sich der Karyotyp 46,XY, t(9;22)(q34;q11) ergibt.

**Chromosomenanalyse:**

**46,XY, t(9;22)(q34;q11) [5]**

**SKY-Chromosomenanalyse:**

Es konnten fünf Metaphasen mittels spektraler Karyotypisierung (SKY) untersucht.

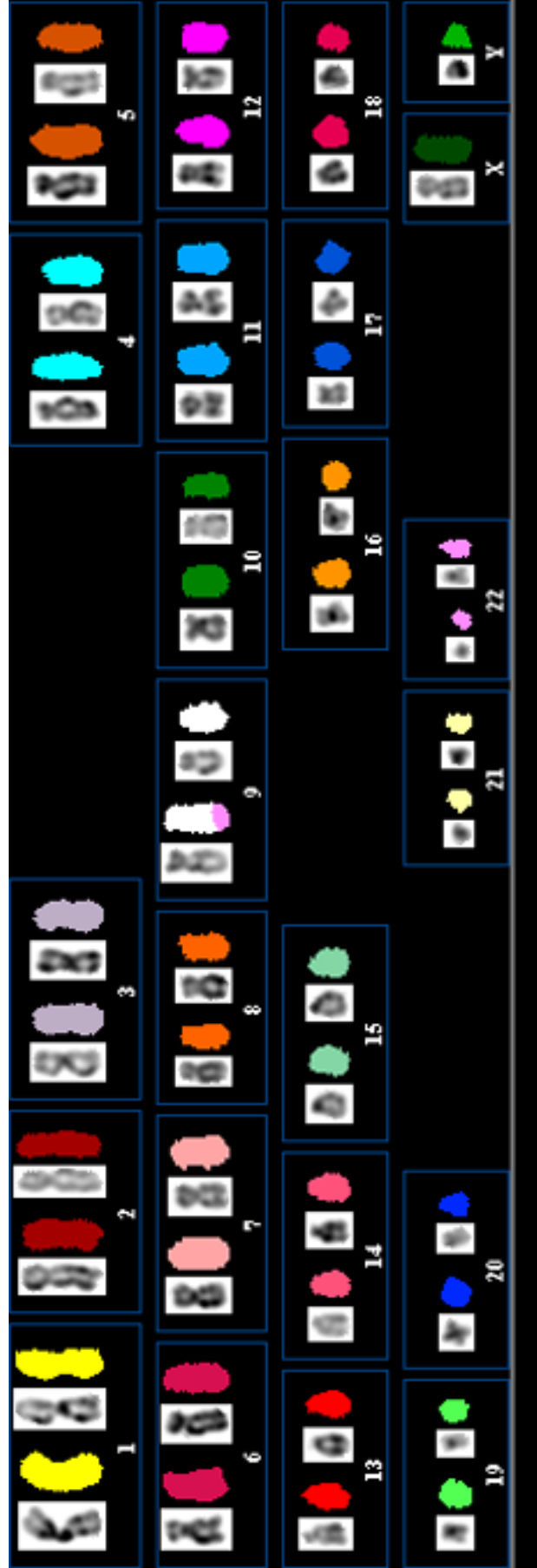
**Karyotyp:**

**46,XY, t(9;22)(q34;q11) [5]**

Die SKY-Analyse bestätigte die G-Bänderungsanalyse insofern, als dass nur ein Philadelphia-Chromosom vorliegt und keine weiteren chromosomalen Veränderungen vorhanden sind (siehe Abb. 17).

Abb. 17: Fall Nr.6

SKY-Chromosomenanalyse



Karyotyp: 46,XY, t(9;22)(q34;q11)

**Fall Nr. 7:**

**Diagnose:** Hier handelte es sich um eine 67 jährige Patientin mit dem Verdacht auf Myelodysplastische Syndrom (MDS) bei Panzytopenie.

**Konventionelle Zytogenetik: arkszellen**

Die mit GM-CSF stimulierten Knochenmarkszellen weisen in etwa 60% der karyotypisierten Metaphasen eine partielle Trisomie 1q auf, so dass sich der Karyotyp 47,XX, +del(1qh+)(p13), 1qh+ ergibt. Daneben findet sich in etwa 40% der Metaphasen der Karyotyp 46,XX, 1qh+.

**Chromosomenanalyse:**

**47,XX, +del(1qh+)(p13), 1qh+ [11]**

**46,XX, 1qh+ [8]**

**46XX, -5, +del(1qh+)(p13), 1qh+ [1]**

**SKY-Chromosomenanalyse:**

Es wurden zwei Metaphasen mittels spektraler Karyotypisierung (SKY) untersucht.

**Karyotyp:**

**47,XX, +der(1h+) del(1)(p11)t(1;19)(p11;?) [2]**

Die SKY-Analyse hat die zytogenetische Untersuchung noch verfeinert. Die mittels SKY karyotypisierten Metaphasen weisen nicht nur eine partielle Trisomie 1q auf, sondern auch eine partielle Trisomie 1q mit transloziertem Material von Chromosom 19 auf dem kurzen Arm des zusätzlichen Chromosoms 1, so dass sich der Karyotyp 47,XX, +der(1h+) del(1)(p11)t(1;19)(p11;?) ergibt (siehe Abb. 18). Die Chromosomenanomalie +1q findet sich bei ca. 5% der MDS-Patienten. Der Bruchpunkt auf Chromosom 19 konnte nicht genau identifiziert werden, da die Qualität der DAPI-Bänderung nicht gut war. Aber man kann nur vermuten, dass der Bruchpunkt in der Bande p13 vom kurzen Arm des Chromosoms 19 liegt. Es war auch erkennbar, dass sich das zentromernahen Heterochromatin deutlich vergrößert hat.

Abb. 18: Fall Nr.7

SKY-Chromosomenanalyse



Karyotyp : 47,XX, +der(1h+) del(1)(p11)t(1;19)(p11;?)

**Fall Nr. 8:**

**Diagnose:** Hier handelte es sich um eine 74 jährige Patientin mit dem Verdacht auf Myelodysplastische Syndrom (MDS) / einer atypischen Zellpopulation in Knochenmark.

**Konventionelle Zytogenetik:**

Die mit GM-CSF stimulierten Knochenmarkszellen weisen durchgehend mehrere sehr ähnliche strukturelle Aberrationen der Chromosomen 7, 12, 13 und 16 auf.

**Chromosomenanalyse:**

**46,XX**, 7q-, 12q+, 13q-, 16q- [5]

**SKY-Chromosomenanalyse:**

Es wurden fünf Metaphasen mittels spektraler Karyotypisierung (SKY) untersucht.

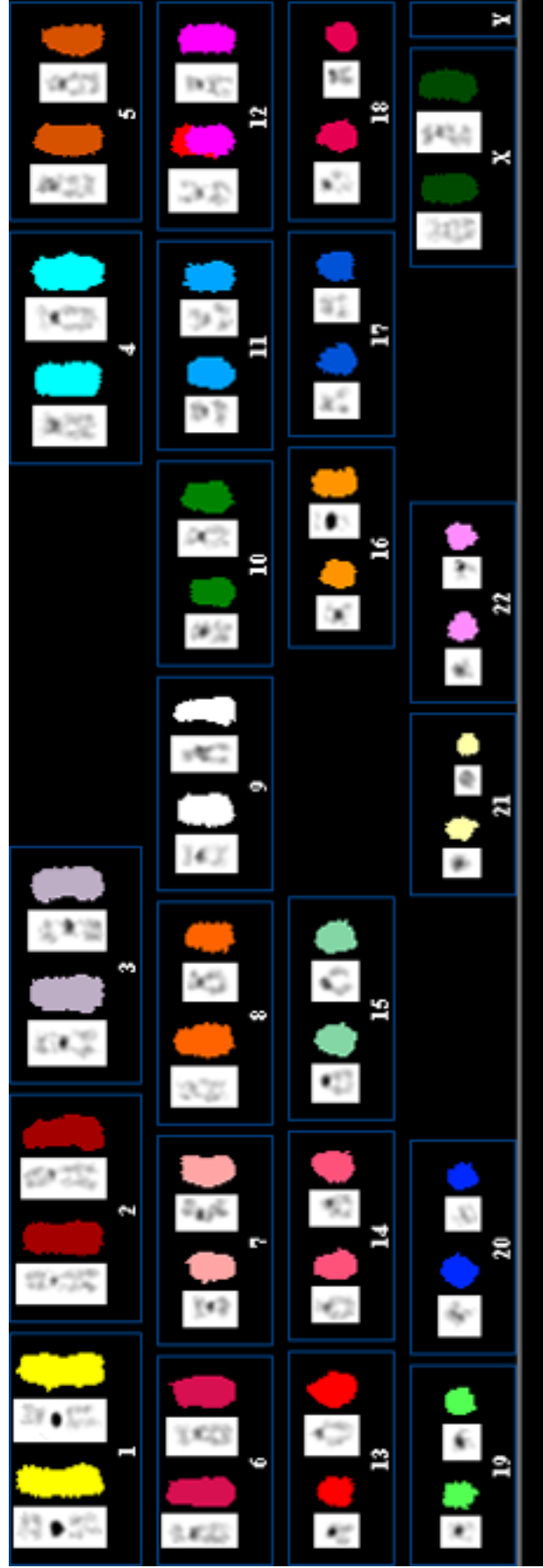
**Karyotypen:**

- **46,XX**, del(7)(q31), der(12)t(12;13)(p13;q31), del(13)(q31) , del(16)(q21) [4]
- **45,XX**, del(7)(q31), der(12)t(12;13)(p13;q31), del(13)(q31) , del(16)(q21), -21 [1]

Mit Hilfe der SKY-Chromosomenanalyse konnte die Verlängerung vom kurzen Arm des Chromosoms 12 geklärt werden: Hierbei handelt es sich um eine unbalancierte Translokation zwischen den Chromosomen 12 und 13, bei der Material von Chromosom 13 auf den kurzen Arm von Chromosom 12 transloziert ist (siehe Abb. 19). Die Deletionen, die an den langen Armen von Chromosomen 7 und 16 zu sehen sind, konnten bestätigt werden.

Abb. 19: Fall Nr.8

SKY-Chromosomenanalyse



Karyotyp: 46,XX, del(7)(q31), der(12)t(12;13)(p13;q31), del(13)(q31), del(16)(q21)



**Fall Nr. 9:**

**Diagnose:** Hier handelte es sich um einen 69 jährigen Patienten mit dem Verdacht auf Akute Myeloische Leukämie (AML).

**Konventionelle Zytogenetik:**

Die mit GM-CSF stimulierten Knochenmarkszellen weisen mehrere unterschiedliche aberranten Karyotypen auf. In allen karyotypisierten Metaphasen liegt eine Monosomie 5 und 7 vor. Alle Karyotypen besitzen drei bis vier Marker-Chromosomen.

**Chromosomenanalyse:**

**47,XY, -5, -7, +3mar [2]**

**47,XY, -5, -7, -21, +4mar [1]**

**46,XY, -5, -7, -21, +3mar [3]**

**45,X, Y, -5, -7, -21, +3mar [1]**

**SKY-Chromosomenanalyse:**

Es wurden fünf Metaphasen mittels spektraler Karyotypisierung (SKY) untersucht.

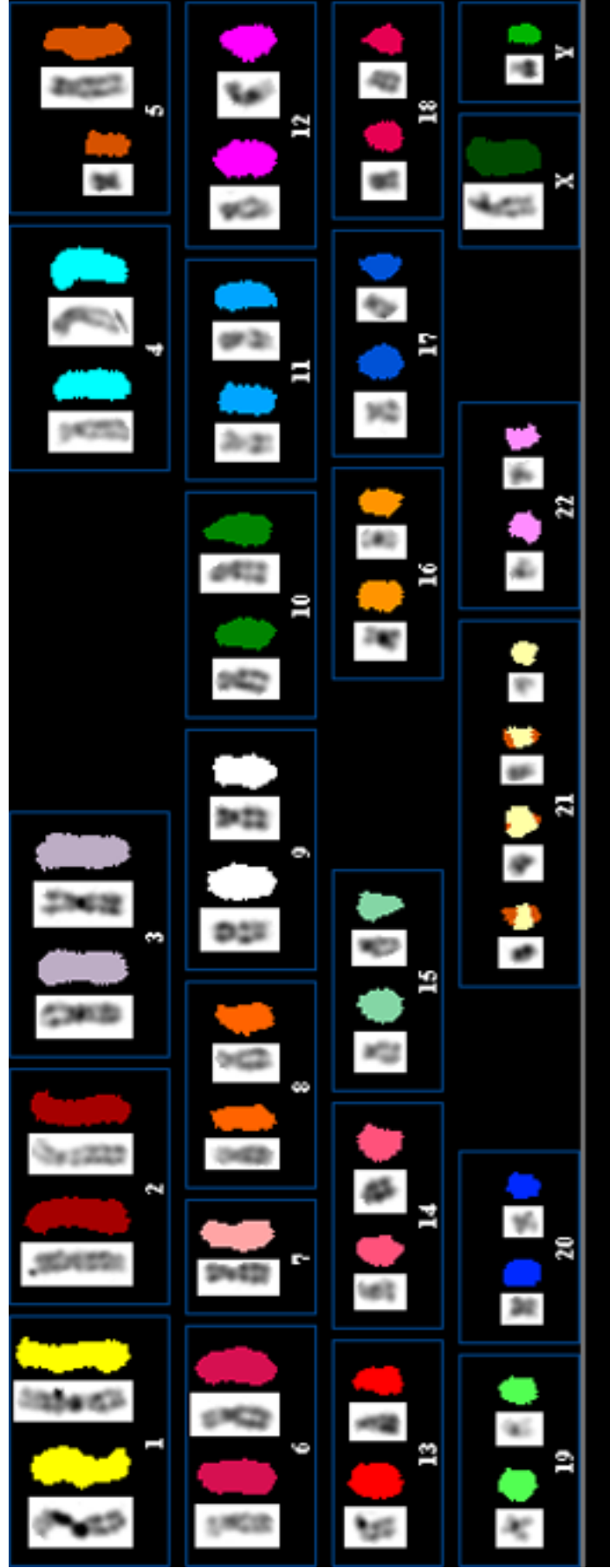
**Karyotypen:**

- **46,XY, del(5)(q13), -7, +2x der(21)t(5;21)(?;?), -21 [4]**
- **47,XY, del(5)(q13), -7, +3x der(21)t(5;21)(?;?), -21 [1]**

Die SKY-Chromosomenanalyse zeigt in allen Metaphasen fast gleiche Aberrationen. In 4 von 5 der Metaphasen ergibt sich der Karyotyp 46,XY, del(5)(q13), -7, +2x der(21)t(5;21)(?;?), -21. In einer einzigen Metaphase liegt noch zusätzlich ein derivatives Chromosom 21 vor (siehe Abb. 20). Chromosom 7 und 21 fehlen in allen Metaphasen. Alle derivativen Chromosomen sind klein und bestehen aus Material von Chromosom 5 und 21. Die Bruchpunkte von den derivativen Chromosomen konnten nicht identifiziert werden, da die DAPI-Bänderung nicht gut genug war. Eine partielle Monosomie 5q13 war in allen Metaphasen vorhanden. Monosomie 5 und 7 kommt bei AML und MDS vor.

Abb. 20: Fall Nr.9

SKY-Chromosomenanalyse



**Karyotyp:** 47,XY, del(5)(q13), -7, +3x der(21)t(5;21)(?;?), -21

**Fall Nr. 10:**

**Diagnose:** Hier handelte es sich um einen 37 jährigen Patienten mit dem Verdacht auf Akute Myeloische Leukämie (AML).

**Konventionelle Zytogenetik:**

70% der mit GM-CSF stimulierten Knochenmarkszellen weisen eine Monosomie 7 auf und 30% der Knochenmarkszellen haben einen normalen diploiden männlichen Chromosomensatz.

**Chromosomenanalyse:**

**45,XY, -7 [14]**

**46,XY [6]**

**SKY-Chromosomenanalyse:**

Es wurden vier Metaphasen mittels spektraler Karyotypisierung (SKY) untersucht.

**Karyotypen:**

- **45,XY, der(14;21)(q10;q10) [1]**
- **44,XY, -7, -22 [1]**
- **45,XY, -7 [1]**
- **44,XY, -7, -21 [1]**

Die SKY-Chromosomenanalyse hat bestätigt, dass ca. 70% der Metaphasen eine Monosomie 7 aufweisen. Es liegt aber auch eine Metaphase mit der Robertson'schen Translokation der(14;21)(q10;q10) (siehe Abb. 21) vor. Das ist ein Hinweis auf einen weiteren zytogenetisch veränderten kleinen Zellklon.

Abb. 21: Fall Nr.10

SKY-Chromosomenanalyse



Karyotyp: 45,XY, der(14;21)(q10;q10)

**Fall Nr. 11:**

**Diagnose:** Hier handelte es sich um einen 73 jährigen Patienten mit dem Verdacht auf ein Megakaryozytäres Myelom.

**Konventionelle Zytogenetik:**

Die mit GM-CSF stimulierten Knochenmarkszellen weisen durchgehend mehrere numerische und strukturelle Aberrationen auf, die sehr einheitlich aussehen. Als Karyotyp wurde 46,XY, -1, -5, -17, +3mar, 12p+?, 20q- angegeben.

**Chromosomenanalyse:**

**46,XY, -1, -5, -17, +3mar, 12p+?, 20q- [10]**

**SKY-Chromosomenanalyse:**

Es konnten nur zwei Metaphasen mittels spektraler Karyotypisierung (SKY) untersucht werden.

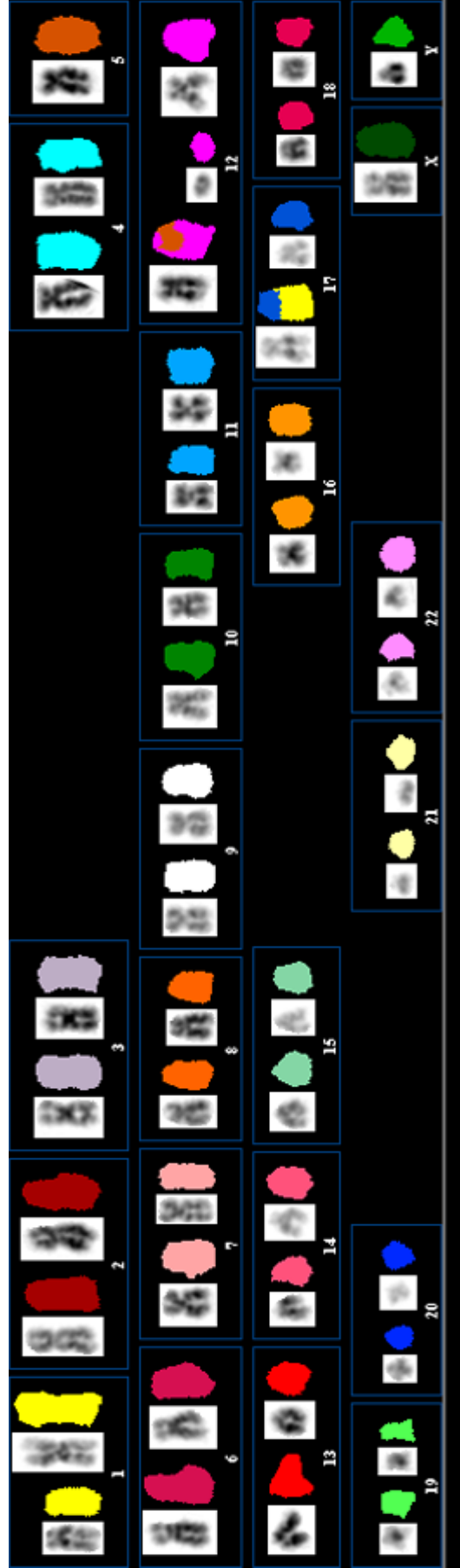
**Karyotyp:**

• **46,XY, del(1)(p22), -5, der(12)t(5;12)(?;p10), +del(12)(q10), der(17)t(1;17)(p22;q21), del(20)(q12) [2]**

Mit Hilfe der SKY-Chromosomenanalyse konnten die Marker-Chromosomen identifiziert werden (siehe Abb. 22). Das erste Marker-Chromosom wurde als deletiertes Chromosom 1 [del(1)(p22)] identifiziert. Das zweite Marker-Chromosom wurde als deletiertes Chromosom 12 [del(12)(q10)] identifiziert. Das dritte Marker-Chromosom wurde als derivatives Chromosom 17 [der(17)t(1;17)(p22;q21)] identifiziert. Das verlängerte Chromosom 12 ist ein derivatives Chromosom 12, wobei der kurze Arm von Chromosom 12 mit unbekanntem Material von Chromosom 5 ausgetauscht ist. Das deletierte Chromosom 20 konnte bestätigt werden.

Abb. 22: Fall Nr.11

SKY-Chromosomenanalyse



**Karyotyp:** 46,XY, del(1)(p22), -5, der(12)t(5;12)(?:p10), +del(12)(q10), der(17)t(1;17)(p22;q21), del(20)(q12)

**Fall Nr. 12:**

**Diagnose:** Hier handelte es sich um eine 76 jährigen Patientin mit dem Verdacht auf Akute Myeloische Leukämie (AML).

**Konventionelle Zytogenetik:**

Die mit GM-CSF stimulierten Knochenmarkszellen weisen durchgehend stark aberrante Karyotypen auf. Der Hauptklon weist den Karyotyp 44,XX, -5, -11, -12, 2x -13, -18, -22, +5mar, der(1), der(7) auf. Der zweite Zellklon weist zusätzlich noch eine strukturelle Aberration an einem Chromosom 4 auf.

**Chromosomenanalyse:**

**44,XX**, -5, -11, -12, -2x 13, -18, -22, +5mar, der(1), der(7) **[5]**

**44,XX**, -5, -11, -12, -2x 13, -18, -22, +5mar, der(1), der(4), der(7) **[2]**

**43,XX**, -5, -11, -12, -2x 13, -18, -21, -22, +5mar, der(1), der(7) **[1]**

**SKY-Chromosomenanalyse:**

Es konnten nur zwei Metaphasen mittels spektraler Karyotypisierung (SKY) untersucht werden.

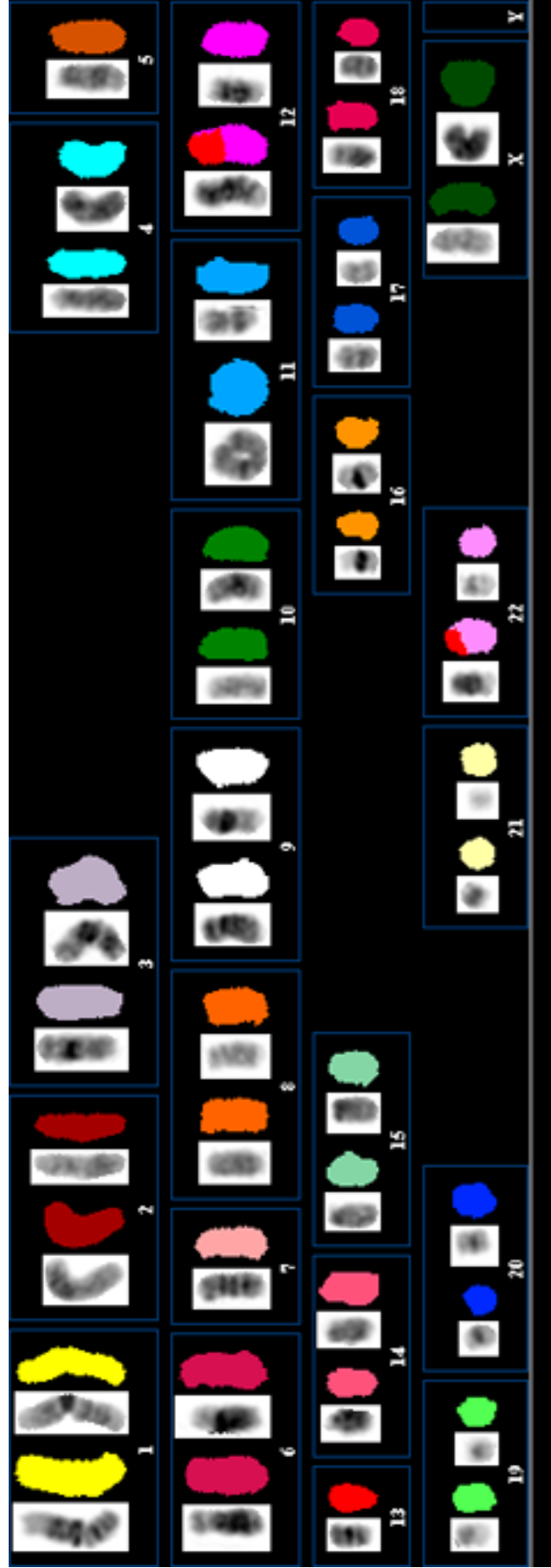
**Karyotypen:**

- **43,XX**, -5, -7, r(11)(p15;q24), der(12)t(12;13)(p13;?), -13, add(18)(p11), der(22)t(13;22)(?;p13).
- **44,XX**, del(5)(q11), -7, r(11)(p15;q24), der(12)t(12;13)(p13;?), -13, add(18)(p11), der(22)t(13;22)(?;p13).

Mit Hilfe der SKY-Chromosomenanalyse konnten die Marker-Chromosomen identifiziert werden und die konventionelle zytogenetische Chromosomenanalyse korrigiert werden. In den zwei Metaphasen liegen eine Monosomie 7, ein Ringchromosom 11, der(12), eine Addition 18 und der(22) vor (siehe Abb. 23). Die Bruchpunkte von Chromosom 13 konnten nicht genau identifiziert werden, da die DAPI-Bänderung nicht eindeutig war.

Abb. 23: Fall Nr.12

SKY-Chromosomenanalyse



**Karyotyp:** 43,XX,-5,-7,r(11)(p15;q24),der(12)t(12;13)(p13;?),-13,add(18)(p11),der(22)t(13;22)(?:p13)



**Fall Nr. 13:**

**Diagnose:** Hier handelte es sich um einen 86 jährigen Patienten mit dem Verdacht auf Myelodysplastische Syndrom (MDS).

**Konventionelle Zytogenetik:**

90% der mit GM-CSF stimulierten Knochenmarkszellen weisen einen Verlust des Y-Chromosoms und ein Marker-Chromosom auf.

**Chromosomenanalyse:**

**46,X, -Y, +mar [18]**

**45,X, -X [1]**

**45,X, -Y, -13, +mar [1]**

**SKY-Chromosomenanalyse:**

Es wurden nur zwei Metaphasen mittels spektraler Karyotypisierung (SKY) untersucht.

**Karyotyp:**

- 46,XY [2]

Die mittels SKY untersuchten Metaphasen zeigen den Karyotyp 46,XY. Das Marker-Chromosom wurde als Y-Chromosom identifiziert (siehe Abb. 24). Es ist daher wahrscheinlich, dass der Patient ein strukturell verändertes Y-Chromosom besitzt.

Abb. 24: Fall Nr. 13

SKY-Chromosomenanalyse



Karyotyp: 46,XY

**Fa1Nr. 14:**

**Diagnose:** Hier handelte es sich um einen 48 jährigen Patienten mit dem Verdacht auf Panzytopenie.

**Konventionelle Zytogenetik:**

Die mit GM-CSF stimulierten Knochenmarkszellen weisen einen numerisch und strukturell aberranten Karyotyp mit bis zu 14 Marker-Chromosomen auf. Nur eine einzige Metaphase liegt mit einem normalen männlichen Karyotyp 46,XY vor. Die mit TPA-stimulierten Knochenmarkszellen weisen allerdings einen unauffälligen männlichen Chromosomensatz 46,XY auf.

**Chromosomenanalyse:**

**37-38,X, -Y, mit 13 bis 14 Marker-Chromosomen [8]**

**46,XY [11]**

**SKY-Chromosomenanalyse:**

Es wurden fünf Metaphasen mittels spektraler Karyotypisierung (SKY) untersucht.

**Karyotypen:**

- **46,XY [1]**
- **43,XY, der(5)t(5;7)(q12;?), del(7)(q21.3), del(9)(q21.3), -9, der(12)t(12;15)(p12;q10), - 13, - 15, der(16)t(13;16)(?;p12)t(13;16)(?;q12), +der(16)t(13;16)(?;q12), -17, der(18)t(7;18)(?;p11), der(19)t(5;19)(?;p13), der(20)t(20;21)(p10;p10), der(21:21)(q10;q10), der(21)t(9;21)(q21.3;q22) [1]**
- **38,X, -3, der(5)t(5;15)(p15.2;q26), der(5)t(5;7)(q12;?), del(7)(q21.3), -7, der(8)t(8;16)(q24;p12), der(8)t(3;8)(q22;q23), del(9)(q21.3), -9, der(12)t(12;15)(p12;q10), -2x 15, -16, del(17)(q12), der(18)t(7;18)(?;q22), der(19)t(5;19)(?;p13), der(21)t(9;21)(q21.3;q22), -21, -Y [1]**
- **38,X, -3, der(5)t(5;15)(p15.2;q26), der(5)t(5;7)(q12;?), del(7)(q21.3), -7, der(8)t(8;16)(q24;p12), der(8)t(3;8)(q22;q23), del(9)(q21.3), -9, der(12)t(12;15)(p12;q10), -2x 15, -16, del(17)(q12), der(18)t(7;18)(?;q22), der(19)t(5;19)(?;p13), der(20)t(20;21)(p10;p10), der(21)t(9;21)(q21.3;q22), -21, -Y [1]**
- **36,X, -3, der(5)t(5;15)(p15.2;q26), der(5)t(5;7)(q12;?), del(7)(q21.3), -7, der(8)t(8;16)(q24;p12), der(8)t(3;8)(q22;q23), del(9)(q21.3), -9, der(12)t(12;15)(p12;q10), -13, -14, -2x 15, -16, del(17)(q12),**

der(18)t(7;18)(?;q22), der(19)t(5;19)(?;p13), der(20)t(20;21)(p10;p10),  
 der(21)t(9;21)(q21.3;q22), -21, -Y [1]

4 von 5 der mittels SKY karyotypisierten Metaphasen weisen einen numerisch und strukturell stark aberranten Karyotypen auf. Nur eine Metaphase zeigt einen normalen männlichen Karyotyp 46,XY. Die SKY-Chromosomenanalyse bestätigte die konventionelle Chromosomenanalyse. Es konnten jedoch alle Marker-Chromosomen identifiziert werden (siehe Abb. 25).

Die Knochenmarkszellen weisen mindestens drei aberrante Zellklone auf. Es wurde auch 50 Metaphasen auf numerische Aberrationen untersucht. Die Ergebnisse der numerischen Untersuchung der Chromosomen zeigen, dass mindestens zwei Hauptklone und mehrere kleinere Zellklone vorhanden sind (siehe Tabelle 14).

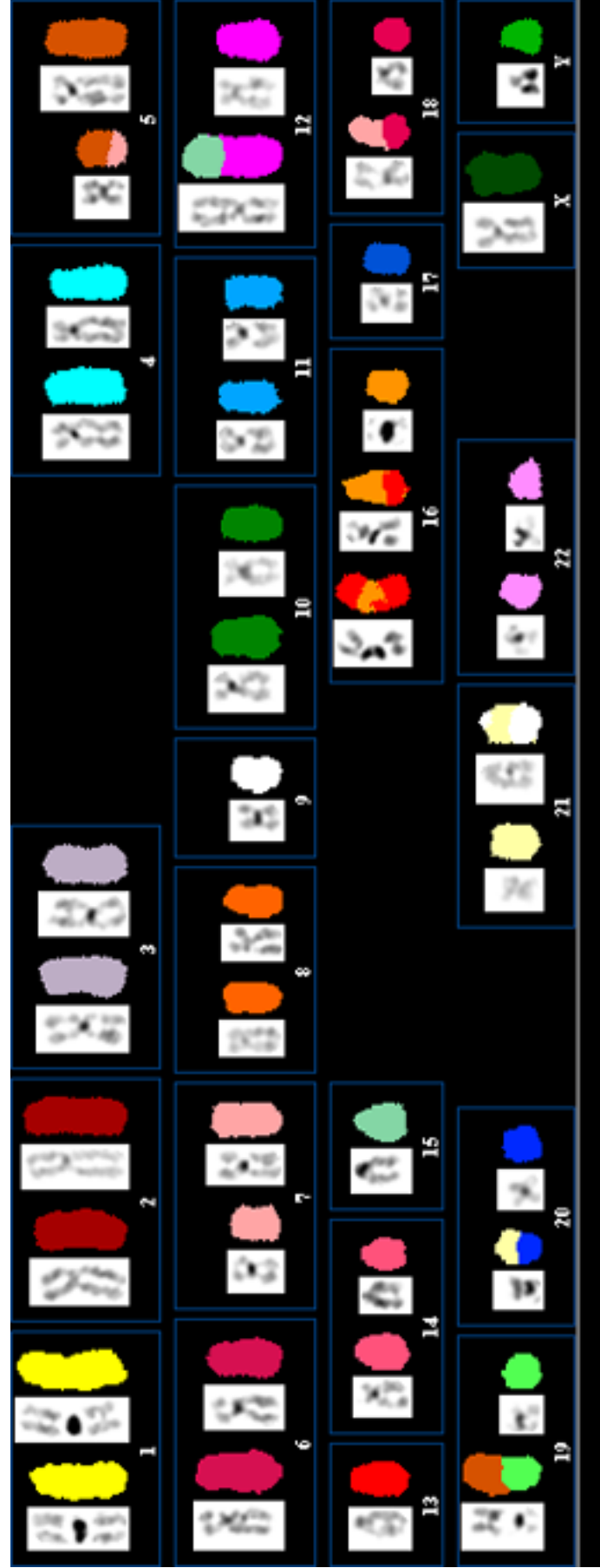
Chromosomenzahl	30	36	37	38	41	43	46
Metaphasenzahl	1	3	16	25	1	3	1

**Tabelle 14:** Übersicht über die Ergebnisse der numerischen Untersuchung

Die Chromosomen 5, 7, 9, 12, 15, 16, 17, 18, 19 und 21 waren in 49 von 50 karyotypisierten Metaphasen entweder numerisch oder strukturell aberrant.

Abb. 25: Fall Nr.14

SKY-Chromosomenanalyse



**Karyotyp: 43,XY, der(5)t(5;7)(q12;?), del(7)(q21.3), del(9)(q21.3), -9, der(12)t(12;15)(p12;q10), -13, -15, der(16)t(13;16)(?;p12)(?;q12), +der(16)t(13;16)(?;q12), -17, der(18)t(7;18)(?;p11), der(19)t(5;19)(?;p13), der(20)t(20;21)(p10;p10), der(21:21)(q10;q10), der(21)t(9;21)(q21.3;q22)**

**Fall Nr. 15:**

**Diagnose:** Hier handelte es sich um eine 77 jährige Patientin mit der Diagnose IgA-Plasmozytom.

**Konventionelle Zytogenetik:**

Die mit TPA/IL-2 stimulierten Knochenmarkszellen weisen einen normalen weiblichen Karyotyp 46,XX auf. Aber die unstimulierte Langzeitkultur der Knochenmarkszellen weist einen stark aberranten Karyotyp auf.

**Chromosomenanalyse:**

**46,XX [10]**

**46,X, -X, der(1), add(12)(p13), -13, +18, +19, -22, +mar [4]**

**SKY-Chromosomenanalyse:**

Es wurden zwei Metaphasen mittels spektraler Karyotypisierung (SKY) untersucht.

**Karyotyp:**

- **46,X, +der(8)t(1;8)(?:p23), der(12)t(1;12)(?:p13), -13, +18, +19, -22, -X [2]**

Die SKY-Chromosomenanalyse hat die konventionelle zytogenetische Untersuchung der Knochenmarkszellen noch verfeinert und das Marker-Chromosom identifiziert (siehe Abb. 26). In den zwei untersuchten Metaphasen liegen zwei derivative Chromosomen vor. Das Marker-Chromosom wurde als derivatives Chromosom 8 identifiziert. Das derivativen Chromosom 8 besteht aus einem vollständigen Chromosom 8 und transloziertem Material von Chromosom 1 am kurzen Arm von Chromosom 8. Das zweite derivative Chromosom besteht aus transloziertem Material von Chromosom 1 am kurzen Arm von Chromosom 12. Die Bruchpunkte des translozierten Materials von Chromosom 1 konnten nicht identifiziert werden, da die Bänderung der Chromosomen nicht gut war.

Abb. 26: Fall Nr.15

SKY-Chromosomenanalyse



**Karyotyp:** 46,X, +der(8)t(1;8)(?;p23), der(12)t(1;12)(?;p13), -13, +18, +19, -22, -X

**Fall Nr. 16:**

**Diagnose:** Hier handelte es sich um einen 64 jährigen Patienten mit dem Verdacht auf Mantelzell-Lymphom.

**Konventionelle Zytogenetik:**

50% der mit TPA-stimulierten Knochenmarkszellen zeigen einen Y-Verlust. Die zweite Hälfte der Zellen weist einen unauffälligen männlichen Karyotyp 46,XY auf.

**Chromosomenanalyse:**

**45,X, -Y [10]**

**46,XY [8]**

**45,XY, - 4 [1]**

**SKY-Chromosomenanalyse:**

Es wurden fünf Metaphasen mittels spektraler Karyotypisierung (SKY) untersucht.

**Karyotypen:**

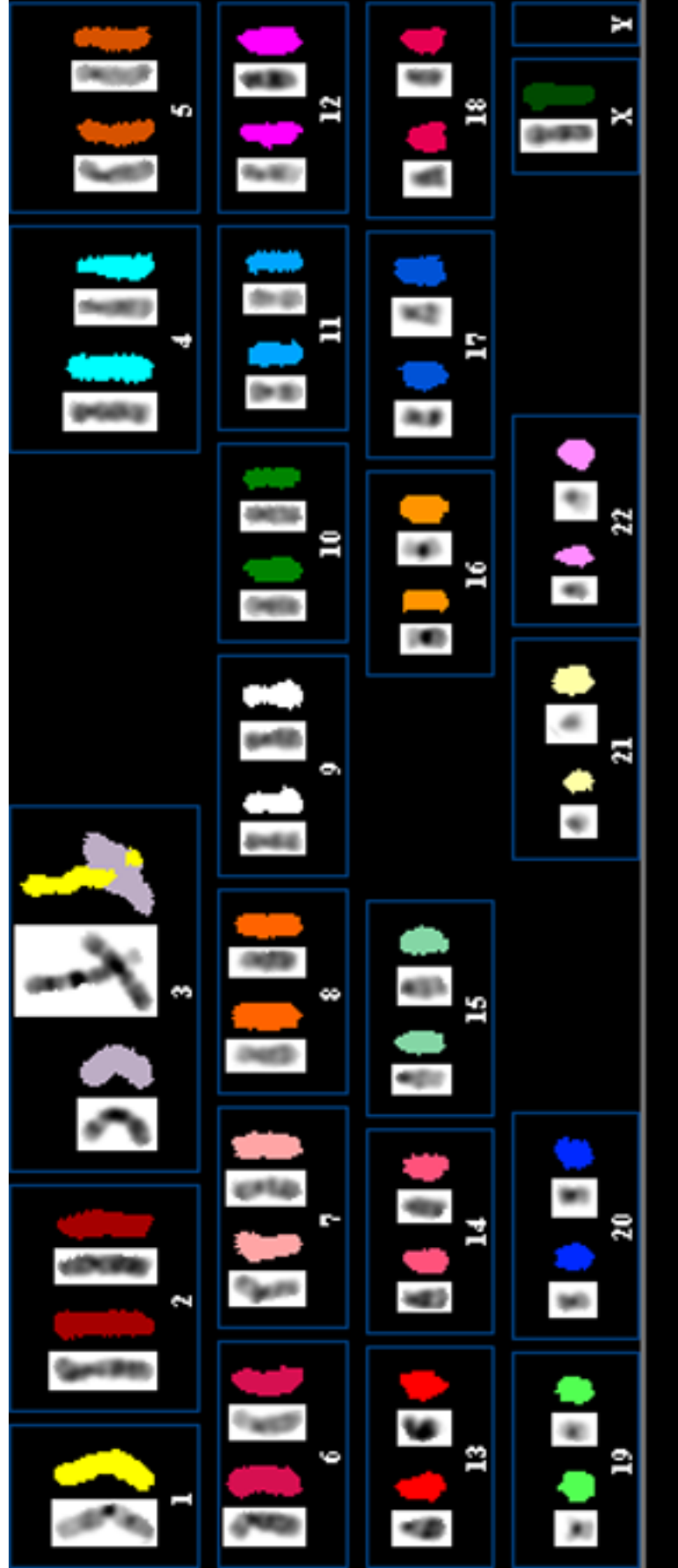
- **45,X, -Y [3]**
- **44,X, -10, -Y [1]**
- **46,XY [1]**

Die SKY-Chromosomenanalyse hat die konventionelle zytogenetische Untersuchung bestätigt. In 4 von 5 mittels SKY karyotypisierten Metaphasen fehlt das Y-Chromosom (siehe Abb. 27). Es wurde auch eine Metaphase mit vollständigem Chromosomensatz gefunden.



Abb. 27: Fall Nr. 16

SKY-Chromosomenanalyse



Karyotyp: 45,X,-Y

**Fall Nr. 17:**

**Diagnose:** Hier handelte es sich um einen 42 jährigen Patienten mit dem Verdacht auf Anämie und Thrombozytopenie.

**Konventionelle Zytogenetik:**

Die Knochenmarkszellen weisen durchgehend einen aberranten Karyotypen auf. In allen karyotypisierten Metaphasen liegt eine Deletion von Chromosom 8 und 9 vor.

**Chromosomenanalyse:**

**46,XY, del(8q), del(9q), -21, +mar [7]**

**46,XY, del(8q), del(9q), -9, -16, -21, +3mar [1]**

**45,XY, del(8q), del(9q), -10, -21, +mar [1]**

**44,XY, del (8q), del(9q), -12, -19, -21, +mar [7]**

**SKY-Chromosomenanalyse:**

Es wurden sieben Metaphasen mittels spektraler Karyotypisierung (SKY) untersucht.

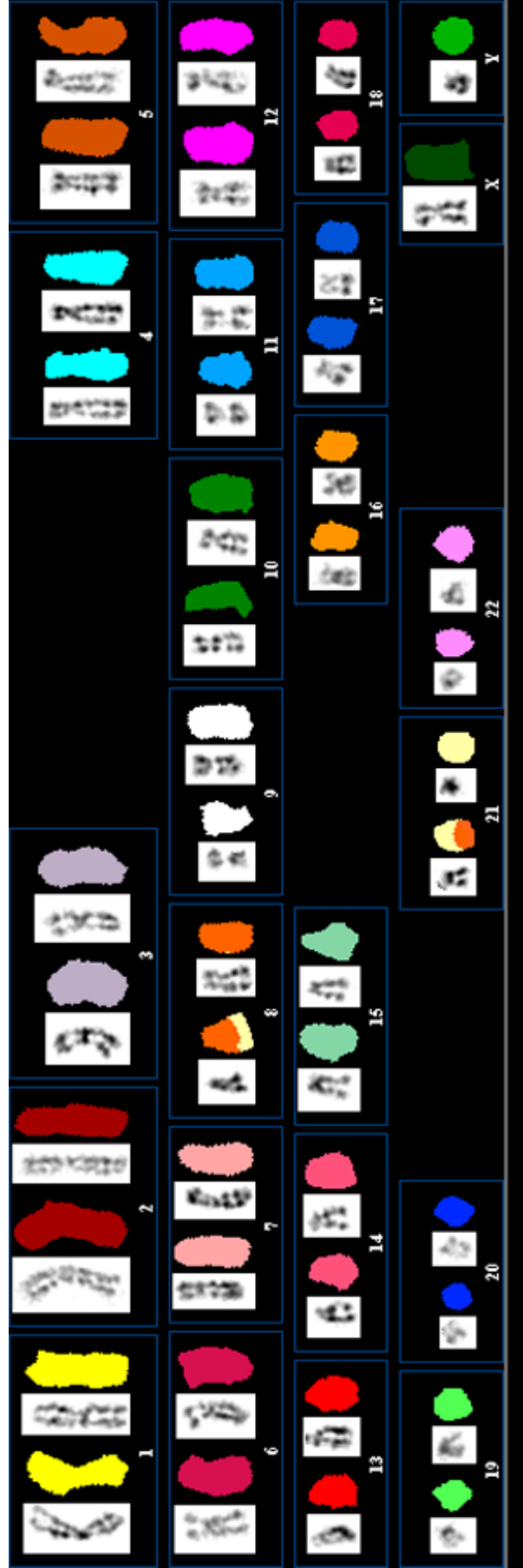
**Karyotypen:**

- **46,XY, t(8;21)(q22 ;q22), del(9)(q22) [4]**
- **43,XY, t(8;21)(q22 ;q22), del(9)(q22), -12, -18, -22 [2]**
- **41,XY, -1, t(8;21)(q22 ;q22), -9, -12, -14, -22 [1]**

Die SKY-Chromosomenanalyse hat die konventionelle zytogenetische Untersuchung verfeinert und das Marker-Chromosom als t(8;21) identifiziert. Die Knochenmarkszellen weisen durchgehend eine balancierte reziproke Translokation zwischen Chromosom 8 und 21, und zusätzlich eine partielle Deletion im langen Arm des Chromosoms 9 in Band 22 auf (siehe Abb. 28). In zwei Metaphasen liegt zusätzlich Monosomien 12 und 22 vor. Das ist wahrscheinlich ein Hinweis auf einen zweiten Zellklon.

