

Aus dem Pathologischen Institut
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald

Chromosom 9 in Ependymomen – Eine Mikrosatellitenanalyse

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Doreen Gentner
aus Huisheim

Würzburg, Januar 2010

Referent: Prof. Dr. med. Cordula Matthies

Koreferent: Prof. Dr. med. Wolfgang Roggendorf

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 21.03.11

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Definition	1
1.2	Inzidenz.....	1
1.3	Lokalisation, Alters- und Geschlechterverteilung	1
1.4	WHO-Klassifikation	2
1.5	Genetik.....	5
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit.....	6
2	Material und Methoden.....	7
2.1	Untersuchungsmaterial	7
2.2	Untersuchungsmethoden	7
2.2.1	Mikrodissektion	7
2.2.2	Gewinnung genomischer DNA	7
2.2.3	Mikrosatellitenanalyse.....	9
2.2.4	Polymerasekettenreaktion.....	11
2.2.5	Polyacrylamidgelelektrophorese	11
2.2.6	Analyse der Gelelektrophorese	11
3	Ergebnisse	14
3.1	Patientendaten	14
3.2	Statistische Methoden.....	17
3.3	Klinikopathologische Korrelationen	17
3.4	Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse.....	20
4	Diskussion.....	25
4.1	Marker	25
4.1.1	D9S1645	26
4.1.2	D9S156	26
4.1.3	D9S1748 und D9S1749	26
4.1.4	D9S1788	29
4.1.5	D9S1817	30
4.1.6	D9S252	31
4.1.7	D9S257	31
4.1.8	D9S1828	32
4.1.9	D9S1683	32
4.1.10	D9S170	32

4.1.11	D9S1872	33
4.1.12	D9S117	34
4.1.13	D9S1863 und D9S118	34
4.2	Verteilung der Aberrationen	35
4.3	Aberrationen von Chromosom 9 im Vergleich mit Chromosom 6 und 22..	36
4.4	Rezidive	36
4.5	Mikrosatelliteninstabilität	37
4.6	Resektionsstatus	38
4.7	Adjuvante Therapie	38
4.8	Lokalisation	38
4.9	Graduierung	40
4.10	Alter	41
4.11	DBCCR1 als möglicher prognostischer Faktor	42
5	Zusammenfassung	43
6	Anhang	44
6.1	Verwendete Abkürzungen	44
6.2	PCR-Ansätze und PCR-Programme	46
6.3	Zusammensetzung der formamidhaltigen Gellösung	46
7	Literaturverzeichnis	47
8	Abbildungsverzeichnis	58
9	Tabellenverzeichnis	60

1 Einleitung

1.1 Definition

Ependymome sind gliale Tumoren, die sich von den Ependymzellen der Hirnventrikel oder des Zentralkanals und seltener von embryonalen ependymalen Residuen im zerebralen Parenchym herleiten.

1.2 Inzidenz

Etwa 5-10% aller Gliome sind Ependymome. Im Kindesalter sind sie nach dem pilozytischen Astrozytom und dem Medulloblastom die dritthäufigsten Tumoren des Zentralnervensystems, während sie bei Erwachsenen mit etwa 2-3% der Hirntumoren relativ selten sind (Deutsche Krebsgesellschaft).

1.3 Lokalisation, Alters- und Geschlechterverteilung

Ependymome entstehen an oder in der Nähe der ependymalen Oberfläche. Sie können an jeder Stelle des Ventrikelsystems und des Spinalkanals auftreten, sehr selten auch extraneural. Die häufigste Lokalisation ist der vierte Ventrikel, gefolgt vom Spinalkanal, den lateralen Ventrikeln und dem dritten Ventrikel.

Ependymome im Spinalkanal treten meist bei Erwachsenen mit einem Altersgipfel von 30-40 Jahren auf, während sie bei Kindern kaum vorkommen. Dies ist bedingt durch die höhere Inzidenz myxopapillärer Ependymome, die meist in der Conus-Cauda-Region lokalisiert und bei Kindern sehr selten sind (WHO, 2007).

Infratentorielle Ependymome kommen hauptsächlich bei Kindern vor und haften meist am Grund des vierten Ventrikels, können aber auch durch die lateralen und ventralen Foramina des Ventrikels ragen und lateral die Fossa posterior auskleiden. Supratentorielle Ependymome betreffen sowohl Kinder als auch Erwachsene. Sie entstehen im Bereich der Mittellinie und in den lateralen Ventrikeln, gelegentlich auch außerhalb des Ventrikelsystems im Parenchym.

Beide Geschlechter sind gleichermaßen von Ependymomen betroffen (Schiffer et al., 1991).

1.4 WHO-Klassifikation

Die Tumorklassifizierung der World Health Organization von 2007 (WHO, 2007) unterteilt allgemein Tumoren des Nervensystems nach ihrem histologischen Erscheinungsbild und ordnet sie aufsteigend nach ihrer Malignität. Sie beginnt mit den benignen Grad-I-Tumoren und endet mit den hochmalignen Tumoren Grad IV. Für die Ependymome gibt es hierbei Grad I-III:

Subependymome, WHO Grad I

Myxopapilläre Ependymome, WHO Grad I

Ependymome, WHO Grad II (mit den Varianten klarzellig, zellulär, papillär und tanyzytisch)

Anaplastische Ependymome, WHO Grad III

Die oft asymptomatischen **Subependymome** wachsen meist intra- oder periventrikulär, seltener im Rückenmark und treten nicht selten multipel auf. Am häufigsten werden sie im vierten Ventrikel vorgefunden, gefolgt von den lateralen Ventrikeln. Sie kommen in allen Altersgruppen vor, meist aber bei Menschen mittleren Alters und alten Patienten. Das Verhältnis von Männern zu Frauen ist 2,3:1. Histologisch sind bei insgesamt sehr niedriger Zelldichte Gruppen von Kernen locker in ein fibrilläres Netzwerk eingestreut. Häufig findet man perivaskuläre Pseudorosetten, Verkalkungen und mikrozystische Degeneration. Sie stellen etwa 8% der Ependymome dar. Die Prognose ist gut, da eine chirurgische Entfernung meist kurativ ist (WHO, 2007). In dieser Arbeit wurden keine Subependymome untersucht.

