

Fides Heinze
Dr. med.

Molekulare Diagnostik von konventionellen Nierenzellkarzinomen: Fluoreszenz In Situ Hybridisation oder Mikrosatelliten?

Geboren am 07.03.1975 in Heidelberg
Reifeprüfung am 15.05.1994 in Heidelberg
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1995 bis SS 2001
Physikum am 20.03.1997 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heidelberg, Nepal
Staatsexamen am 13.11. 2001 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Chirurgie
Doktorvater: Prof. Dr. G. Kovacs

Die genetische Klassifikation der Nierenzellkarzinome unterscheidet vier verschiedene Tumortypen. Der häufigste Tumortyp, stellt mit 75-80% aller chirurgisch entfernten Tumoren das konventionelle Nierenzellkarzinom dar. Dieses ist gekennzeichnet durch eine Deletion der Chromosom 3p Region. Weiterhin sind Duplikationen des Chromosoms 5q und Deletionen der Chromosomen 6q, 8p, 9p und 14q charakteristisch.

Bei der genetischen Klassifizierung der Tumoren ist die zuverlässige Erfassung genetischer Veränderungen wichtig. Dazu stehen mehrere Methoden zur Verfügung:

Die Mikrosatelliten-Analyse ist die zur Zeit schnellste und zuverlässigste Methode zur Erfassung genetischer Alterationen. Die elterlichen Allele können unterschieden und aus frischem und archiviertem Material typisiert werden. Es können sowohl Deletionen als auch Duplikationen in Tumor-DNS, die weniger als 10% Kontamination mit normalem Zell-DNS aufweisen, festgestellt werden. Die große Dichte von polymorphen MS-Orten erlaubt eine genaue Aufstellung der spezifischen Region, die untersucht wird. Untersuchungen dieser spezifischen Regionen erlauben eine korrekte Diagnosestellung und Hinweise auf die klinische Prognose von Tumoren. Die Nachteile der Mikrosatelliten-Analyse sind ihr großer apparativer Aufwand, des weiteren braucht man die genaue Kenntnis der spezifischen Regionen.

FISH-Analyse ist eine weit verbreitete Methode. Sie zeigt komplexe karyotypische Anomalien, wie Translokationen, Deletionen und Genamplifikationen sowohl in Metaphasekernen als auch in Interphasekernen. Für die FISH-Analyse braucht man geeignete Sonden. Das Spektrum dieser Sonden, die bereits für viele Fragestellungen erworben werden können, wächst ständig. Die FISH-Analyse bietet die Möglichkeit, je nach Präparationstechnik, die Signale in den Zellen lokalisiert zu sehen.

Ziel der Arbeit ist die Zusammenstellung eines Set von Sonden für die Diagnosestellung von konventionellen Nierenzellkarzinomen mittels FISH-Analyse. Dieses Set von BAC-Sonden wurde auf ihre Lokuspezifität und ihre Übereinstimmung mit Mikrosatelliten-Daten überprüft.

Um geeignete Sonden für die spezifischen chromosomalen Regionen konventioneller Nierenzellkarzinome zu bekommen, wurden in dieser Arbeit entsprechende BAC-Klone

ausgewählt und getestet. Die primären (3p und 5q) und sekundären (6q, 8p, 9p und 14q) genetischen Veränderungen dieses Tumors wurden im einzelnen untersucht.

Die Prognose der Nierenzelltumoren hängt in hohem Maße vom biologischen Verhalten der Tumoren und nicht so sehr von der TMN-Klassifikation zum Zeitpunkt der Nephrektomie ab. Konventionelle Nierenzellkarzinome entwickeln sich als Karzinome und weisen während der Progression ein sequentielles Auftreten von Allelverlust an den Chromosomen 6q23-qter, 8p11.2-pter, 9p21 und 14q24.2-qter auf. Alterationen in den Chromosomen 8p11.2-pter, 9p21 und 14q24.2 haben eine signifikante Korrelation mit dem Tumorstadium, jedoch nicht mit der Tumorgröße zum Zeitpunkt der Nephrektomie. Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnten die Vor- und Nachteile der beiden Methoden, FISH- und Mikrosatelliten-Analyse, aufgezeigt werden.

Die FISH-Analyse ist eine geeignete Methode um zahlenmäßige Chromosomen-Aberationen in diploiden konventionellen NZK auffindig zu machen. Der Verlust eines Signals kann als Deletion diagnostiziert werden. Duplikationen erscheinen in der FISH-Analyse mit drei Signalen. FISH-Analysen von triploiden oder tetraploiden Tumoren könnten irreführend als allelische Imbalance betrachtet werden, bzw. nicht als allelische Imbalance erkannt werden. In dieser Arbeit waren die Tumoren HD181, HA460 und HA462 als tetraploide Tumoren bekannt, weshalb die FISH-Ergebnisse mit den BAC-Klonen der Regionen 3p21, 14q31.1, die je zwei Signale aufwiesen, als Deletionen der chromosomalen Regionen interpretiert werden konnten. Die MS-Analysen bestätigten diese Ergebnisse. Mosaik-Klone erscheinen in der FISH-Analyse als heterogene Signalverteilung mit 1-4 Signalen, je nach Anzahl der Allelkopien des Klons. Sie sind schwer von den aneuploiden Zellen zu unterscheiden, die ebenfalls eine unterschiedliche Anzahl von Signalen erzeugen können.

Generell kann die FISH-Methodik zur genetischen Diagnose von Nierenzellkarzinomen eingesetzt werden. Mögliche Probleme wurden in dieser Arbeit aufgezeigt:

1. Es kann insbesondere im Zusammenhang mit sekundären genetischen Alterationen zu heterogener Signalverteilung kommen, die eine eindeutige Bewertung erschwert.
2. Allelverluste können in Folge von Tetraploidie oder uniparenteraler Isodisomie unentdeckt bleiben.

Mit den hier verwendeten BAC-Klonen 230a11, 475c18, 355h21, 365c2, 330j4, 519b19 und 149k16 wurde ein Set von Sonden zusammengestellt, mit dem konventionelle Nierenzellkarzinome diagnostiziert werden können. Zudem ist durch die Untersuchung progressions-assoziiertes Marker eine begrenzte Aussage über den klinischen Verlauf möglich.