Abb. 28: Fall Nr.17

SKY-Chromosomenanalyse



Karyotyp: 46,XY, t(8;21)(q22;q22), del(9)(q22)

**Fall Nr. 18:**

**Diagnose:** Hier handelte es sich um eine 62 jährige Patientin mit der Diagnose Akute Myeloische Leukämie (AML).

**Konventionelle Zytogenetik:**

Die mit GM-CSF stimulierten Knochenmarkszellen weisen durchgehend einen stark aberranten Chromosomensatz mit bis zu 5 Marker-Chromosomen auf.

**Chromosomenanalyse:**

**41-46**, stark aberranter Chromosomensatz mit bis zu 5 Marker-Chromosomen

**SKY-Chromosomenanalyse:**

Es wurden fünf Metaphasen mittels spektraler Karyotypisierung (SKY) untersucht.

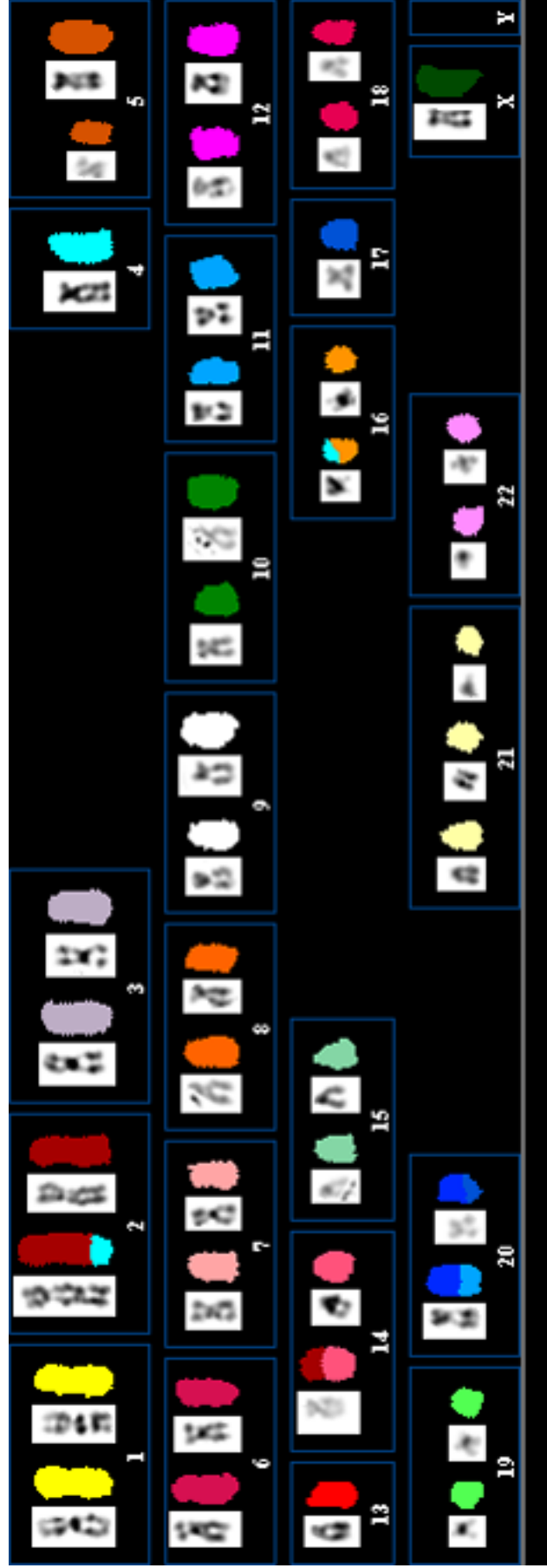
**Karyotypen:**

- **40,XX**, -4, del(5)(q12), -6, -7, -2x 11, -12, der(16)t(4;16)(?;p10), -17, der(20)t(17;20)(q22;q13), der(20)t(11;20)(q14;q13), +21, 2x dup(21)(q21q22)
- **41,XX**, -4, del(5)(q12), -12, der(16)t(4;16)(?;p10), -17, -18, -2x 20, +21, 2x dup(21)(q21q22)
- **43,X**, der(2)t(2;4)(q37;?), -4, del(5)(q12), -13, der(14)t(2;14)(q37;q10), der(16)t(4;16)(?;p10), -17, der(20)t(11;20)(q14;q13), der(20)t(17;20)(q22;q13), +21, 2x dup(21)(q21q22), -X
- **44,XX**, -4, del(5)(q12), tas(8;21)(q24.2;p13), der(16)t(4;16)(?;p10), -17, der(20)t(17;20)(q22;q13), der(20)t(11;20)(q14;q13), +21, 2x dup(21)(q21q22), -22
- **46,XX**, del(5)(q12)

Mittels SKY-Chromosomenanalyse wurden die Marker-Chromosomen identifiziert. 4 von 5 karyotypisierten Metaphasen zeigen einen stark aberranten Karyotypen, diese sind aber nicht einheitlich. Nur eine einzige Metaphase weist eine Deletion 5q auf, die in allen Metaphasen regelmäßig vorhanden ist. In drei Metaphasen liegen Chromosom 16 und beide Chromosomen 20 als derivative Chromosomen vor. In vier Metaphasen liegen ein überzähliges Chromosom 21 und eine Verdopplung von beiden Chromosomen 21 am langen Arm innerhalb der Banden q21 bis q22 vor (siehe Abb. 29). In den vier stark aberranten Metaphasen fehlt ein Chromosom 17.

Abb. 29: Fall Nr. 18

SKY-Chromosomenanalyse



**Karyotyp:** 43,X, der(2)t(2;4)(q37;?), -4, del(5)(q12), -13, der(14)t(2;14)(q37;q10), der(16)t(4;16)(?;p10), -17, der(20)t(11;20)(q14;q13), der(20)t(17;20)(q22;q13), +21, 2x dup(21)(q21q22), -X

**Fall Nr. 19:**

**Diagnose:** Hier handelte es sich um eine 71 jährige Patientin mit der Diagnose hochmalignes Lymphom vom B-Zelltyp.

**Konventionelle Zytogenetik:**

Ca. 76% der Knochenmarkszellen weisen einen stark aberranten Chromosomensatz mit bis zu 11 Marker-Chromosomen auf. Die aberranten Karyotypen waren im hyperdiploiden Bereich und nicht einheitlich. Aber etwa 24% der Knochenmarkszellen weisen einen normalen weiblichen Karyotyp 46,XX auf.

**Chromosomenanalyse:**

- **48-52;** numerisch und strukturell stark aberranter Chromosomensatz mit bis zu 11 Marker-Chromosomen [**16**]
- **46,XX** [**5**]

**SKY-Chromosomenanalyse:**

Es wurden drei Metaphasen mittels spektraler Karyotypisierung (SKY) untersucht.

**Karyotypen:**

- **50,X,** del(3)(q13), der(3)t(3;10)(p26;?), +3, 2x ins(5;3)(q21;?), +5, +der(6)del(q16)t(6;22)(p10;q10), der(8)t(8;X)(q22;?), der(9)t(9;10)(p23;?), -10, +12, +14, +del(17)(q22), der(21;21)(q10;q10), -22, del(X)(q10) [**1**]
- **46,X,** der(12)t(7;12)(?;p12), der(17)t(10;17)(?;q24), der(X)t(3;X)(?;p21) [**1**]
- **45,X, -X** [**1**]

Zwei von drei Metaphasen, die mittels SKY-Chromosomenanalyse untersucht wurden, zeigten einen numerisch und strukturell stark aberranten Karyotyp (siehe Abb. 30). Eine einzige Metaphase weist nur einen X-Chromosomenverlust auf. Die SKY-Chromosomenanalyse bestätigte die konventionelle zytogenetische Untersuchung. Mittels SKY-Chromosomenanalyse konnten alle Marker-Chromosomen identifiziert werden.

Abb. 30: Fall Nr.19

SKY-Chromosomenanalyse



**Karyotyp:** 50,X, del(3)(q13), der(3)t(3;10)(p26;?), +3, 2x ins(5;3)(q21;?), +5, +der(6)del(q16)t(6;22)(p10;q10), der(8)t(8;X)(q22;?), der(9)t(9;10)(p23;?), -10, +12, +14, +del(17)(q22), der(21;21)(q10;q10), -22, del(X)(q10)

**Fall Nr. 20:**

**Diagnose:** Hier handelte es sich um eine 68 jährige Patientin mit dem Verdacht auf Myelodysplastische Syndrom (MDS).

**Konventionelle Zytogenetik:**

Die mit GM-CSF-stimulierten Knochenmarkszellen weisen in 5 von 7 untersuchten Metaphasen einen pseudodiploiden Chromosomensatz auf, der eine Verkürzung des langen Arms von Chromosom 3 und eine Verlängerung des langen Arms von Chromosom 5 besitzt. Allerdings zeigt nur eine einzige Metaphase einen numerisch und strukturell aberranten Karyotypen.

**Chromosomenanalyse:**

**46,XX, 3q-, 5q+ [5]**

**43,XX, -1, -2, 3q-, 5q+, -18, -19, +t(18 ;19) [1]**

**46,XX [1]**

**SKY-Chromosomenanalyse:**

Es wurden drei Metaphasen mittels spektraler Karyotypisierung (SKY) untersucht.

**Karyotypen:**

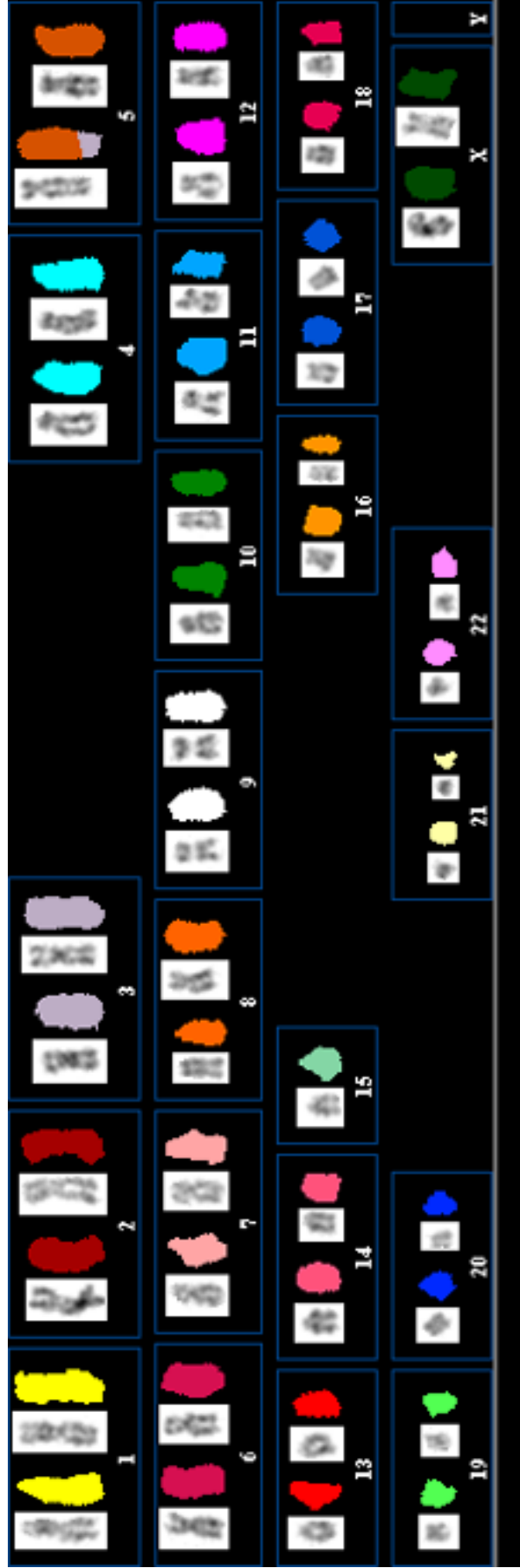
- **45,XX, del(3)(q26), der(5)t(3;5)(q26,q34), -15 [1]**
- **45,XX, del(3)(q26), der(5)t(3;5)(q26,q34), -9 [1]**
- **44, del(3)(q26), der(5)t(3;5)(q26,q34), -2x X [1]**

Es konnten nur drei Metaphasen mittels SKY-Chromosomenanalyse untersucht werden. Alle drei untersuchten Metaphasen weisen eine unbalancierte Translokation zwischen Chromosom 3 und 5 auf (siehe Abb. 31), weil das Chromosom 3 in Bande 3q26 und Chromosom 5 in Bande 5q34 gebrochen sind. Das Segment (3q26) wurde auf den langen Arm von Chromosom 5 in Bande 5q34 transloziert.



Abb. 31: Fall Nr.20

SKY-Chromosomenanalyse



**Karyotyp: 45,XX, del(3)(q26), der(5)t(3;5)(q26,q34), -15**

**Fall Nr. 21:**

**Diagnose:** Hier handelte es sich um eine 74 jährige Patientin mit dem Verdacht auf Myelodysplastische Syndrom (MDS), Non-Hodgkin-Lymphome (NHL).

**Konventionelle Zytogenetik:**

Die mit GM-CSF-stimulierten Knochenmarkszellen weisen einen hypodiploiden Chromosomensatz mit zahlreichen numerischen und strukturellen Aberrationen und bis zu 8 Marker-Chromosomen auf. Die mit TPA-stimulierten Knochenmarkszellen weisen dagegen einen unauffälligen weiblichen Karyotyp 46,XX auf.

**Chromosomenanalyse:**

**43,XX** numerisch und strukturell stark aberranter Chromosomensatz **[4]**

**46,XX [3]**

**SKY-Chromosomenanalyse:**

Es wurden vier Metaphasen mittels spektraler Karyotypisierung (SKY) untersucht.

**Karyotypen:**

- **43,XX**, -3, del(5)(q12), -7, 2x der(8)t(3;8)(?;p22), +8, der(12)t(12;17)(p13;p12), der(13)t(7;13)(?;p10), der(16)t(3;16)(?;q21), -17, -18, der(20)t(7;20)(?;q12) **[3]**

- **44,XX**, -3, del(5)(q12), -7, der(8)t(3;8)(?;p22), add(8)(p23), +8, der(12)t(12;17)(p13;p12), der(13)t(7;13)(?;p10), der(16)t(3;16)(?;q21), -17, der(20)t(7;20)(?;q12)

**[1]**

Die SKY-Chromosomenanalyse hat die Marker-Chromosomen identifiziert. Alle untersuchten Metaphasen weisen einen Karyotyp mit zahlreichen numerischen und strukturellen Chromosomenaberrationen auf (siehe Abb. 32). Die Chromosomen 3, 7 und 17 fehlen in allen Metaphasen. Die Chromosomen 5, 8, 12, 13, 16 und 20 liegen in allen karyotypisierten Metaphasen als aberrantes Chromosom vor.

Abb. 32: Fall Nr.21

SKY-Chromosomenanalyse



**Karyotyp: 43,XX, -3, del(5)(q12), -7, 2x der(8)t(3;8)(?:p22), +8, der(12)t(12;17)(p13;p12), der(13)t(7;13)(?:p10), der(16)t(3;16)(?:q21), -17, -18, der(20)t(7;20)(?:q12)**

### **3.3 Ergebnisse der zytogenetischen und molekularzytogenetischen Untersuchungen an Meningeombiopsiematerial**

Für die vorliegende Studie wurden neben zytogenetischen auch molekularzytogenetische Untersuchungen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und spektraler Karyotypisierung (SKY) an Meningeomen von 29 Patienten Proben nach Anlegen von Primärkulturen durchgeführt. Ziel der Arbeit war sowohl die Identifizierung von numerischen und strukturellen Chromosomenaberrationen als auch die Erfassung klonale Unterschiede in verschiedenen Arealen eines Tumors. Bei 22 Patienten wurden die Meningeome mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) auch auf eine Deletion im p53-Gen untersucht, um einen Überblick über die Häufigkeit von p53-Gen-Deletionen zu erhalten.

Die pathologisch-anatomischen Befunde und das Meningeombiopsiematerial wurden freundlicherweise von der Abteilung für Neurochirurgie des Westpfalzkrankenhauses zur Verfügung gestellt.

Die Ergebnisse der Untersuchung werden unten im Einzelfall beschrieben.

#### **3.3.1 Fall Nr. 1**

Hier handelte es sich um eine 47jährige Patientin. Es wurden vier verschiedene Tumorareale nach Anlegen von Primärkulturen zytogenetisch untersucht. Es wurden von jedem Areal 50 Metaphasen auf numerische Aberrationen und mindestens 10 Metaphasen auf strukturelle Aberrationen untersucht.

#### **Pathologisch-anatomischer Gesamtbefund**

Nach pathologischer Untersuchung des Tumorgewebes konnte der Tumor nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgeschichte I eingestuft werden.

#### **Areal I – Mikroskopisch – pathologischer Befund**

In Probe I Meningeomgewebe, meningotheilialer Subtyp, mit herdförmig vermehrter Zelldichte.

#### **Areal I - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (22x 45, 20x 44, 5x 43, 1x 42, 2x 41 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **29** Metaphasen

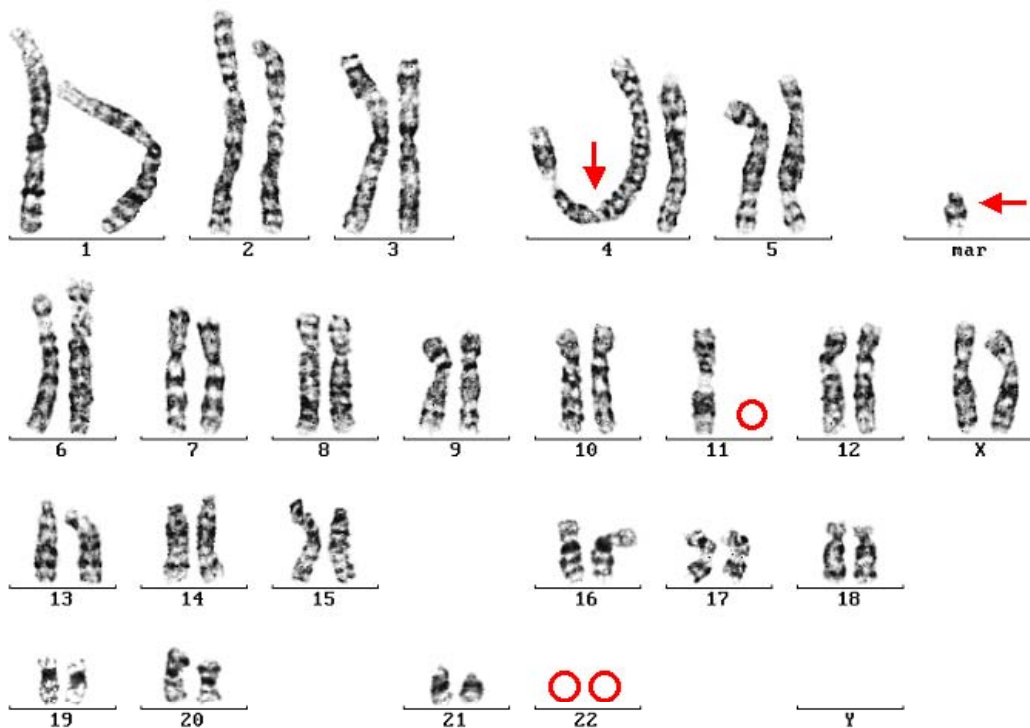
- 6x 45,XX**, -2x22, +mar(22q+?)  
**2x 45,XX**, -11, -2x 22, +1x mar, 1x mar(22q+?)  
**1x 45,XX**, -8, -9, -2x 22, +2x mar, 1x mar(22q+?)  
**1x 45,XX**, del(7)(q21), add(11)(p15), -2x 22, +mar(22q+?)  
**1x 45,XX**, -4, -7, der(11)t(11;?)(p15;?), -2x 22, +2x mar, +1x mar(22q+?)  
**1x 45,X**, rob(14;14)(q10;q10), +17,-2x22, -X, + mar(22q+ ?)  
**1x 45,XX**, tas(4;11)(q34;p15), -2x22, +mar(22q+ ?)  
**1x 45,XX**, tas(4;11)(q34;q24), -2x 22, +mar(22q+ ?)  
**1x 45,XX**, tas(4;11)(q34;p15), - 8, -2x 22, + 1x mar, 1x mar(22q+ ?)  
**1x 44,XX**, -5, -13, -2x22, +1x mar, 1x mar(22q+ ?)  
**1x 44,XX**, -6, -21, -2x22, +1x mar, +1x mar(22q+ ?)  
**1x 44,XX**, -11, -2x 22, + mar(22q+ ?)  
**1x 44,XX**, -1, -2x22, +mar(22q+ ?)  
**1x 44,XX**, -10, tas(14;22)(p13;p13), -2x 22, + mar(22q+?)  
**1x 44,X**, add(4)(q34),add(11)(p15), -13, -2x 22, -X, +1x mar, +1x mar(22q+?)  
**1x 43,XX**, -7, -19, -2x 22, + mar(22q+?)  
**1x 43,XX**, -4, -12, -14, -17, -2x22, +2x mar, 1x mar(22q+?)  
**1x 43,X**, -7, -2x 22, -X, +mar(22q+?)  
**1x 43,XX**, -6, -9, add(11)(p15), -2x 22, + 1x mar, +1x mar(22q+?)  
**1x 43,XX**, -9, -14, -2x 22, + mar(22q+ ?)  
**1x 43,XX**, -6, tas(11;18)(p15;q22), -2x 22  
**1x 41,XX**, -9, -11, -14, -19, -2x22, +mar(22q+ ?)  
**1x 41,XX**, -8, -9, -14, -19, -20, -2x 22, +1x mar, 1x mar(22q+?)

Die karyotypisierten Metaphasen weisen In Areal I abnorme Karyotypen auf, wobei mehrere Zellklone vorliegen. Ein Zellklon (21%) weist durchgehend ein Verlust von beiden Chromosomen 22 und ein Marker-Chromosom auf, so dass sich der Karyotyp 45,XX, -2x 22, +mar(22q+?) ergibt (siehe Abb. 33). Der Rest der Metaphasen (79% , 41-45,XX) zeigt numerische und strukturelle Aberrationen, die jedoch nicht einheitlich sind. In allen Metaphasen finden sich ein bis zu drei Marker-Chromosomen. In 40% der Metaphasen ist das Chromosom 11 betroffen, indem es entweder fehlt oder aberrant ist.



**Karyotyp:** 45,XX, -2x 22, + mar

**Abb. 33:** Die Abbildung zeigt einen aberranten Karyotyp mit dem Verlust von beiden Chromosomen 22 und einem Marker-Chromosom. Der Pfeil weist auf das aberrante Marker-Chromosomen hin, der Ring auf die fehlenden Chromosomen (22) hin.



Karyotyp: 45,XX, tas(4;11)(q34;p15), -2x 22, + mar

**Abb. 34:** Die Abbildung zeigt einen aberranten Karyotyp mit telomerischer Assoziation zwischen den Chromosomen 4 und 11, Verlust der beiden Chromosomen 22 sowie ein Marker-Chromosom. Der Pfeil weist auf aberrante Chromosomen und der Ring auf fehlende Chromosomen hin.

In drei Metaphasen findet sich eine telomerische Assoziation zwischen den Chromosomen 4 und 11 (siehe Abb. 34). In einer anderen Metaphase liegt noch eine telomerische Assoziation zwischen den Chromosomen 11 und 18 vor. In vier Metaphasen liegt eine Addition an den kurzen Armen von Chromosom 11 vor. In einer Metaphase liegt eine Robertson'sche Translokation zwischen zwei Chromosomen 14 vor. In einer Metaphase findet sich eine Addition an den kurzen Arm von Chromosom 4. In allen Metaphasen fehlen beide Chromosomen 22. Die Chromosomen 11, 9 und 14 zeigen am häufigsten einen Verlust.

#### **Areal II – Mikroskopisch – pathologischer Befund**

In Probe II Meningeomgewebe, meningoethelialer Subtyp, mit herdförmig vermehrter Zelldichte und umschriebener frischer Einblutung.

#### **Areal II - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (40x45, 8x44, 1x42, 1x40 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **19** Metaphasen

**5x 45,XX**, -2x22, +mar(22q+?)  
**2x 45,XX**, -19, -2x 22, +1x mar, +1x mar(22q+?)  
**1x 45**, -13, -14, -2x22, -2x XX, +4x mar, +mar(22q+?)  
**1x 45,XX**, -15, -2x22, 1x mar, 1x mar(22q+?)  
**1x 45,XX**, -11, -2x 22, +1x mar, +mar(22q+?)  
**1x 45,XX**, -9, -2x 22, +1x mar, +mar(22q+?)  
**1x 45,XX**, -9, -14, +17, -2x 22, +1x mar, +mar(22q+?)  
**1x 45,XX**, -5, -20, -2x 22, +2x mar, +mar(22q+?)  
**1x 45,XX**, tas(18;?;21)(p11;?;q22), -2x22, + mar(22q+ ?)  
**1x 44,XX**, -2x22  
**1x 44,XX**, -20, -2x 22, +mar(22q+?)  
**1x 44,XX**, -9, -2x10, -2x22, +2x mar, +mar(22q+ ?)  
**1x 42,XX**, -9, -11, -16, -2x 22, + mar(22q+?)  
**1x 40,XX**, add(4)(q34), -9, -11, -16, -19, -2x22

In Areal II weisen die Meningeomzellen (26%) durchgehend einen Verlust von beiden Chromosomen 22 und ein kleines akrozentrisches Marker-Chromosom auf, woraus sich der Karyotyp 45,XX, -2x 22, +mar(22q+?) ergibt. Die andere Hälfte der Metaphasen zeigt einen Verlust von beiden Chromosomen 22 und zusätzlich einen wechselnden Chromosomenverlust und bis zu fünf Marker-Chromosomen. In einer Metaphase liegt eine telomerische Assoziation zwischen den Chromosomen 18, 21 und einen weiteren Chromosom unbekannter Herkunft vor.

### **Areal III – Mikroskopisch – pathologischer Befund**

In Probe III Meningeomgewebe, meningothelialer Subtyp, mit stellenweise vermehrter Zelldichte mit fokal leichten regressiven Veränderungen.

### **Areal III - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **36** Metaphasen (1x 46, 30x 45, 3x 44, 2x 43 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **10** Metaphasen

**7x 45,XX**, -2x 22, +mar(22q+ ?)  
**1x 45,XX**, -13, -2x 22, +1x mar, 1x mar(22q+ ?)  
**1x 45,XX**, -11, -15, -17, -21, -2x 22, t(11;?)(p15;?), +3x mar, 1x mar(22q+ ?)  
**1x 44,XX**, tas(11;13)(p15;q33), add(12)(p13), -2x 22

70% der Metaphasen weisen in Areal III einen Chromosomenverlust von beiden Chromosomen 22 und ein kleines akrozentrisches Marker-Chromosom auf. Die



andere Hälfte zeigt zusätzlich einen wechselnden Chromosomenverlust und bis zu vier Marker-Chromosomen. In einer Metaphase ist Chromosom 11 mit Chromosom 13 telomerisch assoziiert und in einer anderen Metaphase mit unbekanntem Chromosom transloziert. In einer Metaphase liegt eine Addition am kurzen Arm von Chromosom 12 vor. Bei der numerischen Chromosomenaberrationen-Untersuchung gab es nur eine Metaphase mit vollständigem Chromosomensatz.

#### **Areal IV – Mikroskopisch – pathologischer Befund**

Es liegt Kein Befund vor.

#### **Areal IV - Chromosomenanalyse**

- Metaphasen-numerisch: **50** Metaphasen (1x 49, 23x 45, 14x 44, 9x 43, 2x 42, 1x 41 Chromosomen)

- Metaphasen-feinstrukturell: **10** Metaphasen

**1x 49,XX**, +2x 2, +18, -2x 22, +1x mar, 1x mar(22q+ ?)

**5x 45,XX**, -2x 22, + mar(22q+ ?)

**1x 44,XX**, tas(4;11)(q34;p15), -2x 22, +mar(22q+ ?)

**1x 43,XX**, tas(11;13)(p15;p13), -19, -2x 22, +mar(22q+ ?)

**1x 42,X**, -7, -10, tas(11;?)(q24;?), -2x 22,+ mar(22q+ ?)

**1x 41,XX**, -2, -3, -9, tas(11;13)(p15;q13), -2x 22, +mar(22q+ ?)

In Areal IV weisen die Meningeomzellen (50%) einen Verlust von beiden Chromosomen 22 und ein kleines akrozentrisches Marker-Chromosom auf, woraus sich der Karyotyp 45,XX, -2x 22, +mar(22q+?) ergibt. Die andere Hälfte zeigt noch zusätzlich einen wechselnden Chromosomenverlust und bis zu zwei Marker-Chromosomen. In vier aberranten Metaphasen war Chromosom 11 telomerisch mit Chromosom 4 und 13 assoziiert. Es gab noch eine hyperdiploide Zelle, die den Karyotyp 49,XX, +2x 2, +18, -2x 22, +1x mar, 1x mar(22q+?) hatte.

#### **Beurteilung**

Die Meningeomzellen weisen in allen Arealen fast durchgehend abnorme Karyotypen auf, wobei ein Hauptklon und mehrere kleine Zellklone vorliegen, die aber alle einen Verlust von beiden Chromosomen 22 aufweisen. Der Hauptklon (34%) war in allen Arealen mit dem Karyotyp 45,XX, -2x 22, +mar vertreten. Chromosom 11 war das am häufigsten abnorme Chromosom nach Chromosom 22. Im Areal III liegt eine Metaphase mit vollständigem Chromosomensatz und im

Areal IV eine Metaphase mit einem hyperdiploiden Chromosomensatz vor. Dies weist darauf hin, dass es einen Arealunterschied zwischen Areal III und IV gibt.

### **FISH-Untersuchung - SKY-Chromosomenanalyse**

Es wurden sechs Metaphasen von Areal IV mittels spektraler Karyotypisierung (SKY) analysiert.

#### **Karyotypen**

**1x 45,XX**, t(13;22)(q13;q12), -22

**1x 45,XX**, tas(11;11)(q24;q24), t(13;22)(q13;q12), -22

**1x 44,XX**, -12, t(13;22)(q13;q12), -22

**1x 43,XX**, der(4)t(4;19)(q34;p12)ins(4;19)(q24;?), del(7)(p10), +der(12)t(12;14)(p10;q10), t(13;22)(q13;q12), -14, -18, -19, -22

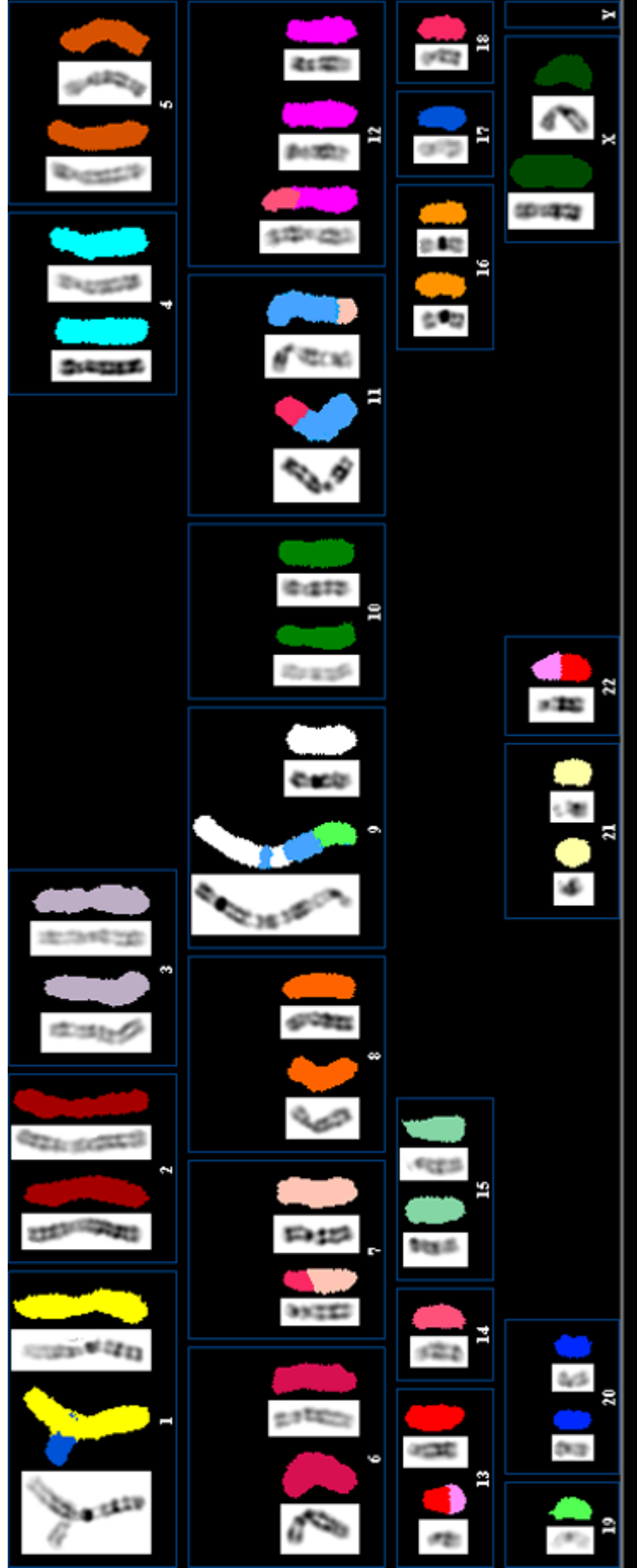
**1x 43,XX**, der(7)t(7;18)(p12;q11), der(9)t(9;11)(q33;?)tas(11;19)(q24;q13), tas(11;18)(p15;q22q12), der(11)t(7;11)(?;q24), +der(12)t(12;14), t(13;22)(q13;q12), -14, -18, -19, -22

**1x 42,XX**, -9, der(11)t(11;17)(p10;q10), t(13;22)(q13;q12), -17, -19, -22

Mittels der SKY-Chromosomenanalyse konnte das Marker-Chromosom in allen Metaphasen als reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 13 und 22 identifiziert werden. Zusätzlich konnten weitere numerische und strukturelle Aberrationen entdeckt werden (siehe Abb. 35), die jedoch nicht einheitlich waren. Die SKY-Chromosomenanalyse bestätigte die konventionelle zytogenetische Untersuchung dahingehend, dass in den Meningeomzellen mehrere Zellklone vorhanden sind. Die SKY-Chromosomenanalyse hat somit die konventionelle zytogenetische Untersuchung verfeinert und die Marker-Chromosomen identifiziert.

Abb. 35: Fall Nr. 1

SKY-Chromosomenanalyse



**Karyotyp:** 43,XX, der(7)t(7;18)(p12;q11), der(9)t(9;11)(q33;?)tas(11;19)(q24;q13), tas(11;18)(p15;q22q12), der(11)t(7;11)(?;q24), +der(12)t(12;14)(p10;q10), t(13;22)(q13;q12), -14, -18, -19, -22

### 3.3.2 Fall Nr. 2

Hier handelte es sich um eine 66jährige Patientin. Es wurden drei verschiedene Tumoreale nach Anlegen von Primärkulturen zytogenetisch untersucht. Es wurden von jedem Areal 50 Metaphasen auf numerische und 5 bis 9 Metaphasen auf strukturelle Aberrationen untersucht.

#### Pathologisch-anatomischer Gesamtbefund

Nach pathologischer Untersuchung des Tumorgewebes konnte der Tumor nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft werden.

#### Areal I – Mikroskopisch – pathologischer Befund

Es stellt sich ein relativ zeldichtes Tumorgewebe dar mit dreidimensional durchflochtenen Zellfasziken, bzw. Zellstapeln. Die Zellen sind blass eosinophil, das Zytoplasma ist nur schwer abgrenzbar. Die Zellkerne rundlich bis ovalär, teilweise auch länglich mit einem feingranulären Chromatin.

#### Areal I - Chromosomenanalyse

- Numerisch: **50** Metaphasen (34x 44, 9x 43, 5x 42, 1x 41, 1x 40 Chromosomen)

- Feinstrukturell: **9** Metaphasen

**1x 44,XX**, add(4)(q34), -19, -22

**1x 44,XX**, -19, -22

**1x 44,XX**, add(4)(q34), tas(11;12)(p15;p13), -19, -22

**1x 43,XX**, -1, add(4)(q34), der(11)t(11;1)(p15;q12), -19, -22

**1x43,XX**, inv(1)(p12), add(4)(q34), -12, -19, -22

**1x 42,XX**, - 2x 18, -19, -22

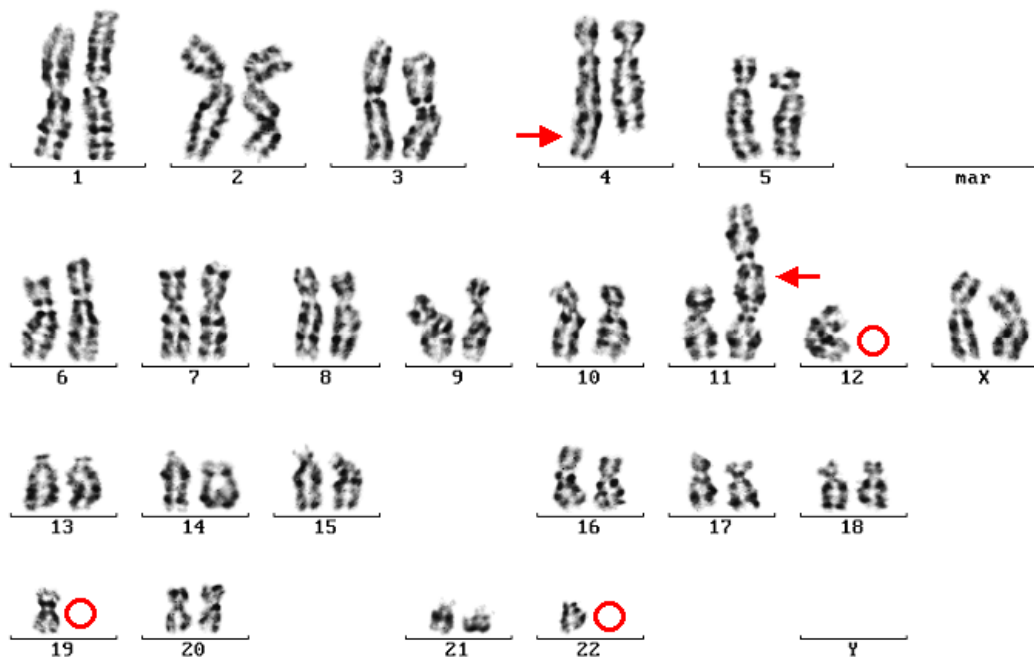
**1x 42,XX**, add(4)(q34), -2x 19, -21, -22

**1x 41,XX**, add(4)(q34), -15, -17, -19, - 20, -22

**1x 41,XX**, -1, +4, add(4)(q34), -6,-9, tas(11;19)(p15;p13), -15, -16, -2x 22, +mar

Die Meningeomzellen weisen in Areal I uneinheitlich abnorme Karyotypen (41-44,XX) auf, in denen aber durchgehend eine Monosomie 19 und eine Monosomie 22 vorliegen. In etwa 78% der Metaphasen hängt zusätzlich

unbekanntes DNA-Material am langen Arm von Chromosom 4 (Addition) an (siehe Abb. 36).



**Karyotyp:** 44,XX, add(4)(q34), tas(11;12)(p15;p13), -19, -22

**Abb. 36:** Die Abbildung zeigt eine Addition am langen Arm von Chromosom 4, eine telomerische Assoziation zwischen den Chromosomen 11 und 12 sowie Monosomien für 12, 19 und 22. Pfeile weisen auf aberrante, Ringe auf fehlende Chromosomen.

In zwei Metaphasen liegt eine telomerische Assoziation vor, zum einen zwischen den Chromosomen 11 und Chromosom 12, zum anderen zwischen den Chromosomen 11 und 19. In einer anderen Metaphase findet sich eine parazentrische Inversion in Chromosom 1 [inv(1)(p12)]. Das heißt, dass das Chromosom 1 am kurzen Arm in der Bande p12 gebrochen ist. Der Bereich zwischen p12 und p36 wurde vertauscht, die Bruchstelle vereinigte sich mit dem Ende des Chromosoms 1(p36). Chromosom 1 ist in zwei Metaphasen verloren gegangen und in einer weiteren aberrant [Inversion, inv(1)(p12)].

### Areal II – Mikroskopisch – Pathologischer Befund

Hierin gleichartige Veränderungen erkennbar, zudem sind vermehrt eingeblutete Tumorzonen zu sehen mit hier etwas aufgelockerter Textur. Keinherdig kommen Fibrinein- und Auflagerungen vor. Im Außenbereich miterfasst wenig Dura.

Areal II - Chromosomenanalyse

- Numerisch: **50** Metaphasen (1x 46, 41x 45, 5x 44, 1x43, 2x 42 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **6** Metaphasen

**1x 46,XX**

**2x 45,XX, -22**

**1x 44,XX, -4, -22**

**1x 42,XX, -1, add(4)(q34), -8, -18, -22**

**1x 42,XX, -1, -11, der(11)t(11;?)(p15;?) -19, -22, +mar**

In Areal II weisen zwei Metaphasen eine Monosomie 22 auf. In einer Metaphase liegt zusätzlich noch ein Marker-Chromosom und ein derivatives Chromosom 11 vor, was einen weiteren Zellklon repräsentieren könnte. Nur in einer Metaphase liegt eine Addition an Chromosom 4 vor.

### **Areal III – Mikroskopisch – pathologischer Befund**

Hier zeigen sich gleichartige Veränderungen wie in den Fraktionen 1. und 2. Zusätzlich kommen im Randbereich anhängend unterschiedlich weit gestellte Gefäße zur Darstellung, teilweise mit arterientypischer Wandung. Darüber hinaus sind ganz vereinzelt schollig basophile psammomatöse Körperchen zu erkennen. Die Textur ist abschnittsweise aufgelockert. An anderen Stelle relativ kompakt.

### **Areal III - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (2x 46, 39x 45, 7x 44, 2x 42 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **5** Metaphasen

**1x 46,XX**

**2x 45,XX, -22**

**1x 44,XX, -16, -22**

**1x 42,XX, -6, -12, -20, -22**

In Areal III weisen zwei Metaphasen einen weiblichen Karyotypen (45,XX, -22) auf. In einer Metaphase ist der komplette Chromosomensatz vorhanden. In zwei Metaphasen kommen andere numerische Aberrationen vor.