Myxopapilläre Ependymome sind fast ausschließlich im Bereich des Conus medullaris oder Filum terminale lokalisiert. Meist sind junge Erwachsene betroffen. Das Verhältnis von männlich zu weiblich ist 2,2:1. Sie sind charakterisiert durch GFAP-Expression, würfelförmige oder verlängerte Tumorzellen, die papillär um vaskularisiertes Bindegewebe angeordnet sind. Eine mukoide Matrix akkumuliert zwischen Tumorzellen und Blutgefäßen und sammelt sich auch in Mikrozysten. Mitosen fehlen oder sind selten. **Abbildung 1** zeigt ein Beispiel für ein myxopapilläres Ependymom.

Die Prognose ist mit einer Überlebenszeit von mehr als zehn Jahren nach teilweiser oder kompletter Resektion günstig (WHO, 2007).

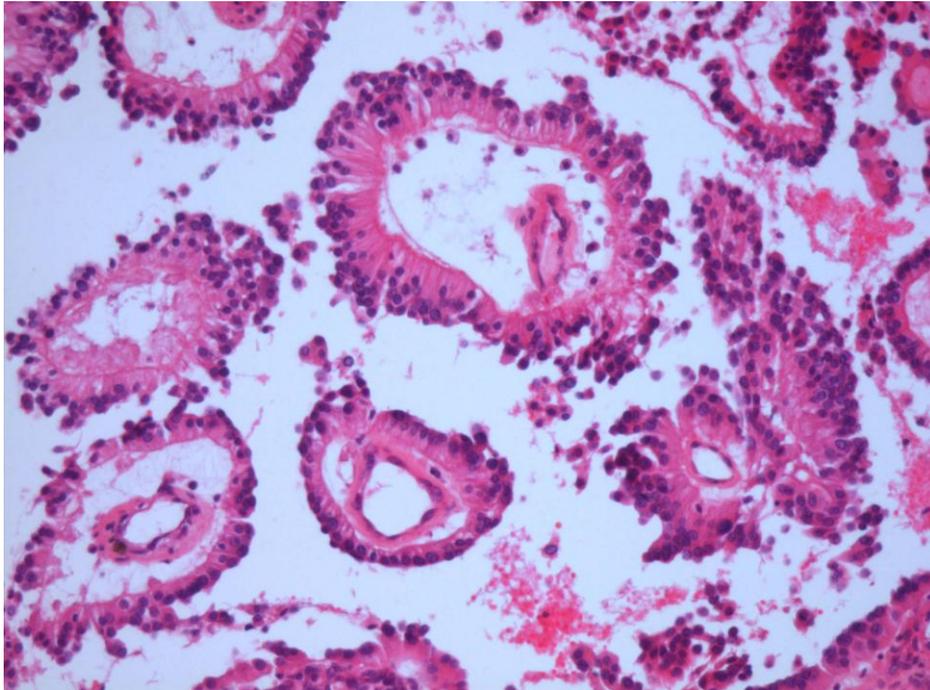


Abbildung 1: Myxopapilläres Ependymom. Tumorzellen, die papillär um vaskularisiertes Bindegewebe angeordnet sind. Mukoide Matrix zwischen Tumorzellen und Blutgefäßen.

Ependymome entstehen in allen Altersgruppen, die Inzidenz ist aber sehr vom histologischen Typ und der Lokalisation abhängig. Infratentorielle Ependymome herrschen bei Kindern vor (Kudo et al., 1990), während spinale Tumoren bei Erwachsenen vermehrt auftreten. Supratentorielle Ependymome bei sind pädiatrischen und erwachsenen Patienten gleich häufig. Es gibt keine Geschlechtspräferenz.

Es werden die Varianten klarzelliges, zelluläres, papilläres und tanzytisches Ependymom unterschieden. Ein mikroskopisches Charakteristikum der Ependymome ist die radiäre Anordnung der Tumorzellen um ein zentral gelegenes Gefäß, die Pseudorosette. Diese Strahlenkränze sind kernfrei und werden durch die Fortsätze der Tumorzellen gebildet, während die Kerne am peripheren Zellende liegen. Weniger häufig sind echte ependymale Rosetten, bei denen von den Tumorzellen kugelige oder tubuläre Räume gebildet und das echte Ependym imitiert wird. Selten findet man Mitosen und Nekrosen. **Abbildung 2** zeigt ein Beispiel für ein Ependymom.

Prognostische Parameter bei Ependymomen sind kontrovers diskutiert. Als wichtigster Faktor ist die komplette Resektion zu nennen. Weiterhin spielt das Alter

eine Rolle. Kinder tendieren zu einer wesentlich schlechteren Prognose, wobei dies in gewissem Maß auf die häufigere infratentorielle Lokalisation bei Kindern im Gegensatz zu den besser resektablen spinalen Tumoren bei Erwachsenen zurückzuführen ist. Besonders schlecht ist das Überleben bei Kindern unter zwei Jahren. Dagegen betrug die 5- bzw. 10-Jahresüberlebensrate in einer Studie mit Erwachsenen 57% und 45%. Weiterhin ist die Lokalisation ein Prognosefaktor mit dem besten Outcome für spinale Ependymome, gefolgt von supratentoriellen und infratentoriellen Tumoren. Das histopathologische Grading stellt noch immer ein ungelöstes Problem dar. Von den gewöhnlich mit Anaplasie verbundenen Merkmalen korrelieren nur der mitotische Index, Proliferationsindices und Foci mit hyperzellulären weniger differenzierten Zellen mit einer schlechteren Prognose. Viele andere histologische Parameter wurden in verschiedenen Studien mit konträren Resultaten untersucht (WHO, 2007).