### **Beurteilung**

Anhand der grob und feinstrukturell analysierten Metaphasen ist erkennbar, dass in den verschiedenen Arealen des Tumors verschiedene Zellklone existieren. Ein Zellklon mit dem Karyotyp 45,XX, -22 ist in Areal II und III, nicht aber in Areal I vorhanden, in dem dafür mehrere andere Zellklone vorliegen.

In Areal I ist erkennbar, dass nur hypodiploide abnorme Metaphasen vorhanden sind, was als Hinweis auf die fortschreitende Progression des Tumors gewertet werden kann. Es standen aber nicht genügend analysierbare Metaphasen zur Verfügung, um diesen Verdacht zu erhärten. In Areal I konnte sowohl bei der numerischen als auch bei strukturellen Chromosomenaberrationen-Untersuchung keine Metaphase mit vollständigem Chromosomensatz festgestellt werden.

### **3.3.3 Fall Nr. 3**

Hier handelte es sich um einen 66jährigen Patienten. Es wurden zwei verschiedene Tumorareale nach dem Anlegen von Primärkulturen zytogenetisch untersucht. Es wurden von jedem Areal 50 Metaphasen auf numerische und 11 bis 19 Metaphasen auf strukturelle Aberrationen untersucht.

#### **Pathologisch-anatomischer Gesamtbefund**

Nach pathologischer Untersuchung des Tumorgewebes konnte der Tumor nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad II eingestuft werden.

#### **Mikroskopisch – pathologischer Gesamtbefund**

Mikroskopisch erkennt man in allen Biopsien ein gleichartiges Bild. Man sieht einen relativ zellreichen Tumor. Dieser Tumor wird von schmalen fibrösen zellarmen Septen durchsetzt. Dazwischen sieht man recht gelegen, unterschiedlich zytoplasmareiche Zellen mit teilsrundlichen, teils länglich-ovalen Kernen, die eine Vergrößerung des Kernchromatins aufweisen. Die Zellen sind auch etwas unterschiedlich groß. Mitosen sieht man vermehrt. Nur gelegentlich sieht man ein etwas wirbelig anmutendes Muster. Gelegentlich sieht man im Randbereich eine breite fibröse Kapsel, die in den zur Darstellung gelangten Abschnitten von Tumorgewebe nicht durchbrochen wird. Die durchgeführte Reaktion mit Ki-67 zeigt eine diffuse, herdförmig betonte Positivität, die mindestens 10% herdförmig auch etwas mehr erreicht.

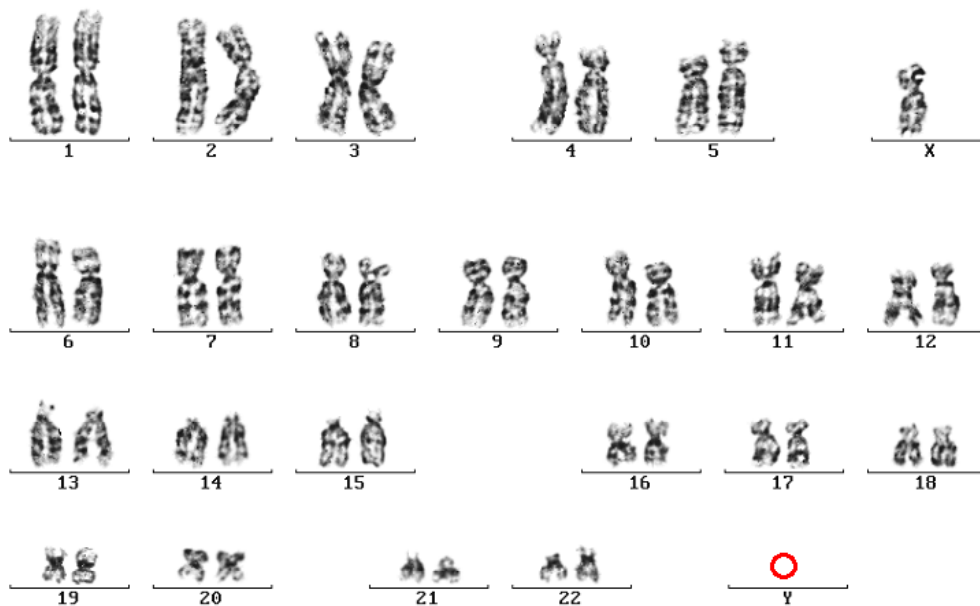
#### **Areal IV - Chromosomenanalyse:**

- Numerisch: **50** Metaphasen (47x 46, 3x 45 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **11** Metaphasen

**10x 46,XY**

**1x 45,X, -Y**

In Areal IV weisen die Meningeomzellen überwiegend (ca. 91%) einen normalen männlichen Karyotypen 46,XY auf. Daneben liegt eine Metaphase mit Y-Verlust vor (siehe Abb. 37).



**Karyotyp: 45,X, -Y**

**Abb. 37:** Die Abbildung zeigt ein männliches Karyogramm mit Y- Verlust. Der Ring weist auf fehlende Chromosomen (Y) hin.

**Areal VI - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (39x 46, 10x 45, 1x 44 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **19** Metaphasen

**13x 46,XY****5x 45,X, -Y****1x 44,XY, -15, -22**

Die Meningeomzellen weisen in Areal VI überwiegend (ca. 2/3) einen normalen männlichen Karyotyp 46,XY auf. Daneben findet sich aber auch ein Zellklon (ca.1/3) mit dem Karyotyp 45,X, -Y. In einer Metaphase liegen neben dem Chromosom-22-Verlust auch eine Monosomie des Chromosom 15 vor. Dies ist aber vermutlich nur ein präparativ bedingter Chromosomenverlust.



**Beurteilung**

Die Meningeomzellen weisen in den zwei untersuchten Arealen überwiegend einen normalen männlichen Karyotyp 46,XY auf. Daneben findet sich ein Zellklon mit dem Karyotyp 45,X, -Y, der aber in Areal VI fünf Mal häufiger als in Areal IV vorkommt.

**3.3.3a (Rezidiv von 3)**

Hier handelte es sich um einen 67jährigen Patienten (Rezidiv von Fall Nr. 3). Es wurden fünf verschiedene Tumoreareale nach Anlegen von Primärkulturen zytogenetisch untersucht. Es wurden von jedem Areal 50 Metaphasen auf numerische und 5 bis 12 Metaphasen auf strukturelle Aberrationen untersucht.

**Pathologisch-anatomischer Gesamtbefund**

Nach pathologischer Untersuchung des Tumorgewebes konnte der Tumor nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad II eingestuft werden.

**Mikroskopisch – pathologischer Gesamtbefund**

Siehe Abschnitt 3.3.3 Fall Nr. 3

**Areal I - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (45x 46, 4x 45, 1x 44 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **7** Metaphasen

**5x 46,XY**

**1x 45,XY, - 5**

**1x 45,XY, - 22**

**Areal II - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (47x 46, 2x 45, 1x 44 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **5** Metaphasen

**4x 46,XY**

**1x 44,X, -18, -Y**

**Areal III - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (44x 46, 4x 45, 2x 44 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **12** Metaphasen

**10x 46,XY**

**1x 45,XY, -15**

**1x 45,XY, -6**

#### **Areal IV - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (29x 46, 19x 45, 2x 44 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **11** Metaphasen

**6x 46,XY**

**5x 45,X, -Y**

#### **Areal V - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: 50 Metaphasen (46x 46, 2x 45, 2x 44 Chromosomen)
- Feinstrukturell: 7 Metaphasen

**6x 46,XY**

**1x 45,XY, -4**

**1x 44,X, -1, -Y**

#### **Beurteilung**

In den Arealen I und III weisen die Meningeomzellen weit überwiegend einen normalen männlichen Karyotypen 46,XY auf. Daneben finden sich aber auch vier Zellen, die einen wechselnden Chromosomenverlust aufweisen. Dieser Verlust ist wahrscheinlich präparativ bedingt.

In den Arealen II und V weisen die Meningeomzellen auch überwiegend einen normalen männlichen Karyotypen 46,XY auf. Es wurde jeweils eine Metaphase mit Verlust des Y-Chromosoms beobachtet.

In Areal IV weisen die Meningeomzellen zwei Zellklone auf. Der erste Klon (55%) zeigt einen normalen männlichen Karyotyp 46,XY. Der zweite Klon (45%) zeigt einen Verlust des Y-Chromosoms, woraus sich der Karyotyp 45,X, -Y ergibt. Dem Y-Verlust wird in der Regel keine pathologische Bedeutung beigemessen. Dieser Zellklon (45,X, -Y) war auch schon bei der ersten Untersuchung (Fall Nr. 3) vorhanden.

**FISH-Untersuchung - P53-Gen**

In den 200 ausgewerteten Interphasezellkernen der Meningeomzellen (Areal IV) zeigten sich in 192 (96%) Kernen in dem Bereich 17p13.1 zwei normale Signale. In acht Kernen (4%) wurde nur ein Signal gefunden, was wahrscheinlich auf einen Artefakt zurückgeführt werden kann, weil dieser Wert knapp unter dem Bereich des Cut-Off-Werts von 5% lag. Es wurden zudem drei Metaphasen untersucht, die zwei normale Signale zeigten.

**3.3.4 Fall Nr. 4**

Hier handelte es sich um einen 63jährigen Patienten. Es wurden zwei verschiedene Tumoreale nach Anlegen von Primärkulturen zytogenetisch untersucht. Es wurden von jedem Areal 50 Metaphasen auf numerische und 10 bis 18 Metaphasen auf strukturelle Aberrationen untersucht.

**Pathologisch-anatomischer Gesamtbefund**

Nach pathologischer Untersuchung des Tumorgewebes konnte der Tumor nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft werden.

**Areal V - Mikroskopisch - pathologischer Befund**

Hier ein analoges Tumorgewebe mit nahezu ausschließlich zellreicheren, nur herdförmig zellärmeren und faserreicheren Arealen.

**Areal V - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (46x 45, 2x 44, 2x 43 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **18** Metaphasen

**14x 45,XY, -22**

**1x 44,XY, -5, -22**

**1x 44,XY, -11, -22**

**1x 43,XY, -5, -20, -22**

**1x 43,XY, -14, -17, -22**

**Areal VII - Mikroskopisch – pathologischer Befund**

Es lag kein Befund vor.

**Areal VII - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (45x 45, 4x 44, 1x 43 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **10** Metaphasen

**5x 45,XY**, -22

**1x 44,XY**, -18, -22

**1x 44,X**, -22, -Y

**1x 44,XY**, -10, -22

**1x 44,XY**, -19, -22

**1x 43,XY**, -15, -21, -22

**Beurteilung**

Die Meningeomzellen weisen in beiden Arealen überwiegend eine Monosomie 22 auf, woraus sich der männliche Karyotyp 45,XY, -22 ergibt. Es wurden aber auch mehrere Metaphasen mit numerischen Aberrationen beobachtet, die jedoch nicht einheitlich waren. Es könnte sich hierbei um präparative Verluste handeln.

**3.3.5 Fall Nr. 6**

Hier handelte es sich um eine 58jährige Patientin. Es wurden sechs verschiedene Tumorareale nach Anlegen von Primärkulturen zytogenetisch untersucht. Es wurden von jedem Areal 50 Metaphasen auf numerische und 7 bis 20 Metaphasen auf strukturelle Aberrationen untersucht.

**Pathologisch-anatomischer Gesamtbefund**

Nach pathologischer Untersuchung des Tumorgewebes konnte der Tumor nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft werden.

**Areal I - Mikroskopisch – pathologischer Befund**

Areal I und IV: Die in der Konsistenz ähnlichen Gewebeproben zeigen einen zellreichen Tumor, der sich aus Zügen und teilweise zwiebelschalenartig angeordneten Stapeln mittelgroßer Zellen aufbaut. Das Zytoplasma eosinophil und konfluierend. Die Kerne im Querschnitt ovalär bis rundlich, im Längsschnitt teilweise auch spindelig. Das Chromatin homogen oder feingranuliert. Hin und wieder prominente Nukleolen. Gelegentlich eingestreut sind Kalkkörperchen, teilweise mit konzentrischer Binnenschichtung.

**Areal I - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (39x 45, 6x 44, 3x 43, 2x 42 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **18** Metaphasen

**10x 45,XX**, -22

**1x 44,XX**, -3, -22

**2x 44,XX**, -16, -22

**2x 44,XX**, -8, -22

**1x 43,XX**, -11, -18, -22

**1x 42,XX**, -5, -11, -18, -22

**1x 42,XX**, -2x 6, -12, -22

**Areal II - Mikroskopisch – pathologischer Befund**

Areal II, V und VI: Die in diesen Fraktionen mit weicher Konsistenz beschriebenen Gewebeanteile zeigen Strukturen des gleichen Tumorgewebes, dabei sind in Fraktion 2 abschnittsweise kollagenfaserreiche und zellarme Anteile der Dura miterfasst. Der Gefäßgehalt ist abschnittsweise etwas vermehrt mit leichter Hyperämie. Gelegentlich kommen lymphoide Zellen vor, die fokal in Gruppen liegen. In Fraktion 6 erkennt man gelegentlich innerhalb des Tumors Reste kollagenfaserreicher lamellärer Strukturen. Darüber hinaus kommen hier Anteile von Hirngewebe vor.

**Areal II - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (47x 45, 2x 43, 1x 42 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **7** Metaphasen

**5x 45,XX**, -22

**1x 43,XX**, -8, -10, -22

**1x 42,XX**, -19, -21, -2x 22

**Areal III - Mikroskopisch – pathologischer Befund**

Das Tumorgewebe hier ist gleichartig strukturiert, wie in den übrigen Fraktionen. Die psammomatösen Körperchen liegen etwas dichter.

**Areal III - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (48x 45, 2x 44 Chromosomen)

- Feinstrukturell: **10** Metaphasen

**10x 45,XX, -22**

#### **Areal IV - Mikroskopisch – pathologischer Befund**

Siehe Areal I

#### **Areal IV - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (42x 45, 5x 44, 3x 43 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **17** Metaphasen

**12x 45,XX, -22**

**1x 44,XX, -6, -22**

**1x 44,XX, -9, -22**

**1x 44,XX, -10, -22**

**1x 43,XX, -10, -20, -22**

**1x 43,XX, -19, -20, -22**

#### **Areal V - Mikroskopisch – pathologischer Befund**

Siehe Areal II

#### **Areal V - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (1x46,43x 45, 5x 44, 1x43 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **20** Metaphasen

**1x 46,XX, +10, -22**

**15x 45,XX, -22**

**1x 44,XX, -8, -22**

**1x 44,XX, -14, -22**

**1x 44,XX, -18, -22**

**1x 44,XX, -19, -22**

#### **Areal VI - Mikroskopisch – pathologischer Befund**

Siehe Areal II

#### **Areal VI - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (48x 45, 1x 44, 1x42 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **10** Metaphasen

**10x 45,XX, -22**

### **Beurteilung**

Die Meningeomzellen weisen in den Arealen III und VI durchgehend eine Monosomie 22 auf, woraus sich der Karyotyp 45,XX, -22 ergibt. In den Arealen I, II, IV und V weisen die Meningeomzellen überwiegend eine Monosomie 22 auf, woraus sich der Karyotyp 45,XX, -22 ergibt. Daneben finden sich aber einige Zellen, die einen zusätzlichen wechselnden Chromosomenverlust aufweisen. Dieser Verlust ist wahrscheinlich präparativ bedingt, da die fehlenden Chromosomen sehr verschieden sind. In Areal V liegt eine Metaphase vor, die den Karyotyp 46,XX, +10, -22 aufweist.

### **3.3.6 Fall Nr. 7**

Hier handelte es sich um eine 52jährige Patientin. Es wurden sechs verschiedene Tumoreale nach Anlegen von Primärkulturen zytogenetisch untersucht. Es wurden von jedem Areal 50 Metaphasen auf numerische und 5 bis 16 Metaphasen auf strukturelle Aberrationen untersucht.

### **Pathologisch-anatomischer Gesamtbefund**

Nach pathologischer Untersuchung des Tumorgewebes konnte der Tumor nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft werden.

### **Mikroskopisch – pathologischer Gesamtbefund**

Man erkennt Gewebe eines Tumors mit regional wechselnder Zelldichte, wobei hier dreidimensional durchflochtene Zellstapel erkennbar sind. Das Zytoplasma der Zellen blaß eosinophil mit ineinander fließenden Zellgrenzen. Die Kerne rundlich bis ovalär, teilweise auch länglich mit einem mäßig dichten, granulär strukturierten Chromatin und stellenweise prominenten Nukleolen bzw. Chromozentren. Fokal zeigen sich immer wieder kollagenfaserreichere und zellärmere Zonen. Ganz vereinzelt zeigen sich zwiebelschalenartige Verwirbelungen. Gelegentlich kommen mehrkernige Zellen vor. In Fraktion 3 kommen zum Teil vakuolige interstitielle Auflockerungen vor, diese sind kleinherdig zu sehen. In Fraktion 5 erkennt man einen Saum von schmalen Großhirnrindengewebe, gleichartiges Gewebe liegt in Fraktion 4 bei. In Fraktion 4 scheint der Fasergehalt des Tumors zumindest stellenweise etwas vermehrt.

**Areal I - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (1x 45, 35x 44, 7x 43, 5x 42, 1x 41, 1x40 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **10** Metaphasen

**7x 44,XX**, del(2)(p12), del(6)(q16), -16, -22

**1x 44,XX**, del(2)(p12), del(6)(q16), tas(11;11)(p15;p15), -16, -22

**1x 44,XX**, del(2)(p12), del(6)(q16), tas(8;20)(q24;p12), -16, -22

**1x 42,XX**, del(2)(p12), del(6)(q16), -16, -2x 19, -22

Die Meningeomzellen weisen in Areal I durchgehend den aberranten weiblichen Karyotypen 44,XX, del(2)(p12), del(6)(q16), -16, -22 auf. In zwei Metaphasen liegt zusätzlich noch eine telomerische Assoziation einmal zwischen zwei Chromosomen 11 und zweimal zwischen den beiden Chromosomen 8 und 20 vor, so dass eventuell noch ein zweiter Zellklon vorliegt. In einer weiteren Metaphase liegt zusätzlich ein Verlust des Chromosoms 19 vor. Dieser Verlust ist wahrscheinlich präparativ bedingt.

**Areal II - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (43x 44, 3x 43, 3x 42, 1x 41 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **16** Metaphasen

**1x 45,XX**, del(2)(p12), del(6)(q16), tas(8 ;11)(p23 ;p15), -16, del(22)(q12)

**8x 44,XX**, del(2)(p12), del(6)(q16), -16, -22

**1x 44,XX**, del(2)(p12), tas(4;20)(p15;q13), del(6)(q16), -16, -22

**1x 43,XX**, del(2)(p12), del(6)(q16), -16, -21, -22

**1x 43,XX**, del(2)(p12), del(6)(q16), -16, -17, -22

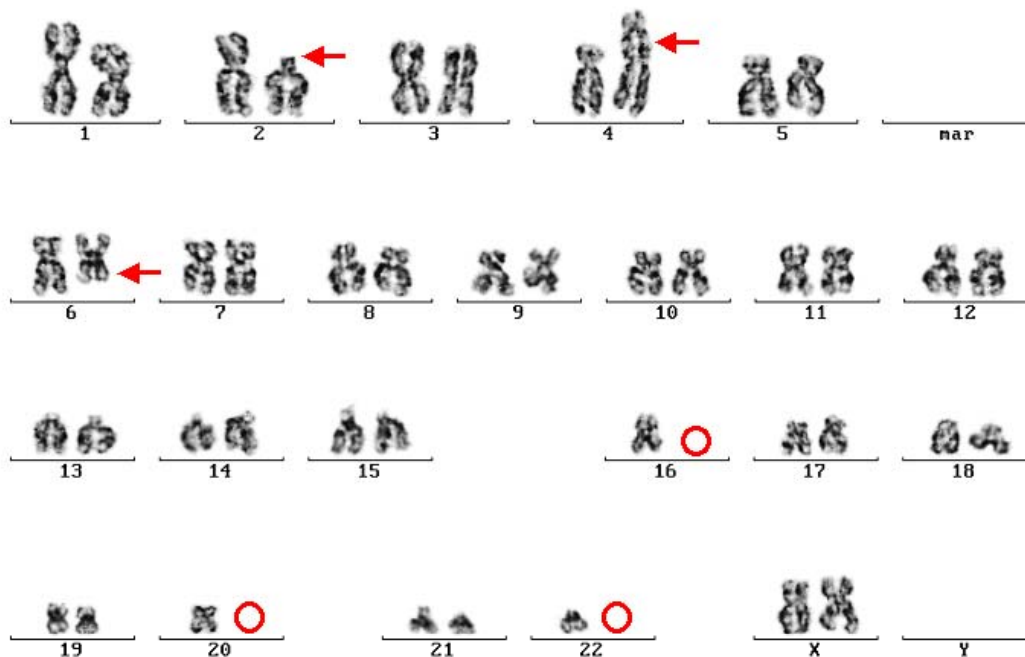
**1x 42,XX**, del(2)(p12), del(6)(q16), -12, -16, -17, -22

**1x 42,XX**, del(2)(p12), del(6)(q16), -10, -12, -16, -22

**1x 42,XX**, del(2)(p12), del(6)(q16), -9, -16, -19, -22

**1x 41,XX**, del(2)(p12), del(6)(q16), -2x 16, -18, -2x 22





**Karyotyp:** 44,XX, del(2)(p12), tas(4;20)(p15;q13), del(6)(q16), -16, -22

**Abb. 38:** Die Abbildung zeigt einen aberranten Karyotyp mit einer Deletion am kurzen Arm von Chromosom 2, telomerischer Assoziation zwischen den Chromosomen 4 und 20, eine partielle Deletion am langen Arm des Chromosoms 6 und Verlust der Chromosomen 16, 20 und 22. Der Pfeil weist auf aberrante, der Ring auf fehlende Chromosomen hin.

In Areal II weisen etwa 50% der Zellen einen aberranten weiblichen Karyotypen auf, woraus sich der Karyotyp 44,XX, del(2)(p12), del(6)(q16), -16, -22 ergibt. Die andere Hälfte zeigt zusätzlich einen wechselnden Chromosomenverlust. Ein einheitlicher Karyotyp liegt folglich nicht vor, sodass ein präparativer Chromosomen-Verlust zu vermuten ist. In zwei weiteren Metaphasen treten telomerische Assoziation jeweils zwischen den Chromosomen 8 und 11, 4 und 20 auf (siehe Abb. 38). Dabei dürfte es sich auch um Einzelbefunde handeln, die keine eigenen Zellklone repräsentieren.

### Areal III - Chromosomenanalyse

- Numerisch: **50** Metaphasen (44x 44, 2x 43, 4x 42 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **7** Metaphasen

**6x 44,XX, del(2)(p12), del(6)(q16), -16, -22**

**1x 42,XX, del(2)(p12), del(6)(q16), -10, -15, -16, -22**

In Areal III weisen die Meningeomzellen durchgehend einen weiblichen abnormen Karyotypen 44,XX,del(2)(p12), del(6)(q16), -16, -22 auf.

In einer Metaphase liegt zudem zusätzlich ein vermutlich präparativer Verlust der Chromosomen 10 und 15 vor.

#### **Areal IV - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (43x 44, 5x 43, 1x 42, 1x 40 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **12** Metaphasen

**8x 44,XX**, del(2)(p12), del(6)(q16), -16, -22

**1x 43,X**, del(2)(p12), del(6)(q16), -16, -22, -X

**1x 43,XX**, del(2)(p12), del(6)(q16), -8, -16, -22

**1x 43,XX**, del(2)(p12), del(6)(q16), -16, -17, -22

**1x 40,X**, del(2)(p12), del(6)(q16), tas(7;20)(p21;q13), -16, -18, -19, -20, -22, -X

In Areal IV weisen die Meningeomzellen überwiegend (in ca. 70%) einen weiblichen abnormen Karyotypen von 44,XX, del(2)(p12), del(6)(q16), -16, -22 auf.

Daneben finden sich aber auch drei Zellen, die neben der del(2)(p12), del(6)(q16), -16, -22 noch einen weiteren allerdings wechselnden Chromosomenverlust aufweisen. Dieser Verlust ist wahrscheinlich präparativ bedingt. In einer Metaphase liegt zusätzlich noch eine telomerische Assoziation zwischen den beiden Chromosomen 7 und 20 vor, was wohl auch als Einzelbefund zu bewerten ist.

#### **Areal V - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (46x 44, 3x 43, 1x 41 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **7** Metaphasen

**5x 44,XX**, del(2)(p12), del(6)(q16), -16, -22

**1x 43,XX**, del(2)(p12), del(6)(q16), -15, -16, -22

**1x 41,XX**, del(2)(p12), del(6)(q16), -13, -16, -2x 19, -22

In Areal V weisen die Meningeomzellen durchgehend den weiblichen abnormen Karyotypen 44,XX,del(2)(p12), del(6)(q16), -16, -22 auf. In zwei Metaphasen wurde zusätzlich ein wechselnder Chromosomenverlust beobachtet, der jedoch nicht einheitlich war und deshalb vermutlich präparativ bedingt ist.

**Areal VI - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **35** Metaphasen (33x 44, 1x 43, 1x 41 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **5** Metaphasen

**5x 44,XX**, del(2)(p12), del(6)(q16), -16, -22

5 Metaphasen der Meningeomzellen weisen in Areal VI durchgehend den weiblichen abnormen Karyotypen 44,XX,del(2)(p12), del(6)(q16), -16, -22 auf.

**Areal VII - Chromosomenanalyse:**

- Numerisch: **37** Metaphasen (31x 44, 5x 43, 1x 41 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **5** Metaphasen

**4x 44,XX**, del(2)(p12), del(6)(q16), -16, -22

**1x 43,XX**, del(2)(p12), del(6)(q16), -16, -17, -22

4 Metaphasen der Meningeomzellen weisen in Areal VII durchgehend den weiblichen abnormen Karyotypen 44,XX,del(2)(p12), del(6)(q16), -16, -22 auf. In einer Metaphase liegt zusätzlich der Verlust von Chromosom 17 vor. Der Verlust von Chromosom 17 ist wahrscheinlich präparativ bedingt.

**FISH-Untersuchung - P53-Gen**

In den 200 ausgewerteten Interphasezellkernen der Meningeomzellen (Areal II) zeigten sich in 195 (97,5%) Kernen in dem Bereich 17p13.1 zwei normale Signale. In sechs Kernen (3%) wurde nur ein Signal gefunden, was aber als Artefakt eingestuft werden kann, weil dieser Wert unter dem Bereich des Cut-Off-Werts von 5% liegt.

**SKY-Chromosomenanalyse**

Es konnte nur eine Metaphase mittels spektraler Karyotypisierung (SKY) analysiert werden:

**42,XX**, der(2)t(2;12)(p12;?), der(6)t(6;16)(q14;?), -9, -15, -16, -22

Die SKY-Untersuchung hat die Ergebnisse der G-Bänderung bestätigt. Allerdings konnte sie darüber hinaus zusätzliche Aberrationen entdecken (siehe

Abb. 39), die ohne SKY-Untersuchung nicht erfassbar waren. Es wurde nachgewiesen, dass nicht nur der kurze Arm von Chromosom 2 verloren gegangen ist, sondern auch kleine Stücke des Materials von Chromosom 12, das an der Bruchstelle von Chromosom 2 hängt. Es wurde auch eine unbalancierte

Translokation zwischen den beiden Chromosomen 6 und 16 beobachtet.

**Gesamtbeurteilung**

Anhand der zytogenetischen und molekularzytogenetischen Untersuchung ist erkennbar, dass es einen Hauptzellklon mit dem Karyotypen 44,XX, der(2)t(2;12)(p12;?), der(6)t(6;16)(q14;?), -16, -22 gibt. Es kommen aber auch noch Metaphasen vor, die zusätzlich einen weiteren wechselnden Chromosomenverlust aufweisen, der vermutlich präparativ bedingt ist.

Abb. 39: Fall Nr.7  
SKY-Chromosomenanalyse



**Karyotyp:** 42,XX, der(2)t(2;12)(p12;?), der(6)t(6;16)(q14;?), -9, -15, -16, -22

### **3.3.7 Fall Nr. 8**

Hier handelte es sich um eine 64jährige Patientin. Es wurden zwei verschiedene Tumoreale nach Anlegen von Primärkulturen zytogenetisch untersucht. Es wurden von jedem Areal 50 Metaphasen auf numerische und 5 bis 13 Metaphasen auf strukturelle Aberrationen untersucht.

#### **Pathologisch-anatomischer Gesamtbefund**

Nach pathologischer Untersuchung des Tumorgewebes konnte der Tumor nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft werden.

#### **Areal I - Mikroskopisch – pathologischer Befund**

Man erkennt ein Tumorgewebe mit regional wechselnder, insgesamt relativ hoher Zelldichte. Die Zellen liegen in Stapeln, wobei immer wieder zwiebelschalenartige Zellwirbel vorkommen. Die Kerne rundlich bis ovalär und mäßig chromatindicht mit teils feingranulärer Binnenstruktur. Diffus eingestreut kommen regional wechselnd große Kalkkörperchen die meist eine konzentrische Binnenstruktur aufweisen vor. Daneben kommen hyperämische und dilatierte Gefäße vor. Spärlich miterfasst koagulationsgeschädigte Dura sowie vereinzelt Knochenpartikel.

#### **Areal I - Chromosomenanalyse**

Eine Chromosomenanalyse war nicht möglich, da die Meningeomzellen nicht gewachsen sind.

#### **Areal II - Mikroskopisch – pathologischer Befund**

Relativ wenig Tumorgewebe mit vorzugsweise psammomatös geschichteten Kalkkörperchen.

#### **Areal II - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (49x46, 1x 45 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **5** Metaphasen

**5x 46,XX**

#### **Areal IV - Mikroskopisch – pathologischer Befund**

Tumorgewebe mit ähnlichem Aufbau wie in Areal I beschrieben mit hier allgemeiner Lockerung des Gewebes und zwiebelschalenartig geschichteten Tumorzellgruppen. Diffus eingestreut Kalkkörperchen mit Binnenschichtung.

#### **Areal IV - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (47x46, 2x 45, 1x 44 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **13** Metaphasen

**10x 46,XX**

**1x 45,X, -X**

**1x 45,XX, -3**

**1x 44,XX, -15, -22**

#### **Beurteilung**

Die Meningeomzellen weisen durchgehend einen normalen weiblichen Karyotypen mit 46,XX auf. Daneben finden sich in Areal IV drei Zellen, die einen wechselnden Chromosomenverlust aufweisen. Dieser Verlust ist wahrscheinlich präparativ bedingt.

#### **FISH-Untersuchung - P53-Gen**

In den 200 ausgewerteten Interphasezellkernen der Meningeomzellen (Areal IV) zeigten sich in 198 (99%) Kernen in dem Bereich 17p13.1 zwei normale Signale. In zwei Kernen (1%) wurde nur ein Signal gefunden, was auf ein Artefakt zurückgeführt werden kann, weil dieser Wert erheblich unter dem Bereich des Cut-Off-Werts von 5% liegt.

#### **3.3.8 Fall Nr. 9**

Hier handelte es sich um eine 53jährige Patientin. Es wurden zwei verschiedene Tumoreale nach Anlegen von Primärkulturen zytogenetisch untersucht. Es wurden von jedem Areal 100 Metaphasen auf numerische und 47 bis 63 Metaphasen auf strukturelle Aberrationen untersucht.

#### **Pathologisch-anatomischer Gesamtbefund**

Nach pathologischer Untersuchung des Tumorgewebes konnte der Tumor nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft werden.

#### **Areal I - Mikroskopisch – pathologischer Befund**

Man erkennt ein regional wechselnd zelldichtes Tumorgewebe bestehend aus in Stapeln angeordneten Zellen mit ineinander fließenden eosinophilen Zytoplasmaleibern. Die Kerne im Querschnitt rundlich bis oval, im Längsschnitt

länglich bis spindelig. Das Chromatin feingranuliert. Hin und wieder prominente Nucleolen. Immer wieder sind Verwirbelungen der Zellen erkennbar, teilweise mit zentral vermehrtem Kollagenfasergehalt. An anderen Stellen sind zwiebelschalenartige Zellstapel zu sehen. Immer wieder sind Verkalkungszonen nachweisbar. Im Randbereich sind Anteile von faserreichem membranösem Duragewebe miterfasst. Schließlich miterfasst wenig Knochengewebe. Die EVG-Färbung zeigt innerhalb des Tumors immer wieder breite kollagenfaserreiche Bündel.

### **Areal I - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **100** Metaphasen (1x 48, 9x 46, 68x 45, 14x 44, 2x 43, 1x 41 Chromosomen)

- Feinstrukturell: **63** Metaphasen

**1x 48,XX**, + 2, +12, tas(19;?)(q13;?), del(22)(q12)

**1x 47;XX**, +21, tas(21;?)(p13;?), del(22)(q12)

**7x 46,XX**, del(22)(q12)

**1x 46,XX**, tas(21;?)(p13;?), del(22)(q12)

**1x 46,XX**, tas(3;21)(p26;p13), del(22)(q12)

**1x 46,XX**, tas(19;21)(q13;p13), del(22)(q12)

**1x 46,XX**, tas(3;6)(q26;q28), del(22)(q12)

**33x 45,XX**, tas(21;?)(p13;?), -22

**2x 45,XX**, -22

**1x 45,XX**, -17, del(22)(q12)

**1x 44,XX**, -9, -22

**2x 44,XX**, -21, -22

**1x 44,XX**, -8, tas(21;?)(p13;?) , -22

**1x 44,XX**, -3, tas(21;?)(p13;?), -22

**2x 44,XX**, -21, tas(21;?)(p13;?), -22

**1x 44,XX**, -10, -19, tas(21;?)(p13;?), del(22)(q12)

**1x 44,XX**, -9, -11, tas(21;?)(p13;?)

**1x 44,XX**, -9, tas(21;?)(p13;?), -22

**1x 44,XX**, -17, tas(21;?)(p13;?), -22

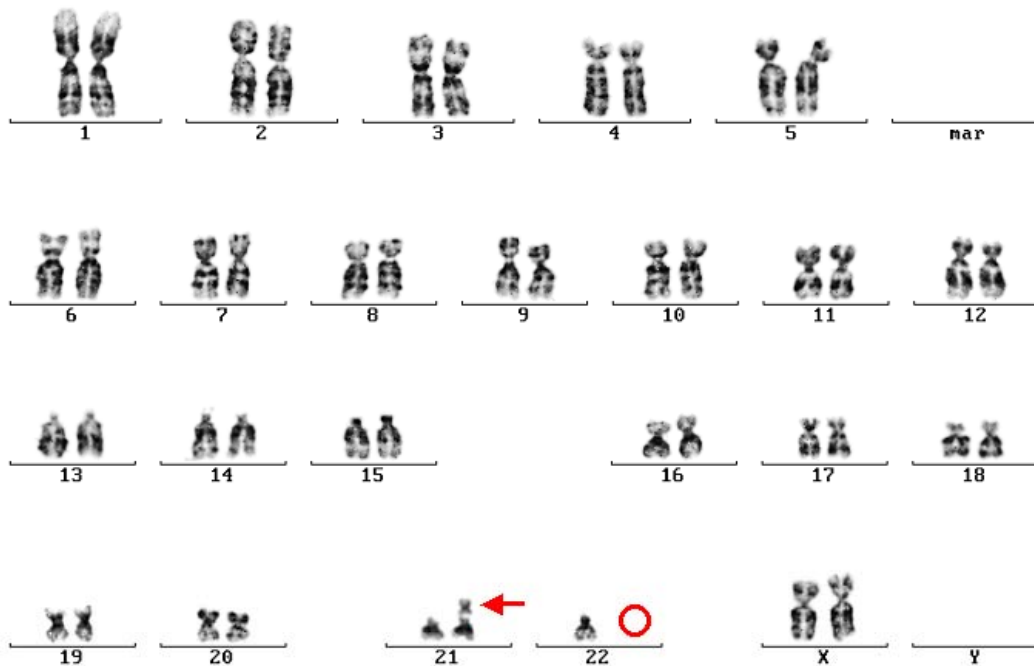
**1x 44,XX**, tas(14;21)(p13;p13), -15, -22

**1x 43,XX**, -19, -21, -22

**1x 41,XX**, -2x 3, -6, -8, -15, del(22)(q12)



Die Meningeomzellen weisen in Areal I in ca. 55% der Zellen einen abnormen weiblichen Karyotyp mit telomerischer Assoziation zwischen Chromosom 21 und einem Chromosom unbekannter Herkunft sowie eine Monosomie 22 auf, woraus sich der Karyotyp  $45,XX, \text{tas}(21;?)(p13;?), -22$  ergibt (siehe Abb. 40).



**Karyotyp:**  $45,XX, \text{tas}(21;?)(p13;?), -22$

**Abb. 40:** Die Abbildung zeigt ein Karyogramm mit telomerischer assoziation zwischen Chromosom 21 und einem Chromosom unbekannter Herkunft sowie eine Monosomie 22. Der Pfeil weist auf die Assoziation, der Ring auf das fehlende Chromosom 22.

In etwa 11% der Metaphasen findet man einen weiblichen Karyotypen mit partieller Monosomie 22 [46,XX, del(22)(q12)]. Etwa 35% der Zellen zeigen zusätzlich numerische und strukturelle Aberrationen, die jedoch nicht einheitlich sind. In vier Metaphasen liegt zusätzlich eine telomerische Assoziation vor, an denen Chromosom 21 dreimal mit drei verschiedenen Chromosomen (3,14 und 19) beteiligt ist. 13% der Metaphasen zeigen zusätzlich einen Verlust des Chromosoms 21. 70% der Metaphasen haben eine Addition am kurzen Arm von Chromosom 21.

In einer Metaphase liegt außer einer telomerischen Assoziation zwischen

Chromosom 21 und einem Chromosom unbekannter Herkunft und einer partiellen Monosomie 22 noch eine Trisomie 21, so dass sie eventuell einen weiteren Zellklon repräsentieren. Daneben findet sich noch eine Metaphase mit einer Trisomie 2, eine Trisomie 12, eine telomerische Assoziation zwischen Chromosom 19 und einem Chromosom unbekannter Herkunft und eine partielle Monosomie 22. Das Chromosom unbekannter Herkunft ist wahrscheinlich ein Teil von Chromosom 22.

### **Areal II - Mikroskopisch – pathologischer Befund**

Hier sieht man gleichartiges Tumorgewebe, wobei immer wieder Knochenbildungen innerhalb des Tumors und hier vorzugsweise in den fibrös verdichteten Arealen vorkommen.

### **Areal II - Chromosomenanalyse:**

- Numerisch: 100 Metaphasen (1x 47, 3x 46, 76x 45, 15x 44, 4x 43, 1x 42, 1x 41 Chromosomen)
- Feinstrukturell: 47 Metaphasen

**1x 47,XX**, +21, tas(21;?)(p13;?), del(22)(q12)

**3x 46,XX**, del(22)(q12)

**1x 46,XX**, tas(14;19)(p13;p13), del(22)(q12)

**1x 45,XX**, tas(16;19)(q23;q13), tas(21;?)(p13;?), -22

**1x 45,XX**, tas(3;?;19)(p26;?;q13), -18, del(22)(q12)

**1x 45,XX**, tas(3;19)(p26;?), -8, del(22)(q12)

**21x 45,XX**, tas(21;?)(p13;?) , -22

**1x 45,XX**, -22

**1x 45,XX**, add(19)(q13), -22

**1x 45,XX**, add(3)(p26), -22

**1x 44,XX**, -19, tas(21;?)(p13;?), -22

**1x 44,XX**, -21, -22

**1x 44,XX**, -20, tas(21;?)(p13;?), -22

**2x 44,XX**, -9, tas(21;?)(p13;?) , -22

**1x 44,XX**, -10, -11, del(22)(q12)

**1x 44,XX**, tas(21;?)(p13;?), -2x 22

**1x 44,XX**, -16, tas(21;?)(p13;?), -22

**1x 44,XX**, -15, tas(21;?)(p13;?), -22

1x 44,XX, -11, tas(19;21)(q13;q22), -22

1x 44,XX, tas(14;21)(q13;q13), -17, -22

1x 43,XX, -2x 19, tas(21;?)(p13;?), -22

1x 43,XX, -9, -21, tas(21;?)(p13;?), -22

1x 43,XX, tas(3;19)(p26;q13), -8, -9, -15, del(22)(q12)

1x 43,XX, tas(3;19;20)(p26;q13;q13), -11, -21, tas(21;?)(p13;?) , -22

Die Meningeomzellen weisen in Areal II in ca. 45 % der Metaphasen einen abnormen weiblichen Karyotyp mit telomerischer Assoziation zwischen Chromosom 21 und einem Chromosom unbekannter Herkunft sowie eine Monosomie 22 auf (siehe Abb. 40), woraus sich der Karyotyp 45,XX, tas(21;?)(p13;?), -22 ergibt. 6% der Metaphasen zeigen nur eine partielle Monosomie 22 [46,XX, del(22)(q12)]. In einer Metaphase liegt zusätzlich noch ein Chromosom 21 vor, so dass ein Karyotyp mit 47,XX, +21, tas(21;?)(p13;?), del(22)(q12) vorliegt. Es wurden jedoch in ca. 45% der Metaphasen numerische und strukturelle Aberrationen beobachtet, die jedoch nicht einheitlich waren. In drei Metaphasen liegt eine telomerische Assoziation zwischen Chromosom 3 und 19 vor. In einer anderen Metaphase wurde eine telomerische Assoziation zwischen den beiden Chromosomen 14 und 21 beobachtet (siehe Abb. 41). In sechs Metaphasen war Chromosom 19 mit verschiedenen Chromosomen (3, 14, 16, 20) telomerisch assoziiert.

### Beurteilung

Die grob- und feinstrukturell analysierten Metaphasen zeigen, dass in den beiden Arealen zwei große Zellklone [46,XX, del(22)(q12) und 45,XX, tas(21;?)(p13;?), -22]. Die Telomer-Assoziation scheint aber ein Einzelbefund zu sein. Der Karyotyp 47,XX, +21, tas(21;?)(p13;?), del(22)(q12) kommt in Areal I und Areal II jeweils nur ein Mal vor. Dies weist darauf hin, dass wahrscheinlich noch ein sehr kleiner Zellklon existiert, der zytogenetisch nicht erfassbar ist. In Areal II jedoch ist das Chromosom 19 am häufigsten betroffen. Der Chromosomenverlust ist in beiden Arealen uneinheitlich, aber alle verlorenen Chromosomen (z.B. 8,10,14,15 und 19) kommen bei Meningeomen vor.



**Karyotyp:** 46,XX, tas(14;19)(p13;p13), del(22)(q12)

**Abb. 41:** Die Abbildung zeigt ein Karyogramm mit telomerischer Assoziation zwischen den beiden Chromosomen 14 und 19, und partieller Monosomie 22. Der Pfeil weist auf aberrante Chromosomen, der Ring auf den Verlust von Chromosom 19.

### 3.3.9 Fall Nr. 11

Hier handelte es sich um einen 33jährigen Patienten. Es wurden zwei verschiedene Tumoreale nach Anlegen von Primärkulturen zytogenetisch untersucht. Es wurden von jedem Areal 100 Metaphasen auf numerische und 38 bis 39 Metaphasen auf strukturelle Aberrationen untersucht.

#### Pathologisch-anatomischer Gesamtbefund

Nach pathologischer Untersuchung des Tumorgewebes konnte der Tumor nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft werden.

#### Areal IV - Chromosomenanalyse

- Numerisch: **100** Metaphasen (21x 46, 63x 45, 14x 44, 2x 43 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **38** Metaphasen

**1x 46,XY**

**2x 46,XY, -22, +mar**

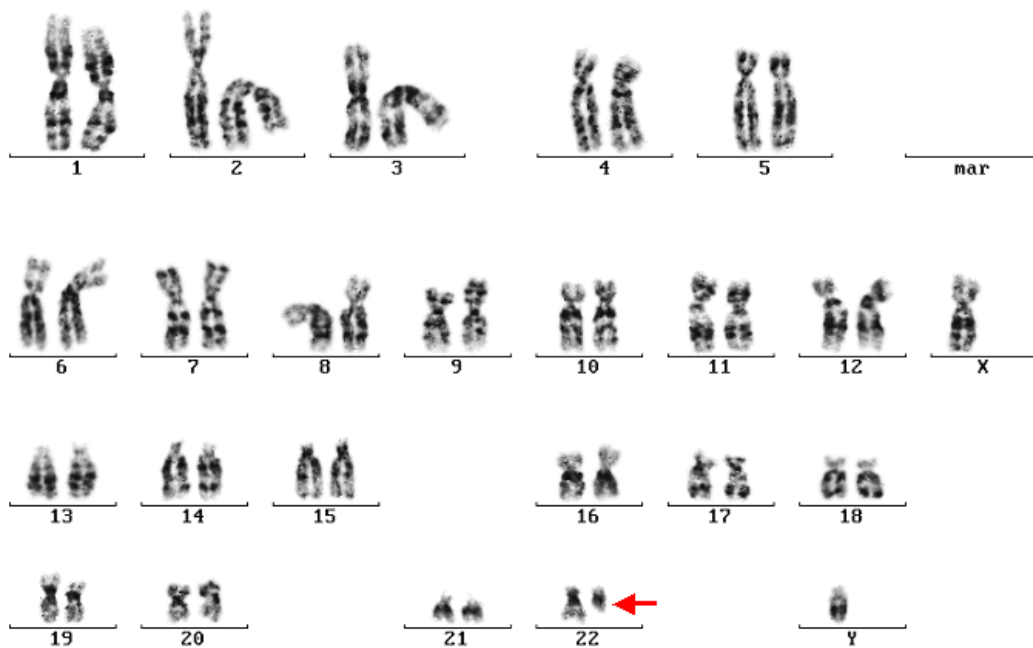
**1x 46,XY, -12, + 21, -22, +mar**

**9x 46,XY, del(22)(q12)**

**17x 45,XY, -22**

- 1x 45,XY, -19, -22, +mar**
- 1x 45,X, -8, 22q-, -Y, +mar**
- 1x 45,XY, 7q-, -21, -22, +mar**
- 1x 45,XY, -9, del(22)(q12)**
- 1x 44,XY, -19, -22**
- 1x 44,XY, -3, -17, -22, +mar**
- 1x 44,XY, -15, -22**
- 1x 44,XY, -21, -22**

Die Meningeomzellen in Areal IV weisen in ca. 45% den männlichen Karyotypen 45,XY, -22 auf. Daneben liegt aber auch ein Zellklon (ca. 25%) mit einem nur partiellen Chromosomenverlust 22 (46,XY, 22q-) vor (siehe Abb. 42). Etwa 16% der Metaphasen zeigen einen wechselnden Chromosomenverlust mit einem Marker-Chromosom. Dieses Marker-Chromosom sieht einem kleinen akrozentrischen Chromosom ähnlich. In etwa 13% der Metaphasen finden sich aber auch Zellen, die einen wechselnden Chromosomenverlust aufweisen, in allen Metaphasen fehlt jedoch das Chromosom 22. Der wechselnde Chromosomenverlust ist wahrscheinlich präparativ bedingt. In Areal IV wurde auch eine Metaphase mit 7q- gefunden, was ein Hinweis auf einen weiteren Zellklon sein könnte. In einer Metaphase liegt zusätzlich zur Monosomie 12, Monosomie 22 und einem Marker-Chromosom noch ein überzähliges Chromosom 21 vor. Hieraus ergibt sich der Karyotyp 46,XY, -12, +21, -22, +mar.



**Karyotyp:** 46,XY, del(22)(q12)

**Abb. 42:** Die Abbildung zeigt ein Karyogramm mit partiellem Chromosomverlust 22. Der Pfeil weist auf dieses aberrante Chromosom 22.

### Areal V - Chromosomenanalyse

- Numerisch: **100** Metaphasen (24x 46, 61x 45, 15x 44 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **39** Metaphasen

**1x 46,XY**

**2x 46,XY, -22, +mar**

**8x 46,XY, del(22)(q12)**

**13x 45,XY, -22**

**1x 45,XY, -16, del(22)(q12)**

**1x 45,XY, -20, -22, +mar**

**1x 45,XY, -5, del(22)(q12)**

**1x 45,XY, -19, -22, +mar**

**1x 45,XY, -15, del(22)(q12)**

**2x 44,XY, -16, -22**

**1x 44,XY, -18, -22**

**1x 44,Y, -6, del(22)(q12), -X**

**1x 44,XY, -11, -22**

**1x 44,Y, -16, -22, -X, +mar**

**1x 44,XY, -16, -19, - 22, +mar**

**1x 44,XY, -6, -22**

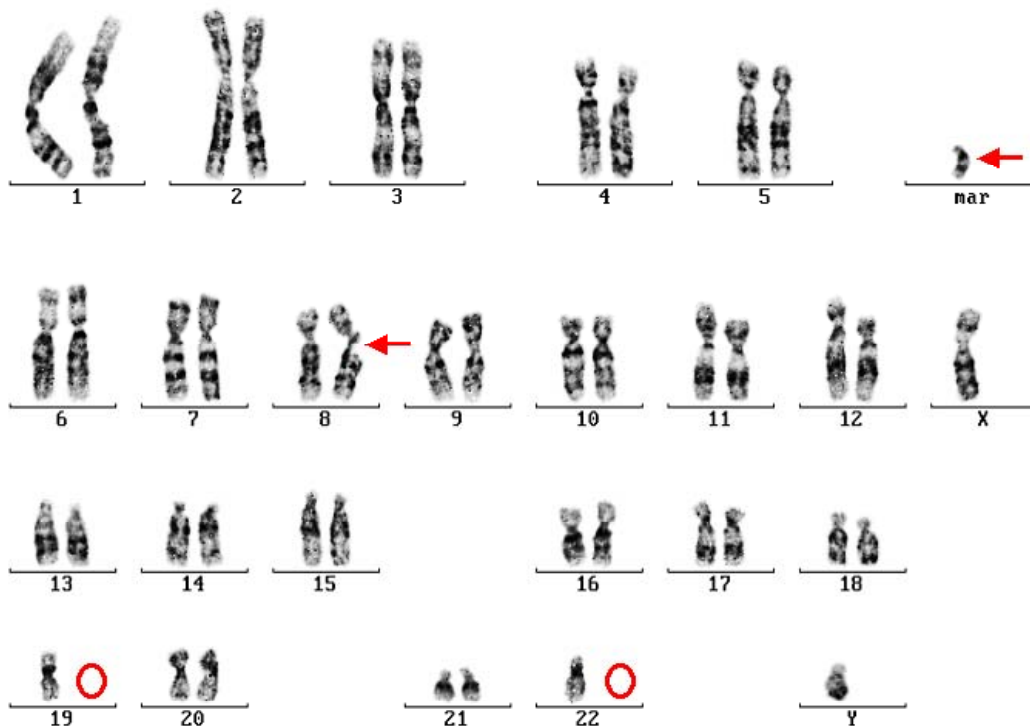
**1x 44,XY, -19, -20, del(22)(q12)**

**1x 44,XY, -12, -22**

In Areal V weisen die Metaphasen (ca. 38%) eine Monosomie 22 auf, woraus sich der Karyotyp 45,XY, -22 ergibt. Außerdem ist noch ein relativ großer Zellklon (ca. 23%) mit dem Karyotyp 46,XY, del(22)(q12) vorhanden. Es kommt zusätzlich in ca. 16% der Metaphasen ein Marker-Chromosom vor (siehe Abb. 43). Daneben finden sich aber auch Zellen, die wechselnden Chromosomenverlust aufweisen. Dieser Verlust ist wahrscheinlich präparativ bedingt.

### **Beurteilung**

Die grob- und feinstrukturell analysierten Metaphasen zeigen, dass die auftretenden Aberrationen in beiden Arealen ähnlich sind. Aber es ist erkennbar, dass mindestens drei Zellklone vorliegen.



**Karyotyp:** 45,XY, chtb(8)(q12), -19, -22, + mar

**Abb. 43:** Die Abbildung zeigt ein Karyogramm mit einem Chromatidbruch in Chromosom 8, Monosomie der Chromosomen 19 und 22 sowie einem Marker-Chromosom. Der Pfeil weist auf aberrante, der Ring auf fehlende Chromosomen hin.

### FISH-Untersuchung - P53-Gen

In den 200 ausgewerteten Interphasezellkernen der Meningeomzellen (Areal IV) zeigten sich in 197 (98,5%) Kernen in dem Bereich 17p13.1 zwei normale Signale. In drei Kernen (1,5%) wurde nur ein Signal gefunden, was jedoch auf Artefakte zurückgeführt werden kann, weil dieser Wert erheblich unter dem Bereich des Cut-Off-Werts von 5% lag.

Es wurden zusätzlich 10 Metaphasen untersucht, die alle zwei normale Signale aufweisen.

### 3.3.10 Fall Nr. 12

Hier handelte es sich um eine 78jährige Patientin. Es wurden fünf verschiedene Tumoreale nach Anlegen von Primärkulturen zytogenetisch untersucht. Es wurden von jedem Areal 100 Metaphasen auf numerische und 5 bis 34 Metaphasen auf strukturelle Aberrationen untersucht.



### **Pathologisch-anatomischer Gesamtbefund**

Nach pathologischer Untersuchung des Tumorgewebes konnte der Tumor nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad II eingestuft werden.

### **Mikroskopisch – pathologischer Gesamtbefund**

Man erkennt unterschiedlich große Anteile eines Tumorgewebes, das sich aus unterschiedlich breiten Stapeln mittelgroßer eosinphiler Zellen aufbaut. Die Zellen zeigen rundlich bis ovaläre, teils auch etwas länglich strukturierte Kerne, mit feingranulärem Chromatin. Gelegentlich sind prominente Nukleolen erkennbar. Diffus verteilt sieht man zwiebelschalenartige Wachstumsmuster der Zellen. Hin und wieder kommen Lymphozyten vor. Progesteronrezeptoren werden in zahlreichen Meningeomzellen in einer schwachen bis mittelstarken Reaktivität dargestellt. Der Proliferationsindex (gemessen mit dem MIB 1 Antikörper) ist abschnittsweise erhöht, wobei zumindest stellenweise eine Dichte von 10 bis 15 % an mittelstark bis stark positiv dargestellten Tumorzellen zu verzeichnen ist.

### **Areal I - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (2x 80, 1x 41, 14x 40, 17x 39, 8x 38, 4x 37, 3x 36, 1x 35 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **0** Metaphasen, da nicht auswertbar

### **Areal IV - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (16x 40, 19x 39, 14x 38, 1x36 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **5** Metaphasen

**2x 40,XX**, inv(1)(p12), del(4)(p15), der(6)t(6;14)(q14;p11), -9, der(11)t(11;19)(p12;p12), -14, -16, -18, -19, add(21)(p13), -22

**2x 38,XX**, inv(1)(p12), del(4)(p15), -6, der(6)t(6;14)(q14;p11), -9, -10, der(11)t(11;19)(p12;p12), -14, -16, -18, -19, add(21)(p13), -22

**1x 36,X**, inv(1)(p12), -4, der(6)t(6;14)(q14;p11) , -9, -10, der(11)t(11;19)(p12;p12), -14, -16, -17, -18, -19, -20, add(21)(p13), -22

**Areal V - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (17x 40, 18x 39, 9x 38, 4x 37, 2x 36 Chromosomen)

- Feinstrukturell: **7** Metaphasen

**3x 40,XX**, inv(1)(p12), del(4)(p15), der(6)t(6;14)(q14;p11), -9, der(11)t(11;19)(p12;p12), -14, -16, -18, -19, add(21)(p13), -22

**2x 39,XX**, inv(1)(p12), del(4)(p15), der(6)t(6;14)(q14;p11), -9, -11, -14, -16, -18, -19, add(21)(p13), -22

**1x 38,XX**, inv(1)(p12), -3, del(4)(p15), der(6)t(6;14)(q14;p11), -9, der(11)t(11;19)(p12;p12), -13, -14, -16, -18, -19, add(21)(p13), -22

**1x 36,X**, inv(1)(p12), del(4)(p15), der(6)t(6;14)(q14;p11), -9, der(11)t(11;19)(p12;p12), -14, -16, -17, -18, -19, -20, add(21)(p13), -22, -X

**Areal VI - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (12x 40, 19x 39, 10x 38, 9x 37 Chromosomen)

- Feinstrukturell: **11** Metaphasen

**4x 40,XX**, inv(1)(p12), del(4)(p15), der(6)t(6;14)(q14;p11), -9, der(11)t(11;19)(p12;p12), -14, -16, -18, -19, add(21)(p13), -22

**1x 40,XX**, inv(1)(p12), del(4)(p15), der(6)t(6;14)(q14;p11), -9, tas(11;16;19)(p14;p13q13;p13), -14, -16, -18, add(21)(p13), -22

**1x 39,XX**, inv(1)(p12), der(4)t(4;7)(p13;q35), der(6)t(6;14)(q14;p11), -7, -9, der(11)t(11;19)(p12;p12), -14, -16, -18, -19, add(21)(p13), -22

**1x 39,XX**, inv(1)(p12), del(4)(p15), der(6)t(6;14)(q14;p11), -9, der(11)t(11;19)(p12;p12), -14, -16, -18, -19, -20, add(21)(p13), -22

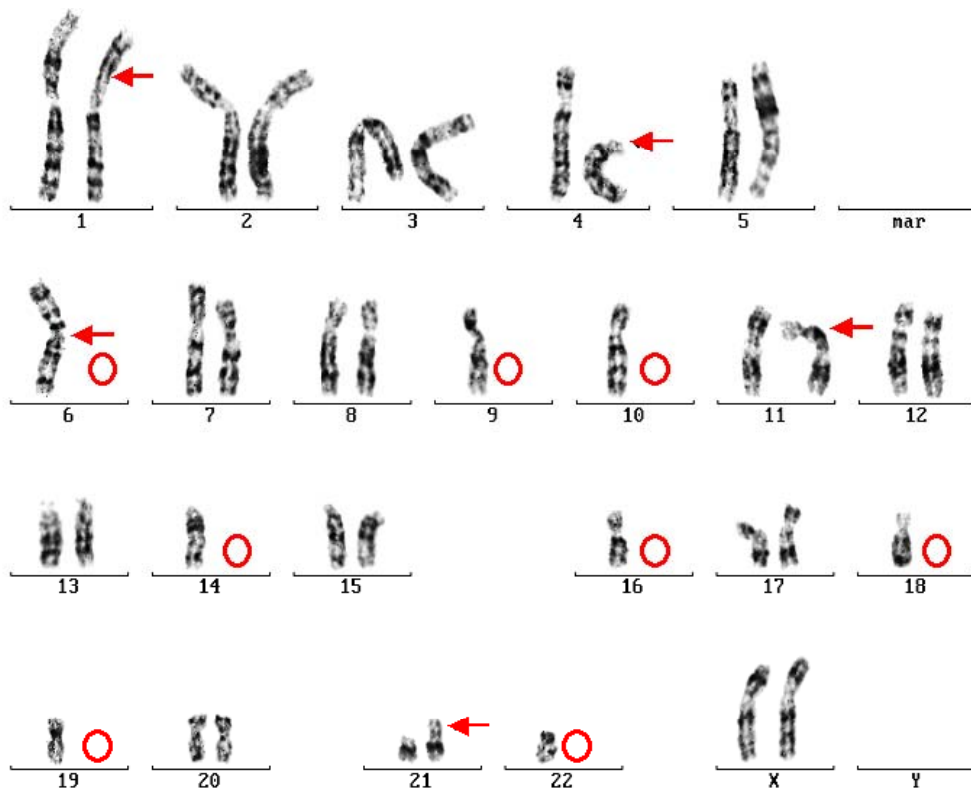
**1x 38,XX**, inv(1)(p12), del(4)(p15), der(6)t(6;14)(q14;p11), -9, der(11)t(11;19)(p12;p12), -12, -14, -16, -18, -19, tas(21;21)(q22;p13), -22

**1x 37,XX**, inv(1)(p12), -2, del(4)(p15), der(6)t(6;14)(q14;p11), -7, -9, der(11)t(11;19)(p12;p12), -14, -16, -18, -19, -20, add(21)(p13), -22

**1x 37,XX**, inv(1)(p12), del(4)(p15), -6, der(6)t(6;14)(14;p11), -9, der(11)t(11;19)(p12;p12), -2x14, -16, -18, -19, add(21)(p13), -2x22

**1x 37,XX**, inv(1)(p12), del(4)(p15), -6, der(6)t(6;14)(q14;p11), -7, -9,  
der(11)t(11;19)(p12;p12), -14, -16, -18, -19, -20, add(21)(p13), -22

Die Meningeomzellen in den Arealen IV, V und VI weisen durchgehend stark aberrante Karyotyp im hypodiploiden Bereich (36-40,XX) auf. Etwa 30% der Meningeomzellen in den Arealen IV, V und VI weisen einheitlich den Karyotyp 40,XX, inv(1)(p12), del(4)(p15), der(6)t(6;14)(q14;p11), -9, der(11)t(11;19)(p12;p12), -14, -16, -18, -19, add(21)(p13), -22 auf. Der Rest der Meningeomzellen (ca. 70%) weist zusätzlich einen wechselnden Chromosomenverlust auf (siehe Abb. 44).



**Karyotyp:** 38,XX, inv(1)(p12), del(4)(p15), -6, der(6)t(6;14)(q14;p11), -9, -10, der(11)t(11;19)(p12;p12), -14, -16, -18, -19, add(21)(p13), -22

**Abb. 44:** Die Abbildung zeigt einen Karyotyp mit folgenden Aberrationen: Eine Inversion an Chromosom 1, eine Deletion an Chromosom 4, Monosomie der Chromosomen 6, 9, 10, 14, 16, 18, 19 und 22, eine unbalancierte Translokation zwischen den Chromosomen 6 und 14 sowie den Chromosomen 11 und 19 und eine Addition am kurzen Arm von Chromosom 21. Der Pfeil weist auf aberrante, der Ring auf verlorene Chromosomen hin.

#### Areal VII - Chromosomenanalyse

- Numerisch: **50** Metaphasen (4x 80, 29x 79, 37x 78, 16x 77, 9x 75 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **34** Metaphasen

**8x 79,XXXX**, 2x inv(1)(p12), 2x del(4)(p15), -6, der(6)t(6;14)(q14;p11), -8, -9, 2x der(11)t(11;19)(p12;p12) -2x 14, -2x 16, -2x 18, -2x 19, add(21)(p13), -2x 22

**2x 78,XXX**, 2x inv(1)(p12), 2x del(4)(p15), -6, der(6)t(6;14)(q14;p11), -8, -9, 2x der(11)t(11;19)(p12;p12) -2x 14, -2x 16, -2x 18, -2x 19, add(21)(p13), -2x 22, -X

**2x 78,XXXX**, 2x inv(1)(p12), 2x del(4)(p15), -6, der(6)t(6;14)(q14;p11), -8, -9, 2x der(11) t(11;19)(p12;p12) -2x 14, -2x16, -2x 18, -2x 19, -21, add(21)(p13), -2x 22

**1x 78,XXXX**, 2x inv(1)(p12), 2x del(4)(p15), -6, der(6)t(6;14)(q14;p11), -8, -9, -12, 2x der(11) t(11;19)(p12;p12), -2x 14, -2x16, -2x 18, -2x 19, add(21)(p13), -2x 22

**1x 78,XXXX**, 2x inv(1)(p12), 2x del(4)(p15), -6, der(6)t(6;14)(q14;p11), -8, -2x 9, 2x der(11) t(11;19)(p12;p12), -12, -2x 14, -2x16, -2x 18, -2x 19, add(21)(p13), -2x 22

**1x 78,XXXX**, 2x inv(1)(p12), 2x del(4)(p15), -6, der(6)t(6;14)(q14;p11), -8, -2x 9, 2x der(11) t(11;19)(p12;p12), -13, -2x 14, -2x16, -2x 18, -2x 19, add(21)(p13), -2x 22

**1x 78,XXXX**, 2x inv(1)(p12), 2x del(4)(p15), -6, der(6)t(6;14)(q14;p11), -2x8, - 9, 2x der(11) t(11;19)(p12;p12), -2x 14, -2x16, -2x 18, -2x 19, add(21)(p13), -2x 22

**1x 77,XXXX**, 2x inv(1)(p12), 2x del(4)(p15), -6, der(6)t(6;14)(q14;p11), -8, -2x 9, -10, 2x der(11) t(11;19)(p12;p12), -2x 14, -2x16, -2x 18, -2x 19, add(21)(p13), -2x 22

**1x 77,XXXX**, 2x inv(1)(p12), 2x del(4)(p15), -6, der(6)t(6;14)(q14;p11), -8, - 9, 2x der(11) t(11;19)(p12;p12), -12, -2x 14, -15, -2x16, -2x 18, -2x 19, add(21)(p13), -2x 22

**1x 77,XXXX**, 2x inv(1)(p12), -3, 2x del(4)(p15) , -6, der(6)t(6;14)(q14;p11), -7, -8, -9, 2x der(11) t(11;19)(p12;p12), -2x 14, -2x16, -2x 18, -2x 19, add(21)(p13), -2x 22

**1x 77,XXXX**, 2x inv(1)(p12), 2x del(4)(p15), -2x6, der(6)t(6;14)(q14;p11), -8, - 9, 2x der(11) t(11;19)(p12;p12), -2x 14, -2x16, -2x 18, -2x 19, -20, add(21)(p13), -2x 22

**1x 77,XXXX**, 2x inv(1)(p12), 2x del(4)(p15), -6, der(6)t(6;14)(q14;p11), -8, -2x 9, 2x der(11) t(11;19)(p12;p12), -13, -2x 14, -2x16, -2x 18, -2x 19, add21p, -2x 22

**1x 77,XXXX**, 2x inv(1)(p12), 2x del(4)(p15), -6, der(6)t(6;14)(q14;p11), -8, - 9, 2x der(11) t(11;19)(p12;p12), -2x 14, -2x16, -2x 18, -2x 19, -20, -21, add(21)(p13), -2x 22

**1x 77,XXXX**, 2x inv(1)(p12), 2x del(4)(p15), -2x6, der(6)t(6;14)(q14;p11), -8, - 9, 2x der(11) t(11;19)(p12;p12), -2x 14, -2x16, -3x 18, -2x 19, add(21)(p13), -2x 22

**1x 77,XXXX**, 2x inv(1)(p12), 2x del(4)(p15), -2x6, der(6)t(6;14)(q14;p11), - 9, 2x

der(11) t(11;19)(p12;p12), -2x 14, -2x16, -3x 18, -2x 19, -21, add(21)(p13), -2x 22

**1x 77,XXXX**, 2x inv(1)(p12), 2x del(4)(p15),-6, der(6)t(6;14)(q14;p11), -8, -9, 2x der(11) t(11;19)(p12;p12), -13, -2x 14, -2x16, -2x 18, -2x 19, -21, add(21)(p13), -2x 22

**1x 76,XXXX**, 2x inv(1)(p12), 2x del(4)(p15),-6, der(6)t(6;14)(q14;p11), -8, -9, -11, der(11) t(11;19)(p12;p12), -2x 14, -15, -2x16, -2x 18, -2x 19, -20, add(21)(p13), -2x 22

**1x 76,XXXX**, 2x inv(1)(p12), 2x del(4)(p15), -6, der(6)t(6;14)(q14;p11), -8, -9, -2x11, 2x der(11) t(11;19)(p12;p12), -2x 14, -2x16, -2x 18, -3x 19, -20, add(21)(p13), -2x 22, + mar

**1x 76,XXXX**, 2x inv(1)(p12), 2x del(4)(p15), -2x 6, der(6)t(6;14)(q14;p11), -8, -9, -10, 2x der(11) t(11;19)(p12;p12), -2x 14, -2x16, -17, -2x 18, -2x 19, add(21)(p13), -2x 22

**1x 75,XXXX**, 2x inv(1)(p12), 2x del(4)(p15), -6, der(6)t(6;14)(q14;p11), -8, -2x 9, 2x der(11) t(11;19)(p12;p12), -13, -2x 14, -3x16, -2x 18, -3x 19, add(21)(p13), -2x 22

**1x 73,XXXX**, -1, inv(1)(p12), 2x del(4)(p15), -6, der(6)t(6;14)(q14;p11), -8, -9, -11, der(11) t(11;19)(p12;p12), -13, -2x 14, -2x16, -3x 18, -2x 19,-2x 21, add(21)(p13), -2x 22

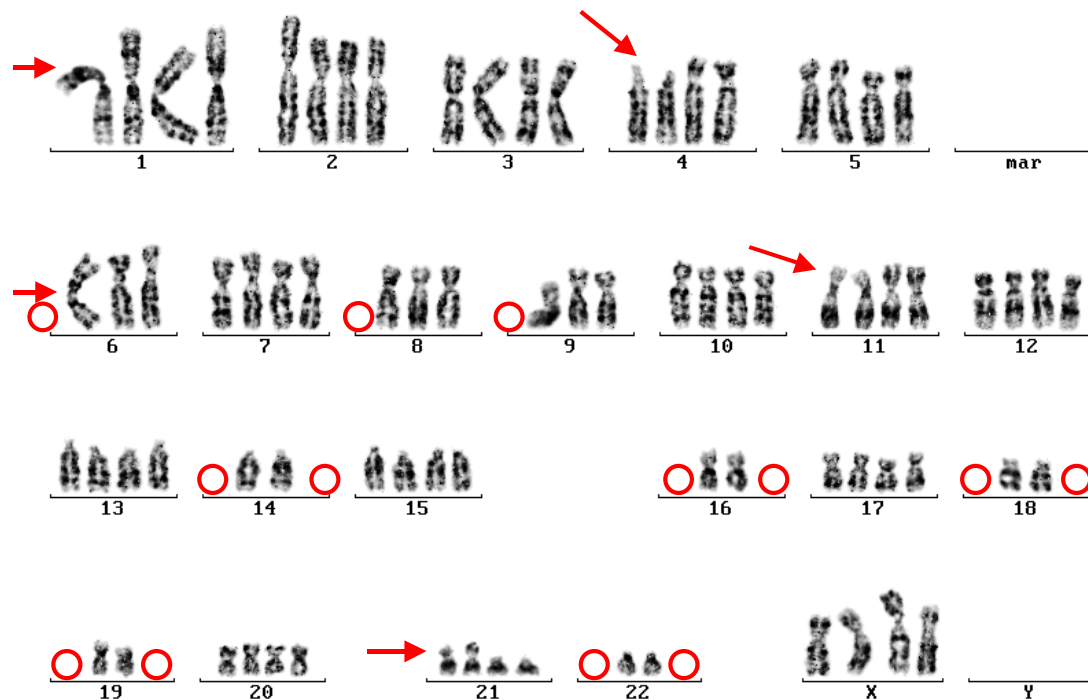
**1x 73,XX**, 2x inv(1)(p12), +2, -4, del(4)(p15), -6, der(6)t(6;14)(q14;p11), -8, -9, -11, der(11) t(11;19)(p12;p12), -2x 14, -15, -2x16, -2x 18, -3x 19,-20, add(21)(p13), -2x 22, -2x XX

**1x 72,XXX**, -1, 2x inv(1)(p12), -3, -4, 2x del(4)(p15), -6, der(6)t(6;14) (q14;p11), -8, -9, -2x10, 2x der(11) t(11;19)(p12;p12), -2x 14, -2x16, -2x 18, -2x 19,-21, add(21)(p13), -2x 22, -X

In Areal VII weisen die Meningeomzellen durchgehend stark aberrante Karyotypen im hypertriploiden Bereich (72-79,XXXX) auf. Etwa 25% der Meningeomzellen in Areal VII weisen den Karyotyp **79,XXXX**, 2x inv(1)(p12), 2x del(4)(p15),-6, der(6)t(6;14)(q14;p11), -8, -9, 2x der(11) t(11;19)(p12;p12) -2x 14, -2x 16, -2x 18, -2x 19, add(21)(p13), -2x 22 auf (siehe Abb. 45). Der Rest (75%) von

Meningeomzellen weist noch zusätzlich einen wechselnden Chromosomenverlust auf.

In diesem Areal tritt jedoch in allen Karyotypen ein Verlust der Chromosomen 6 und 8 auf, der in anderen Arealen nicht vorlag. Die Chromosomen, die in diesem Areal verloren gegangen sind, sind auch in den Arealen IV, V und VI betroffen. Am häufigsten sind die Chromosomen 11, 13, 20, 21 und X mit jeweils 4, 4, 5, 5 und 5mal betroffen. In einer Metaphase liegt zusätzlich noch ein Marker-Chromosom vor, so dass eventuell noch ein sehr kleiner Zellklon vorliegt, der zytogenetisch nicht erfassbar war.



Karyotyp: 79,XXXX, 2x inv(1)(p12), 2x del(4)(p15), -6, der(6)t(6;14)  
(q14;p11), -8, -9, 2x der(11)t(11;19)(p12;p11), -2x 14, -2x 16, -2x 18,  
-2x 19, 2x add(21)(p13), -2x 22

**Abb. 45:** Die Abbildung zeigt einen aberranten Karyotyp im hypertriploiden Bereich mit den folgenden Aberrationen: Zweimal eine Inversion in Chromosom 1, zweimal eine Deletion in Chromosom 4, Monosomie der Chromosomen 6, 8, 9, 2x 14, 2x 16, 2x 18, 2x 19 und 2x 22, eine unbalancierte Translokation zwischen den Chromosomen 6 und 14, zwei unbalancierte Translokationen zwischen den Chromosomen 11 und 19 und zweimal eine Additionen am kurzen Arm von Chromosom 21.

### **Beurteilung**

Die grob- und feinstrukturell analysierten Metaphasen zeigen an, dass mindestens zwei Hauptzellklone in diesem Tumor in unterschiedlichen Arealen vorhanden sind. Zudem sind noch mehrere sekundäre Zellklone möglich. Die Hypertriploidie, die in Areal VII vorhanden ist, wurde mit sehr großer Wahrscheinlichkeit aus dem Hauptzellklon entwickelt, der in den anderen Arealen vertreten ist. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine Verdopplung eines hypodiploiden Chromosomensatzes, da die Aberrationen in allen Arealen ähnlich aussehen. In Areal VII liegt jedoch der Chromosomensatz doppelt vor.

### **FISH-Untersuchung - P53-Gen**

In den 200 ausgewerteten Interphasezellkernen der Meningeomzellen (Areal VII) zeigten sich in 190 (95%) Kernen in dem Bereich 17p13.1 vier Signale. In zehn Kernen (5%) wurden zwei normale Signale gefunden. Dies weist darauf hin, dass in 90% der Meningeomzellen in Areal VII ein vierfaches p53-Gen vorhanden ist. Nur 10% der Meningeomzellen besitzen das p53-Gen doppelt wie normalerweise üblich.

Es wurden zudem 13 Metaphasen mit vier Signalen und zwei Metaphasen mit zwei normalen Signalen gefunden, was die Interphaseuntersuchung bestätigt. Dieses ist auch ein Hinweis, dass in diesem Areal ein hypodiploider Klon vorhanden ist.

### **3.3.11 Fall Nr. 13**

Hier handelte es sich um eine 74jährige Patientin. Es wurden drei verschiedene Tumoreale nach Anlegen von Primärkulturen zytogenetisch untersucht. Es wurden von jedem Areal 50 Metaphasen auf numerische und 7 bis 10 Metaphasen auf strukturelle Aberrationen untersucht.

### **Pathologisch-anatomischer Gesamtbefund**

Nach pathologischer Untersuchung des Tumorgewebes konnte der Tumor nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft werden.

### **Mikroskopisch – pathologischer Gesamtbefund**

Mehrere unterschiedlich große Anteile eines Meningeoms (teils meningotheelialer,



stellenweise psammomatöser Subtyp) – WHO-Grad I. Stellenweise miterfasst wenig Knochengewebe. In Fraktion IV kleinere Anteile der Dura mata. Für Malignität ergibt sich am hier vorliegenden Material kein Anhalt.

#### **Areal III - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (48x 46, 2x 45 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **10** Metaphasen

**10x 46,XY**

#### **Areal V - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (47x 46, 3x 45 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **8** Metaphasen

**8x 46,XY**

**1x 46,XY, del(12)(q14)**

#### **Areal VI - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (48x 46, 2x 45 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **7** Metaphasen

**7x 46,XY**

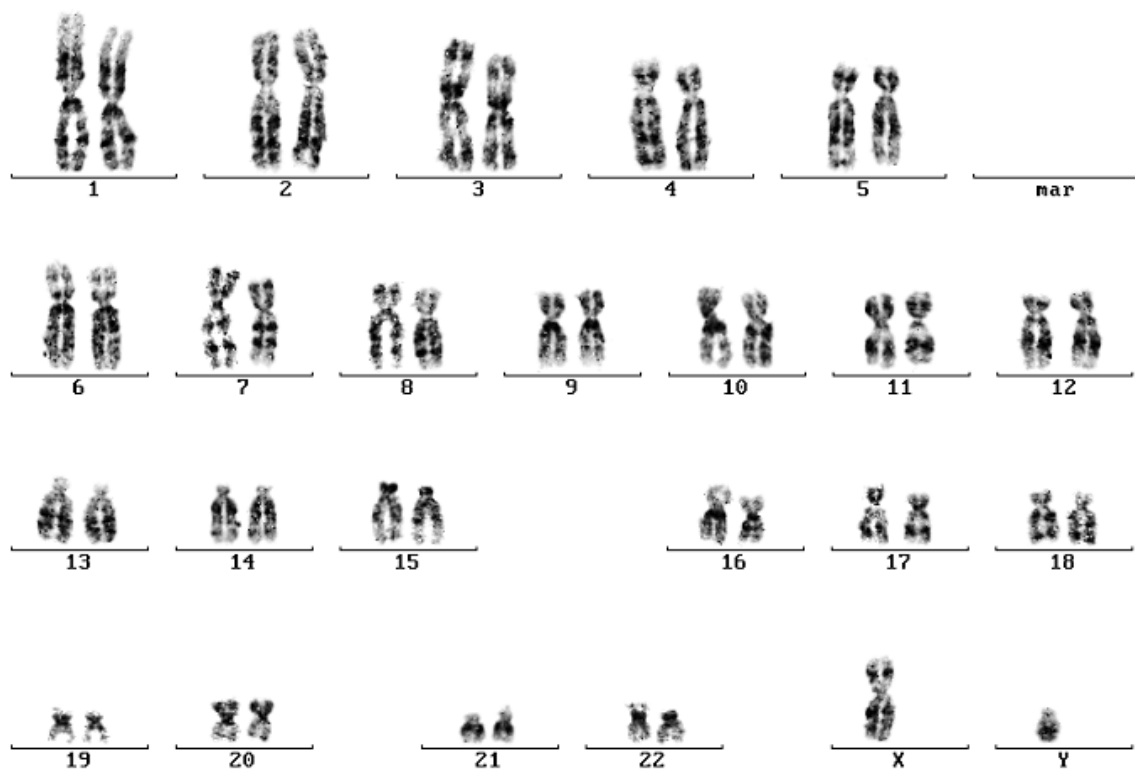
#### **Beurteilung**

Die Meningeomzellen weisen durchgehend einen normalen männlichen Karyotypen mit 46,XY auf (siehe Abb. 46). In Areal V findet sich lediglich eine Metaphase mit einer Deletion auf dem langen Arm von Chromosom 12 in der Bande q14. Diese Deletion könnte ein Hinweis auf einen sehr kleinen Zellklon sein, der zytogenetisch nicht eindeutig erfassbar war.

#### **FISH-Untersuchung - P53-Gen**

In den 200 ausgewerteten Interphasezellkernen der Meningeomzellen (Areal VI) zeigten sich in 198 (99%) Kernen in dem Bereich 17p13.1 zwei normale Signale. In zwei Kernen (1%) wurde nur ein Signal gefunden, was als Artefakt gewertet werden kann, weil dieser Wert weit unter dem Bereich des Cut-Off-Werts von 5% lag.

Es wurden zusätzlich vier Metaphasen untersucht, die zwei normale Signale aufweisen.



### **Karyotyp: 46,XY**

**Abb. 46:** Die Abbildung zeigt einen normalen männlichen Karyotyp 46,XY.

#### **3.3.12 Fall Nr. 15**

Hier handelte es sich um eine 33jährige Patientin. Es wurden sieben verschiedene Tumoreareale nach Anlegen von Primärkulturen zytogenetisch untersucht. Es wurden von jedem Areal 25 bis 50 Metaphasen auf numerische und 5 bis 16 Metaphasen auf strukturelle Aberrationen untersucht.

#### **Pathologisch-anatomischer Gesamtbefund**

Nach pathologischer Untersuchung des Tumorgewebes konnte der Tumor nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft werden.

#### **Mikroskopisch – pathologischer Gesamtbefund**

Man erkennt unterschiedlich große Tumorgewebsanteile bestehend aus regional wechselnd breiten Stapeln kleiner bis mittelgroßer Zellen, die teilweise dreidimensional verflochten sind. Die Zellen sind eosinophil, relativ isomorph und weisen rundlich bis ovaläre, mäßig chromatinhaltige Kerne auf. Die Kerngröße

wenig variabel. Hin und wieder kommen Nucleolen vor. Immer wieder diffus im Tumor verteilt sind zwiebelschalenartige Anordnungsmuster der Zellen zu sehen. Darüber hinaus sind ebenso regional wechselnd und diffus psammomatöse Verkalkungen unterschiedlicher Größe zu sehen. Diese oftmals mit perifokal hyalinen Strukturen. In Fraktion II ist im koagulationsgeschädigten Areal eine kräftige Fibrose zu sehen, ebenso sind in den Fraktionen IV, V, VI und VII sowie VIII bis X verstärkt frosierte Areale erkennbar, daneben auch Dura mater Anteile. In wechselndem Ausmaß sind (wohl entnahmebedingte) Nekrosen zu sehen. In Fraktion II ist zusätzlich Großhirngewebe miterfasst.

#### **Areal III - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (48x 46, 2x 45 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **9** Metaphasen

**7x 46,XX**

**1x 45,XX, -3**

**1x 45,XX, -15**

#### **Areal IV - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **25** Metaphasen (25x 46 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **5** Metaphasen

**5x 46,XX**

#### **Areal V - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **30** Metaphasen (30x 46 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **7** Metaphasen

**7x 46,XX**

#### **Areal VI - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (50x 46 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **10** Metaphasen

**10x 46,XX**

#### **Areal VII - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (47x 46, 2x 45, 1x 39 Chromosomen)

- Feinstrukturell: **14** Metaphasen

**11x 46,XX**

**1x 45,XX, -21**

**1x 45,XX, -1**

**1x 39,X, -5, -7, -16, -17, -20, -22, -X**

#### **Areal VIII - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (47x 46, 2x 45, 1x 41 Chromosomen)

- Feinstrukturell: **14** Metaphasen

**11x 46,XX**

**1x 45,XX, -20**

**1x 45,XX, -7**

**1x 41,XX, -4, -9, -2x 19, -21**

#### **Areal IX - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (48x 46, 1x 45, 1x 44 Chromosomen)

- Feinstrukturell: **14** Metaphasen

**12x 46,XX**

**1x 45,XX, -8**

**1x 44,XX, -9, -20**

#### **Areal X - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (48x 46, 1x 43, 1x 40 Chromosomen)

- Feinstrukturell: **16** Metaphasen

**14x 46,XX**

**1x 43,X, -4, -11, -X**

**1x 40,XX, -9, -2x 10, -11, -16, -20**

#### **Beurteilung**

Die Meningeomzellen weisen durchgehend einen normalen weiblichen Karyotypen 46,XX auf. Daneben finden sich aber einige Zellen, die einen wechselnden Chromosomenverlust aufweisen. Dieser Verlust ist wahrscheinlich präparativ

bedingt, da der Chromosomenverlust uneinheitlich ist.

### **FISH-Untersuchung - P53-Gen**

In den 200 ausgewerteten Interphasezellkernen der Meningeomzellen (Areal IX) zeigten sich in 198 (99%) Kernen in dem Bereich 17p13.1 zwei normale Signale. In zwei Kernen (1%) wurde nur ein Signal gefunden, was als Artefakt gewertet wurde, weil dieser Wert weit unter dem Bereich des Cut-Off-Werts von 5% lag.

Es wurden zudem acht Metaphasen ausgewertet, die zwei normale Signale zeigten.

### **3.3.13 Fall Nr. 16**

Hier handelte es sich um eine 76jährige Patientin. Es wurden drei verschiedene Tumoreale nach Anlegen von Primärkulturen zytogenetisch untersucht. Es wurden von jedem Areal 30 bis 50 Metaphasen auf numerische und 5 bis 10 Metaphasen auf strukturelle Aberrationen untersucht.

### **Pathologisch-anatomischer Gesamtbefund**

Nach pathologischer Untersuchung des Tumorgewebes konnte der Tumor nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft werden.

### **Mikroskopisch – pathologischer Gesamtbefund**

Man erkennt ein relativ zeldichtes Tumorgewebe aus kleinen bis mittelgroßen Zellen mit prominent eosinophilem Zytoplasma und rundlich bis ovlären, mäßig chromatinhaltigen Kernen. Zellen liegen teilweise in Stapeln angeordnet. Hin und wieder kommen kleinere psammomatöse Körperchen vor. Bildbeherrschend sind zumindest abschnittsweise zahlreiche, unterschiedlich weit gestellte dünnwandige Gefäße, die zwischen den Tumorzellen eingelagert sind. Diese teilweise hyperämisch, gelegentlich sind perivaskuläre hyaline Manschetten entwickelt. In diesen Stellen kommen auch Knocheneinlagerungen vor in Form kurzer, relativ dicht gelegener Knochenbälkchen.

### **Areal I - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **30** Metaphasen (28x 46, 2x 45 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **5** Metaphasen

**5x 46,XX**

**Areal II - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **35** Metaphasen (33x 46, 2x 45, 1x 42 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **5** Metaphasen

**5x 46,XX**

**Areal III - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (46x 46, 1x 45, 1x 44, 1x 43, 1x 42 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **10** Metaphasen

**7x 46,XX**

**1x 44,XX, -1, -21**

**1x 43,XX, -9, -12, -22**

**1x 42,XX, -13, -14, -2x 19**

**Beurteilung**

Die Meningeomzellen weisen in den Arealen I und II durchgehend einen normalen weiblichen Karyotypen 46,XX auf.

In Areal III weisen die Meningeomzellen zwar auch überwiegend den normalen weiblichen Karyotyp 46,XX auf, es finden sich aber nebenbei drei Metaphasen, die einen wechselnden Chromosomenverlust aufweisen. Dieser Verlust ist aber wahrscheinlich präparativ bedingt.

**FISH-Untersuchung - P53-Gen**

In den 200 ausgewerteten Interphasezellkernen der Meningeomzellen (Areal IV) zeigten sich in 198 (99%) Kernen in dem Bereich 17p13.1 zwei normale Signale. In zwei Kernen (1%) wurde nur ein Signal gefunden, was auf einen Artefakt zurückgeführt werden kann, da dieser Wert weit unter dem Bereich des Cut-Off-Werts von 5% liegt.

**3.3.14 Fall Nr. 18**

Hier handelte es sich um eine 73jährige Patientin. Es wurden fünf verschiedene Tumoreale nach Anlegen von Primärkulturen zytogenetisch untersucht. Es wurden von jedem Areal 31 bis 50 Metaphasen auf numerische und 5 bis 28 Metaphasen auf strukturelle Aberrationen untersucht.

### **Pathologisch-anatomischer Gesamtbefund**

Nach pathologischer Untersuchung des Tumorgewebes konnte der Tumor nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft werden.