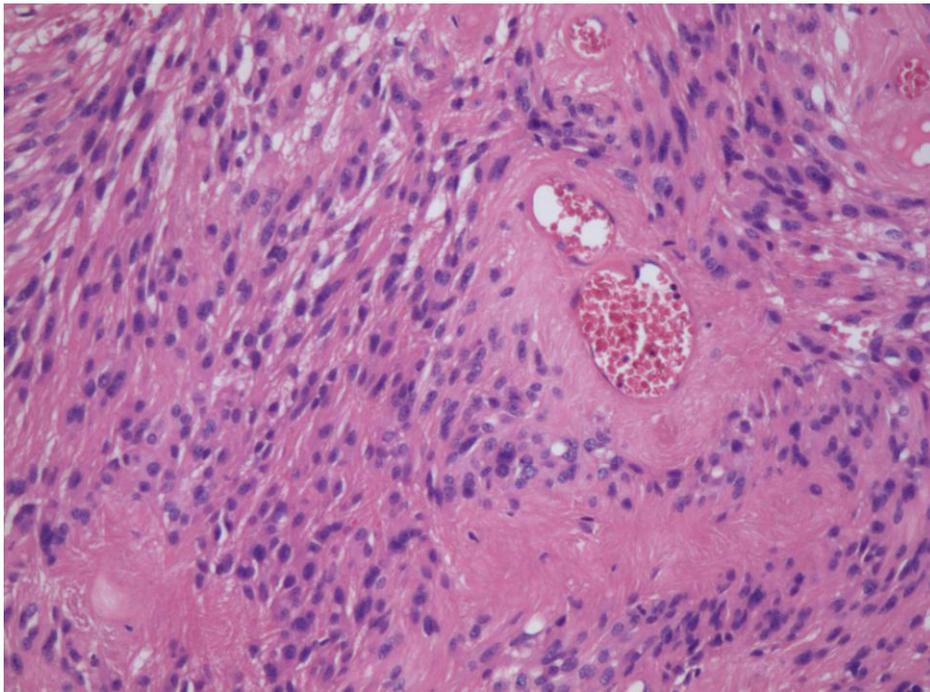


Abbildung 2: Ependymom WHO-Grad II mit Pseudorosetten.

Die Inzidenz **anaplastischer Ependymome** variiert wegen uneinheitlicher Beurteilung hinsichtlich der histologischen Beurteilung. Sie sind aber im Kindesalter häufiger, treten meist intrakraniell auf und zeigen als histologische Malignitätszeichen eine gesteigerte Zelldichte und eine deutlich erhöhte Mitoserate. Häufig sind auch Pseudorosetten, während ependymale Rosetten selten sind oder fehlen. Darüber

hinaus werden auch Nekrosen und pathologische Blutgefäße beobachtet. Siehe hierzu auch **Abbildung 3**.

Auch bei anaplastischen Ependymomen gibt es keine konstante Relation zwischen Histologie und Prognose (Ernestus et al., 1996). Das Alter unter drei Jahren, inkomplette Tumorresektion und Hinweise auf Metastasen entlang des Liquorraums erwiesen sich als negative Prognosefaktoren bei Kindern. Paradoxerweise korrelieren viele genomische Imbalancen nicht mit einem höheren WHO-Grad (WHO, 2007).

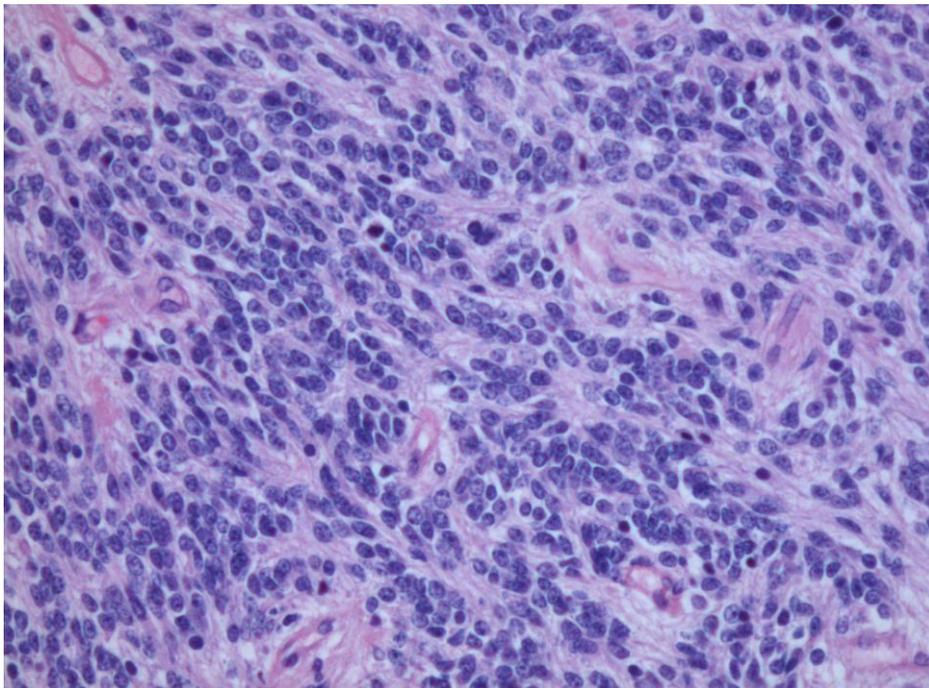


Abbildung 3: Anaplastisches Ependymom. Gesteigerte Zelldichte und eine deutlich erhöhte Mitoserate.