### **Mikroskopisch – pathologischer Gesamtbefund**

1. bis 7. einen gleichartigen Tumor mit etwas unterschiedlichem Aufbau. In weiten Abschnitten zeigt der Tumor ein fibröses Erscheinungsbild mit etwas unterschiedlicher Zelldichte. Die Zellen sind länglich-oval, locker strukturiert. An einigen Abschnitten sieht man ganz dicht Psammomkörper gelegen, die an anderen Stellen weitgehend fehlen.

### **Areal I - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (2x 46, 41x 45, 5x 44, 2x 43 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **28** Metaphasen

**1x 46,XX, +10, -22**

**1x 46,XX, -7, -22, +2x mar**

**19x 45,XX, -22**

**1x 45,XX, -2x 22, +mar**

**1x 45,XX, +4, -21, -22**

**1x 45,XX, del(1)(p34), -15, -22, +mar**

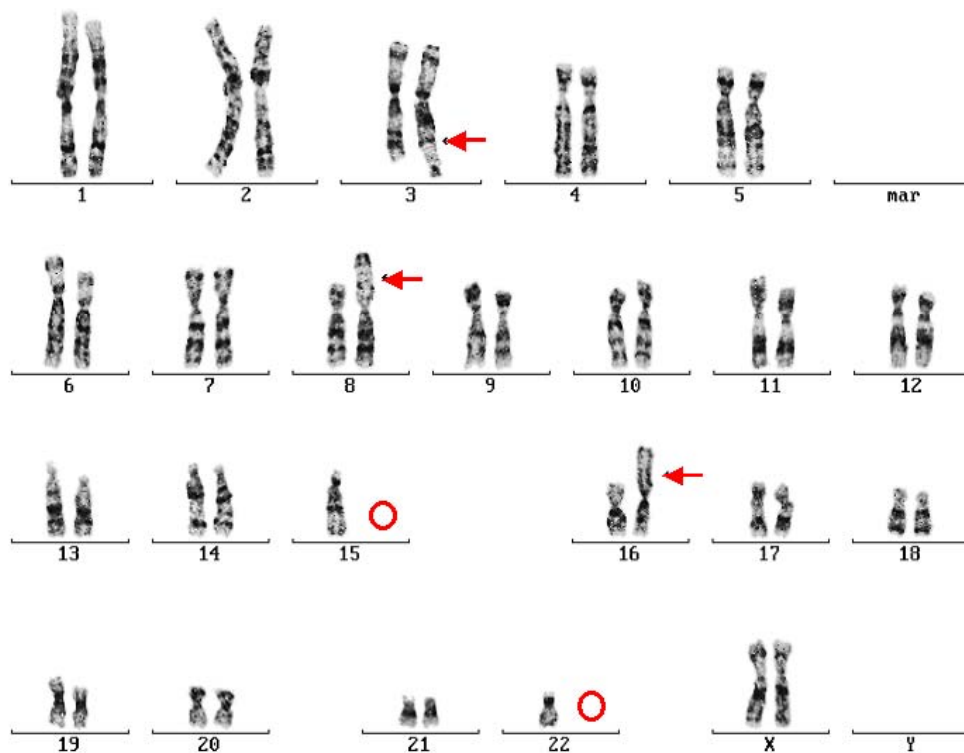
**1x 44,XX, der(3)t(3;?)(q26;?), der(8)t(8;?)(p23;?), -15, der(16) t(16;?)(p13;?), -22**

**1x 44,XX, -9, -10, -19, -22, + 2x mar**

**1x 43,XX, + 2, -8, -9, -19, -21, -22, +mar**

**1x 43,XX, -12, -15, -17, -19, -22, + 2x mar**

In Areal I weisen die Meningeomzellen überwiegend (ca 2/3) nur eine Monosomie 22 auf, woraus sich der Karyotyp 45,XX, -22 ergibt. Daneben liegt ein Zellklon (ca 1/3) mit Monosomie 22 und bis zwei Marker-Chromosomen vor. In einer Metaphase liegt zusätzlich noch eine 1p-Deletion vor. Die 1p-Deletion kommt recht oft bei Meningeomen vor, die einen WHO-Grad von II oder III aufweisen. Es liegt außerdem noch eine stark aberrante Metaphase mit den Karyotyp 44,XX, der(3)t(3;?)(q26;?), der(8)t(8;?)(q23;?), -15, der(16)t(15;16)(q14;p13), -22 vor (siehe Abb. 47).



**Karyotyp:** 44,XX, der(3)t(3;?)(q26;?), der(8)t(8;?)(p23;?), -15, der(16)t(15;16)(q14;p13), -22

**Abb. 47:** Die Abbildung zeigt einen aberranten Karyotyp mit folgenden Aberrationen: Eine unbalancierte Translokation am langen Arm von Chromosom 3 mit unbekanntem Material, eine unbalancierte Translokation am kurzen Arm von Chromosom 8 mit unbekanntem Material, Verlust des Chromosoms 15, eine unbalancierte Translokation zwischen den Chromosomen 15 und 16 und Verlust des Chromosoms 22.

### Areal II - Chromosomenanalyse

- Numerisch: 31 Metaphasen (30x 45, 1x 44 Chromosomen)
- Feinstrukturell: 5 Metaphasen

**5x 45,XX, -22**

In Areal II weisen die Meningeomzellen durchgehend eine Monosomie 22 auf.

### Areal V - Chromosomenanalyse

- Numerisch: 50 Metaphasen (1x 46, 46x 45, 2x 44, 1x 43 Chromosomen)
- Feinstrukturell: 14 Metaphasen



**1x 46,XX**

**9x 45,XX, -22**

**1x 45,XX, del(9)(p21), -22**

**1x 45,XX, -2x 22, + mar**

**1x 44,XX, + 3, -18, -19, -22**

**1x 43,XX, -18, -19, -22**

In Areal V weisen die Meningeomzellen überwiegend (ca 2/3) eine Monosomie 22 auf, woraus sich der Karyotyp 45,XX, -22 ergibt. Es liegt zudem eine Metaphase mit 9p- und Monosomie 22 vor (siehe Abb. 48). Die 9p-Deletion kommt nicht selten bei solchen Meningeomen vor, die einen WHO-Grad von II oder III repräsentieren. Es wurde aber auch eine Metaphase mit Monosomie 22 und einem Marker-Chromosom beobachtet. Daneben finden sich noch zwei Metaphasen mit wechselndem Chromosomenverlust. Dieser Verlust ist wahrscheinlich präparativ bedingt. Es liegt auch eine Metaphase mit vollständigem Chromosomensatz vor.



**Karyotyp:** 45,XX, del(9)(p12), -22

**Abb. 48:** Die Abbildung zeigt einen aberranten Karyotyp mit partieller Deletion am kurzen Arm eines Chromosoms 9 und einer Monosomie 22.

#### Areal VI - Chromosomenanalyse

- Numerisch: **50** Metaphasen (48x 45, 1x 44, 1x 36 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **16** Metaphasen

**15x 45,XX, -22**

**1x 36,XX, -3, -7, -10, -14, -16, -17, -18, -19, -2x 22**

#### Areal VII - Chromosomenanalyse

- Numerisch: **50** Metaphasen (3x 46, 45x 45, 2x 44 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **5** Metaphasen

**1x 46,XX**

**4x 45,XX, -22**

In den Arealen VI und VII weisen die Meningeomzellen durchgehend eine Monosomie 22 auf. Daneben liegt aber auch eine Metaphase mit einem normalen weiblichen Karyotyp 46,XX vor.

### **Beurteilung**

Anhand diese Ergebnisse kann festgestellt werden, dass der Tumor aus mehreren unterschiedlichen Zellklonen besteht. In den Arealen II, VI und VII findet man überwiegend einen weiblichen Karyotyp 45,XX, -22, der typisch für Meningeome vom WHO-Grad I ist. In den Arealen I und V sind zusätzliche strukturelle Aberrationen vorhanden. Ebenso ist auch ein Klon mit einem normalen weiblichen Karyotyp 46,XX nachweisbar. In Areal I liegen Chromosomen 2, 4 und 10 in unterschiedlichen Metaphasen als überzählige Chromosomen vor.

### **FISH-Untersuchung - P53-Gen**

In den 200 ausgewerteten Interphasezellkernen der Meningeomzellen (Areal I) zeigten sich in 199 (99,5%) Kernen in dem Bereich 17p13.1 zwei normale Signale. In einem Kern (0,5%) wurde nur ein Signal gefunden, was als Artefakt gewertet werden kann, weil dieser Wert weit unter dem Bereich des Cut-Off-Werts von 5% lag. Es wurde auch 5 Metaphasen untersucht, die zwei normale Signale zeigen.

### **3.3.15 Fall Nr. 19**

Hier handelte es sich um eine 51jährige Patientin. Es wurden vier verschiedene Tumorareale nach Anlegen von Primärkulturen zytogenetisch untersucht. Es wurden von jedem Areal 50 bis 100 Metaphasen auf numerische und 18 bis 29 Metaphasen auf strukturelle Aberrationen untersucht.

### **Pathologisch-anatomischer Gesamtbefund**

Nach pathologischer Untersuchung des Tumorgewebes konnte der Tumor nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft werden.

### **Mikroskopisch – pathologischer Gesamtbefund**

Areal I. bis Areal III. Unterschiedlich große anteile eines Meningeoms (hier vorwiegend meningotheiomatöser Typ) mit einzelnen Psammomkörperchen und stellenweise Fibrose.

Areal IV. Weitgehend regulär aufgebautes kollagenfaserreiches Weichgewebe (der Dura mater) hier morphologisch fassbaren krankhaften Befund. Eine

meningeale Proliferation ist in Fraktion IV in den vorliegenden Schnittpräparaten nicht nachzuweisen.

Das vorliegende Tumorgewebe ist als WHO-Grad I zu klassifizieren. Für Malignität insgesamt kein Anhalt.

#### **Areal I - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **100** Metaphasen (11x 46, 80x 45, 4x 44, 1x 43, 1x 42, 3x 40 Chromosomen)

- Feinstrukturell: **29** Metaphasen

**3x 46,XX**, del(22)(q12)

**18x 45,XX**, -22

**1x 45,XX**, -15, del(22)(q12)

**1x 44,XX**, -21, -22

**1x 44,XX**, -15, -22

**1x 43,XX**, -9, -14, -22

**1x 41,XX**, -13, -14, -16, -22, -X

**1x 40,X**, -3, -9, -14, -16, -22, -X

**1x 40,XX**, -3, -9, -16, -20, -21, -22

**1x 40,XX**, -9, -10, -14, -15, -17, -22

#### **Areal II - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (7x 46, 40x 45, 2x 44, 1x 43 Chromosomen)

- Feinstrukturell: **20** Metaphasen

**3x 46,XX**, del(22)(q12)

**13x 45,XX**, -22

**1x 45,XX**, -18, del(22)(q12)

**1x 44,XX**, -18, -22

**1x 44,XX**, -10, -22

**1x 43,XX**, -13, -18, -22

**Areal III - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (7x 46, 38x 45, 3x 44, 1x 43, 1x 41 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **19** Metaphasen

**3x 46,XX**, del(22)(q12)

**11x 45,XX**, -22

**1x 45,XX**, tas(18;20)(q22;q13.2), -22

**1x 44,XX**, -9, -22

**1x 44,XX**, -13, -22

**1x 43,XX**, -8, -14, -22

**1x 41,XX**, -11, -13, -14, -15, -22

In den Arealen I, II und III weisen die Meningeomzellen überwiegend (ca 2/3) eine Monosomie 22 auf, woraus sich der Karyotyp 45,XX, -22 ergibt. Daneben liegt aber auch ein kleiner Zellklon (ca 20%) mit einer partiellen Monosomie 22 vor, woraus sich der Karyotyp 46,XX, del(22)(q12) ergibt. In 10% der Metaphasen findet sich ein wechselnder Chromosomenverlust. In Areal III liegt eine Metaphase, die einen weiblichen Karyotyp 44,XX, tas(18;20)(q22;q13.2), -20, -22 aufweist. Die Telomerische Assoziation scheint aber ein Einzelbefund zu sein. Ein Verlust von Chromosom 13 kommt in allen Arealen ein bis zwei Mal vor.

**Areal IV - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (1x 47, 36x 46, 9x 45, 2x 44, 1x 43, 1x 42 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **18** Metaphasen

**1x 47,XX**, +9

**8x 46,XX**

**3x 45,XX**, -22

**1x 45,XX**, -14

**1x 45,XX**, -19

**1x 44,XX**, -15, -17

**1x 44,XX**, -11, -15

**1x 43,XX, -13, -20, -X**

**1x 42,XX, -13, -15, -17, -22**

In Areal IV weisen die Meningeomzellen (ca 50%) einen normalen weiblichen Karyotyp 46,XX auf. Daneben liegt aber auch ein kleiner Zellklon (ca. 1/3) mit einer Monosomie 22 vor. Es wurden auch in fünf Metaphasen wechselnde Chromosomenverluste beobachtet. Dieser Verlust ist aber wahrscheinlich präparativ bedingt.

### **Beurteilung**

Anhand von 86 Karyogrammen kann man feststellen, dass mindestens drei verschiedene Zellklone [46,XX; 46,XX, del(22)(q12) und 45,XX, -22] und eventuell ein kleiner Zellklon mit dem Verlust von Chromosom 13 vorhanden sind.

### **FISH-Untersuchung - P53-Gen**

In den 200 ausgewerteten Interphasezellkernen der Meningeomzellen (Areal I) zeigten sich in 197 (98,5%) Kernen in dem Bereich 17p13.1 zwei normale Signale. In drei Kernen (1,5%) wurde nur ein Signal gefunden, was auf einen Artefakt zurückgeführt werden kann, weil dieser Wert deutlich unter dem Bereich des Cut-Off-Werts von 5% lag.

Es wurden zudem 10 Metaphasen untersucht, die zwei normale Signale zeigen.

### **3.3.16 Fall Nr. 20**

Hier handelte es sich um einen 65jährigen Patienten. Es wurden zwei verschiedene Tumorareale nach Anlegen von Primärkulturen zytogenetisch untersucht. Es wurden von jedem Areal 50 Metaphasen auf numerische und 8 bis 9 Metaphasen auf strukturelle Aberrationen untersucht.

### **Pathologisch-anatomischer Gesamtbefund**

Nach pathologischer Untersuchung des Tumorgewebes konnte der Tumor nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft werden.

### **Areal I - Mikroskopisch – pathologischer Befund**

Neben Großhirngewebe miterfasst Formationen eines Meningeoms (meningealer Typ) mit stellenweise Infiltration des Hirnparenchyms.

### **Areal I - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (47x45, 2x 44, 1x 43 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **9** Metaphasen

**9x 45,XY, -22**

### **Areal II - Mikroskopisch – pathologischer Gesamtbefund**

Neben spärlich Duragewebe und wenig Hirnparenchym miterfasst weitere Formationen des (meningotheliomatösen) Meningeoms.

### **Areal II - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (1x 46, 48x 45, 1x 44 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **8** Metaphasen

**1x 46,XY**

**7x 45,XY, -22**

### **Beurteilung**

Nach der Erfassung von grob- und feinstrukturell analysierten Metaphasen ist erkennbar, dass die Meningeomzellen durchgehend einen männlichen Karyotypen mit Monosomie 22 aufweisen, woraus sich der Karyotyp 45,XY, -22 ergibt. In Areal II liegt außerdem eine Metaphase mit dem Karyotyp 46,XY vor, die einen sehr kleinen Zellklon repräsentieren könnte, der allerdings zytogenetisch nicht sicher erfassbar war.

### **FISH-Untersuchung - P53-Gen**

In den 200 ausgewerteten Interphasezellkernen der Meningeomzellen (Areal III) zeigten sich in 196 (98%) Kernen in dem Bereich 17p13.1 zwei normale Signale. In vier Kernen (2%) wurde nur ein Signal gefunden, was auf einen Artefakt zurückgeführt werden kann, weil dieser Wert deutlich unter dem Bereich des Cut-Off-Werts von 5% lag.

### **3.3.17 Fall Nr. 22**

Hier handelte es sich um eine 73jährige Patientin. Es wurden drei verschiedene Tumorareale nach Anlegen von Primärkulturen zytogenetisch untersucht. Es wurden von jedem Areal 50 Metaphasen auf numerische und 7 bis 11 Metaphasen auf strukturelle Aberrationen untersucht.

### **Pathologisch-anatomischer Gesamtbefund**

Nach pathologischer Untersuchung des Tumorgewebes konnte der Tumor nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft werden.

### **Mikroskopisch – pathologischer Gesamtbefund**

1. bis 3.: ein weitgehend identisches Bild. Man sieht teilweise von einer fibrösen Membran begrenztes Tumorgewebe, bestehend aus meist in zwiebelschalen Formationen gelegenen, relativ großen, polygonalen bis rundlichen Zellen mit bläschenförmigen Kernen, die gelegentlich kleinere Nukleolen aufweisen. Stellenweise sieht man auch Bindegewebszüge. Gelegentlich findet man im Zentrum der wirbeligen Strukturen Psammomkörper. Mitosen sind nicht vermehrt nachweisbar. Auch findet man keine nennenswerte Zellpolymorphie.

### **Areal I - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (46x 45, 2x 44, 2x 43 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **7** Metaphasen

**6x 45,XX, -22**

**1x 44,XX, -8, -22**

### **Areal II - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (3x 46, 42x 45, 3x 44, 1x 43, 1x 42 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **9** Metaphasen

**1x 46,XX, -22, + mar**

**6x 45,XX, -22**

**1x 45,XX, -16, -22, + mar**

**1x 43,XX, -5, -9, -22**

### **Areal III - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (47x 45, 1x 44, 2x 43 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **11** Metaphasen

**9x 45,XX, -22**

**1x 43,XX, -10, -2x 22**

**1x 43,XX, -9, -13, -22**

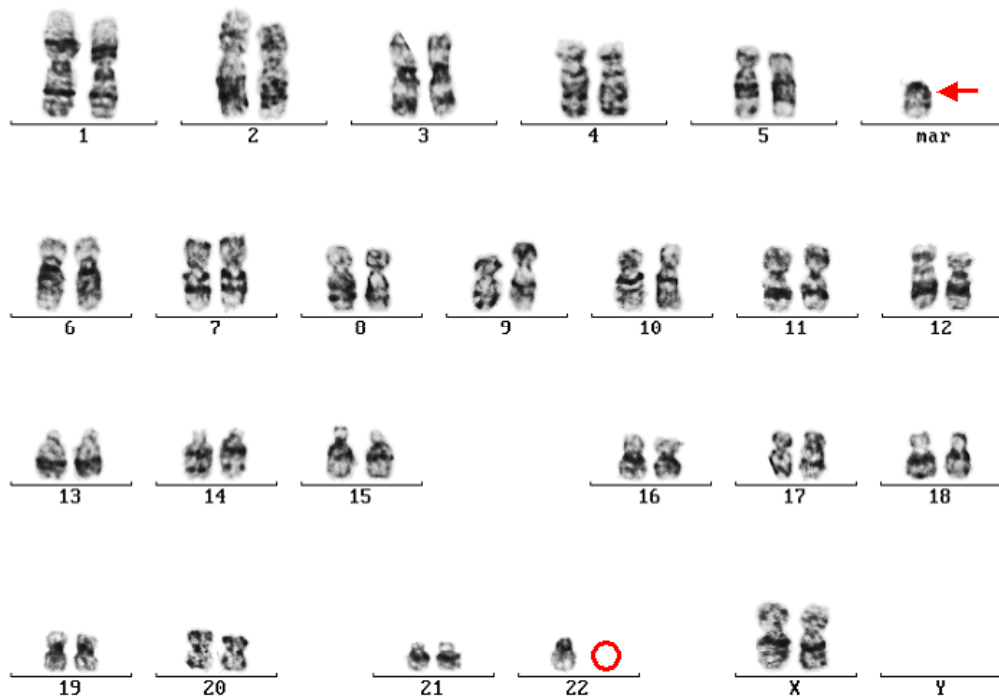


### **Beurteilung**

Die Meningeomzellen weisen überwiegend (80%) eine Monosomie 22 auf, woraus sich der Karyotyp 45,XX, -22 ergibt. Daneben finden sich aber auch (ca. 10%) Zellen, die einen zusätzlichen wechselnden Chromosomenverlust aufweisen. Dieser Verlust ist wahrscheinlich präparativ bedingt. In Areal II finden sich zudem zwei Zellen, die neben der Monosomie 22 noch ein Marker-Chromosom aufweisen (siehe Abb. 49). Wenn man für Areal II die Ergebnisse der grob- und der feinstrukturellen Metaphaseanalyse zusammenfasst, findet man einen kleinen Zellklon, der einen vollständigen Chromosomensatz (3x 46 Chromosomen) aufweist, wobei das fehlende Chromosom 22 durch ein Marker-Chromosom ersetzt sein könnte.

### **FISH-Untersuchung - P53-Gen**

In den 200 ausgewerteten Interphasezellkernen der Meningeomzellen (Areal III) zeigten sich in 197 (98,5%) Kernen in dem Bereich 17p13.1 zwei normale Signale. In drei Kernen (1,5%) wurde nur ein Signal gefunden, was auf einen Artefakt zurückgeführt werden kann, weil dieser Wert weit unter dem Bereich des Cut-Off-Werts von 5% lag.



**Karyotyp:** 46,XX, -22, + mar

**Abb. 49:** Die Abbildung zeigt einen aberranten Karyotypen mit einer Monosomie 22 und einem Marker-Chromosom. Der Pfeil weist auf ein Marker-Chromosom, der Ring auf Monosomie 22 hin.

### 3.3.18 Fall Nr. 24

Hier handelte es sich um einen 66jährigen Patienten. Es wurden zwei verschiedene Tumoreale nach Anlegen von Primärkulturen zytogenetisch untersucht. Es wurden von jedem Areal 50 Metaphasen auf numerische und 7 bis 10 Metaphasen auf strukturelle Aberrationen untersucht.

#### Pathologisch-anatomischer Gesamtbefund

Nach pathologischer Untersuchung des Tumorgewebes konnte der Tumor nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft werden.

#### Mikroskopisch – pathologischer Gesamtbefund

Man erkennt einen Tumor mit teilweise etwas wirbelig angeordneten Faserzügen mit Zellen, die längliche bis rund ovale, locker strukturierte aufweisen. Gelegentlich sieht man auch dichtere kompakte Kollagenfaserstrukturen, in deren

Randbereich derartige Strukturen nachweisbar sind. Hin und wieder hier auch Psammomkörperchen.

#### **Areal V - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (1x 48, 45x 45, 4x 44 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **7** Metaphasen

**6x 45,XY, -22**

**1x 44,XY, -20, -22**

#### **Areal VIII - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (43x 45, 2x 44, 2x 43, 2x 42, 1x 38 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **10** Metaphasen

**7x 45,XY, -22**

**1x 44,XY, -10, -22**

**1x 42,XY, -3, -6, - 2x 22**

**1x 38,XY, -1, -2, -11, -13, -15, -16, -20, -22**

#### **Beurteilung**

Die Meningeomzellen weisen durchgehend eine Monosomie 22 auf, woraus sich der Karyotyp 45,XY, -22 ergibt. Daneben finden sich aber auch einige Zellen, die wechselnden Chromosomenverlust aufweisen. Dieser Verlust ist wahrscheinlich präparativ bedingt. Im Areal V gab es eine Metaphase mit überzähligem Chromosomensatz (48 Chromosomen).

#### **3.3.19 Fall Nr. 25**

Hier handelte es sich um einen 70jährigen Patienten. Es wurden fünf verschiedene Tumoreale nach Anlegen von Primärkulturen zytogenetisch untersucht. Es wurden von jedem Areal 30 Metaphasen auf numerische und 5 bis 11 Metaphasen auf strukturelle Aberrationen untersucht.

#### **Pathologisch-anatomischer Gesamtbefund**

Nach pathologischer Untersuchung des Tumorgewebes konnte der Tumor nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft werden. Aufgrund des stellenweise erhöhten Proliferationsindex lässt sich an diesen

Stellen ein Übergang in ein Grad II Meningeom (atypisches Meningeom) nicht mit absoluter Sicherheit ausschliessen.

#### **Areal I - Mikroskopisch – pathologischer Befund**

Neben spärlich Knochengewebe mit fibrosierten Periost sowie Ausläufern eines hier meningotheiomatösen Meningeoms miterfasst im Randbereich gelegen hyperplastisches zart fibrosiertes Fettgewebe mit Hyperämie (Galea weich, klinische Angabe).

#### **Areal I - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **30** Metaphasen (28x 46, 1x 42, 1x 41 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **8** Metaphasen

**6x 46,XY**

**1x 46,XY, -4, -12, +2x mar**

**1x 42,XY, - 2, - 14, - 17, - 22**

In Areal I weisen die Meningeomzellen überwiegend einen normalen männlichen Karyotypen 46,XY auf. In einer Metaphase von Areal I liegen zwei Marker-Chromosomen vor, so dass eventuell auch ein kleiner abnormer Zellklon vorliegt.

#### **Areal II - Mikroskopisch – pathologischer Befund**

Knochenanteil mit zum Teil ausgedehnter Durchsetzung durch Formationen eines meningotheiomatösen Meningioms, stellenweise mit reaktiven und reparativen Veränderungen des Knochens.

#### **Areal II: - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **31** Metaphasen (12x 46, 14x 45, 1x 44, 4x 43 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **11** Metaphasen

**3x 46,XY**

**3x 45,XY, i(1)(q10), -22**

**1x 45,XY, -8, -22, + mar**

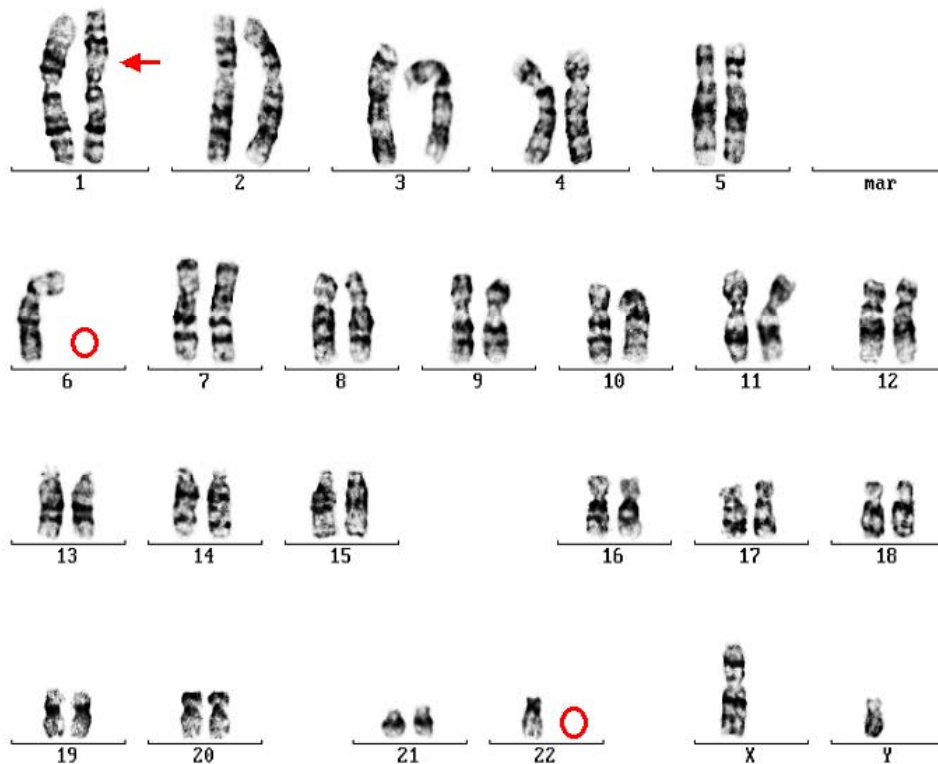
**1x 44,XY, i(1)(q10), -6, -22**

**1x 43,XY, -7, -17, -20**

**1x 43,XY, -2, -12, -21**

**1x 43,XY**, del(1)p22, -2, add(7)(q35), der(10)t(10;?)(p12;?), -11, -15, add(18)(q22), -19, -20, -22, + 3x mar

In Areal II weisen die Meningeomzellen zu ca. 28% einen normalen männlichen Karyotypen mit 46,XY auf. Daneben liegt aber auch ein Zellklon (zu ca. 28%) mit Isochromosom 1 {i(1)(q10)} und Monosomie 22 vor. In einer Metaphase liegt zusätzlich zur Monosomie 22 und ein Isochromosom 1q noch eine Monosomie 6 vor (siehe Abb. 50). Daneben finden sich aber zwei Metaphasen, die wechselnden Chromosomenverlust aufweisen. Dieser Verlust ist wahrscheinlich präparativ bedingt. Es liegt auch eine Metaphase mit numerischen und strukturellen Aberrationen sowie drei Marker-Chromosomen vor. Diese Metaphase könnte auch ein Hinweis auf einen weiteren Zellklon sein.



**Karyotyp:** 44,XY, i(1)(q10), -6, -22

**Abb. 50:** Die Abbildung zeigt einen aberranten Karyotyp mit einem Isochromosom 1q und Monosomien für die Chromosomen 6 und 22. Der Pfeil weist auf Isochromosom 1, der Ring auf verlorene Chromosomen hin.

#### **Areal IV - Mikroskopisch – pathologischer Befund**

Gewebe eines meningotheiomatösen Meningeoms mit stellenweise frischen Einblutungen.

**Areal IV - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **33** Metaphasen (22x 45, 4x 44, 6x 43, 1x 41 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **10** Metaphasen

**3x 45,XY**, i(1)(q10), -22

**1x 44,XY**, i(1)(q10), -21, -22

**1x 44,XY**, i(1)(q10), -16, -22

**1x 44,XY**, -19, -22

**1x 44,XY**, -14, -22

**1x 43,XY**, -20, -21, -22

**1x 43,XY**, -15, -16, -22

**1x 41,XY**, i(1)(q10), -7, -13, -14, -21, -22

Die Meningeomzellen weisen in Areal IV (ca. 60%) ein Isochromosom 1 und eine Monosomie 22 auf. Die andere Hälfte (ca. 40%) zeigt kein Isochromosom 1, sondern nur Monosomie 22 mit einem wechselnden Verlust weiterer Chromosomen.

**Areal V - Mikroskopisch – pathologischer Befund**

Gewebe eines meningotheiomatösen Meningeoms mit stellenweise frischen Einblutungen sowie miterfasstem Hirnrindengewebe. Die immunhistologischen Untersuchungen zeigen zumindest stellenweise eine etwas erhöhte Proliferationsaktivität (fokal 15 – 20%) wobei an anderen Stellen eine deutlich niedrige Proliferationsfraktion (unter 5%) vorliegt. Innerhalb des Tumorgewebes gibt es offenbar proliferationsaktivere Zellen.

**Areal V - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **30** Metaphasen (28x 45, 1x 44, 1x 41 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **5** Metaphasen

**5x 45,XY**, i(1)(q10), -22

**Areal VI - Mikroskopisch – pathologischer Befund**

Dabei stellt sich ein schwärzliches 2x 1,2 x 0,5 cm messendes Gewebe dar, welches mikroskopisch kräftig eingeblutete Meningeomformationen aufweist. Die Zelldichte ist stellenweise etwas betont.

**Areal VI - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **32** Metaphasen (28x 45, 1x 44, 1x 43, 1x 42, 1x 40 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **10** Metaphasen

**7x 45,XY**, i(1)(q10), -22

**1x 43,Y**, i(1)(q10), -17, -22, -X

**1x 42,XY**, i(1)(q10), -2, -11, -21, -22

**1x 40,XY**, i(1)(q10), -9, -10, -13, -16, -20, -22

In den Arealen V und VI weisen die Meningeomzellen durchgehend ein Isochromosom 1 {i(1)(q10)} und eine Monosomie 22 auf, woraus sich der Karyotyp 45,XX, i(1)(q10), -22 ergibt. In Areal VI finden sich aber auch drei Metaphasen, die weitere wechselnde Chromosomenverluste aufweisen. Dieser Verlust ist wahrscheinlich präparativ bedingt.

**Beurteilung**

Zur besseren quantitativen Erfassung des Mosaikbefundes wurden die grob- und feinstrukturell analysierten Metaphasen zusammengefasst. Der Befund weist darauf hin, dass in den Arealen unterschiedliche Zellklone vorhanden sind.

In Areal I liegt ein Zellklon mit einem normalen männlichen Karyotyp 46,XY vor. Aber in Areal II weisen die Meningeomzellen mindestens zwei Zellklone mit dem Karyotyp 46,XY und 45,XY, i(1)(q10), -22 auf.

In den Arealen IV, V und VI weisen die Meningeomzellen durchgehend keinen normalen männlichen Karyotyp 46,XY auf, sondern nur abnorme karyotypen mit einem Isochromosom 1q und einer Monosomie 22. Daneben finden sich aber auch einige Zellen, die zusätzlich wechselnden Chromosomenverlust aufweisen.

**FISH-Untersuchung - P53-Gen**

In den 200 ausgewerteten Interphasezellkernen der Meningeomzellen (Areal VI) zeigten sich in 193 (96,5%) Kernen in dem Bereich 17p13.1 zwei normale Signale. In sieben Kernen (3,5%) wurde nur ein Signal gefunden, was auf einen Artefakt zurückgeführt werden kann, weil dieser Wert unter dem Bereich des Cut-Off-Werts von 5% lag.

**3.3.20 Fall Nr. 26**

Hier handelte es sich um eine 62jährige Patientin. Es wurden fünf verschiedene

Tumorareale nach Anlegen von Primärkulturen zytogenetisch untersucht. Es wurden von jedem Areal 30 bis 50 Metaphasen auf numerische und 7 bis 23 Metaphasen auf strukturelle Aberrationen untersucht.

### **Pathologisch-anatomischer Gesamtbefund**

Nach pathologischer Untersuchung des Tumorgewebes konnte der Tumor nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft werden.

### **Mikroskopisch – pathologischer Gesamtbefund**

In mehreren unterschiedlich grossen Anteilen vorliegendes partiell zellreiches Meningeom mit stellenweise regressiven Veränderungen und herdförmig frischen Einblutungen (meningotheliomatöser Subtyp) mit einzelnen Psammomkörperchen und kleinherdiger Fibrose. Kleinherdige Fibrose (Fraktion 4 – 6 und 8). In Fraktion 5 miterfasst spärlich Großhirngewebe.

### **Areal I - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (30x 46, 4x 45, 9x44, 2x43, 1x 42, , 2x 41, 2x 40 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **23** Metaphasen

**3x 46,XX, +21, -22**

**1x 45,XX, -9, +21, -22**

**1x 45,XX, -22**

**1x 45,XX, +21, - 2x 22**

**1x 45,XX, -13, + 21, -22**

**2x 44,XX, -18, -22**

**1x 44,XX, -1, -16, +21, -22**

**1x 44,XX, -17, -20, +21, -22**

**1x 44,XX, -19, -20, +21, -22**

**1x 44,XX, -10, -11, +21, -22**

**1x 44,XX, -9, -19, +21, -22**

**1x 44,XX, -9, -22**

**1x 44,XX, -10, -20, +21, -22**

**1x 43,XX, -8, -18, -22**

**1x 43,XX, -6, -18, -22**

**1x 42,XX, -17, -2x 18, -22**

**1x 41,XX, -7, -17, -18, -19, -22**



**1x 41,XX**, -2, -4, -9, -19, -22

**1x 40,X**, -11, -12, -2x 16, -22, -X

**1x 40,XX**, -1, -2, -10, -18, -20, -22

#### **Areal II - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (39x 46, 8x 45, 2x44, 1x 42 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **18** Metaphasen

**12x 46,XX**, + 21, -22

**1x 45,XX**, -8, + 21, -22

**1x 45,XX**, -19, +21, -22

**1x 45,XX**, -7, +21, -22

**1x 44,XX**, -19, - 20, +21, -22

**1x 44,XX**, -18, -22

**1x 42,X**, -10, -14, -15, + 21, - 22, - X

#### **Areal III - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **30** Metaphasen (22x 46, 5x 45, 2x43, 1x 41 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **8** Metaphasen

**1x 46,XX**, +21, -22

**2x 45,XX**, -20, +21, -22

**1x 45,XX**, -19, +21, -22

**1x 45,XX**, -13, +21, -22

**1x 43,XX**, -5, -14, -22

**1x 43,XX**, -6, -17, -18, + 21, -22

**1x 41,XX**, -3, -6, -9, -12, -18, +21, -22

#### **Areal VI - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **33** Metaphasen (1x 47, 25x 46, 5x 45, 2x43 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **7** Metaphasen

**5x 46,XX**, +21, -22

**1x 45,XX**, -4, +21, -22

**1x 44,XX**, -18, -22

#### **Areal VII - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **34** Metaphasen (23x 46, 7x 45, 2x 44, 2x43 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **19** Metaphasen

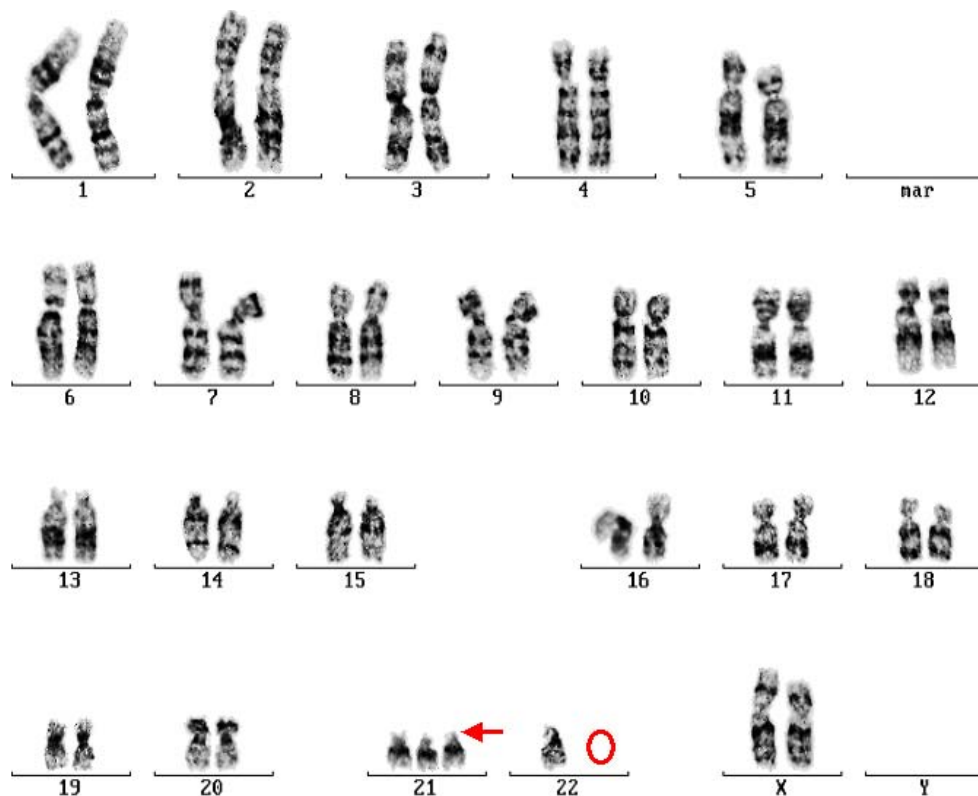
**8x 46,XX, +21, -22**  
**1x 45,XX, -4, +21, -22**  
**1x 45,XX, -11, +21, -22**  
**1x 45,XX, -19, +21, -22**  
**1x 45,XX, -15, +21, -22**  
**1x 45,XX, -9, -22, + mar**  
**1x 45,XX, -9, +21, -22**  
**1x 45,XX, -22**  
**1x 44,XX, -9, -18, +21, -22**  
**1x 44,XX, -10, -13, +21, -22**  
**1x 43,XX, -2, -2x 18, +21, -22**  
**1x 43,X, -14, 22, -X**

### **Gesamt Beurteilung**

Die Meningeomzellen weisen zu ca. 40% eine Monosomie 22 und eine Trisomie 21 auf, woraus sich der Karyotyp 46,XX, +21, -22 ergibt (siehe Abb. 51). Daneben finden sich aber auch in ca. 60% der Metaphasen numerische Aberrationen, die neben der Monosomie 22 und der Trisomie 21 noch einen wechselnden Chromosomenverlust (40-45,XX) aufweisen, der jedoch nicht mit einem einheitlichen Karyotypen angegeben werden kann. Chromosom 18 fehlt in etwa 12% der Metaphasen, die numerische Aberrationen gezeigt haben. Außerdem findet man einen Verlust der Chromosomen 19, 20 und 17 in jeweils 10%, 7 % und 5% der Zellen. Zwei Metaphasen weisen in Areal I und VII nur eine Monosomie 22 auf, so dass sie einen kleinen Monosomie 22-Zellklon repräsentieren dürften. In einer Metaphase des Areals VII liegt ein Marker-Chromosom vor. Da sich der Befund nicht wiederholt, ist anzunehmen, dass ein Kulturartefakt vorliegt. Der Befund zeigt, dass wahrscheinlich Monosomie 22 die Ausgangsaberration war und dann in einem weiteren Zellklon eine Trisomie 21 hinzukam.

### **FISH-Untersuchung - P53-Gen**

In den 200 ausgewerteten Interphasezellkernen der Meningeomzellen (Areal VII) zeigten sich in 196 (98%) Kernen in dem Bereich 17p13.1 zwei normale Signale. In vier Kernen (2%) wurde nur ein Signal gefunden, was auf einen Artefakt zurückgeführt werden kann, weil dieser Wert weit unter dem Bereich des Cut-Off-Werts von 5% lag. Zudem wurden noch acht Metaphasen untersucht, die auch zwei normale Signale zeigen.



**Karyotyp:** 46,XX, + 21, -22

**Abb. 51:** Die Abbildung zeigt ein Karyotyp mit einer Trisomie 21 und einer Monosomie 22. Der Pfeil weist auf die Trisomie 21, der Ring auf das verlorene Chromosom 22 hin.

### 3.3.21 Fall Nr. 27

Hier handelte es sich um eine 64jährige Patientin. Es wurden sieben verschiedene Tumorareale nach Anlegen von Primärkulturen zytogenetisch untersucht. Es wurden von jedem Areal 25 bis 34 Metaphasen auf numerische und 5 bis 8 Metaphasen auf strukturelle Aberrationen untersucht.

#### Pathologisch-anatomischer Gesamtbefund

Nach pathologischer Untersuchung des Tumorgewebes konnte der Tumor nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft werden.

#### Mikroskopisch – pathologischer Gesamtbefund

Areal I. bis Areal IV.: Mehrere Anteile eines Meningeoms (meningotheliomatöser Typ) mit einzelnen Psammomkörperchen und fokal fibrösen Abschnitten, insbesondere in IV.

Areal V. bis Areal VIII.: Mehrere Anteile eines Meningeoms (meningotheliomatöser

Typ) mit stellenweise Psammomkörperchen, degenerativen Veränderungen und abschnittsweise fibrösen Herden, betont in Fraktion V. In Fraktion VII miterfasst Großhirngewebe sowie in Fraktion VII und VIII Anteilen der Dura mater. Zeichen der Malignität lassen sich nicht nachweisen.