1.5 Genetik

Noch ist nicht viel bekannt über die molekulargenetischen Veränderungen, die der Bildung und Progression von Ependymomen zugrunde liegen. Zytogenetische und molekulargenetische Studien haben strukturelle und numerische Aberrationen der Chromosomen 6, 7, 9, 10, 11, 13, 17 und 22 gezeigt (Bhattacharjee et al., 1997; Hamilton and Pollack, 1997). In Studien mit komparativer genomischer Hybridisierung (Comparative Genomic Hybridization, CGH) zeigten diese Tumoren meist komplexe Aberrationsmuster. Die meisten Verluste betrafen die Chromosomen 1p, 4q, 6q, 9, 10, 13q, 16, 17, 19q, 20q und 22q (Hirose et al., 2001; Scheil et al.,

2001; Tong et al., 2001; Jeuken et al., 2002; Rickert and Paulus, 2004; Hirose and Yoshida, 2006). Diese Methode CGH erkennt jedoch nur Veränderung mit einer minimalen Auflösung von 10 Megabasenpaaren (Hentze, 2000).

Die Mikrosatellitenmethode ermöglicht eine feinere Analyse von genetischen Aberrationen und wies mit dem verwendeten 377A-DNA-Sequencer Produkte von etwa 90 bis 350 Basenpaaren nach. Frühere Loss of Heterozygosity (LOH) Studien der Abteilung für Neuropathologie des pathologischen Instituts der Universität Würzburg zeigten ebenso wie Tong et al. (Tong et al., 2001) Aberrationen auf 3p, 6q, 9p21, 9q34, 10q, 11q, 13q 17p, 22q11.21-12.2 und 22q13.1-13.3 (Tong et al., 2001; Huang et al., 2002; Huang et al., 2003).

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Basierend auf die vorangegangene Studie der Abteilung für Neuropathologie des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg, in der genetische Aberrationen auf dem Chromosom 9 in Ependymome beschrieben wurden, sollte eine Screeninguntersuchung des gesamten Chromosoms sowie eine verfeinerte Analyse der zuvor auffälligen Regionen erfolgen. Dabei wurden Marker verwendet, die möglichst gleichmäßig über das Chromosom verteilt waren, und damit Gene untersucht, die schon in anderen Tumoren auffällig waren oder eine Rolle im Zellzyklus spielen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mögliche Tumorsuppressorgene oder Onkogene, die mit der Entstehung oder Progression von Ependymome verbunden sind, zu definieren. Darüber hinaus sollte eine Korrelation zu den klinischen Daten (Alter, Geschlecht, Lokalisation des Tumors, Ausmaß der chirurgischen Resektion, adjuvante Radio- und Chemotherapie, Überlebenszeit und Rezidivstatus) erfolgen. Da die Ependymome eine sehr heterogene Gruppe von Tumoren darstellen, bei denen über die WHO-Graduierung keine prognostischen Aussagen möglich sind wie bei anderen Gliomen, könnten sich Mikrosatellitenmarker als nützlich bei der Einteilung der Ependymome erweisen und einen Hinweis auf die Prognose liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

Untersucht wurde genomische DNA von 48 Ependymomen. Davon stammten 45 Tumorproben von Patienten, die an der Klinik für Neurochirurgie der Universität Würzburg zwischen 1988 und 2004 operiert worden waren. Drei zusätzliche Proben kamen von Patienten der Universitätsklinik in Münster. Die pädiatrischen Patienten wurden nach dem HIT-Protokoll der deutschen Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie behandelt (Timmermann et al., 2005; Timmermann et al., 2006). Alle Gewebeproben wurden vor dem Beginn einer Bestrahlung und/oder Chemotherapie entnommen. Von vier Patienten wurden zusätzlich zu den Primärtumoren auch Rezidivtumoren untersucht. Die DNA wurde aus paraffinfixiertem oder tiefgefrorenem nativem Material gewonnen, als Referenzmaterial diente Blut desselben Patienten.

2.2 Untersuchungsmethoden

2.2.1 Mikrodissektion

Von den Paraffinblöcken wurden jeweils 10-20 Schnitte von 8 µm Dicke angefertigt. Der erste Schnitt wurde mit Hämalaun und Eosin (H.E.) gefärbt, um den Tumor abgrenzen zu können. Anschließend wurde das Tumormaterial aus den ungefärbten Schnitten herausgetrennt und wie unter 2.2.2.2 beschrieben weiter verarbeitet. Das hauptsächlich aus Tumormaterial bestehende Gefriermaterial wurde nach Herstellung eines orientierenden H.E.-Schnittes zerkleinert und direkt verwendet.

2.2.2 Gewinnung genomischer DNA

2.2.2.1 DNA aus Gefriermaterial

Die DNA wurde mit Hilfe des DNeasy Tissue Kit von Qiagen (Düsseldorf, Deutschland, Cat. No. 69502) gewonnen.

Zuerst wurde das Gefriermaterial zerkleinert, in ein 1 ml fassendes Reaktionsgefäß gegeben und 180 µl Verdaupuffer für Gewebe hinzugefügt. Um das Gewebe zu verdauen, wurde 20 µl Proteinase K hinzugegeben und das Material bei 55° C inkubiert, bis es vollständig lysiert war. Nach Zugabe von 200 µl Verdaupuffer wurde erneut bei 70° C für zehn Minuten inkubiert. Als nächstes wurde 200 µl Ethanol (96-100%) dazupipettiert und die Probe auf die im Kit enthaltene Zentrifugensäule