#### **Areal I - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **34** Metaphasen (28x 46, 2x44, 2x43, 1x 42, 1x 40 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **7** Metaphasen

**4x 46,XX**

**1x 46,XX**, -16, + mar

**1x 44,XX**, -5, -10

**1x 43,XX**, -9, -11, -17

**1x 40,XX**, -4, -8, -12, -17, -18, -20

#### **Areal II - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **33** Metaphasen (30x 46, 2x 45, 1x 42 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **8** Metaphasen

**5x 46,XX**

**1x 45,XX**, -13

**1x 45,XX**, -22

**1x 42,XX**, -6, -18, -19, -20

#### **Areal IV - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **30** Metaphasen (1x 47, 27x 46, 1x 45, 1x 44 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **7** Metaphasen

**1x 47,XX**, +13

**6x 46,XX**

#### **Areal V - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **30** Metaphasen (30x 46 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **6** Metaphasen

**6x 46,XX**

#### **Areal VI - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **25** Metaphasen (25x 46 Chromosomen)

- Feinstrukturell: **5** Metaphasen

**5x 46,XX**

#### **Areal VII - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **25** Metaphasen (23x 46, 1x 45, 1x 44 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **6** Metaphasen

**4x 46,XX**

**1x 45,XX, -18**

**1x 44,XX, -2, -19**

#### **Areal VIII - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **27** Metaphasen (25x 46, 1x 45, 1x 41 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **6** Metaphasen

**4x 46,XX**

**1x 45,XX, -18**

**1x 41,XX, -6, -11, -18, -19, -X**

#### **Beurteilung**

Die Meningeomzellen weisen überwiegend einen normalen weiblichen Karyotypen 46,XX auf. In einer Metaphase von Areal I liegt ein Marker-Chromosom vor, so dass eventuell ein abnormer Zellklon vorliegt. Daneben finden sich aber auch Zellen, die einen wechselnden Chromosomenverlust aufweisen. Dieser Verlust ist wahrscheinlich präparativ bedingt. In Areal IV liegt eine Metaphase vor, die ein überzähliges Chromosom 13 enthält.

#### **FISH-Untersuchung - P53-Gen**

In den 200 ausgewerteten Interphasezellkernen der Meningeomzellen (Areal VI) zeigten sich in 197 (98,5%) Kernen in dem Bereich 17p13.1 zwei normale Signale. In drei Kernen (1,5%) wurde nur ein Signal gefunden, was aber auf ein Artefakt zurückgeführt werden kann, weil dieser Wert deutlich unter dem Bereich des Cut-Off-Werts von 5% lag.

#### **3.3.22 Fall Nr. 28**

Hier handelte es sich um eine 63 jährige Patientin. Es wurden fünf verschiedene Tumorealen nach Anlegen von Primärkulturen zytogenetisch untersucht. Es wurden von jedem Areal 20 bis 30 Metaphasen auf numerische und 5 bis 8

Metaphasen auf strukturelle Aberrationen untersucht.

### **Pathologisch-anatomischesr Gesamtbefund**

Nach pathologischer Untersuchung des Tumorgewebes konnte der Tumor nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft werden.

### **Areal I - Mikroskopisch – pathologischer Befund**

Neben collagenfaserreichem duratypischen Gewebe miterfast Formationen eines Meningeoms (meningoepithelialer Subtyp) mit stellenweise frischen Einblutungen.

### **Areal I - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **30** Metaphasen (29x 46, 1x45 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **6** Metaphasen

**6x 46,XX**

### **Areal II - Mikroskopisch – pathologischer Befund**

Neben regional wechselnd reichlich Duragewebe, miterfasst Formationen eines abschnittsweise gefäßreichen meningiomatösen Tumors mit regional wechselnder Zelldichte.

### **Areal II - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **30** Metaphasen (29x 46, 1x44 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **7** Metaphasen

**5x 46,XX**

**1x 46,XX, +3, -21**

**1x 44,XX, -9, -18**

### **Areal III - Mikroskopisch – pathologischer Befund**

Neben regional wechselnd reichlich Duragewebe, miterfasst Formationen eines abschnittsweise gefäßreichen meningiomatösen Tumors mit regional wechselnder Zelldichte.

### **Areal III - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **30** Metaphasen (27x 46, 2x45, 1x44 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **8** Metaphasen

**6x 46,XX**

**1x 45,XX, -14**

**1x 45,XX, -11**

**Areal IV - Mikroskopisch – pathologischer Befund**

Neben regional wechselnd reichlich Duragewebe, miterfasst Formationen eines abschnittsweise gefäßreichen meningiomatösen Tumors mit regional wechselnder Zelldichte sowie Infiltration spärlich miterfasstem Knochengewebe.

**Areal IV - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **20** Metaphasen (20x 46 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **5** Metaphasen

**5x 46,XX**

**Areal V - Mikroskopisch – pathologischer Befund**

Breites collagenfaserreiches Weichgewebe (Dura, klein.Ang.) mit herdförmig frischen Einblutungen, spärlich anhängendem Knochengewebe.

**Areal V - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **22** Metaphasen (20x 46 , 1x 45, 1x 43 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **7** Metaphasen

**5x 46,XX**

**1x 45,XX, -19**

**1x 43,XX, -6, -10, -20**

**Beurteilung**

Die Meningeomzellen weisen überwiegend einen normalen weiblichen Karyotypen 46,XX auf. Daneben finden sich aber auch 7 Metaphasen, die einen wechselnden Chromosomenverlust aufweisen. Dieser Verlust ist wahrscheinlich präparativ bedingt. In Areal II liegt eine Metaphase mit einem überzähligen Chromosom 3 vor.

**FISH-Untersuchung - P53-Gen**

In den 200 ausgewerteten Interphasezellkernen der Meningeomzellen (Areal I) zeigten sich in 198 (99%) Kernen in dem Bereich 17p13.1 zwei normale Signale. In zwei Kernen (1%) wurde nur ein Signal gefunden, was aber auf einen Artefakt zurückgeführt werden kann, weil dieser Wert weit unter dem Bereich des Cut-Off-Werts von 5% lag. Zudem wurden auch vier Metaphasen ausgewertet, die zwei normale Signale zeigen.

**3.3.23 Fall Nr. 29**

Hier handelte es sich um eine 66 jährige Patientin. Es wurden drei verschiedene Tumorareale nach Anlegen von Primärkulturen zytogenetisch untersucht. Es wurden von jedem Areal 50 Metaphasen auf numerische und 6 bis 10 Metaphasen auf strukturelle Aberrationen untersucht.

**Pathologisch-anatomischer Gesamtbefund**

Nach pathologischer Untersuchung des Tumorgewebes konnte der Tumor nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft werden.

**Areal I - Mikroskopisch – pathologischer Befund**

Gewebe eines Meningeoms (hier fibröse Variante) mit kleineren Knochenpartikeln.

**Areal I - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (1x 46, 48x45, 1x 44 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **8** Metaphasen

**8x 45,XX, -22**

**Areal II - Mikroskopisch – pathologischer Befund**

Neben Knochenanteilen miterfasst Gewebe eines Meningeoms (hier meningotheiomatöse Variante) mit abschnittsweise Schaumzellen und Nachweis von Psammomkörperchen.

**Areal II - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (48x45, 1x44, 1x 43 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **10** Metaphasen

**10x 45,XX, -22**

**Areal III - Mikroskopisch – pathologischer Befund**

Mäßig zellreiches Meningeomgewebe mit anhängender Dura mater mit collagenfaserreicheren Abschnitten, stellenweise Knochenpartikeln und einzelnen Psammomkörperchen.

**Areal III - Chromosomenanalyse**

- Numerisch: **50** Metaphasen (47x45, 2x44, 1x 43 Chromosomen)
- Feinstrukturell: **6** Metaphasen

**6x 45,XX, -22**



**Beurteilung**

Die Meningeomzellen weisen durchgehend eine Monosomie 22 auf, woraus sich der Karyotyp 45,XX, -22 ergibt.

**FISH-Untersuchung - P53-Gen**

In den 200 ausgewerteten Interphasezellkernen der Meningeomzellen (Areal I) zeigten sich in 193 (96,5%) Kernen in dem Bereich 17p13.1 zwei normale Signale. In sieben Kernen (3,5%) wurde nur ein Signal gefunden, was auf einen Artefakt zurückgeführt werden kann, weil dieser Wert knapp unter dem Bereich des Cut-Off-Werts von 5% lag.

**3.3.24 Fall Nr. 5**

Hier handelte es sich um eine 37jährige Patientin. Es wurden sieben Zellkulturen von verschiedene Tumorealen angelegt. Hier konnte jedoch keine zytogenetische Untersuchung durchgeführt werden, da die Metaphasenanzahl sehr gering war. Mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wurden Meningeomzellen von Areal III in Interphasezellkernen auf Deletionen im p53-Gen untersucht.

**Pathologisch-anatomischer Gesamtbefund**

Nach pathologischer Untersuchung am Tumorgewebe konnte der Tumor nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft werden.

**Areal III - Mikroskopisch – Pathologischer Befund**

Hier sind in Ballen angeordnete Tumorzellen zu erkennen mit regional wechselnder Vaskularisierung mit im Randbereich collagenfaserreichem kompakten Gewebe. Hin und wieder kommen psammomatöse Kalkkörperchen vor. Fokal sind leichte fibröse Verdichtungen erkennbar.

**FISH-Untersuchung - P53-Gen**

In den 200 ausgewerteten Interphasezellkernen der Meningeomzellen (Areal III) zeigten sich in 197 (98,5%) Kernen in dem Bereich 17p13.1 zwei normale Signale. In drei Kernen (1,5%) wurde nur ein Signal gefunden, was aber als Artefakt gedeutet werden kann, da dieser Wert deutlich unter dem Bereich des Cut-Off-Werts von 5% lag.

**3.3.25 Fall Nr. 10**

Hier handelte es sich um eine 72jährige Patientin. Es wurden fünf Zellkulturen von verschiedenen Tumorarealen angelegt. Hier konnte jedoch keine zytogenetische Untersuchung durchgeführt werden, da die Metaphasenzahl sehr gering war. Mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wurden Interphasezellkerne der Meningeomzellen in Areal I auf eine Deletion im p53-Gen untersucht.

**Pathologisch-anatomischer Gesamtbefund**

Nach pathologischer Untersuchung des Tumorgewebes konnte der Tumor nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft werden.

**Mikroskopisch – pathologischer Gesamtbefund**

Man erkennt hier ein Tumorgewebe mit einem gleichartigen Aspekt. Es stellen sich mittelgroße Tumorzellen dar mit eosinophilem Zytoplasma und rundlich bis ovalären mäßig chromatinhaltigen Kernen. Zellen liegen oftmals in Stapeln zusammengefasst, wobei immer wieder zwiebelschalenartige Verwirbelungen auftauchen, an anderer Stelle sind zugartige Zellanordnungen erkennbar. Diffus im Tumorgewebe eingestreut kommen unterschiedlich große Verkalkungen vor mit teilweise konzentrischen Schichtungsfiguren. In Fraktion 2 zeigen sich ödematös aufgelockerte Areale. In Fraktion 3 ist der Gefäßgehalt des Tumors akzentuiert, wobei Gruppen von kapillarähnlichen Gefäßen vorkommen mit fibrösen Ummantelungen. Daneben sind hier Schaumzellähnliche Ansammlungen nachweisbar, teilweise vergesellschaftet mit Granulozyten. In Fraktion 4 stellt sich ein Partikel Großhirngewebes dar mit regulärem Aspekt. Fraktion 5 zeigt kleinere Knochenpartikel als Beimischung.

**FISH-Untersuchung - P53-Gen**

In den 200 ausgewerteten Interphasezellkernen der Meningeomzellen (Areal I) zeigten sich in 197 (98,5%) Kernen in dem Bereich 17p13.1 zwei normale Signale. In drei Kernen (1,5%) wurde nur ein Signal gefunden, was auf einen Artefakt zurückgeführt werden kann, weil dieser Wert weit unter dem Bereich des Cut-Off-Werts von 5% lag.

**3.3.26 Fall Nr. 14**

Hier handelte es sich um eine 78jährige Patientin. Es wurden fünf Zellkulturen von

verschiedenen Tumorarealen angelegt. Hier konnte jedoch keine zytogenetische Untersuchung durchgeführt werden, weil die Metaphasenzahl sehr gering war. Mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wurden Interphasezellkerne der Meningeomzellen in Areal II auf eine Deletion im p53-Gen untersucht.

#### **Pathologisch-anatomischer Gesamtbefund**

Nach pathologischer Untersuchung des Tumorgewebes konnte der Tumor nach WHO-Klassifikation der Meningeome in den Tumorgrad II (ein atypisches Meningeom) eingestuft werden, wobei stellenweise der Übergang in ein anaplastisches Meningeom (WHO-Grad III) nicht ausgeschlossen werden kann.

#### **Mikroskopisch – pathologischer Gesamtbefund**

Insgesamt sieht man in den verschiedenen Fraktionen ein zellreiches Gewebe mit in unterschiedlichbreiten Stapeln angeordneten kleinen bis mittelgroßen Zellen mit eosinophilem Zytoplasma. Die Kerne weisen eine gewisse Pleomorphie auf, wobei sich Schwankungen der Größe, Form und Chromatindichte erkennen lassen. Hin und wieder kommen prominente Nukleolen vor. An zahlreichen Stellen sind Mitosen erkennbar mit vorwiegend physiologischen teilweise auch atypischen Mitosen. Ganz vereinzelt sind zwiebelschalenartige Zellanordnungen zu sehen. An mehreren Stellen kommen unterschiedlich große Nekrosen vor. Diese zeigen gelegentlich Einblutungen. Zwischen den Tumorformationen sind gelegentlich straffe collagenfaserreiche Züge erkennbar mit eingelagerten hyperämischen Gefäßen. Stellenweise kommen in breiteren Nekrosen thrombotisch verschlossene kleine Gefäße vor.

#### **FISH-Untersuchung - P53-Gen**

In den 200 ausgewerteten Interphasezellkernen der Meningeomzellen (Areal II) zeigten sich in 198 (99%) Kernen in dem Bereich 17p13.1 zwei normale Signale. In zwei Kernen (1%) wurde nur ein Signal gefunden, was auf einen Artefakt zurückgeführt werden kann, weil dieser Wert weit unter dem Bereich des Cut-Off-Werts von 5% lag.

#### **3.3.14a (Fall Nr. 21 Rezidiv von Fall Nr. 14)**

Hier handelte es sich um eine 79jährige Patientin (Rezidiv von Fall Nr. 14). Es wurden fünf Zellkulturen von verschiedene Tumorarealen angelegt. Hier konnte allerdings keine zytogenetische Untersuchung durchgeführt werden, da die

Metaphasenanzahl sehr gering war. Mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wurden Meningeomzellen von Areal II in Interphasezellkernen auf Deletionen im p53-Gen untersucht.

### **Pathologisch-anatomischer Gesamtbefund**

Durch die pathologische Untersuchung des Tumorgewebes konnte der Tumor nach WHO-Klassifikation der Meningeome in den Tumorgrad II (ein atypisches Meningeom) eingestuft werden, wobei stellenweise der Übergang in ein anaplastisches Meningeom (WHO-Grad III) nicht ausgeschlossen werden kann.

### **Mikroskopisch – pathologischer Gesamtbefund**

Man erkennt ein zeldichtes und zellreiches Tumorgewebe mit meningealem Charakter. Die Zellen liegen in Zügen und unterschiedlich großen Gruppen zusammen, wobei teilweise Wirbelbildungen zu erkennen sind. Die Kerne zeigen gewisse Schwankungen der Größe, Form und Chromatindichte, wobei immer wieder Membraneinbuchtungen zu sehen sind. Gelegentlich granuläre Chromatinstrukturen. Kleinherdig kommen in Fraktion III Nekrosen vor, in Begleitung weniger Granulozyten. Die Vaskularisation ist regional unterschiedlich. Der Fasergehalt ist regional ebenfalls etwas unterschiedlich. In Fraktion V sind vermehrt Mitosen und stellenweise betonte Kernatypien erkennbar. In Fraktion I, VI und VIII sind verstärkt fibröse Zonen zu sehen, sowie teilweise anhängende Durastrukturen. Diese regional wechselnd stark vaskularisiert. Das Tumorgewebe teils unscharf in die Dura übergehend. Der Mitosengehalt ist stellenweise etwas erhöht (mehr als 4 Mitosen pro 10 HPF).

### **FISH - Untersuchung - P53-Gen**

In den 200 ausgewerteten Interphasezellkernen der Meningeomzellen (Areal VI) zeigten sich in 195 (97,5%) Kernen in dem Bereich 17p13.1 zwei normale Signale. In fünf Kernen (2,5%) wurde nur ein Signal gefunden, was auf einen Artefakt zurückgeführt werden kann, weil dieser Wert deutlich unter dem Bereich des Cut-Off-Werts von 5% lag.

### **3.3.27 Fall Nr. 23**

Hier handelte es sich um eine 82jährige Patientin. Es wurden sieben Zellkulturen von verschiedene Tumorarealen angelegt. Hier konnte allerdings keine

zytogenetische Untersuchung durchgeführt werden, da die Metaphasenzahl sehr gering war. Mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wurden Meningeomzellen von Areal VI in Interphasezellkernen auf eine Deletion im p53-Gen untersucht.

#### **Pathologisch-anatomischer Gesamtbefund**

Nach pathologischer Untersuchung des Tumorgewebes konnte der Tumor nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft werden.

#### **Mikroskopisch – pathologischer Gesamtbefund**

Man sieht einen Tumor mit überwiegend wirbeliger Struktur, wobei im Zentrum der Wirbel nicht selten, stellenweise sogar sehr häufig Psammomkörper nachweisbar sind. Die Wirbel werden aus Zellen gebildet mit isomorphen, rundlichen bis länglich ovalen, locker strukturierten Kernen, dazwischen eine feinfibrilläre Matrix.

#### **FISH-Untersuchung - P53-Gen**

In den 200 ausgewerteten Interphasezellkernen der Meningeomzellen (Areal VI) zeigten sich in 199 (99,5%) Kernen in dem Bereich 17p13.1 zwei normale Signale. In einem einzigen Kern (0,5%) wurde nur ein Signal gefunden, was auf einen Artefakt zurückgeführt wurde, weil dieser Wert weit unter dem Bereich des Cut-Off-Werts von 5% lag.

## 4 Diskussion

### 4.1 p53-Gendeletion bei Leukämien

#### 4.1.1 Allgemeines zum p53-Tumorsuppressorgen

Zum optischen Nachweis von Nukleinsäuresequenzen im Chromatin wurde in der vorliegenden Arbeit die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungstechnik verwendet. Mit Hilfe dieser Technik ist es z.B. möglich, mit Gen-Sonden ein bestimmtes Gen im Chromatin zu detektieren. So wurde eine p53-Gen-Sonde verwendet, um Knochenmarksmaterial von 110 Leukämiepatienten auf die Häufigkeit von p53-Gen-Deletionen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden sowohl Interphasezellkerne als auch Metaphasen der Leukämiezellen mit dieser Gen-Sonde untersucht.

Das p53-Tumorsuppressorgen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 17p13 lokalisiert. Der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 17 bei Leukämie ist immer mit einer ungünstigen Prognose assoziiert. So kann man sich darauf einstellen, dass die Erkrankung in den nächsten ein bis zwei Jahren höchstwahrscheinlich fortschreiten wird und es auch zu einer Resistenz gegenüber Chemotherapie kommt. Die Patienten zeigten auch eine signifikant kürzere Überlebenszeit (Mehes, 2005; Dewald et al., 2003; Karhu et al., 2003; Kröber et al., 2002; Wattel et al., 1994). Die Deletion des p53-Tumorsuppressorgens ist häufig mit der Mutation seines homologen Allels assoziiert (Mehes, 2005; Thornton et al., 2004). Ungefähr 50% der soliden Tumoren zeigen Mutationen, die das p53-Gen inaktivieren. Die p53-Aktivität wird meistens von onkogene Viren inhibiert (Boyapati et al., 2004).

Der cyklinabhängige Kinaseinhibitor p21 und das 14-3-3 $\sigma$  Protein werden von p53 hochreguliert (Hermeking et al., 1997; El-Deiry et al., 1993). Die G1-cyklinabhängige Kinase fördert den Eintritt von Zellen in die S-Phase. p21 ist ein natürlicher Inhibitor der G1-cyklinabhängigen Kinase (Hermeking et al., 1997). Durch Hemmung der Aktivität der cyklinabhängigen Kinase wird die Zellzyklusprogression von 14-3-3 $\sigma$  Protein blockiert (Laronga et al., 2000).

#### 4.1.2 p53-Gendeletion bei lymphatische Leukämien

Das p53-Gen ist bei mehr als der Hälfte aller soliden Tumoren mutiert. Aber die hämatologisch malignen Tumoren beinhalten nicht so häufig Veränderungen im p53-Gen: Weniger als 20% der hämatologisch malignen Tumoren zeigen Mutationen im p53-Tumorsuppressorgen (Boyapati et al., 2004).

Die Aktivierung des MDM2-Gens fördert die Degradierung des p53-Proteins. Bei vielen Tumoren einschließlich der chronisch lymphatischen Leukämie ist MDM2 überexprimiert (Watanabe et al., 1994).

In der Literatur wird beschrieben, dass 3,4 - 18% der Chronisch Lymphatischen Leukämie (CLL)-Fälle eine p53-Gen-Deletion aufweisen (Reddy, 2006; Sindelarova et al., 2005; Nahi et al., 2004; Byrd et al., 2003; Döhner et al., 2000; Bentz et al., 1999; Hernandez-Boussard et al., 1999; Stilgenbauer et al., 1998). In einer Arbeit wurden 115 CLL-Patienten einschließlich 90 unbehandelter und 25 vorbehandelter Patienten auf eine p53-Gen-Deletion untersucht. Es gab einen signifikanten Unterschied zwischen den unbehandelten (7% mit p53-Gen-Deletion) und den vorbehandelten Patienten (50%) (Thornton et al., 2004). Die Inaktivierung der Funktion des p53-Tumorsuppressorgens kann durch einen Chromosomenverlust oder eine Gendeletion sowie Punktmutationen verursacht werden (Drexler et al., 2000). Mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wurden 23 CLL-Patienten auf eine p53-Gen-Deletion untersucht. 6 (26%) der 23 CLL-Patienten wiesen eine p53-Gen-Deletion auf. Die p53-Gen-Deletion war mit der Progression der Erkrankung assoziiert (Amiel et al., 1997). Punktmutationen im p53-Gen wurden in vier von vier Proben der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) nachgewiesen, die eine 17p Monosomie aufwiesen. In 35 anderen Proben, die zytogenetisch normale Chromosomen 17 zeigten, wurde jedoch keine Mutationen detektiert (Fenaux et al., 1992b).

Entgegen dem oben schon genannten Literaturwert von 3,4 - 18% konnte in der vorliegenden Arbeit in keinem der 55 untersuchten Patienten mit lymphatischer Leukämie eine Alleldeletion des p53-Gens nachgewiesen werden.

Stattdessen hatte ein Patient eine Trisomie 17. Von einer solchen Besonderheit wurde in keiner Weise in den oben genannten Arbeiten berichtet.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen somit nicht mit den

Literaturangaben überein. Als Grund könnte die zu geringe Anzahl der untersuchten Fälle genannt werden.

#### **4.1.3 p53-Gendeletion bei myeloische Leukämien**

Das p53-Tumorsuppressorgen (Lokalisation auf Chromosom 17p13) ist bei den meisten Tumoren des Menschen mutiert. Ungefähr 5-8% der Akuten Myeloischen Leukämie (AML)-Fälle haben p53-Mutationen (Nahi et al., 2006). Trotz eines vorhandenen funktionsfähigen p53-Gens konnten beim Verlust von zwei p53 ähnlichen Proteinen, p73 und p63, DNA Schäden nicht verhindert werden (Flores et al., 2002). Eine Mangelfunktion im p53-Gen kann durch Mutationen im p53-ähnlichen Transkriptionsfaktor wie das p73-Gen, verursacht werden. Das p73-Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 in der Bande 1p36 lokalisiert. Beim Myelodysplastischen Syndrom (MDS) und in Blasten-Krisen bei chronisch myeloischen Leukämien (CML) ist das p73-Gen häufig deletiert (Hofmann et al., 2001; Mori et al., 1998). Akute myeloische Leukämie (AML) und Myelodysplastisches Syndrom (MDS) weisen jeweils zu 17% bzw. 10% eine p53-Gen-Deletion oder Rearrangements (Umverteilungen) am p53-Gen auf (Krug et al., 2002). Bei akuter myeloischer Leukämie (AML) und Myelodysplastischem Syndrom (MDS) kommt oft der Verlust des p53-Gens mit einer Deletion von 17p am p53 Locus (Lai et al., 1995) vor. Eine Deletion oder Mutation des p53-Gens ist in chronisch myeloischer Leukämie (CML) nur jeweils mit 3% bzw. 0% zu finden. Das Vorkommen von Deletionen und Mutationen erhöht sich jedoch in der Plastischen Phase auf jeweils 21% bzw. 19% (Krug et al., 2002). In soliden Tumoren ist das p53-Gen oft verändert: Infolge von Deletionen oder Mutationen weisen mehr als die Hälfte der soliden Tumoren einen Verlust der p53 Wildtyp-Expression auf (Hainaut et al., 1998; Hollstein et al., 1991).

Bei den 55 hier untersuchten Patienten, die an myeloischer Leukämie erkrankt waren, konnte in 7 Fällen (13%) eine Deletion im p53-Gen mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) nachgewiesen werden. Der Anteil der gefundenen p53-Gen-Deletionen war höher als erwartet. Die sieben Patienten, bei denen eine p53-Gen-Deletion nachgewiesen wurde, waren an akuter myeloischer Leukämie (AML) erkrankt. Der zytogenetische Befund der Patienten, die eine p53-Gen-Deletion aufwiesen, zeigte einen numerisch und strukturell aberranten Karyotyp.

In einer Zeitspanne von über 15 Jahren wurden 25 therapiebezogene akute



myeloische Leukämien (tAML) und myelodysplastische Syndrome (tMDS) gefunden, die eine 17p Deletion aufwiesen (Merlat et al, 1999). Soenen und seine Mitarbeiter berichteten 1998 über einen Fall von myelodysplastischem Syndrom (MDS), der eine p53-Gen Deletion und eine unbalancierte Translokation t(5;17) aufwies.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Ergebnisse der in der vorliegenden Arbeit untersuchten lymphatischen Leukämiezellen die Literaturangaben nicht bestätigt haben. Das liegt eventuell daran, dass hier keine große Anzahl von Patienten untersucht wurde. Um genaue und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, müsste eine viel größere Anzahl von Patienten untersucht werden.

Dagegen waren die Ergebnisse der hier untersuchten myeloischen Leukämiezellen höher als erwartet. Die Häufigkeit von p53-Gen-Deletionen war in vorliegenden Arbeit im Vergleich zu Literaturangaben relativ hoch (13%).

#### **4.2 Chromosomenanalyse mittels Spektraler Karyotypisierung (SKY) bei Leukämien**

Heute weiß man, dass Krebs vor allem die Folge von Veränderungen der Gene ist. Die Krebszellen weisen verschiedene Störungen des Erbgutes auf. Durch die Darstellung menschlicher Chromosomen konnte ein Teil dieser Veränderungen sichtbar gemacht werden. Die Spektrale Karyotypisierung ist eine neue molekularzytogenetische Untersuchungsmethode, die einen erheblichen Fortschritt in der Analyse chromosomaler Veränderungen bringt. Mit Hilfe der SKY-Technik können alle menschlichen Chromosomen in verschiedenen Farben dargestellt werden und auf chromosomale Veränderungen hin untersucht werden. Eine Kombination der SKY-Technik mit der konventionellen Zytogenetik erlaubt eine bessere Diagnosegenauigkeit, mit der die Ärzte eine genauere Therapieentscheidung bei jedem einzelnen Patienten treffen können. (Bayani et al., 2001 ; Markovic et al., 2000; Mohr et al., 2000 ; Hilgenfeld et al., 1999; Rowley et al., 1999;Veldman et al., 1997).

Der Einsatz der SKY-Analyse ist bei komplex-aberranten Karyotypen wegen der zahlreichen Rearrangements hilfreich (Mrozek et al., 2002; Hilgenfeld et al, 2001; Odero et al, 2001; Mohr et al., 2000; Kakazu et al; 1999; Veldman et al., 1997).

Die SKY-Analyse ermöglicht die Identifizierung von Marker-Chromosomen und die simultane Untersuchung des gesamten Genoms nach Chromosomenaberrationen (Heng et al., 2003). Zusätzlich zur Aufklärung komplex-aberranter Karyotypen und der Identifizierung von Marker-Chromosomen können mittels SKY-Analyse neue und krankheitsspezifische Chromosomenaberrationen identifiziert werden (Veldman et al., 1997). Für die Aufklärung komplexer Chromosomenaberrationen und Marker-Chromosomen ist die Anwendung der SKY-Analyse sehr vorteilhaft. Trotzdem lassen sich nicht alle Chromosomenaberrationen mit SKY-Technik vollständig identifizieren. Die SKY-Technik erfasst keine arm- oder bandenspezifischen Aberrationen. Das DAPI-Bild zeigt eine zu geringe Auflösung (Bayani et al., 2003; Markovic et al., 2000; Tonon et al., 2000). Die Auflösungsgrenze der SKY-Technik ist im Hinblick auf die Detektion von kleineren Deletionen oder intrachromosomalen Veränderungen wie Inversionen beschränkt (Bayani und Squire, 2001). Die Chromosomenqualität in Hinblick auf die Länge und Spreitung hat einen Einfluss auf die Hybridisierung und damit auch auf die Sensitivität von SKY.

Gegen die Anwendung der SKY-Analyse in der Routinediagnostik spricht allerdings der sehr hohe Kosten- und Zeitaufwand. Zudem hat die SKY-Technik noch weitere Nachteile, z.B. begrenzte Auflösung und Farbüberschneidungen bei vielen Chromosomenaberrationen. Darüber hinaus kann eine Deletion oder Duplikation genetischen Materials mittels SKY nicht nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 21 Fälle mit G-Bänderungsanalyse und SKY-Analyse untersucht, um komplex-aberrante Karyotypen besser aufzuklären. Bei 17 (81%) der Fälle wurden durch SKY zusätzliche Chromosomenaberrationen festgestellt. Bei 4 (19%) der Fälle wurde der zytogenetische Befund bestätigt.

#### **4.2.1 SKY-Analyse bei MDS-Patienten**

Der Verlust eines Chromosoms 5 oder 5q und der Verlust eines Chromosoms 7 oder 7q sind relativ oft in MDS-Patienten durch G-Bänderungsanalyse nachweisbar. Die Deletion am langen Arm von Chromosom 5 (5q) ist die häufigste Aberration, die bei MDS-Patienten vorkommt (Giagounidis et al., 2004; Godon et al., 2000; Heim et al., 1986;). Auch in anderen myeloiden Neoplasien kommt häufig der Verlust eines ganzen Chromosoms 5 oder eine Deletion 5q vor (Le

Beau, 1992). Durch die SKY-Analyse konnte enthüllt werden, dass bei diesen Verlusten häufig Translokationen vorliegen (Bayani und Squire, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden 5 Leukämie-Patienten, die an MDS erkrankt waren, mittels SKY-Analyse untersucht. 4 von 5 Fällen wiesen numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen auf. Zwei Fälle zeigten zusätzlich zu anderen Chromosomenveränderungen aberrante Chromosomen 5 (eine Deletion 5q und ein derivatives Chromosom 5). Zwei andere Fälle zeigten ein derivatives Chromosom 7. In einem Fall waren Chromosom 5 und Chromosom 7 gleichzeitig aberrant.

In einem Fall (Nr.13) konnte eine Aberration mit Hilfe der SKY-Analyse nicht eindeutig identifiziert werden. Hier fand sich bei der G-Bänderungsanalyse ein Y-Chromosomenverlust und ein Marker-Chromosom. Die SKY-Analyse identifizierte das Marker-Chromosom als einheitliches Y-Chromosom, konnte hier also ausschließlich Material von Chromosom Y nachweisen. Somit war die Aberration an diesem Y Chromosom vermutlich intrachromosomal bedingt, wie es bei einer Amplifikation oder Inversion der Fall ist.

#### **4.2.2 SKY-Analyse bei AML-Patienten**

5q-Deletionen kommen auch bei AML-Patienten recht oft vor (Pedersen, 1996). Mehrere Gene, die für die blutbildenden Wachstumsfaktoren (IL3, IL4 und IL5) und für Wachstumsfaktor-Rezeptoren (CSF-1R) kodieren, sind auf dem langen Arm von Chromosom 5 lokalisiert (Godon et al., 2000; Boulwood et al., 1994). Die t(8;21) Translokation ist eine der häufigsten chromosomalen Anomalien in akuten myeloischen Leukämien (Linggi et al., 2002; Ohki, 1993). AML-Fälle, die t(8;21), t(15;17) und inv(16) aufweisen, haben eine relativ gute Prognose. Dagegen sind die AML-Fälle, die 3q26, 5q und 7q Aberrationen aufweisen, mit einem hohen Risiko assoziiert (Erkeland S.J., 2004; Pedersen-Bjergaard J et al., 2002; Lowenberg B et al., 1999). Ungefähr 20 bis 40% der AML-Patienten zeigen keine abnormalen Chromosomen (Erkeland S.J., 2004; Look AT, 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurden 8 Leukämie-Patienten, die an AML erkrankt waren, mittels SKY-Analyse untersucht. 6 von 8 AML-Patienten wiesen komplex aberrante Karyotypen auf, die durch das Vorliegen vor allem von unbalancierten Translokationen und einer hohen Anzahl an Chromosomenaberrationen charakterisiert waren. Zwei Fälle zeigten jedoch nur Monosomie 7. Bei 7 von 8

AML-Patienten kam entweder eine Monosomie 7 oder ein derivatives Chromosom 7 vor. Bei 4 von 8 AML-Patienten kam entweder eine Monosomie 5 oder eine partielle Monosomie 5q vor. Die häufigsten Aberrationen waren auf den Chromosomen 7, 5, 8, 17, 20 und 21 mit einer Häufigkeit von jeweils 6, 4, 3, 3, 3 und 3 Patienten nachzuweisen. Trotz der Untersuchung mittels SKY-Analyse konnte in vier Fällen (Nr. 2, Nr. 9, Nr. 12 und Nr. 18) keine vollständige Aufklärung der komplex-aberranten Karyotypen erfolgen. Dies lag vor allem daran, dass bestimmte Rearrangements zu komplex waren, um alle beteiligten Chromosomen zu identifizieren.

Klonale Veränderungen lassen sich bei AML- und MDS-Patienten nachweisen. Sechs von acht Patienten, die an AML und MDS erkrankt waren, wiesen klonale Chromosomenaberrationen auf (Hasse et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wiesen vier von acht AML-Patienten (Fall-Nr. 2, 4, 5, und 18) klonale Chromosomenaberrationen auf.

Die Anzahl der Aberrationen pro Karyotyp lagen im Durchschnitt bei 8. Die häufigsten Aberrationen, die hier mittels SKY untersuchten AML-Patienten gefunden wurden, waren Verluste, die durch strukturelle Aberrationen entstanden sind. In dieser Arbeit kam häufig ein aberrantes Chromosom 7 sowohl bei AML als auch bei MDS vor.

### 4.3. Zytogenetik der Meningeome

Meningeome, die den WHO-Grad I aufweisen, machen ungefähr 80% aller Meningeome aus. Ungefähr 15-20% der Meningeome weisen ein aggressives Verhalten und eine Progression zum atypischen Typ (WHO-Grad II) auf. 1-2% der Meningeome weisen den anaplastischen Typ (WHO-Grad III) auf (Perry et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden 24 (83%) von 29 Meningeomen nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft und 5 (17%) von 29 Meningeomen in den Tumorgrad II. Die Tumorgradverteilung in dieser Arbeit entspricht der Literaturangaben.

Meningeome sind in den letzten Jahren intensiv zytogenetisch untersucht worden (Al-Mefty et al, 2004). Sie kommen bei Frauen ungefähr doppelt so häufig wie bei Männern vor, aber beide Geschlechter sind mit steigender Malignität der Tumoren ungefähr gleich häufig betroffen (Zang, 2001; Zang, 1982; Kepes, 1982). Die ungleiche Verteilung bei den Geschlechtern weist darauf hin, dass die Geschlechtshormone eine mögliche Rolle in der Tumorgenese der Meningeome spielen (Logan et al, 1990). In der vorliegenden Arbeit war das Geschlechtsverhältnis 1,9:1 und entspricht damit den Literaturangaben. Benigne Meningeome weisen oft einen normalen Chromosomensatz oder - als häufigste Chromosomenaberration - eine Monosomie 22 auf (Zang, 1982). Zu Beginn der zytogenetischen Tumoruntersuchungen konnte nur festgestellt werden, dass Meningeome zytogenetisch einen vollständigen oder partiellen Verlust eines Chromosoms zeigen, das zur Gruppe G gehört (Singer und Zang, 1970; Zang und Singer, 1967). Das fehlende Chromosom wurde später als Chromosom 22 identifiziert (Zankl und Zang, 1972).

Neben einer Monosomie 22 wurde aber auch vom Verlust oder Gewinn weiterer Chromosomen sowie strukturellen Aberrationen berichtet (Casalone , 1987; Rey , 1983; Yamada , 1980; Zankl und Zang, 1972; Zang KD, 1967).

In der vorliegenden Arbeit wiesen 11 von 24 zytogenetisch untersuchten Tumoren entweder einen normalen Karyotyp (sechs Fälle) oder eine Monosomie 22 (fünf Fälle) auf. Zwei andere Tumore zeigten in unterschiedlichen Arealen einen normalen Karyotyp und eine Monosomie 22. Alle 13 Tumore wurden nach der

WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft. Vier Meningeome (Nr. 1, 7, 12 und 25) wiesen stark aberrante Karyotypen auf. Diese Komplexität der chromosomalen Aberrationen ist vermutlich ein Zeichen für die fortgeschrittene Tumorprogression. Fall Nr. 1 und Nr. 7 wurden nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft. Fall Nr. 12 wurde in den Tumorgrad II eingestuft. Fall Nr. 25 wurde in den Tumorgrad I und teilweise in den Tumorgrad II eingestuft. Die Anzahl der Aberrationen pro Karyotyp lag im Durchschnitt bei 7. Die häufigsten Aberrationen in diesem Patientenkollektiv waren Verluste, die durch strukturelle Veränderungen entstanden. Die verlorenen Chromosomen (z.B. 10,14,15,19,Y) sind in Meningeomen nicht selten von Chromosomenaberrationen betroffen.

Die Aberrationen, die bei Meningeomen von WHO-Grad II vorhanden sind, waren am häufigsten Verluste an 1p(76%), 22q(71%), 14q(43%), 18q(43%), 10(38%) und 6q (33%) seltener aber auch Gewinn an 20q(48%), 12q(43%), 15q(43%), 1q(33%), 9q(33%) und 17q (33%) zu finden. Bei Meningeomen WHO-Grad III, die in unserer Arbeit nicht vorlagen, wurden mit ähnlicher Häufigkeit die meisten Aberrationen gefunden, die bei Meningeom II vorkommen. Jedoch steigt die Verlustrate an 6q (53%), 10 (68%) und 14q (63%) an. Außerdem wiesen 32% von Meningeom Grad-III einen Verlust von Chromosom 9p auf (Weber et al, 1997).

In der vorliegenden Arbeit hat bei sechs Fällen (Fall Nr. 1, 2, 7, 9, 25 und 26) der mikroskopisch-pathologische Befund nicht mit dem zytogenetischen Befund übereingestimmt, da die oben genannten Tumoren in den Tumorgrad I eingestuft wurden und der zytogenetische Befund einen aberranten Chromosomensatz aufwies, der normalerweise nicht bei niedriggradigen Meningeomen, sondern bei atypischen und anaplastischen Meningeomen vorkommt. Daher ist zu empfehlen, dass man verschiedene Untersuchungsmethoden einbeziehen soll, um genauere Befunde zu erhalten.

#### **4.3.1 Arealuntersuchungen**

Im Rahmen der neurochirurgischen Operation wurden unterschiedliche lokalisiert nicht zusammenhängende Areale eines Tumors entnommen und konserviert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es festzustellen, ob zytogenetische Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Arealen innerhalb eines Tumors vorliegen. In einem Zweiten Arbeitsschritt wurde eine Korrelation zwischen dem

zytogenetischen und histologische Befund vorgenommen.

In der vorliegenden Arbeit wurden 96 Proben von frischem Biopsiematerial aus verschiedenen Arealen von 24 Meningeomen mit G-Bänderungstechnik analysiert. Zur besseren Aufklärung komplex aberranter Karyotypen wurden zwei Fälle (Nr. 1 und Nr. 7) mittels SKY-Analyse untersucht. Die SKY-Analyse konnte in allen Fällen dieser Arbeit zusätzliche Informationen liefern. Dadurch konnte die chromosomale Herkunft unbalancierter Aberrationen bzw. die Art eines Rearrangements bestimmt werden. Dies zeigt, dass die SKY-Analyse als Ergänzung der konventionellen Zytogenetik notwendig ist. In der vorliegenden Arbeit gab es bei 13 von 24 Meningeomen (54%) zytogenetische Unterschiede zwischen den verschiedenen Arealen innerhalb eines Tumors.

**Im Fall Nr. 1** wurden vier verschiedene Areale zytogenetisch untersucht. Die Meningeomzellen wiesen in allen Arealen einen Hauptzellklon und mehrere kleine Zellklone auf, die jedoch alle einen Verlust von beiden Chromosomen 22 und weitere numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen zeigten. Der Hauptzellklon machte in allen Arealen im Durchschnitt 42% der Meningeomzellen aus und wies den Karyotyp 45,XX, -2x 22, +mar auf. Chromosom 11 war das am häufigsten abnorme Chromosom nach Chromosom 22. Im Areal III lag eine Metaphase mit normalen Chromosomensatz und im Areal IV eine Metaphase mit einem hyperdiploiden Chromosomensatz vor. In den Arealen I und IV lag ein Verlust von Chromosom 7 in jeweils drei und eine aberrante Metaphase vor. In den Arealen I, II und IV wurden jeweils 5, 5 und eine aberrante Metaphase mit Verlust des Chromosoms 9 gefunden. Im Areal III wurde dagegen in keiner der analysierten Metaphasen ein Verlust der Chromosomen 7, 9 und 14 gefunden. Dies weist darauf hin, dass es einen Arealunterschied zwischen den vier Arealen gibt. Durch SKY-Chromosomenanalyse an sechs Metaphasen von Areal IV konnte das Marker-Chromosom in allen Metaphasen als reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 13 und 22 identifiziert werden. Zusätzlich konnten weitere numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen entdeckt werden (siehe Abb. 35), die jedoch nicht einheitlich waren. Mit Hilfe der SKY-Chromosomenanalyse kann die Aufklärung von komplex-aberranten Karyotypen und die Identifizierung von Marker-Chromosomen erzielt werden (Bayani et al., 2003; Markovic et al., 2000; Tonon et al., 2000; Veldman et al., 1997). Mittels

SKY-Chromosomenanalyse konnte ein aberrantes Chromosom 7 in zwei verschiedenen Metaphasen nachgewiesen werden. Mittels SKY-Chromosomenanalyse konnte z.B. eine unbalancierte Translokation zwischen den Chromosomen 7 und 11 sowie auch zwischen den Chromosomen 7 und 18 nachgewiesen werden (siehe Abb. 35).

Ein verlorenes und ein derivatives Chromosom 9 wurden auch in zwei aberranten Metaphasen nachgewiesen. Ein Verlust von Chromosom 14 war auch in zwei anderen Metaphasen präsent. Trotz der Untersuchung mittels SKY konnte in diesem Fall keine vollständige Aufklärung des komplex aberranten Karyotyps erfolgen. Dies lag daran, dass bestimmte Rearrangements zu komplex waren und somit keine genaue Aussage getroffen werden konnte, welche Banden an welcher der unterschiedlichen Aberrationen innerhalb eines Chromosoms beteiligt waren. In einer Metaphase lag z.B. ein derivatives Chromosom 9 vor, das unbalancierte Translokationen zwischen den Chromosomen 9, 11 und 19 aufwies. Aber es konnte die Bruchpunkte nicht identifiziert werden (siehe Abb. 35).