gegeben, die in ein 2 ml fassendes Reaktionsgefäß gestellt war. Beim Zentrifugieren bei 13 000 rpm (rounds per minute) gelangte der flüssige Teil der Probe in das Reaktionsgefäß, während die DNA selektiv unter den vom Puffer hergestellten salzreichen Bedingungen an die Silica-Gel-Membran der Zentrifugensäule gebunden wurde. Proteine und andere Inhaltsstoffe, die die PCR stören könnten, gelangten dagegen hindurch. Um letzte Verunreinigungen herauszulösen, folgte ein Waschschrift mit 500 µl eines salzarmen Waschpuffers, der auf die Zentrifugensäule gegeben wurde. Anschließend wurde wieder bei 13 000 rpm zentrifugiert und die durch die Membran gelangte Flüssigkeit verworfen. Dieser Schritt wurde mit einem zweiten Waschpuffer wiederholt. Um die gereinigte DNA aus der Silica-Gel-Membran der Zentrifugensäule herauszulösen, wurden 200 µl eines Elutionspuffers auf die in ein neues Reaktionsgefäß gestellte Zentrifugensäule pipettiert und nach Inkubation von einer Minute erneut zentrifugiert. Durch die Wiederholung dieses Schrittes war die gesamte DNA aus der Zentrifugensäule herausgelöst.

2.2.2.2 DNA aus paraffinfixiertem Gewebe

Die DNA wurde mit Hilfe des DNeasy Tissue Kit von Qiagen (Cat. No. 69502, Düsseldorf, Deutschland) gewonnen.

Zur Entparaffinierung wurde 1 200 µl Xylol zu den vorbereiteten Schnitten gegeben und der Ansatz bei Raumtemperatur 5 Minuten bei 13 000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand entfernt und 1 200 µl Ethanol (96-100%) abpipettiert um das restliche Xylol zu entfernen. Es folgte eine erneute Zentrifugation und die anschließende Entfernung des Ethanols im Überstand. Als nächstes wurden die Reaktionsgefäße mit dem Ansatz offen für ca. 15 Minuten in einen Inkubator bei 37° C gestellt, bis das restliche Ethanol verdunstet war. Daraufhin wurde das Material mit 180 µl Gewebeverdaupuffer versetzt.

Um das Gewebe zu verdauen, wurde 20 µl Proteinase K hinzugegeben und das Material bei 55° C inkubiert, bis es vollständig lysiert war. Nach Zugabe von 200 µl Verdaupuffer wurde erneut bei 70° C für zehn Minuten inkubiert. Danach wurden 200 µl Ethanol (96-100%) dazupipettiert und die Probe auf die Zentrifugensäule aus dem Kit gegeben, die in ein 2 ml fassendes Reaktionsgefäß gestellt war. Beim Zentrifugieren bei 13 000 rpm gelangte der flüssige Teil der Probe in das Gefäß, die DNA wurde jedoch an die Silica-Gel-Membran der Zentrifugensäule gebunden. Anschließend folgte ein Waschschrift mit 500 µl eines salzarmen Waschpuffers, der

auf die Zentrifugensäule gegeben wurde. Erneut wurde bei 13 000 rpm zentrifugiert und die durch die Membran gelangten Flüssigkeit verworfen. Dieser Schritt wurde mit einem anderen Waschpuffer wiederholt. Zuletzt war nun die gereinigte DNA aus der Silica-Gel-Membran der Zentrifugensäule herauszulösen. Dazu wurden 200 µl eines Elutionspuffers auf die in ein neues Reaktionsgefäß gestellte Zentrifugensäule pipettiert und nach Inkubation von einer Minute noch einmal zentrifugiert. Durch die Wiederholung dieses Schrittes war die gesamte DNA aus der Zentrifugensäule herausgelöst (Qiagen).

2.2.2.3 DNA aus Vollblut

Für die Isolation von DNA aus Vollblut wurde der QIAamp DNA Mini Kit (Cat. No. 51104) von Qiagen (Düsseldorf, Deutschland) verwendet.

Zuerst wurden 20 µl Proteinase K und 200 µl Blut in ein Reaktionsgefäß gegeben und 200 µl Verdaupuffer hinzugefügt. Das Material wurde bei 56° C 10 Minuten inkubiert, anschließend 200 µl Ethanol (96-100%) dazupipettiert. Der Versuchsansatz wurde auf eine in ein Reaktionsgefäß gestellte QIAamp Zentrifugensäule appliziert, bei 13 000 rpm zentrifugiert und das durch die Zentrifugensäule in das Gefäß gelangte flüssige Material verworfen. Im Anschluss waren 500 µl Waschpuffer auf die Zentrifugensäule zu geben, bei 8 000 rpm eine Minute zu zentrifugieren und das Filtrat zu entfernen. In einem erneuten Waschschrift wurden 500 µl eines zweiten Waschpuffers hinzugefügt. Es folgte eine Zentrifugation bei 13 000 rpm für 3 Minuten, um alle Verunreinigungen im Versuchsansatz zu beseitigen. Durch Inkubation der DNA mit 200 µl eines Elutionspuffers für eine Minute und anschließendes Zentrifugieren bei 8 000 rpm für eine Minute konnte die DNA aus der Zentrifugensäule gelöst werden. Eine Wiederholung des letzten Schrittes steigerte die DNA-Ausbeute deutlich.

2.2.3 Mikrosatellitenanalyse

Mikrosatelliten sind repetitive DNA-Sequenzen von zwei bis vier Basen, sehr oft CA-repeats, die bis zu 100 Mal wiederholt werden können und insgesamt etwa 0,5% des Genoms ausmachen. Mikrosatelliten sind durch einen hochgradigen Polymorphismus charakterisiert. Sie werden oft für LOH-Analysen benutzt, um Informationen über Verlust oder Gewinn genomischen Materials zu bekommen (Goldstein et al., 1995). Bevorzugt wurden Mikrosatellitenmarker mit einem möglichst

hohen Heterozygotie-Index ausgewählt, so dass möglichst viele informative Loci zu erhalten werden konnten.