DAL-1 (differentially expressed in adenocarcinoma of the lung) Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 18 (18p11.3) lokalisiert. DAL-1 Protein gehört zur Familie der 4.1 Proteine. 60% der sporadischen Meningeomen weisen ein Verlust von DAL-1 auf (Gutmann, 2000). Eine Metaphase wies einen Verlust von Chromosom 18 auf. In andere Metaphase hängt der kurze Arm von Chromosom 18 an Chromosom 7 und lange Arm von Chromosom 18 an Chromosom 11. dadurch entstanden zwei derivative Chromosomen [der(7) und der(11)] (siehe Abb. 35). Die konventionelle zytogenetische Untersuchung und die SKY-Chromosomenanalyse weisen darauf hin, dass in den Meningeomzellen (Fall Nr. 1) mehrere Zellklone vorhanden sind, die numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen aufweisen. Die Meningeomzellen zeigten Chromosomenaberrationen wie Verlust der Chromosomen 7, 9 und 14, die normalerweise nach Literaturangaben in atypischen und anaplastischen Meningeomen vorkommen. Der Tumor (Fall Nr. 1) wurde nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft. Pathohistologisch ergaben sich keine Unterschiede zwischen den vier Arealen. Der mikroskopisch-pathologische Befund stimmt nicht mit dem zytogenetischen Befund überein, da der zytogenetische Befund stark aberrante Karyotypen zeigt, die normalerweise



beim WHO-Grad II und WHO-Grad III vorkommen.

**Im Fall Nr. 7** wurden sieben verschiedene Areale zytogenetisch und ein Areal mittels SKY-Analyse untersucht. Die Meningeomzellen wiesen zytogenetisch in allen Arealen einen Hauptzellklon und mehrere kleine Zellklone auf. Der Hauptzellklon wies einen weiblichen abnormen Karyotyp 44,XX, del(2)(p12), del(6)(q16), -16, -22 auf.

Strukturelle Aberrationen an den Chromosomen 3 und 6 wurden in aggressiven Meningeomen nachgewiesen (Perry et al., 1996).

Die kleine weitere Zellklone zeigten noch zusätzliche numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen, die allerdings nicht einheitlich waren. Die SKY-Analyse hat die Ergebnisse der G-Bänderung bestätigt und sogar ergänzt, so dass zusätzliche Aberrationen entdeckt wurden. Es wurde festgestellt, dass der kurze Arm von Chromosom 2 verloren gegangen ist. Außerdem hängt ein kleines Stück von Chromosom 12 an der Bruchstelle von Chromosom 2. Es wurde auch eine unbalancierte Translokation zwischen den beiden Chromosom 6 und 16 nachgewiesen (siehe Abb. 39). Die Identifizierung dieser Aberrationen wäre ohne SKY-Chromosomenanalyse nicht möglich gewesen. Nach pathologischer Untersuchung wurde der Tumor (Nr.7) nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft. Der Pathologische Befund stellt fest, dass in Areal 1 bis 7 neben Dura mata zahlreiche Anteile eines regional wechselnd zellichten Meningeoms vom meningiotheliomatösen Subtypus mit stellenweise leichter Fibrose miterfasst werden. Die Chromosomenanalyse zeigte aber, dass der Tumor einen stark aberranten Chromosomensatz aufweist. Das deutet darauf hin, dass der Tumor in der fortschreitenden Progressionsphase ist und die Einstufung in den Tumorgrad I aus zytogenetischer Sicht wahrscheinlich nicht ganz richtig ist.

**Im Fall Nr. 12** wiesen die Meningeomzellen in den Arealen IV, V und VI durchgehend stark aberrante Karyotypen im hypodiploiden Bereich (36-40,XX) auf. In den Arealen IV, V und VI wurde ein Hauptzellklon und mehrere kleine Zellklone nachgewiesen. Der Hauptzellklon, der ungefähr 30% der Meningeomzellen ausmachte, wies den Karyotyp 40,XX, inv(1)(p12), del(4)(p15), der(6)t(6;14)(q14;p11), -9, der(11)t(11;19)(p12;p12), -14, -16, -18, -19,

add(21)(p13), -22 auf. Die kleinen Zellklone, die etwa 70% der Meningeomzellen ausmachten, zeigten alle fast durchgehend gleiche strukturelle Chromosomenaberrationen, die im Hauptzellklon vorkamen, und weitere zusätzliche numerische Chromosomenaberrationen. Das deutet darauf hin, dass sich die kleinen Zellklone wahrscheinlich aus dem Hauptzellklon entwickelt haben. Drei Metaphasen im Areal VI wiesen einen Verlust von Chromosom 7 auf. Der Verlust von Chromosom 7 kommt selten bei Meningeomen vor. Bei der Addition, die am kurzen Arm von Chromosom 21 in allen Karyotypen vorkam, handelt es sich wahrscheinlich um eine Telomerassoziation zwischen dem Chromosom 21 und dem kurzen Arm von Chromosom 22.

Zusätzlich zum Verlust eines Chromosoms 22 kommen bei der Progression weitere unterschiedliche Chromosomenverluste vor. Strukturelle Chromosomenaberrationen kommen allerdings außer am kurzen Arm von Chromosom 1 (1p-) selten vor und Zugewinne sind noch seltener. Bei der Progression kommen häufig ganze oder partielle Monosomien 14 vor (Menon et al., 1997; Simon et al., 1995). Die Meningeomzellen in Areal VII wiesen durchgehend stark aberrante Karyotypen im hypertriploiden Bereich (72-79,XXXX) auf. Der Hauptzellklon (25%) in Areal VII wies den Karyotyp 79,XXXX, 2x inv(1)(p12), 2x del(4)(p15), -6, der(6)t(6;14)(q14;p11), -8, -9, 2x der(11)t(11;19)(p12;p12), -2x 14, -2x 16, -2x 18, -2x 19, add(21)(p13), -2x 22 auf (siehe Abb. 45). Mehrere kleine Zellklone (75%) wiesen noch zusätzlich einen wechselnden Chromosomenverlust auf. Der Verlust von Chromosom 6 und 8 kam in Areal VII in allen Karyotypen vor. Dieser Verlust lag in den anderen Arealen nicht vor. Die Chromosomenanalyse zeigt an, dass mindestens zwei Hauptzellklone in diesem Tumor in unterschiedlichen Arealen vorhanden sind. Daneben lagen noch mehrere sekundäre Zellklone vor. Der hypertriploide Chromosomensatz wurde mit großer Wahrscheinlichkeit aus dem Hauptzellklon entwickelt. Möglicherweise handelt es sich hier um eine Verdopplung eines hypodiploiden Chromosomensatzes, da die Aberrationen in allen Arealen ähnlich aussehen. Der Tumor (Fall Nr. 12) wurde nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad II eingestuft. Der Pathologische Befund zeigt in Areal 1 bis 8 jeweils unterschiedlich große Formationen eines Meningeoms (meningothelialer Typ) mit stellenweise leicht regressiven Veränderungen

„Pathologischer Befund“. Die Chromosomenanalyse bestätigte den mikroskopisch-pathologischen Befund, wonach der Tumor zum WHO-Grad II gehört. Alle Chromosomenaberrationen (wie 6q-, -14, -18, -19), die hier im Tumor (Fall Nr. 12) gefunden wurden, kommen nach Literaturangaben bei atypischen und anaplastischen Meningeomen vor.

**Im Fall Nr. 18** wurde in zwei (Areal II und VI) von fünf Arealen durchgehend nur eine Monosomie 22 beobachtet. Aber in den anderen drei Arealen (Areal I, V und VII) wurden verschiedene Karyotypen beobachtet. In Areal I wiesen ungefähr 68% der Meningeomzellen nur eine Monosomie 22 auf und etwa 30% der Meningeomzellen hatten uneinheitliche aberrante Karyotypen. In einer Metaphase lagen eine 1p-Deletion und weitere Chromosomenaberrationen vor. Der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 kommt häufig bei Meningeomen vor, die einen WHO-Grad II oder III aufweisen. In Areal V wiesen 9 von 14 analysierten Metaphasen eine Monosomie 22 auf, in vier anderen Metaphasen wurden numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen festgestellt. In einer Metaphase lag eine 9p-Deletion und eine Monosomie 22 vor (siehe Abb. 48). Diese Metaphase präsentiert wahrscheinlich einen weiteren kleinen Zellklon, der zytogenetisch aber nicht eindeutig erfassbar ist. Die 9p-Deletion kommt nicht selten bei solchen Meningeomen vor, die einen WHO-Grad II oder III repräsentieren. In den Arealen V und VII lag jeweils eine Metaphase mit einem normalen weiblichen Karyotyp 46,XX vor.

Die Inaktivierung des p16-Gens, das auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 lokalisiert ist, wurde in letzter Zeit in einem kleinen Teil von atypischen und in den meisten anaplastischen Meningeomen beobachtet (Perry et al, 2002). Das p16-Gen ist ein Zellzyklusregulator. Die 9p21 Region beinhaltet p16 (CDKN2A), p15 (CDKN2B) und p14ARF Gene, die für die maligne Transformation von Meningeomen und vielleicht auch für die erhöhte Zellproliferation wichtig sind (Perry et al, 2002). CDKN2A, p14ARF und CDKN2B sind Tumorsuppressorgene, die auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 lokalisiert sind. In den meisten anaplastischen Meningeomen finden sich entweder eine homozygote Deletion von CDKN2A, p14ARF und CDKN2B; Mutationen in CDKN2A, p14ARF oder ein Mangel an Expression von einem oder mehreren dieser Gene. Dadurch wird der G1/S-Phase Checkpoint im Zellzyklus inaktiviert (Boström J et al., 2001).

Der Tumor (Nr. 18) wurde nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft. Der mikroskopisch-pathologische Befund zeigt, dass man mikroskopisch in allen Proben (Areal 1 bis 7) einen gleichartigen Tumor (WHO-Grad I) sieht „Pathologischer Befund“. In der Chromosomenanalyse wurde bestätigt, dass die Meningeomzellen in den Arealen II, VI und VII überwiegend nur eine Monosomie 22 aufwiesen. In den Arealen I und V jedoch hatten etwa 30% der Meningeomzellen uneinheitliche aberrante Karyotypen, was darauf hin weist, dass in diesen Tumor Arealen wahrscheinlich eine progressive Tendenz vorhanden ist. Diese Tumorprogression spiegelt sich im histologischen Befund nicht wieder.

**Im Fall Nr. 25** wurden fünf Areale zytogenetisch untersucht. Die Meningeomzellen wiesen in den Arealen unterschiedliche Zellklone auf. In Areal I lag ein Zellklon mit einem normalen männlichen Karyotyp 46,XY vor. In Areal II lagen zwei Zellklone mit dem Karyotyp 46,XY und 45,XY, i(1)(q10), -22 vor. Dagegen wiesen die Meningeomzellen in den Arealen IV, V und VI durchgehend keinen normalen männlichen Karyotyp 46,XY auf, sondern nur aberrante Karyotypen mit einem Isochromosom 1q und einer Monosomie 22. Daneben fanden sich aber auch einige Zellen, die zusätzlich wechselnden Chromosomenverlust aufwiesen. Im Areal IV kamen Verluste der Chromosomen 21, 16, 14 und 7 mehrfach vor. Der zytogenetische Befund zeigt, dass in diesem Tumor mindestens zwei Hauptzellklone und mehrere kleine Nebenklone existieren. Die Meningeomzellen wiesen in Areal IV, V und VI fast durchgehend auch einen Verlust vom kurzen Arm des Chromosoms 1 auf. Die kleinen Zellklone zeigten noch zusätzlich einen unregelmäßigen Verlust der Chromosomen 7, 9, 14, 16, und 19 auf, die normalerweise bei atypischen und anaplastischen Meningeomen vorkommen. Der Tumor (Fall Nr. 25) wurde nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft. Bei der mikroskopisch-pathologische Untersuchung wurde nur in den Arealen V und VI stellenweise eine etwas erhöhte Proliferationsaktivität beobachtet. Aufgrund des stellenweise erhöhten Proliferationsindex lässt sich an diesen Stellen ein Übergang in ein Grad II Meningeom (atypisches Meningeom) nicht mit absoluter Sicherheit ausschließen „Pathologischer Befund“. Das deutet darauf hin, dass in diesem Tumor schon eine Progressive Tendenz vorhanden ist. Der mikroskopisch-pathologische Befund wurde durch die

Chromosomenanalyse bestätigt, die auch schon darauf hindeutete, dass der Tumor sich wahrscheinlich in der Übergangsphase zur Malignität befindet oder sogar stellenweise schon die Malignität erreicht hat.

30% der Meningeomen, die einen 1p-Verlust aufweisen, sind Rezidive (Ketter et al., 2001). Bei den atypischen und anaplastischen Meningeomen ist die Progression mit der Monosomie 1 oder Monosomie 1p assoziiert (Zang, 2001; Niedermayer et al, 1997; Boström et al., 1997; Henn et al., 1995; Bello et al., 1994). Durch eine FISH-Untersuchung an Meningeomen wurde eine Monosomie 1p in 70% der atypischen Meningeomen und bei allen anaplastischen Meningeomen nachgewiesen (Müller et al., 1999). Allelverlust an weiteren Stellen kann zu einer Tumorprogression führen. Dadurch entstehen atypische und anaplastische Meningeome (Leone et al, 1999; Weber et al, 1997; Menon et al, 1997; Simon, et al., 1995; Rempel et al, 1993). Atypische und anaplastische Meningeome weisen zusätzlich zur Monosomie 22 noch andere Monosomien auf, vor allem eine Monosomie 1p (Müller et al, 1999; Niedermayer et al, 1997; Kolles et al., 1995; Bello et al., 1994; Simon et al, 1995). Der Verlust von 1p wurde in 60% der atypischen und in 86% der anaplastischen Meningeome gefunden (Ishino, 1998). Numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen, insbesondere der Verlust vom kurzen Arm des Chromosoms 1, sind mit weiterer biologischer Aggressivität assoziiert (Niedermayer, 1997; Simon, 1995; Zang, 1980). Der Verlust von Chromosom 1p ist mit einer erhöhten Rezidivrate von Meningeomen assoziiert (Henn et al., 1995). Mittels Heterozygotieverlustuntersuchungen (LOH) wurden drei chromosomale Regionen identifiziert, die bei Meningeomen von Grad I selten verändert sind, aber häufig bei Meningeomen von Grad II und Meningeomen Grad III verloren gehen und dann auf Chromosom 1p, 10 und 14q lokalisiert sind. Diese Regionen beinhalten wahrscheinlich Tumorsuppressorgene, die mit der Progression von Meningeomen assoziiert sind (Simon, 1995; Rempel, 1993).

**Im Fall Nr. 26** wurden fünf Areale zytogenetisch untersucht. Die Meningeomzellen wiesen in allen Arealen einen Hauptzellklon (40%) mit einem Karyotyp von 46,XX, +21, -22 auf. Daneben fanden sich mehrere kleine Zellklone, die neben der Monosomie 22 und der Trisomie 21 noch einen wechselnden Chromosomenverlust (40-45, XX) aufwiesen. Einige Chromosomen (9, 17, 19 und

20) gingen häufiger als andere verloren. Der Tumor (Fall Nr. 26) wurde nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft. Der Pathologische Befund zeigt in den Arealen 1 bis 8 in mehreren unterschiedlich großen Anteilen vorliegendes partiell zellreiches Meningeom mit stellenweise regressiven Veränderungen und herdförmig frischen Einblutungen (meningotheliomatöser Subtyp) mit einzelnen Psammomkörperchen und kleinherdiger Fibrose (Fraktion 4-6 und 8). Aber die WHO-Grad I Meningeomen weisen normalerweise entweder einen vollständigen Chromosomensatz, eine Monosomie 22 oder eine partielle Monosomie 22 auf. Der zytogenetische Befund zeigt, dass wahrscheinlich eine Monosomie 22 die Ausgangsaberration war und in weiteren Zellklonen eine Trisomie 21 und uneinheitliche numerische Aberrationen hinzukamen. Auch hier durfte die Tumorprogression schon weiter fortgeschritten sein als der pathologische Befund anzeigt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Literaturangaben, wonach der Verlust von Chromosom 22 die Primäraberration bei Meningeomen ist. In Fall Nr. 3 war der Verlust von Chromosom 22 jedoch nicht die Primäraberration. Aus diesen Ergebnissen, die durch G-Bänderungsanalyse gewonnen wurden, ergibt sich kein Hinweis auf eine bislang nicht bekannte spezifische chromosomale Veränderung. Mittels SKY-Analyse wurden in den Meningeomen Nr. 1 und Nr. 7 Aberrationen (z.B. die reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 13 und 22 und die unbalancierte Translokation zwischen den beiden Chromosomen 6 und 16) gefunden, die mit der konventionelle Karyotypisierung nicht identifiziert worden wären. Deswegen ist die FISH-Untersuchung als Ergänzung für die konventionelle Zytogenetik zu empfehlen.

Die vorliegende Arbeit liefert eine Grundlage für weitere Untersuchungen zur Optimierung der zytogenetischen Analyse durch Kombination verschiedener zytogenetischer und molekularzytogenetischer Methoden.

#### **4.3.2 Karyotyp und Lokalisation des Tumors**

Zytogenetische Aberrationen wurden mit der Tumorlokalisierung assoziiert. 23 spinale Meningeome wiesen entweder einen normalen Karyotyp oder eine Monosomie 22 auf. 51 von 118 Meningeomen der Konvexität und 8 von 57 Meningeomen der Schädelbasis wiesen zusätzlich zur Monosomie 22 noch entweder weitere Chromosomenverluste oder eine Monosomie 1p und weitere

Chromosomenverluste auf (Ketter, 2001). Zankl und Zang (1980) berichten, dass Meningeome von der Schädelbasis oft einen Chromosomensatz von 46 zeigen, Konvexitätsmeningeome dagegen signifikant mehr Chromosomenaberrationen.

In der vorliegenden Arbeit konnten 12 Meningeome untersucht werden, die in der Schädelbasis lokalisiert sind. 4 davon wiesen einen normalen Chromosomensatz auf, weitere 4 zeigten nur eine Monosomie 22. Nochmals 4 wiesen einen starker aberranten Karyotyp und klonale Entwicklung auf. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Meningeome von der Schädelbasis durchaus nicht selten auch einen aberranten Chromosomensatz aufweisen. Eine Korrelation zwischen Lokalisation und zytogenetischen Befund wurde in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen. Dagegen konnten andere Autoren (Ketter, 2001; Zankl und Zang, 1980) diesen Zusammenhang bestätigen. Sie hatten allerdings auch wesentlich mehr Tumoren zur Verfügung.

#### **4.3.3 Verlust des Y-Chromosoms bei Meningeomen**

Ein Karyotyp mit einem normalen Chromosomen 22 aber anderen Chromosomenaberrationen ist bei Meningeomen selten (Lopez-Gines, 1993; Meloni et al, 1991; Casalone et al, 1990; Rey et al, 1988; Al Saadi et al., 1987). Der Verlust der Chromosomen 14, 18, 19 und des Y-Chromosoms kommen häufig bei der Progression vor (Weber et al., 1997). Y-Verlust ist häufig bei Meningeomen (Logan et al, 1990; Al Saadi et al, 1987; Casalone et al, 1987). Der Verlust des Y-Chromosoms wurde bei 7 von 17 (41%) der Meningeome festgestellt. Durch Verlust des Y-Chromosoms gehen ein oder mehrere Gene verloren, die wahrscheinlich in der Wachstumskontrolle von Meningeomzellen eine Rolle spielen. Der Verlust dieser Gene könnte mit der Tumorprogression assoziiert sein (Logan JA et al, 1990). Der Verlust von Geschlechtschromosomen könnte aber auch als Alterungsphänomen interpretiert werden (Zankl et al., 1975).

In der vorliegenden Arbeit wurden in Fall Nr. 3 und Nr. 3a (Rezidiv von Fall Nr. 3) zwei Zellklone festgestellt. Der erste Zellklon wies einen normalen männlichen Karyotyp 46,XY auf. Der zweite Zellklon hatte den Karyotyp 45,X, -Y. Der Y-Verlust war in Fall Nr. 3 nur in einem von zwei Arealen vorhanden. Im Fall 3a wurden fünf Areale untersucht. In Areal IV wiesen 45% der Meningeomzellen einen Verlust des Y-Chromosoms auf. In den Arealen II und V wurde jeweils eine Metaphase mit Verlust des Y-Chromosoms beobachtet. In den Arealen I und II

wurde kein Y-Verlust beobachtet. Die Tumoren von Fall Nr. 3 und Nr. 3a wurden nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad II eingestuft. Meningeome von WHO-Grad II weisen normalerweise einen Verlust von Chromosom 22 und weitere numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen auf. Aber in diesem Fall wiesen die Meningeomzellen entweder einen normalen männlichen Karyotyp 46,XY oder einen Verlust von Chromosom Y als einzige Aberration auf. Verlust von Chromosom 22 wurde nur einmal in Fall Nr. 3 und noch einmal in Fall Nr. 3a beobachtet. Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung von Weber et al. (1997) und Logan et al. (1990), nach denen der Verlust von Y-Chromosomen mit der Tumorprogression assoziiert sein könnte. Der mikroskopisch-pathologische Befund zeigt, dass man in allen Biopsien ein atypisches Meningeom (WHO-Grad II) erkennt.

Die Ergebnisse von Fall Nr.3 und 3a bestätigen die Literaturangaben nicht, nach denen der Verlust von Chromosom 22 als Primäraberration bei Meningeomen zu betrachten ist.

#### **4.3.4 Klonale Entwicklung bei Meningeomen**

Meningeome sind oft zytogenetisch heterogene Tumoren, die häufig verschiedene Verluste und Gewinne von Chromosomen aufweisen. 69 (55%) von 125 untersuchten Meningeomen (WHO-Grad I, II und II) wiesen mehr als einen Zellklon auf (Sayagués et al., 2004).

Die zytogenetischen Untersuchungsergebnisse an Meningeomen weisen eine klonale Entwicklung auf. Die primäre Aberration ist meist eine vollständige oder eine partielle Monosomie 22. Später entstehen zusätzliche numerische und / oder strukturelle Chromosomenaberrationen. Solche Aberrationen sind oft mit weiterer klinischer Aggressivität assoziiert (Lopez-Gines, 1993; Casartelli et al., 1989; Katsuyama, 1986). Nur ein kleiner Anteil von Meningeomen ist durch eine klonale Entwicklung charakterisiert, die außer Monosomie 22 noch weitere numerische oder strukturelle Chromosomenaberrationen aufweist. Diese klonalen Entwicklungen werden klinisch mit einer weiteren biologischen Aggressivität von Tumorzellen assoziiert (Zang, 1982). In der vorliegenden Arbeit wurde in 13 (54%) von 24 zytogenetisch untersuchten Meningeomen eine klonale Entwicklung festgestellt. Die Ergebnisse dieser Arbeit entspricht damit etwa die oben erwähnte Untersuchung von Sayagués et al., 2004.



#### **4.3.5 Atypische und anaplastische Meningeome**

Deletion von Chromosom 1p, 6q, 10 und 14q und auch Amplifikation von 17q gehören zu den besonders oft progressionsassoziierten Aberrationen (Perry et al, 2002; Bostrom et al, 2001; Cai et al, 2001; Lamszus et al, 1999; Leone et al, 1999; Weber et al, 1997; Schneider et al, 1995; Simon et al, 1995). Mittels Comparativer Genomischer Hybridisierung (CGH) wurde eine Amplifikation an 17q identifiziert, die bei einem von sieben benignen Meningeomen, bei vier von 19 (21%) atypischen Meningeomen und bei elf von 18 (61%) anaplastischen Meningeomen, nachgewiesen wurde (Büschges R et al., 2002). Mittels CGH wurde eine Amplifikation am 17q21 nachgewiesen, die bei anaplastischen Meningeomen vorkommt (Weber, 1997). Der zytogenetische und histologische Befund liefert einen wichtigen Beitrag für die Vorhersage von Rezidiven. Daher ist er ein nützlicher Maßstab für die neurochirurgische postoperative Nachsorge (Ketter et al., 2001). Atypische und anaplastische Meningeomen weisen entweder vollständig oder in großen Teilen des Tumors keine Aktivität der alkalischen Phosphatase auf (Niedermayer et al., 1997).

Um ein Rezidiv zu vermeiden oder wenigstens einen verlängerten rezidivfreies Intervall zu erreichen, ist die vollständige Entfernung des Tumors erforderlich (Mahmood et al., 1994; Borovich et al., 1986; Chan et al., 1984). Die atypischen Meningeomen weisen eine Neigung zum lokalen Tumorrezidiv auf, die anaplastischen Meningeomen weisen ein großes Risiko für Lokalrezidive und Metastasen auf (Maier et al., 1992). Atypische und anaplastische Meningeome sind mit einer schlechten Prognose verbunden (Nishizaki et al., 1994; Mahmood et al., 1993; Kallio et al., 1992). In der vorliegenden Arbeit wurden 5 (17%) von 29 Meningeomen in den WHO-Grad II eingestuft. Die Meningeome Nr. 3 und Nr. 14, die in den Tumorgrad II eingestuft wurden, haben nach ungefähr einem Jahr nochmals einen lokalen Tumorrezidiv entwickelt.

#### **4.3.6 Aberrante Chromosomen 7 bei Meningeomen**

15 von 400 Meningeomen, die zytogenetisch untersucht wurden, wiesen strukturelle Aberrationen an Chromosom 7 auf. 12 von diesen Tumoren (80%) zeigten entweder eine partielle oder eine vollständige Monosomie 7p. 6 der 15 Fälle wiesen eine unbalancierte Translokation auf. 4 der 15 Fälle wiesen eine balancierte Translokation auf. Die Zentromerregion von Chromosom 7 war in 11

von 15 Fällen in die Rearrangements involviert. Die zentromernahe Region von Chromosom 7 neigt besonders zu strukturellen Rearrangements. 7 von 11 Meningeomen, die Monosomie 7p aufwiesen, gehören zu Meningeomen WHO-Grad-II oder WHO-Grad-III, die weniger als 20% von allen Meningeomen ausmachen. Ein partieller Verlust von 7p scheint in die Tumorprogression von Meningeomen involviert zu sein (Henn et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit kam im Fall Nr. 1 in den Arealen I und IV ein Verlust von Chromosom 7 mehrfach vor. Und im Areal IV kam ein aberrantes Chromosom 7 in zwei verschiedene Metaphasen vor (siehe Abb. 35).

#### **4.3.7 Aktivitätsverlust der alkalische Phosphatase (ALPL) bei Meningeomen**

Es ist denkbar, dass die Tumorprogression bei Meningeomen durch eine Assoziation zwischen dem Verlust von 1p und der Aberration von Chromosom 14 entsteht (Lopez-Gines et al, 2004). Auf dem Chromosom 1 sind verschiedene regulatorische Gene lokalisiert, die unmittelbar neben dem ALPL-Gen liegen. Das p73-Gen ist auf dem Chromosom 1 (1p36.33) lokalisiert und ein Mitglied der p53-Familie (Kaghad et al., 1997). Die Meningeome, die einen Chromosom 1p-Verlust mit dem Genort des ALPL-Gens aufweisen, gehören zur Tumorgruppe mit der höchsten Rezidivrate (Ketter et al., 2001). Es gibt eine hohe Korrelation zwischen einem Verlust von Chromosom 1p und einem vollständigen oder auf einzelne Areale begrenzten Aktivitätsverlust der alkalische Phosphatase (ALPL) in den Tumorschnitten (Zang et al., 2001). Das Gen der alkalischen Phosphatase ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 lokalisiert (Müller et al, 1999; Niedermayer I, 1996). Deletionen von 1p und 14q sind mit einem höheren Tumorgrad assoziiert. Außerdem kommt eine 14q Deletion bei Rezidiven benigner Meningeomen (WHO-Grad I) vor, trotz vollständiger Tumorentfernung (Cai et al, 2001). Eine Gen-Inaktivierung kann durch DNA-(Hyper)Methylierung erreicht werden. Die DNA-(Hyper)Methylierung ist bei vielen Tumorsuppressorgenen als Inaktivierungsmechanismus bekannt (Baylin et al., 1998).

Der Zusammenhang zwischen dem Aktivitätsverlust der alkalische Phosphatase (ALPL) und der Monosomie 1p in Meningeomzellen deutet darauf hin, dass das ALPL-Gen als Tumorsuppressorgen wirkt (Lamszus et al., 1999; Ishino et al., 1998; Niedermayer et al., 1997; Boström et al., 1997; Lindblom et al., 1994).

Ein Verlust von 1p und erhöhte FDG (Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose) Aufnahme

werden als zytogenetische und metabolische Parameter für die Progression von Meningeomen betrachtet (Henn et al, 1994). Es kann sein, dass ein ALPL-Allel deletiert ist und das verbleibende ALPL-Allel durch Mutation inaktiviert wird. Im Meningeom Nr. 12 unserer Untersuchung wiesen alle Metaphasen in allen Arealen eine Inversion 1p und einen Verlust von Chromosom 14 auf. Meningeom Nr. 12 wurde in den WHO-Grad II eingestuft.

Im Meningeom Nr. 25 wurde nur im Areal IV eine Metaphase gefunden, die gleichzeitig ein Isochromosom 1q und einen Verlust von Chromosom 14 aufwies. Ein Isochromosom 1q wurde in den Arealen II, IV, V und VI ohne aberrantes Chromosom 14 gefunden. Meningeom Nr. 25 wurde in den Tumorgrad I und stellenweise in den Tumorgrad II eingestuft. Diese Ergebnisse bestätigen die oben genannten Literaturangaben, wonach wahrscheinlich die Tumorprogression bei Meningeomen durch eine Assoziation zwischen dem Verlust von Chromosom 1p und der Aberration von Chromosom 14 besteht.

#### **4.3.8 Neurofibromatose Typ 2 Gen (NF2) bei Meningeomen**

Das Neurofibromatosegen Typ2 (NF2) ist ein Tumorsuppressorgen, das auf dem langen Arm von Chromosom 22 lokalisiert ist. Die Inaktivierung von NF2-Gen stellt eine frühzeitige Abnormalität dar, die wahrscheinlich zur Entwicklung vom Meningeom WHO-Grad I führt (Ruttledge et al, 1994). Ungefähr 30% der Meningeome (WHO-Grad I) zeigen eine homozygote Mutation und / oder den Verlust des NF2-Gens auf. Die Inaktivierung eines Allels des NF2-Gens führt zur partiellen Inaktivierung des NF2-Genproduktes Merlin. Dies spielt wahrscheinlich eine Rolle in der Pathogenese der Meningeome (Wellenreuther et al., 1995; Ruttledge et al., 1994).

#### **4.3.9 Rolle des p53-Gens bei Meningeomen**

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag leisten, um die Frage zu klären, ob die Deletion des p53-Gens, die bei verschiedenen anderen Tumoren nachgewiesen wurde, ebenso bei den Meningeomen festzustellen ist.

Die Überproduktion von p53 Protein ist bei verschiedenen Tumoren häufig als Marker für die p53 Punktmutation benutzt worden und wurde in 0-10% von benignen, 50-73% von atypischen und 77-89% von anaplastischen Meningeomen gefunden (Das et al, 2005; Cho et al, 1999). Punktmutationen im p53-Gen kommen bei Meningeomen selten vor (Verheijen et al., 2002; Joachim et al.,

2001). Amatya et al. (2004) untersuchten 22 Meningeomen auf eine Mutation in den Exons 5-8 des p53-Gens. In allen Fällen wurde keine Mutation gefunden. Atypische und anaplastische Meningeomen zeigten eine Überexpression des p53 Proteins. Es zeigte sich, dass es sich hierbei um ein Wildtyp-p53 Protein handelt. Die Ermittlung des Methylierungsstatus von p14ARF-Gen und Expression von MDM2 Protein wurde an 72 Meningeomen durchgeführt, um die Expression von p53-Protein in Meningeomen zu klären. Eine Methylierung im p14ARF-Gen wurde in 5 von 58 der benignen Meningeomen (8,6%), 2 von 10 der atypischen Meningeomen (20%) und 2 von 4 der anaplastischen Meningeomen (50%) gefunden. Die Erhöhung der Methylierung von p14ARF-Gen und die Abwesenheit von Mutationen im p53-Gen könnten wahrscheinlich für die Überexpression des p53-Wildtyp-Protein bei atypischen und anaplastischen Meningeomen verantwortlich sein. Zusätzlich zeigten die atypischen und anaplastischen Meningeomen einen Verlust des MDM2-Proteins. Diese Deregulierung des p14-MDM2-p53 Pfads (pathway) kann bei der Progression von Meningeomen mitwirken (Amatya et al., 2004).

Die Deletion im p53-Gen wurde mittels Interphase-FISH an 23 typischen, 5 atypischen und 6 anaplastischen Meningeomen untersucht. Ein atypische und zwei anaplastische Meningeomen wiesen eine Deletion im p53-Gen auf (Yakut et al., 2002). 61 Meningeomen wurden auf Mutationen in p53-Gen untersucht. Ein anaplastisches und ein strahleninduziertes atypisches Meningeom wiesen Mutationen im p53-Gen auf. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das p53-Gen wahrscheinlich bei der Entstehung von Malignität bei Meningeomen eine Rolle spielt (Joachim et al., 2001).

61 Meningeomen (52 benigne, 4 atypische und 5 anaplastische Meningeomen) wurden auf Mutationen der Exons 5-8 des p53-Gens mittels single strand conformation polymorphism (SSCP)-Analyse und Akkumulation des p53 Proteins durch Immunhistochemie untersucht. Anaplastische Fälle wiesen eine Überexpression von p53 auf. Dagegen wiesen die atypischen Fälle keine Überexpression von p53 auf. Bei 2 von 52 benignen Meningeomen konnten nur einzelne schwach gefärbte Zellen identifiziert werden. Mittels SSCP-Analyse konnten keine Mutationen in allen Fällen nachgewiesen werden. Die erhöhte p53-Konzentration ist mit hohem Proliferationspotential und schneller Rezidivbildung

assoziiert (Nagashima et al., 1999).

Weber et al. (1997) untersuchten 59 Meningeomen der WHO-Grade I-III mittels SSCP-Analyse. In der zitierten Arbeit konnte bei keinem der untersuchten Meningeomen ein Hinweis auf eine Mutation in den Exons 5-8 des p53-Gens nachgewiesen werden, obwohl die meisten der untersuchten Meningeomen der WHO-Grade II und III komplexe chromosomale Aberrationen zeigten. Wang et al. (1995) untersuchten 30 Meningeomen mittels SSCP-Analyse. In einem von zwei anaplastischen Meningeomen wurde eine Mutation im p53-Gen in Codon 161 nachgewiesen. Akkumulation von p53 Protein wurde in 9 von 34 (26%) der untersuchten Meningeome mittels immunohistochemischen Tests nachgewiesen. Die Meningeome, die eine Akkumulation von p53 Protein aufwiesen, zeigten keinen signifikant höheren mittleren Proliferationsindex. In allen untersuchten Meningeomen wurden keine Mutationen in den Exons 4-9 des p53-Gens nachgewiesen (Ellison et al., 1995). Chen P. et al (1994) untersuchten 27 Meningeomen (fünf davon maligne) und konnten keinen Allelverlust des Gens p53 finden. Sie fanden nur einen malignen Tumor, der ein mutiertes p53-Gen aufwies.

Ohgaki et al. (1993) untersuchten 22 Meningeomen (7 davon anaplastische Meningeomen) mittels SSCP-Analyse. In allen Fällen konnten keine Mutationen im p53-Gen nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden 22 Meningeomen (17 benigne und 5 atypische Meningeome) verschiedener histologischer Subtypen mittels Interphase-FISH auf eine Alleldeletion des p53-Gens hin untersucht. Ziel der Untersuchung waren Erkenntnisse über eine mögliche Mitwirkung des p53-Gens an Meningeomen zu gewinnen. In keinem der 22 untersuchten humanen Meningeomen konnte jedoch eine Alleldeletion im p53-Gen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das p53-Gen in der Onkogenese der Meningeomen wahrscheinlich keine entscheidende Rolle spielt. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die oben erwähnten Literaturangaben. Aber nur in einer einzigen wissenschaftlichen Arbeit (Yakut et al., 2002) wurde berichtet, dass eine Alleldeletion des p53-Gens bei atypischen und anaplastischen Meningeomen vorkommt. Nach Literaturangaben hat P53-Protein normalerweise eine kurze Halbwertszeit (20 min) und eine niedrige Konzentration in der Zelle. Überexpression von P53-Protein ist häufig mit p53-Genmutationen assoziiert.

Anhand unserer Ergebnisse kann keine definitive Aussage gemacht werden, da die Anzahl der untersuchten Fälle zu gering war.

## 5. Zusammenfassung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde Knochenmarksmaterial von 110 Leukämiepatienten auf das Vorliegen von p53-Gen-Deletionen untersucht. Zu diesem Zweck wurden sowohl Interphasezellkerne als auch Metaphasen der Leukämiezellen mittels der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungstechnik (FISH) mit der p53-Gen-Sonde untersucht. Dabei konnte in keinem der 55 untersuchten Patienten mit lymphatischer Leukämie eine Alleldeletion des p53-Gens nachgewiesen werden. Da die p53-Gen-Deletion nach den Literaturangaben bei etwa 7% der Patienten mit lymphatischer Leukämie vorkommt, widersprechen die eigenen Ergebnisse diesen Angaben. Als Grund kann die zu geringe Anzahl der untersuchten Fälle genannt werden. Bei den 55 hier untersuchten Patienten, die an myeloischer Leukämie erkrankt waren, konnte in 7 Fällen (13%) eine Deletion im p53-Gen mittels FISH nachgewiesen werden. Der Anteil der gefundenen p53-Gen-Deletionen war deutlich höher als aufgrund der Literaturangaben erwartet. Die sieben Patienten, bei denen eine p53-Gen-Deletion nachgewiesen wurde, waren alle an akuter myeloischer Leukämie (AML) erkrankt. Alle Patienten, die eine p53-Gen-Deletion aufwiesen, zeigten auch einen numerisch und strukturell aberranten Karyotyp.

Im zweiten Arbeitsabschnitt wurden Knochenmarkszellen von 21 Patienten mit hämatologischen Erkrankungen mittels spektraler Karyotypisierung (SKY) untersucht und mit dem zytogenetischen Routinebefund verglichen. Ziel der Untersuchung war die Identifizierung von numerischen und strukturellen Chromosomenaberrationen, die durch die konventionelle zytogenetische Untersuchung nicht identifiziert werden konnten. Bei 17 (81%) der Fälle wurden durch SKY zusätzliche Chromosomenaberrationen festgestellt. Nur bei 4 (19%) der Fälle wurde der zytogenetische Befund bestätigt.

Im dritten Arbeitsabschnitt wurden Meningeome untersucht. Bei 22 Meningeomen (17 benigne und 5 atypische Meningeomen) wurde mittels Interphase-FISH nach einer Alleldeletion des p53-Gens gesucht. Es konnte jedoch in keinem Fall eine solche Deletion nachgewiesen werden.

Weiterhin wurden bei 24 Meningeomen 96 frische Biopsieproben von verschiedenen Tumorarealen mit G-Bänderungstechnik zytogenetisch analysiert.

Zur besseren Aufklärung komplex aberranter Karyotypen wurden zwei Fälle (Nr. 1 und Nr. 7) auch mittels SKY-Analyse untersucht. Ziel der vorliegenden Arbeit war es festzustellen, ob zytogenetische Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Arealen innerhalb eines Tumors vorliegen. Es gab bei 13 von 24 Meningeomen (54%) zytogenetische Unterschiede zwischen den verschiedenen Arealen innerhalb eines Tumors. 24 (83%) von 29 Meningeomen wurden nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft und 5 (17%) von 29 Meningeomen in den Tumorgrad II. Die Tumorgradverteilung in dieser Arbeit entspricht den Literaturangaben. 13 von 24 Tumoren wiesen entweder einen normalen Karyotyp oder nur eine Monosomie 22 auf. Alle 13 Tumoren wurden nach der WHO-Klassifikation von Meningeomen in den Tumorgrad I eingestuft. Vier Meningeome wiesen stark aberrante Karyotypen auf, was vermutlich ein Zeichen für die Tumorprogression darstellt.

Es wurde auch untersucht, ob eine Korrelation zwischen dem zytogenetischen und histologischen Befunden vorliegt. In der vorliegenden Arbeit hat bei sechs Fällen der histologische Befund nicht mit dem zytogenetischen Befund übereingestimmt, da die Tumore in den Tumorgrad I eingestuft wurden, der zytogenetische Befund aber einen aberranten Chromosomensatz aufwies, der normalerweise nicht bei niedriggradigen Meningeomen, sondern bei atypischen und anaplastischen Meningeomen vorkommt.

Die Untersuchungsergebnisse deuten darauf hin, dass die Kombination verschiedener zytogenetischer und molekularzytogenetischer Methoden zur Charakterisierung Chromosomaler Aberrationen bei Meningeomen sinnvoll ist.



**6. Literaturverzeichnis**

**Al Saadi A**, Latimer F, Madercic M, and Robbins T: Cytogenetic Studies of Human Brain Tumors and Their Clinical Significance. II. Meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* 26:127-141 (1987)

**Amatya VJ**, Takeshima Y and Inai K: Methylation of p14ARF gene in meningiomas and its correlation to the p53 expression and mutation. *Modern Pathology* 17, 705-710 (2004)

**Al-Mefty O**, Kadri AS, Pravdenkova S, Sawyer JR, Stangeby C and Husain M: Malignant progression in meningioma: documentation of a series and analysis of cytogenetic findings. *J Neurosurg* 101:210-218, 2004

**Amiel A**, Arbov L, Manor Y, Feigin M, Elis A, Gaber E, Lishner M: Monoallelic p53 deletion in chronic lymphocytic leukemia detected by interphase cytogenetics. *Cancer Genet Cytogenet* 97(2):97-100, 1997

**Bello MJ**, de Campos JM, Kusak ME, et al: Allelic loss of 1p is associated with tumor progression of meningiomas. *Genes Chromosomes Cancer* 9:296-298, 1994

**Bostrom J**, Meyer-Puttli B, Wolter M, Blaschke B, Weber RG, Lichter P, Ichimura K, Collins VP, Reifenberger G: Alterations of the tumor suppressor genes CDKN2A(p16<sup>INK4a</sup>), p14<sup>ARF</sup>, CDKN2B(p15<sup>INK4b</sup>), and CDKN2C (p18<sup>INK4c</sup>) in atypical and anaplastic meningiomas. *Am J Pathol* 159:661-669 (2001).

**Büschges R**, Ichimura K, Weber RG, Reifenberger G and Collins VP: Allelic Gain and Amplification on the Long Arm of Chromosome 17 in Anaplastic Meningiomas. *Brain Pathol*; 12:145-153 (2002)

**Boyapati A**, Kanbe E, Zhang D-E: p53 Alterations in Myeloid Leukemia. *Acta Haematol* 111: 100-106, 2004

**Black P**, Carroll R and Zhang J: The Molecular Biology of Hormone and Growth Factor Receptors in Meningiomas. *Acta Neurochir* 65:50-53 (1996)

**Bender-Götze C**, Walther J.U., Rampf U., Haas R., Graubner U.B., Müller-Weihrich S., Baier U.: Besonderheiten der akuten Leukämien im Kindesalter. 2003 by Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München

**Byrd JC**, Smith L, Hackbarth ML, Flinn IW et al: Interphase Cytogenetic Abnormalities in Chronic Lymphocytic Leukemia May Predict Response to Rituximab. *Cancer Research* 63, 36-38, January 1, 2003

**Boulwood J**, Lewis S, Wainscoat J: the 5q- Syndrome. *Blood* 84:3253-3260 (1994)

**Bayani J**, Squire JA: Advances in the detection of chromosomal aberrations using spectral karyotyping. *Clin Genet*: 59:65-73 (2001)

**Bayani J**, Zielenska M, Pandita A, Al-Romaih K, Karaskova J, Harrison K, Bridge JA, Sorensen P, Thorner P and Squire JA: Spectral Karyotyping Identifies Recurrent Complex Rearrangements of Chromosomes 8, 17, and 20 in Osteosarcomas. *Genes, Chromosomes & Cancer* 36:7-16 (2003)

**Cai DX**, James CD, Scheithauer BW, Couch FJ, Perry A: PS6K amplification characterizes a small subset of anaplastic meningiomas. *Am J Clin Pathol* 115:

213-218 (2001).