Tabelle 1 gibt eine Übersicht der verwendeten Mikrosatellitenmarker mit Bezeichnung, Lokalisation, Produktgröße, Heterozygotie-Index, Fluoreszenzmarkierung und Annealingtemperatur. Dabei beruhen die Angaben zur Lokalisation der Mikrosatelliten auf Daten des Sanger Instituts (<http://www.sanger.ac.uk>) und der Genome Database (Database, 2007). Je ein Primer der beiden Primerpaare wurde mit einem der fluoreszierenden Phosphoramide FAM (blau) oder HEX (grün) markiert. Die Primersequenzen wurden der Genome Database (Database, 2007) entnommen.

Die benötigten Primer wurden von der Firma MWG Biotech (München, Deutschland) synthetisiert. Sie wurden nach den Angaben des Herstellers zunächst als Stocklösungen mit einer Konzentration von 100 pmol/µl angesetzt. Davon wurden Aliquots von Gebrauchslösungen mit einer Konzentration von 50 pmol/µl angesetzt.

Marker	Lokalisation	Produktgröße	Heterozygotie-Index	Färbung	Temperatur
D9S1645	9p24.1	175	0.84	FAM	57°C
D9S156	9p22.3	133	0.8005	HEX	57°C
D9S1749	9p21.3	120	0.94	HEX	62°C
D9S1748	9p21.3	130	0.87	FAM	57°C
D9S1788	9p21.1	130	0.78	FAM	58°C
D9S1817	9p13.3	229	0.88	HEX	57°C
D9S252	9q21.33	212	0.87	HEX	54°C
D9S257	9q22.1	259-285	0.89	FAM	58°C
D9S1828	9q31.1	171-191	0.8	HEX	56°C
D9S1683	9q31.1	147-179	0.7626	FAM	53°C
D9S170	9q33.1	108-127	unbekannt	HEX	56°C
D9S1872	9q33.1	111	0.8920	HEX	54°C
D9S117	9q33.3	106	0.79	HEX	57°C
D9S118	9q34.12	69	0.83	FAM	59°C
D9S1863	9q34.12	240-254	0.74	HEX	56°C

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Mikrosatellitenmarker.

2.2.4 Polymerasekettenreaktion

Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden die Mikrosatelliten unter Verwendung der aufgeführten Primer aus der extrahierten genomischen DNA amplifiziert. Die PCR wurde jeweils getrennt für Tumor- und Blutproben durchgeführt. Die Proben wurden mit einem „Primus 96“ Thermocycler (MWG Biotech, München, Deutschland) amplifiziert. Bei Proben, die sich unter den gegebenen Bedingungen nicht oder nur schlecht amplifizieren ließen, wurde die Anzahl der Zyklen um 10-15 Zyklen erhöht. Einige Proben konnten auch unter diesen Bedingungen nicht amplifiziert werden.

2.2.5 Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 6%igen Polyacrylamidgel im 377A-DNA-Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Zur besseren Auftrennung bei Produkten, die größer als 100 Basenpaare waren, wurde ein formamidhaltiges (28,8%) 4,5%iges Polyacrylamidgel verwendet. Mit dem 377A-DNA-Sequencer waren Produkte mit einer maximalen Größe von 350 Basenpaaren nachweisbar.

Zur Vorbereitung auf den Gellauf wurden die Probenmixe sieben Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eiswasser abgekühlt. Aufgetragen wurden 1,3 µl des Probenmixes bestehend aus:

2,5 µl PCR-Probe

3 µl Laufpufferlösung mit: 2,3 µl Formamid

0,2 µl Standard „ROX 350“

0,5 µl Blue Dextran Puffer

Ein Gellauf dauerte ca. 2,5 bis drei Stunden bei 51°C, 3 000 V, 60 mA und 200 W.

2.2.6 Analyse der Gelelektrophorese

Zunächst wurden die Elektrophoreserohdaten vollautomatisch gesammelt. Die Analyse der PCR-Produkt-Auftrennung erfolgte anschließend mit dem Programm ABI GeneScan (Applied Biosystems, Foster City, USA) entsprechend der Angaben des Herstellers.

Die Sammlung und Analyse der Daten soll im Folgenden beschrieben werden.

Die denaturierten PCR-Produkte sind negativ geladen und bewegen sich im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Dabei werden sie ihrer Größe nach aufgetrennt. Während des Laufs scannt ein Argon-Laser auf einer konstanten Linie vor der Anode kontinuierlich das Gel senkrecht zur Laufrichtung.

Kleine Produkte wandern schneller und passieren so die Scanlinie früher als große. Sobald der Laser auf ein fluoreszierendes PCR-Produkt trifft, emittiert dieses Licht entsprechender Wellenlänge, welches wiederum über ein Spiegelsystem weitergeleitet wird und vom angeschlossenen Computer registriert werden kann. Diese Schritte der Analyse erfolgen somit vollautomatisch.

Daraufhin werden die Rohdaten manuell mit Hilfe des Programms ABI GeneScan bearbeitet und die erhaltenen Elektropherogramme ausgewertet. Auf der x-Achse lässt sich die Produktgröße in Basenpaaren (Bp) ablesen, definiert über den mitlaufenden Größenstandard ROX 350. Die y-Achse zeigt die Fluoreszenz-Einheiten in Fluoreszenz-Units (FU), d.h. die Signalintensität, die sich zur Menge des amplifizierten Produkts direkt proportional verhält. In den darauf folgenden Schritten kann die Fläche oder die Höhe der Peaks des jeweiligen Allels ermittelt werden, über welche Tumorgewebe und Blutprobe semiquantitativ verglichen werden können. Hierbei werden die Höhenverhältnisse von beiden Kontroll- und Tumorallelen berechnet. Ergab sich eine Differenz von 40% und mehr, wurde eine genetische Aberration an diesem Locus angenommen. Beispiele finden sich in den **Abbildung 4-6**. Die gelegentlich beobachtete Mikrosatelliteninstabilität ist exemplarisch in **Abbildung 7** dargestellt.