**Coleman AE**, Forest ST, McNeil N, Kovalchuk AL, Ried T and Janz S: Cytogenetic analysis of the biopotential murine pre-B cell lymphoma, P388, and its derivative macrophage-like tumor, P388D1, using SKY and CGH. *Leukemia* 13:1592-1600 (1999)

**Casalone R**, Granata P, Simi P, Tarantino E, Butti G, Buonaguidi R, Faggionato F, Knerich R, and Solero L: Recessive Cancer Genes in Meningiomas? An Analysis of 31 Cases. *Cancer Genet Cytogenet* 27: 145-159 (1987)

**Casalone R**, Simi P, Granata P, Minelli E, Giudici A, Butti G, and Solero CL: Correlation Between Cytogenetic and Histopathological Findings in 65 Human Meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 45:237-243 (1990)

**Cai DX**, Banerjee R, Scheithauer BW, Lohse CM, Kleinschmidt-DeMastes BK, and Perry A: Chromosome 1p and 14q FISH Analysis in Clinicopathologic Subsets of Meningioma: Diagnostic and Prognostic Implications. *J of Neuropathology and Experimentaal Neurology* Vol.60, No. 6, pp. 628-636 (2001)

**Carroll RS**, Glowacka D, Dashner K et al ( 1993 ) Progesterone receptor expression in meningiomas. *Cancer Res* 53:1312-1316

**Caspersson T**, Zech L and Johansson C: Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res* 60: 315-319 (1970)

**Collins VP**, Nordenskjold NI, Dumanski JP ( 1990 ) the molecular genetics of meningiomas. *Brain Pathol* 1:19-24.

**Cushing H**, Eisenhardt L (1938 ) *Menigeomas: Their classification, regional behavior, life history and surgical end results.* Charles C. Thomas Springfield.

**Cerda-Nicolas M**, Lopez-Gines C, Perez-Bacete M, Barcia-Salorio JL and Llombart-Bosch A: Histopathological and cytogenetic findings in benign, atypical and anaplastic human meningiomas: a study of 60 tumors *J of Neuro-Oncology* 47:99-108 (2000)

**Chen HJ**, Liang CL, Lu K, Lin JW, Cho CL: Implication of Telomerase Activity and Alterations of Telomere Length in the Histologic Characteristics of Intracranial Meningiomas. *Cancer*; 89: 2092-2098 (2000)

**Chen P**, Iavarone A, Fick J, Edwards M, Prados M, and Israel MA: Constitutional p53 Mutations Associated with Brain Tumors in Young Adults. *Cancer Genet Cytogenet* 82:106-115 (1995)

**Cho H**, Ha SY, Park SH, et al : Role of p53 gene mutation in tumor aggressiveness of intracranial meningiomas. *J Korean Med Sci* 14:199-205 (1999)

**Casartelli C**, Rogatto SR, and Neto JB: Karyotypic Evolution of Human Meningioma Progression Through Malignancy. *Cancer Genet Cytogenet* 40:33-45 (1989)

**Das A**, Tan WL and Smith DR, p53 Point Mutation is Rare in Meningiomas from Singaporean Patients. *Asian J of Surgery* 28(1):7-10 (2005)

**Daley GQ**, Van Etten RA, Baltimore D: Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*, 16;247(4944):824-30, 1990

- Dewald GW**, Brockman SR, Paternoster SF, et al: Chromosome anomalies detected by fluorescence in situ hybridisation: correlation with significant biological features in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 121: 287-295, 2003
- Drexler HG**, Fombonne S, Matsuo Y, Hu Z-B, Hamaguchi H and Uphoff CC: p53 alterations in human leukemia-lymphoma cell lines: in vitro artifact or prerequisite for cell immortalization?. *Leukemia* 14(1), 198-206, 2000
- Döhner H**, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E et al.: Genomic Aberrations and Survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, December 28, 2000
- El Deiry WS**, Tokino T, Velculesu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75:817-825, 1993
- Erkeland SJ**, Valkhof M, Heijmans-Antonissen C, Hoven-Beijen A, Delwel R, Hermans M HA and Touw IP: Large-Scale Identification of Disease Genes Involved in Acute Myeloid Leukemia. *J Virol*. February 78(4):1971-1980 (2004)
- Ellison DW**, Lunec J, Gallagher PJ, Steart PV, Jaros E, Gatter KC: Accumulation of wild-type p53 in meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 21(2): 136-42 (1995)
- Flores ER**, Tsai KY, Crowley D, Segunpta S, Yang A, McKeon F, Jacks T: p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature*, 416; 560-564, 2002
- Gautier-Smith PC** ( 1970 ) Parasagittal and falx meningiomas. Appleton-Century-Crofts, New York.
- Gall JG** and Pardue ML: Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 63, 378-383 (1969)
- Ghadimi BM**, Schröck E, Walker RL, Wangsa D, Jauho A, Meltzer PS and Ried T: Specific Chromosomal Aberrations and Amplification of the AIB1 Nuclear Receptor Coactivator Gene in Pancreatic Carcinomas. *Am J Pathol* 154:525-536 (1999)
- Giagounidis A**, Germing U, Haase S, Hildebrandt B, Schlegelberger B, Schoch C, Wilkens L, Heinsch M, Willems H, Aivado M and Aul C: Clinical, morphological, cytogenetic, and prognostic features of patients with myelodysplastic syndromes and del(5q) including band q31. *Leukemia* 18, 113-119 (2004)
- Garini Y**, Gil A, Bar-Am I, Cabib D, and Katzir N: Signal to Noise Analysis of Multiple Color Fluorescence Imaging Microscopy. *Cytometry* 35:214-226(1999)
- Gutmann DH**, Donahoe J, Perry A, Lemke N, Gorse K, Kittiniyom K, Rempel SA, Gutierrez JA and Newsham IF: Loss of DAL-1, a protein 4.1-related tumor suppressor, is an important early event in the pathogenesis of meningiomas. *Human Molecular Genetics*, Vol.9, No.10, 1495-1500 (2000)
- Garini Y** et al: Spectral karyotyping. *Bioimaging* 4, 65-72 (1996)
- Götz C**, Montenarh M: Das Wachstumssuppressorproteini p53 von der Grundlagenforschung bis zur klinischen Anwendung. *Magazin Forschung* 1/1998 (Universität des Saarlandes)
- Godon C**, Talmant P, Garand R, Accart F, Bataille R and Avet-Loiseau H: Deletion of 5q31 is Observed in Megakaryocytic Cells in Patients With Myelodysplastic

Syndromes and a del(5q), Including the 5q- Syndrome. *Genes Chromosome & Cancer* 29:350-352 (2000)

**Haase D**, Feuring-Buske M, Schafer C, Troff C, Gahn B, Hiddemann W, Wormann B. Cytogenetic analysis of CD34+ subpopulations in AML and MDS characterized by the expression of CD38 and CD117. *Leukemia* 11(5): 674-9 (1997)

**Haddad BR**, Schröck E, Meck J, Cowan J, Young H, Ferguson-Smith MA, Ried T : Identification of de novo chromosomal markers and derivatives by spectral karyotyping. *Hum Genet* 103: 619-625 (1998)

**Helen Morrison**, Larry S. Sherman, James Legg, Fatima Banine, Clare Isacke, Carrie A. Haipek, David H. Gutmann, Helmut Ponta, and Peter Herrlich ( 2001 ) The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44, *Genes & Development* 15: 968-980.

**Henn W**, Cremerius U, Heide G, Lippitz B, Schröder JM, Gilsbach JM, Büll U, and Zang KD: Monosomy 1p is Correlated with Enhanced In Vivo Glucose Metabolism in Meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 79:144-148 (1995)

**Henn W**, Niedermayer I, Ketter R, Reichardt S, Freiler A, Zang KD: Monosomy 7p in meningiomas: a rare constituent of tumor progression. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 144:65-68 (2003)

**Heng HHQ**, Ye CJ, Yang F, Ebrahim S, Liu G, Bremer SW, Thomas CM, Ye J, Chen TJ, Tuck-Muller C, Yu JW, Krawetz SA, Johnson A: Analysis of marker or complex chromosomal rearrangements present in pre- and postnatal karyotypes utilizing a combination of G-banding, spectral karyotyping and fluorescence in situ hybridisation. *Clin Genet* 63:358, 2003

**Helseth A**, Mork SJ, Johansen A, Tretli 5 ( 1989 ) Neoplasms of the central nervous system in Norway population-based epidemiological study meningiomas. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 97:646-654.

**Hallek M**, Bergmann M und Emmerich B: Chronische lymphatische Leukämie, Aktualisierte Vorschläge zu Diagnostik und Therapie. *Deutsches Ärzteblatt*, Jg. 99, Heft 19, 10. Mai 2002.

**Hofmann WK**, Takeuchi S, Xiw D, Miller CW, Hoelzer D, Koeffler HP: Frequent loss of heterozygosity in the region of D1S450 at 1p36.2 in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*, 25: 855-858, 2001

**Hermeking H**, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B: 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell*, 1:3-11, 1997.

**Heim S**, Mitelman F: Chromosome abnormalities in the myelodysplastic syndromes. *Clin Haematol* 15:281-319 (1986)

**Hilgenfeld E**, Padilla-Nash H, Schrock E, Ried T: Analysis of B-cell neoplasias by spectral karyotyping (SKY). *Curr Top Microbiol Immunol.*; 246:169-74 (1999)

**Hilgenfeld E**, Padilla-Nash H, McNeil N, Knutsen T, Montagna C, Tchinda J, Horst J, Ludwig WD, Serve H, Buchner T, Berdel WE, Schrock E, Ried T: Spectral karyotyping and fluorescence in situ hybridization detect novel chromosomal aberrations, a recurring involvement of chromosome 21 and amplification of the MYC oncogene in acute myeloid leukemia M2. *Br J Haematol.* 113(2):305-17, May 2001

- John HA**, Birnstiel ML, and Jones KW: RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223, 582-587 (1969)
- Joachim T**, Ram Z, Rappaport ZH, Simon M, Schramm J, Wiestler OD, Von Deimling A: Comparative Analyse of the NF2, TP53, PTEN, KRAS, NRAS and HRAS genes in sporadic and radiation-induced human meningiomas. *Int. J. Cancer* 94, 218-221 (2001)
- Ishino S**, Hashimoto N, Fushiki S et al. ( 1998 ) Loss of material from chromosome arm 1p during malignant progression of meningioma revealed by fluorescent in situ hybridization. *Cancer* 83:360-366.
- Kallioniemi A**, Kallioniemi O-P, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D: Comparative Genomic Hybridization for Molecular Cytogenetic Analysis of Solid Tumors. *Science* 258, 818-821 (1992)
- Kepes JJ** ( 1982 ) Meningeomas: biology, pathology and differential diagnosis. Masson, New York
- Kakazu N**, Taniwaki M, Horiike S, Nishida K, Tatekawa T, Nagai M, Takahashi T, Akaogi T, Inazawa J, Ohki M and Abe T: Combined Spectral Karyotyping and DAPI Banding Analysis of Chromosome Abnormalities in Myelodysplastic Syndrome. *Genes, Chromosomes & Cancer* 26:336-345 (1999)
- Ketter R**, Henn W, Niedermayer I et al (2001) Predictive value of progression-associated chromosomal aberrations for the prognosis of meningiomas: a retrospective study of 198 cases. *J Neurosurg* 95: 601-607
- Ketter R**, Henn W, Feiden W, Prowald A, Sittel C, Steudel WI, Strowitzki M: Nasoethmoidal Meningioma with Cytogenetic Features of Tumor Aggressiveness in a 16-Year-Old Child. *Pediatr Neurosurg* 39:190-194 (2003).
- Kolles H**, Niedermayer I, Schmitt C, et al: Triple approach for diagnosis and grading of meningiomas: histology, morphometry of Ki-67/Feulgen stainings, and cytogenetics. *Acta Neurochir* 137:174-181, 1995
- Katsuyama J**, Papenhausen PR, Herz F, Gazivoda P, Hirano A, and Koss LG: Chromosome Abnormalities in Meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 22:63-68 (1986)
- Karhu R**, Tobin G, Thunberg U, et al: More extensive genetic alterations in unmutated than in hypermutated cases of chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 37: 417- 420, 2003.
- Kröber A**, Seiler T, Benner A, Bullinger L, et al: VH mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100: 1410-1416, 2002.
- Krug U**, Ganser a, Koeffler HP: Tumor suppressor genes in normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene*, 21; 3475-3495, 2002
- Klekner A**, Röhn G, Schillinger G, Schröder R, Klug N and Ernestus RI: ODC mRNA as a prognostic factor for predicting recurrence in meningiomas. *J of Neuro-Oncology* 53:67-75 (2001)
- Lamszus K**, Kluwe L, Matschke J, Meissner H, Laas R, Westphal M: Allelic losses at 1p, 9q, 10q, 14q, and 22q in sporadic meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 110:103-110 (1999).

- Lopez-Gines C**, Cerda-Nicolas M, Gil-Benso R, Callaghan R, Collado M, Roldan P, Llombart-Bosch A: Association of loss of 1p and alterations of chromosome 14 in meningioma progression. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 148, 123-128 (2004)
- Le Beau MM: Deletions of chromosome 5 in malignant disorders. *Cancer Surv.* 15:143-59 (1992)
- Leone PE**, Bello MJ, de Campos JM, Vaquero J, Sarasa JL, Pestana A, Rey JA: NF2 gene mutations and allelic status of 1p, 14q and 22q in sporadic meningiomas. *Oncogene* 18:2231-2239 (1999).
- Lai JL**, Preudhomme C, Zandecki M, Flactif M, Vanrumbeke M, Lepelley P, Wattel E, Fenaux P: Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with 17p deletion. An entity characterized by specific dysgranulopoiesis and a high incidence of p53 mutations. *Leukemia*, 9; 370-381, 1995
- Lopez-Gines C**, Cerda-Nicolas M, Peydro-Olaya A and Llombart-Bosch A: Case of Meningioma with del(1)(p32) as Sole Anomaly. *Cancer Genet Cytogenet* 70:74-76 (1993)
- Logan JA**, Seizinger BR, Atkins L, and Martuza RL: Loss of the Y Chromosome in Meningiomas A Molecular Genetic Approach. *Cancer Genet Cytogenet* 45:41-47 (1990)
- Liyanage M**, Coleman A, Manoir SD, Veldman T, McCormack S, Dickson RB, Barlow C, Wynshaw-Boris A, Janz S, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Schröck E and Ried T: Multicolour spectral of mouse chromosomes. *Nat Genet* 14:312-315 (1996)
- Lipp T**, Schneller F, Adorf D, Haferlach T, Schoch C, Schleuning M: Akute lymphoblastische Leukämie (ALL) bei Erwachsenen. 2003 bei Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München.
- Laronga C**, Yang HY, Neal C, Lee MH: Association of the cyclin-dependent kinases and 14-3-3 sigma negatively regulates cell cycle progression, *J Biol Chem*; 275:23106-23112, 2000
- Look AT**, Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 278:1059-1064 (1997)
- Lowenberg BJ**, Downing R and Burnett A: Acute myeloid leukemia. *N.Engl. J Med.*341:1051-1062 (1999)
- Linggi B**, Müller-Tidow C, Locht L, Hu M, Nip J, Serve H, Berdel W, Reijden B, Quelle D, Rowley JD, Cleveland J, Jansen JH, Pandolfi PP and Hiebert SW: The t(8;21) fusion protein, AML1-ETO, specifically represses the transcription of the p14<sup>ARF</sup> tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Nature Medicine* Vol 8, Nr. 7:pp 743-750 (2002)
- Mitelman F**: Database of Chromosome Aberrations in Cancer-online database , The cancer genome anatomy project of National Cancer Institute update January 23,2001
- Merlat A**, Lai JL, Sterkers Y, Demory JL et al.: Therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with 17p deletion. A report on 25 cases. *Leukemia* 13(2), 250-257, 1999

- Mohr B**, Bornhäuser M, Thiede C, Schäkel U, Schaich M, Illmer T, Pascheberg U and Ehninger G: Comparison of spectral karyotyping and conventional cytogenetics in 39 patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 14, 1031-1038 (2000)
- Mehes G**: Chromosome Abnormalities with Prognostic Impact in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Pathology Oncology Reserch* Vol 11, No 4, 2005.
- Mori N**, Morosetti R, Spira S, Lee S, Ben-Yehuda D, Schiller G, Landolf R, Mizoguchi H, Koeffler HP: Chromosome band 1p36 contains a putative tumor suppressor gene important in the evolution of chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 92: 3405-3409, 1998
- McNeil N**, and Ried T: Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine. Cambridge University Press ISSN 1462-3994 (2000)
- Mitelman F**, Levan G: Clustering of aberrations to specific chromosomes in human neoplasms. III. Incidence and geographic distribution of chromosome aberrations in 856 cases. *Hereditas* 89:207-232 (1980)
- Mark J**, Levan G, Mitelman F : Identification by fluorescence of the G chromosome lost in human meningiomas. *Hereditas* 71: 163-168, 1972
- Menon AG**, Rutter JL, von Sattel JP, Synder H, Murdoch C, Blumenfeld A, Martuza RL, von Deimling A, Gusella JF, Houseal TW: Frequent loss of chromosome 14 in atypical and malignant meningioma: identification of a putative tumor progression locus. *Oncogene* 14:611-616 (1997)
- Maier H**, Ofner D, Hittmair A et al ( 1992 ) Classic, atypical, and anaplastic meningioma: three histopathological subtypes of clinical relevance. *J Neurosurg*77:616-623.
- Mendiratta SS**, Rosenblum JA, Strobos RJ (1967) Congenital meningiomas. *Neurology* 17:914-918.
- Müller P**, Henn W, Niedermayer I, et al: Deletion of chromosome 1p and loss of expression of alkaline phosphatase indicate progression of meningiom. *Clin Cancer Res* 5:3569-3577, (1999)
- Meloni A**, Morgen R, Bridge J, Erling MA, Lewin RJ, and Sandberg AA: Cytogenetic Findings in Typical and Atypical Meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* 51:35-39 (1991)
- Malik Z**, Cabib D, Buckwald RA, Talmi A, Garini Y and Lipson SG: Fourier transform multipixel spectroscopy for quantitative cytology. *J of Microscopy* Vol 182, 133-140 (1996)
- Moorhead PS**, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM and Hungerford DA: Chromosome preparations of leukocytes cultured from Human peripheral blood. *Exp Cell Res* 20, 613-616 (1960)
- Macville M**, Schröck E, Padilla-Nash H, Keck C, Ghadimi BM, Zimonjic D, Popescu N and Ried T: Comprehensive and Definitive Molecular Cytogenetic Characterization of HeLa Cells by Spectral Karyotyping. *Cancer Research* 59: 141-150 (1999)
- Markovic VD**, Bouman D, Bayani J, Al-Maghrabi J, Kamel-Reid S, Squire JA: Lack

of BCR/ABL reciprocal fusion in variant philadelphia chromosome translocations: a use of double fusion signal FISH and spectral karyotyping. *Leukemia* 14:1157-1160 (2000)S

**Mrozek K**, Heinonen K, Theil KS, and Bloomfield CD: Spectral Karyotyping in Patients With Acute Myeloid Leukemia and a Complex Karyotype Shows Hidden Aberrations, Including Recurrent Overrepresentation of 21q, 11q, and 22q. *Genes, Chromosomes & Cancer* 34:137-153 (2002)

**Nakamura M**, Roser F, Michel J, Jacobs C, Samii M: Volumetric Analysis of the Growth Rate of Incompleted Resected Intracranial Meningiomas. *Zentralbl Neurochir* 66: 17-23, 2005

**Nagashima G**, Aoyagi M, Yamamoto M, Yamamoto S, Wakimoto H, Ohno K, Yamamoto K, and Hirakawa K: p53 Overexpression and Proliferative Potential in Malignant Meningiomas. *Acta Neurochir (Wien)* 141: 53-61 (1999)

**Niedermayer I**, Feiden W, Henn W, Steilen-Gimbel H, Steudel WI, Zang KD: Loss of alkaline phosphatase activity in meningiomas: a rapid histochemical technique indicating progression-associated deletion of a putative tumor suppressor gene on the distal part of the short arm of chromosome 1. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:879-886, 1997a.

**Nowell PC**: Phytohemagglutinin: An Initiator of Mitosis in Cultures of Normal Human Leukocytes. *Cancer research* 20, 462-466 (1960)

**Nahi H**, Merup M, Lehmann S, Mollgard L, Selivanova G, Wiman KG, Paul C: PRIMA-1 induces apoptosis in acute myeloid leukaemia cells with p53 gene deletion. *Br J Haematol*. Jan; 132(2):230-6, 2006

**Nahi H**, Lehmann S, Mollgard L, Selivanova G, Wiman KG, Paul C, Merup M: Effects of PRIMA-1 on chronic lymphocytic leukaemia cells with and without hemizygous p53 deletion. *Br J Haematol* 127(3):285-91, 2004

**Nowell PC**, Hungerford DA : A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science* 132:1497, 1960.

**Niedermayer I**, Kolles H, Zang KD, et al: Characterization of intermediate type (WHO "atypical") meningiomas. *Clin Neuropathol* 15:330-336, 1996

**Ohki Misao**: Molecular basis of the t(8;21) translocation in acute myeloid leukemia. *Cancer Biology*, Vol 4, pp369-375 (1993)

**Odero MD**, Calson K, Calasanz MJ, Lahortiga I, Chinwalla V and Rowley JD: Identification of New Translocations Involving ETV6 in Hematologic Malignancies by Fluorescence In Situ Hybridization and Spectral Karyotyping. *Genes, Chromosomes & Cancer* 31:134-142 (2001)

**Ohgaki H**, Eibl RH, Schwab M, Reichel MB, Mariani L, Gehring M, Petersen I, Holl T, Wiestler OD, Kleihues P: Mutations of the p53 tumor suppressor gene in neoplasms of the human nervous system. *Mol Carcinog*. 8(2):74-80 (1993)

**Preston-Martin S** Descriptive epidemiology of primary tumors of the brain. Cranial nerves and cranial meninges in Los Angeles County. *Neuroepidemiology* 5:253-295(1989).

**Perry A**, Scheithauer BW, Stafford SL, Lohse CM, Wollan PC (1999),



„Malignancy” in meningiomas: a clinicopathologic study of 116 patients, with grading implications. *Cancer* 85: 2046-2056.

**Perry A**, Banerjee R, Lohse C, Kleinschmidt-DeMasters B, Scheithauer B, A Role for Chromosome 9p21 Deletions in the Malignant Progression of Meningiomas and the Prognosis of Anaplastic Meningiomas. *Brain Pathol* 12: 183-190 (2002)

**Perry A**, David H. Gutmann and Guido Reifenberger: Molecular pathogenesis of meningiomas. *J of Neuro-Oncology* 70: 183-202 (2004)

**Phelan MC**, Blackburn W, Rogers RC, Crawford EC, Cooley NR, Schrock E, Ning YI and Ried T: FISH Analysis of a Complex Chromosome Rearrangement Involving Nine Breakpoints on Chromosomes 6, 12, 14 and 16. *Prenat. Diagn.* 18: 1174-1180 (1998)

**Pedersen-Bjergaard J**, Christiansen D.H., Andersen M.K. and Skovby F.: Causality of myelodysplasia and acute myeloid leukemia and their genetic abnormalities. *Leukemia* 16:2177-2184 (2002)

**Peschel C**, Duyster J, Günther Ch, Kölb H-J, Muth A, Schneller F: Chronische myeloische Leukämie (CML). 2003 by Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München

**Pedersen B**: Anatomy of the 5q- deletion: different sex ratios and deleted 5q bands in MDS and AML. *Leukemia* Dec;10(12):1883-90 (1996)

**Quest DO** ( 1978 ) Meningiomas: An update. *Neurosurgery* 3:219-222.

**Rohringer M**, Sutherland GR, Low DF, Sima AAF ( 1989 ) Incidence and clinicopathological features of meningioma. *J Neurosurg* 71:665-672

**Rowley J.D.**: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243, 290-293 (1973)

**Reddy KS**, Chronic lymphocytic leukaemia profiled for prognosis using a fluorescence in situ hybridisation panel. *Br J Haematol.* 132(6):705-22, 2006

**Rempel SA**, Schwechheimer K, Davis RL, Cavenee WK and Rosenblum, Loss of heterozygosity for loci on chromosome 10 is associated with morphologically malignant meningioma progression. *Cancer Research* 53: 2386-2392 (1993)

**Ruttledge MH**, Sarrazin J, Rangaratnam S, Phelan CM, Twist E, Merel P, Delattre O, Thomas G, Nordenskjöld M, Collins VP, Dumanski JP, Rouleau GA: Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas. *Nature Genet* 6:180-184 (1994)

**Rey JA**, Bello JM, de Campos JM, Benitez T, Ayuso MC, Valcarel E: Chromosome studies in two human tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 10:159-165 (1983)

**Rey JA**, Bello MJ, de Campos JM, Kusak E, and Moreno S: Chromosomal Involvement Secondary to -22 in Human Meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 33:275-290 (1988)

**Ried T**, Schröck E, Ning Y and Wienberg J: chromosome painting: a useful art. *Human Molecular Genetics* 7: 1619-1626 (1998)

**Rowley JD**, Reshmi S, Carlson K, and Roulston: Spectral Karyotype Analysis of T-Cell Acute Leukemia. *Blood* 93: 2038-2042 (1999)

**Sayagués J M**, Tabertero MD, Maíllo A, Espinosa A, Rasillo A, Díaz P, Ciudad J, López A, Merino M, Goncalves JM, Santos-Briz A, Morales F, and Orfao A: Intratumoral Patterns of Clonal Evolution in Meningiomas as Defined by Multicolor Interphase Fluorescence in Situ Hybridization (FISH), Is There a Relationship between Histopathologically Benign and Atypical/Anaplastic Lesions?. *J of Molecular Diagnostics* 6: 316-325 (2004)

**Seabright M**: Human chromosome banding. *Lancet* 1, 967 (1971)

**Simon M**, von Deimling A, Larson JJ, et al: Allelic losses on Chromosomes 14, 10 and 1 in atypical and malignant meningiomas: a genetic model of meningioma progression. *Cancer Res* 55: 4696-4701, 1995

**Simpson D** ( 1957 ) The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:22-39.

**Schlegel J., Peraud A., Herms J.**, 2004, WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems, Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München.

**Schlegel J**, Ullrich B, Stumm G et al ( 1993 ) Expression of the c-erbB-2 encoded oncoprotein and progesterone receptor in human meningioma. *Acta Neuropathol ( Berl )* 86:473-476.

**Seabright M**: A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* II, 971-972 (1971)

**Schneider BF**, Shashi V, von Kap H, Golde WL: Loss of chromosomes 22 and 14 in the malignant progression of meningiomas: A comparative study of fluorescence in situ hybridization (FISH) and standard cytogenetic analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 85:101-104 (1995).

**Schröck E**, Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith M.A., Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Arm I, Soenksen D, Garini Y, Reid T: Multicolor Spectral Karyotyping of Human Chromosomes. *Science* 273:494-497 (1996)

**Singer H.** und Zang K.D.: Cytologische und cytogenetische Untersuchungen an Hirntumoren. I. Die Chromosomenpathologie des menschlichen Meningeoms. *Humangenetik* 9, 172-184 (1970)

**Sindelarova L**, Michalova K, Zemanova Z, Ransdorfova S et al.: Incidence of chromosomal anomalies detected with FISH and their clinical correlations in B-chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 160(1):27-34, 2005

**Soenen V**, Preudhomme C, Roumier C et al. : Myelodysplasia during the course of myeloma. Restriction of 17p deletion and p53 overexpression to myeloid cells. *Leukemia* , 12(2), 238-241, 1998

**Stilgenbauer S**, Döhner K, Bentz M, Lichter P, Döhner H: Molecular cytogenetic analysis of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol* 76:101-110, 1998

**Tjio J H** and Levan A: the Chromosome Number in Man. *Hereditas* 42, 1-6 (1956)

**Thornton PD**, Gruszka-Westwood AM, Hamoudi RA, et al: Characterization of Tp53 abnormalities in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol J* 5: 47-54, 2004.

**Theobald M** and Offringa R: Anti-p53-directed immunotherapy of malignant disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, Vol. 5, 28.03.2003.

**Trappe A.E.**, Frank A.M., Grosu A.L., Hiller E., Jaksche H., Mayer T.E., Weinziel

F.X.: Primäre Tumoren des Rückenmarks. Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München 2004.

**Tonon G**, Roschke A, Stover K, Shou Y, Kuehl W, and Kirsch IR: Spectral Karyotyping Combined With Locus-Specific FISH Simultaneously Defines Genes and Chromosomes Involved in Chromosomal Translocations. *Genes, Chromosomes & Cancer* 27:418-423 (2000)

**Veldman T**, Vignon C, Schröck E, Rowley JD and Ried T: Hidden chromosome abnormalities in haematological malignancies detected by multicolour spectral karyotyping. *Nat Genet* 15: 406-410 (1997)

**Verheijen FM**, Sprong M, Kloosterman JME, Blaauw G, Thijssen JHH, Blankenstein MA. *The International Journal of Biological Markers*, Vol. 17 no. 1, pp42-48 (2002)

**Wang JL**, Zhang ZJ, Hartman M, Smits A, Westermark B, Muhr C, Nister M. Detection of TP53 gene mutation in human meningiomas: a study using immunohistochemistry, polymorphism and DNA sequencing techniques on paraffin-embedded samples. *Int J Cancer* 64(4):223-8 (1995)

**Winkler P.A.**, E. Uhl, A.L. Grosu, E.U. Walther, K.Seelos, A.M.Frank, M.O. Pinsker, B. Wowra, *Meningeome und Meningeomatose*, Tumorzentrum München und W.Zuckschwerdt Verlag München 2004.

**World Health Organization**: World Health Organization Classification of Tumors. Tumors of the Central Nervous System.Pathology and Genetics. Lyons: IARC Press, 2000

**Watanabe T**, Hotta T, Ichikawa A, Kinoshita T, Nagai H, Uchida T, Murate T, Saito H: the MDM2 oncogene overexpression in chronic lymphocytic leukemia and low-grade lymphoma of B-cell origin. *Blood*, 84: 31583165, 1994

**Weber RG**, Boström J, Wolter M, Baudis M, Collins VP, Reifenberger G and Lichter P. Analysis of genomic alterations in benign, atypical, and anaplastic meningiomas: Toward a genetic model of meningioma progression *Proc Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 94, pp.14719-14724, December 1997

**Yamada K**, Kondo T, Yoshiba M, Oami H: Cytogenetic studies in twenty human brain tumors: Association of no.22 chromosome abnormalities with tumors of the brain. *Cancer Genet Cytogenet* 2:293-307 (1980)

**Yunis JJ**: High resolution of human chromosomes. *Science* 191, 1268-1270 (1976)

**Zang KD**, Singer H: Chromosomal constitution of meningiomas. *Nature* 216:84-85, 1967

**Zang K.D**: Meningioma: a cytogenetic model of a complex benign human tumor, including data on 394 karyotyped cases. *Cytogenet Cell Genet* 93:207-220 (2001)

**Zang KD**: Cytological and cytogenetical studies on human meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* 6:249-274, 1982

**Zankl H** and Zang KD, *Cytological and Cytogenetical Studies on Brain Tumors*. *Humangenetik* 14, 167-168 (1972)

**Zankl H**, Heide Seidel, and Zang KD: *Cytological and Cytogenetical Studies on*

Brain Tumors, V. Preferential Loss of Sex Chromosomes in Human Meningiomas.  
Humangenetik 27: 119-128 (1975)

Buch

Molekularbiologie der Zelle, Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis,  
Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, 2004

- [www.medicine-worldwide.de](http://www.medicine-worldwide.de)
- [www.krebsinformation.de](http://www.krebsinformation.de)
- [www.quarks.de/mag0297/03.htm](http://www.quarks.de/mag0297/03.htm)
- [www.de.wikipedia.org](http://www.de.wikipedia.org)

## 7. Abbildungsvezeichnis

<b>Abb. 1:</b> Regulation der p53 Funktionen bei normalen Zellen (modifiziert nach Theobald et al, 2003).....	13
<b>Abb. 3:</b> Regulation der p53 Funktionen bei transformierten Zellen (modifiziert nach Theobald et al, 2003).....	14
<b>Abb. 4:</b> Schematische Darstellung der Chromosomenpräparation aus Meningeomzellen	19
<b>Abb. 5:</b> Eine schematische Darstellung von verschiedenen Typen von FISH Sonden .....	25
<b>Abb. 6:</b> Schematische Darstellung der zytogenetischen Analyse mittels Spectral Karyotyping (SKY) (modifiziert nach McNeil und Ried, 2000).....	26
<b>Abb. 7:</b> Bestandteile eines Spectral karyotyping (SKY)-Arbeitsplatzes; a. Spectra Cube, b. CCD-Kamera, c. Kamera Steuerungssystem, d. Computer, e. Monitor, f. SKY-Kit, g. SKY-Filterblock, h. Fluorozenzmikroskop.....	28
<b>Abb. 8:</b> SKY-Prinzip nach Schröck et al. (1996) .....	29
<b>Abb. 9:</b> Schematische Darstellung der Region der p53-Gen-Sonde (Vysis).....	38
<b>Abb. 10:</b> Das Bild zeigt normale Metaphasechromosomen nach der Hybridisierung mit der p53-Sonde. Rot = p53-Sonde auf dem Chromosom 17, Hintergrund = DAPI .....	38
<b>Abb. 11:</b> FISH mit der p53-Sonde von Vysis. Bild A zeigt eine Metaphase mit drei p53-Signalen. Bild B zeigt Interphasekerne mit drei p53-Signalen. Das p53-Gen ist als rotes Signal erkennbar.....	44
<b>Abb. 12:</b> FISH mit der p53-Sonde zeigt eine Metaphase und ein Interphasekern jeweils mit nur einem Fluoreszenz-Signal. Das p53-Gen ist als rotes Signal erkennbar. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der Tabelle 11 zusammengefasst. ....	49
<b>Abb. 13:</b> Fall Nr.1.....	55
<b>Abb. 14:</b> Fall Nr.2.....	58
<b>Abb. 15:</b> Fall Nr.3.....	60
<b>Abb. 16:</b> Fall Nr.4.....	62
<b>Abb. 17:</b> Fall Nr.5.....	65
<b>Abb. 18:</b> Fall Nr.6.....	67
<b>Abb. 19:</b> Fall Nr.7.....	69
<b>Abb. 20:</b> Fall Nr.8.....	71
<b>Abb. 21:</b> Fall Nr.9.....	73
<b>Abb. 22:</b> Fall Nr.10.....	75
<b>Abb. 23:</b> Fall Nr.11.....	77
<b>Abb. 24:</b> Fall Nr.12.....	79
<b>Abb. 25:</b> Fall Nr.13.....	81
<b>Abb. 26:</b> Fall Nr.14.....	84
<b>Abb. 27:</b> Fall Nr.15.....	86
<b>Abb. 28:</b> Fall Nr.16.....	88
<b>Abb. 29:</b> Fall Nr.17.....	90
<b>Abb. 30:</b> Fall Nr.18.....	92
<b>Abb. 31:</b> Fall Nr.19.....	94
<b>Abb. 32:</b> Fall Nr.20.....	96
<b>Abb. 33:</b> Fall Nr.21.....	98

- Abb. 34:** Die Abbildung zeigt einen aberranten Karyotyp mit dem Verlust von beiden Chromosomen 22 und einem Marker-Chromosom. Der Pfeil weist auf das aberrante Marker-Chromosomen hin, der Ring auf die fehlenden Chromosomen (22) hin..... 101
- Abb. 35:** Die Abbildung zeigt einen aberranten Karyotyp mit telomerischer Assoziation zwischen den Chromosomen 4 und 11, Verlust der beiden Chromosomen 22 sowie ein Marker-Chromosom. Der Pfeil weist auf aberrante Chromosomen und der Ring auf fehlende Chromosomen hin. .... 102
- Abb. 36:** Fall Nr.1 ..... 106
- Abb. 37:** Die Abbildung zeigt eine Addition am langen Arm von Chromosom 4, eine telomerische Assoziation zwischen den Chromosomen 11 und 12 sowie Monosomien für 12, 19 und 22. Pfeile weisen auf aberrante, Ringe auf fehlende Chromosomen..... 108
- Abb. 38:** Die Abbildung zeigt ein männliches Karyogramm mit Y- Verlust. Der Ring weist auf fehlende Chromosomen (Y) hin..... 111
- Abb. 39:** Die Abbildung zeigt einen aberranten Karyotyp mit einer Deletion am kurzen Arm von Chromosom 2, telomerischer Assoziation zwischen den Chromosomen 4 und 20, eine partielle Deletion am langen Arm des Chromosoms 6 und Verlust der Chromosomen 16, 20 und 22. Der Pfeil weist auf aberrante, der Ring auf fehlende Chromosomen hin. .... 120
- Abb. 40:** Fall Nr.7 ..... 124
- Abb. 41:** Die Abbildung zeigt ein Karyogramm mit telomerischer assoziation zwischen Chromosom 21 und einem Chromosom unbekannter Herkunft sowie eine Monosomie 22. Der Pfeil weist auf die Assoziation, der Ring auf das fehlende Chromosom 22..... 128
- Abb. 42:** Die Abbildung zeigt ein Karyogramm mit telomerischer Assoziation zwischen den beiden Chromosomen 14 und 19, und partieller Monosomie 22. Der Pfeil weist auf aberrante Chromosomen, der Ring auf den Verlust von Chromosom 19..... 131
- Abb. 43:** Die Abbildung zeigt ein Karyogramm mit partiellem Chromosomverlust 22. Der Pfeil weist auf dieses aberrante Chromosom 22. .... 133
- Abb. 44:** Die Abbildung zeigt ein Karyogramm mit einem Chromatidbruch in Chromosom 8, Monosomie der Chromosomen 19 und 22 sowie einem Marker-Chromosom. Der Pfeil weist auf aberrante, der Ring auf fehlende Chromosomen hin. .... 135
- Abb. 45:** Die Abbildung zeigt einen Karyotyp mit folgenden Aberrationen: Eine Inversion an Chromosom 1, eine Deletion an Chromosom 4, Monosomie der Chromosomen 6, 9, 10, 14, 16, 18, 19 und 22, eine unbalancierte Translokation zwischen den Chromosomen 6 und 14 sowie den Chromosomen 11 und 19 und eine Addition am kurzen Arm von Chromosom 21. Der Pfeil weist auf aberrante, der Ring auf verlorene Chromosomen hin. .... 139
- Abb. 46:** Die Abbildung zeigt einen aberranten Karyotyp im hypertriploiden Bereich mit den folgenden Aberrationen: Zweimal eine Inversion in Chromosom 1, zweimal eine Deletion in Chromosom 4, Monosomie der Chromosomen 6, 8, 9, 2x 14, 2x 16, 2x 18, 2x 19 und 2x 22, eine unbalancierte Translokation zwischen den Chromosomen 6 und 14, zwei unbalancierte Translokationen zwischen den Chromosomen 11 und 19 und zweimal eine Additionen am kurzen Arm von Chromosom 21..... 142
- Abb. 47:** Die Abbildung zeigt einen normalen männlichen Karyotyp 46,XY..... 145

- Abb. 48:** Die Abbildung zeigt einen aberranten Karyotyp mit folgenden Aberrationen: Eine unbalancierte Translokation am langen Arm von Chromosom 3 mit unbekanntem Material, eine unbalancierte Translokation am kurzen Arm von Chromosom 8 mit unbekanntem Material, Verlust des Chromosoms 15, eine unbalancierte Translokation zwischen den Chromosomen 15 und 16 und Verlust des Chromosoms 22. .... 151
- Abb. 49:** Die Abbildung zeigt einen aberranten Karyotyp mit partieller Deletion am kurzen Arm eines Chromosoms 9 und einer Monosomie 22. .... 153
- Abb. 50:** Die Abbildung zeigt einen aberranten Karyotypen mit einer Monosomie 22 und einem Marker-Chromosom. Der Pfeil weist auf ein Marker-Chromosom, der Ring auf Monosomie 22 hin. .... 161
- Abb. 51:** Die Abbildung zeigt einen aberranten Karyotyp mit einem Isochromosom 1q und Monosomien für die Chromosomen 6 und 22. Der Pfeil weist auf Isochromosom 1, der Ring auf verlorene Chromosomen hin. .... 164
- Abb. 52:** Die Abbildung zeigt ein Karyotyp mit einer Trisomie 21 und einer Monosomie 22. Der Pfeil weist auf die Trisomie 21, der Ring auf das verlorene Chromosom 22 hin. .... 170

---

## 8. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Die Tabelle zeigt die prognostischen Gruppen anhand des Karyotyps bei AML .....	8
<b>Tabelle 2:</b> Die Tabelle zeigt die Häufigkeit chromosomaler Aberrationen bei der ALL Erwachsener .....	9
<b>Tabelle 3:</b> Die Tabelle zeigt die häufigsten Chromosomenaberrationen bei der CLL .....	10
<b>Tabelle 4:</b> Fluorochrome des Sonden-Kits und ihre optischen Eigenschaften (SKY-Kit- Hersteller ASI) .....	27
<b>Tabelle 5:</b> Fluorochrommarkierung der humanen Chromosomen (SKY-Kit-Hersteller ASI)	28
<b>Tabelle 6:</b> Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der FISH-Untersuchung, den zytogenetischen Befund und die Diagnose. ....	44
<b>Tabelle 7:</b> Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der FISH-Untersuchung, den zytogenetischen Befund und die Diagnose. ....	46
<b>Tabelle 8:</b> Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der FISH-Untersuchung, den zytogenetischen Befund und die Diagnose. ....	47
<b>Tabelle 9:</b> Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der FISH-Untersuchung, den zytogenetischen Befund und die Diagnose. ....	48
<b>Tabelle 10:</b> Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der FISH-Untersuchung, den zytogenetischen Befund und die Diagnose. ....	48
<b>Tabelle 11:</b> Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der FISH-Untersuchung, den zytogenetischen Befund und die Diagnose. ....	50
<b>Tabelle 12:</b> Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der FISH-Untersuchung, den zytogenetischen Befund und die Diagnose. ....	51
<b>Tabelle 13:</b> Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der FISH-Untersuchung, den zytogenetischen Befund und die Diagnose. ....	52
<b>Tabelle 14:</b> Übersicht über die Ergebnisse der numerischen Untersuchung .....	83



---

## LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

- Name:** Taleb Mohammed Ali
- Geschlecht:** männlich
- Geburtsdatum:** 01.10.1961
- Geburtsort:** Albukamal / Syrien
- Nationalität:** Deutsch
- Wohnort:** Am Judenhübel 15/106, Trippstadt, Deutschland
- Familienstand:** verheiratet, zwei Kinder
- Schulbildung:** 1969 -1983 Schulbesuch in Albukamal / Syrien
- Studium:** 1983 -1988 Studium der Biologie an der Universität Aleppo / Syrien  
1991 -1992 Studium der Pädagogik an der Universität Damaskus / Syrien  
1993 -1994 Deutschkurs an der Universität Göttingen  
1995 Aufnahme eines Biologiestudiums an der Universität Kaiserslautern
- Abschluss:** 30.11.2001 Diplom, Dipl.-Biologe (Hauptfach: Humanbiologie; Nebenfächer: Biochemie, Mikrobiologie, Botanik)
- Titel der Abschlussarbeit:** Untersuchung zur Mutagenität eines neuen Vulkanisationsbeschleunigers (Robac AS100; Diisopropylxanthogenpolysulphide) nach Aktivierung mit Mikrosomen in vitro an human Blutlymphozyten.
- Aktuelle (letzte) Tätigkeit:** von 01.12.01 bis 31.12.2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter/ Doktorand
- Thema der Doktorarbeit:** Zytogenetische und molekularbiologische Untersuchungen an humanen Leukämien und Meningeomen.

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit ausschließlich mit den angegebenen Mitteln und von mir selbst erarbeitet sowie verfasst wurde.

Taleb Mohammed Ali

Trippstadt, im August 2006