Veränderungen im Sinne einer Aberration bei einem Patienten an einem Marker wurden einmal bestätigt, ehe sie als genetische Aberration gewertet wurden.

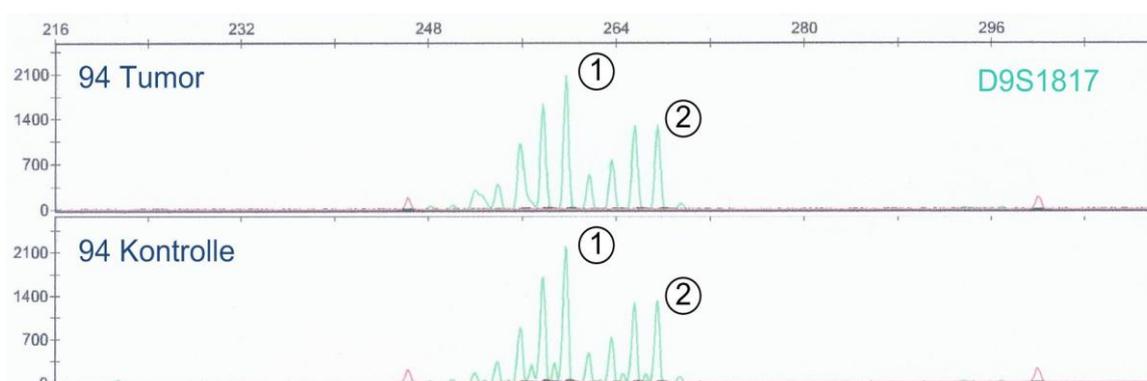


Abbildung 4: Heterozygoter Fall ohne Aberration; (1)= erstes Allel, (2)= zweites Allel. Das Verhältnis beider Allele zueinander ist gleich groß bei Tumor und Kontrolle.

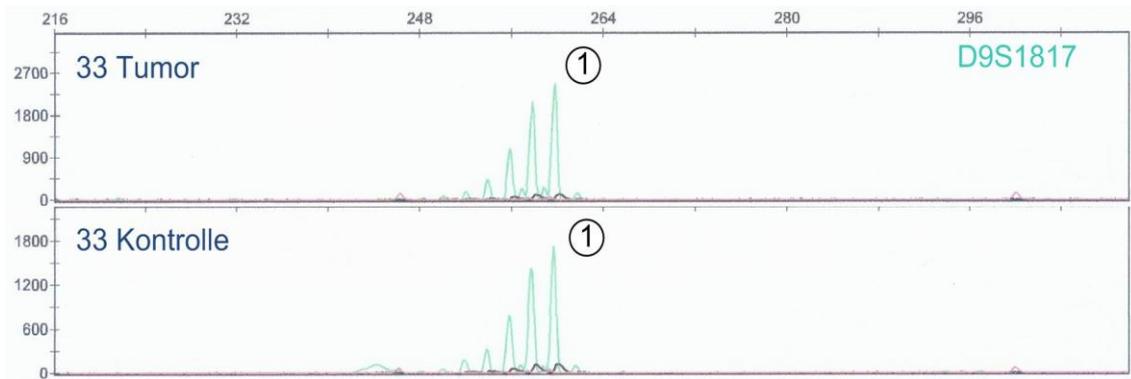


Abbildung 5: Homozygoter Fall. Nur ein Allel ist vorhanden.

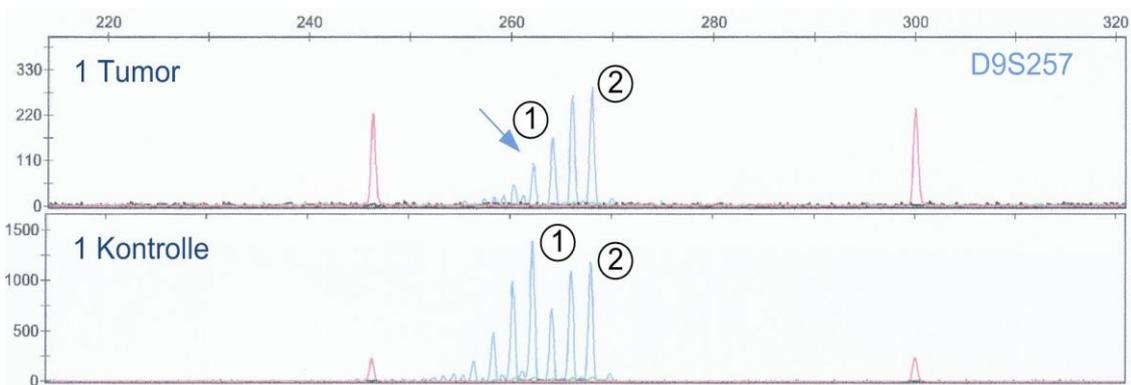


Abbildung 6: Aberration (Pfeil). Da im Tumor ein Allel aberrant ist, ist das Verhältnis beider Allele zueinander nicht mehr in Tumor und Kontrolle gleich.

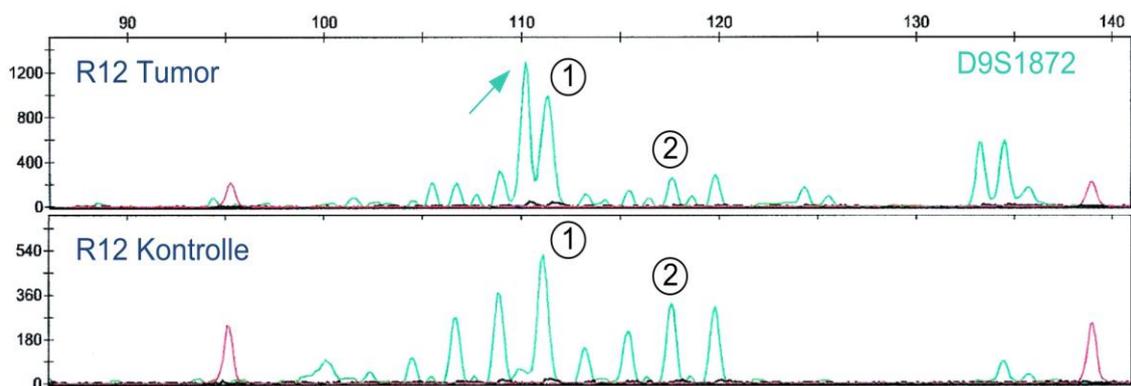


Abbildung 7: Mikrosatelliteninstabilität; (1)= erstes Allel, (2)= zweites Allel. Der Pfeil zeigt auf einen zusätzlichen Peak, der in der Kontrolle nicht vorhanden ist und Mikrosatelliteninstabilität bedeutet.

3 Ergebnisse

3.1 Patientendaten

Es wurde genomische DNA von 48 Patienten untersucht. Für alle Patienten wurden die klinischen Daten bezüglich Alter, Geschlecht, Lokalisation des Tumors, Ausmaß der chirurgischen Resektion, adjuvante Radio- und Chemotherapie und Rezidivstatus gesammelt. Die Überlebenszeit der Patienten wurde vom Zeitpunkt der Diagnosestellung bis zum Jahr 2006 ermittelt. Die klinischen Daten sind in **Tabelle 2** zusammengefasst.

Das Durchschnittsalter lag bei 21,3 Jahren. Unter den Patienten befanden sich 20 Erwachsene, die durchschnittlich 44,9 Jahre alt waren, und 28 Kinder unter 18 Jahren mit dem Durchschnittsalter von 4,4 Jahren. Von den Kindern waren 16 jünger als drei Jahre. Die Altersverteilung kann der **Abbildung 8** entnommen werden.

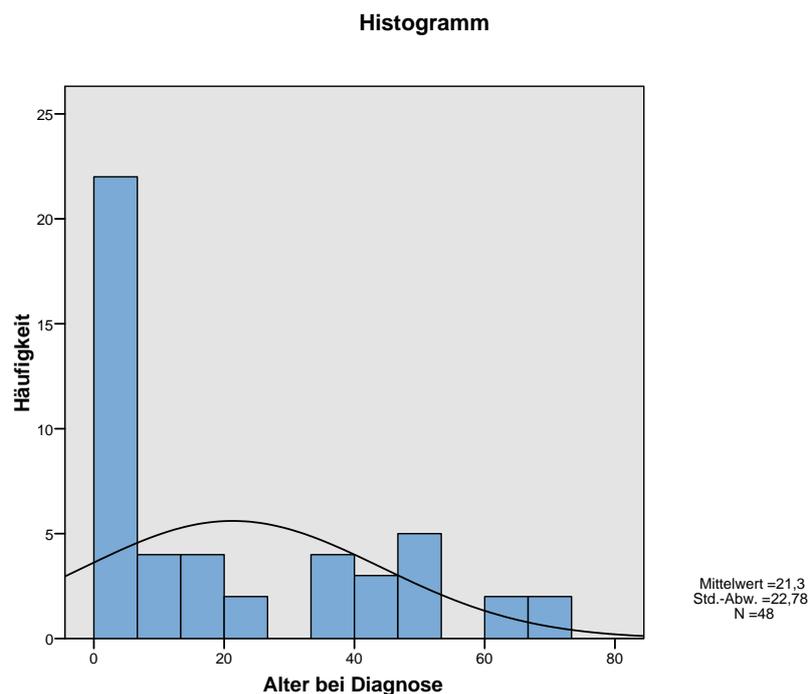


Abbildung 8: Altersverteilung.

3 Ergebnisse

DNA	Alter bei Diagnose (Jahre)	Ge- schlecht	Lokali- sation	Gradu- ierung	Resektions- status	Adjuvante Therapie	Rezidiv	Überleben (Monate)	Status
R6-1	24,9	w	spinal	mEI	subtotal	cht/rt	ja	85	verstorben
16M	52,9	m	spinal	mEI	total	keine	nein	52	lebend
19M	38,2	w	spinal	mEI	total	keine	nein	94	lebend
31M	50,6	w	spinal	mEI	total	keine	nein	177	lebend
14M	47,5	m	spinal	mEI	total	keine	nein	83	lebend
49T	19,1	m	spinal	mEI	total	keine	nein	50	lebend
50T	66,5	w	spinal	mEI	subtotal	rt	ja	75	verstorben
24M	12,2	w	spinal	mEI	subtotal	keine	nein	93	lebend
13M	18,75	w	spinal	mEI	total	keine	nein	92	lebend
3M	34,6	w	spinal	EII	total	keine	nein	100	lebend
5M	39,11	m	spinal	EII	total	keine	nein	61	lebend
9M	46,4	w	spinal	EII	total	keine	nein	105	lebend
10M	38,7	m	spinal	EII	total	keine	nein	89	lebend
11M	41	m	spinal	EII	total	keine	nein	87	lebend
23M	53	m	spinal	EII	subtotal	rt	ja	124	verstorben
30M	70,75	w	spinal	EII	total	keine	nein	72	lebend
94T	45,6	w	spinal	EII	total	rt	nein	34	lebend
R18	14,5	w	spinal	EIII	subtotal	cht/rt	ja	111	lebend
R8-1	64	m	IT	EII	subtotal	keine	ja	110	verstorben
4M	23,8	w	IT	EII	total	keine	ja	131	lebend
15M	69,75	w	IT	EII	total	keine	ja	83	lebend
6M	2,1	m	IT	EII	subtotal	cht/rt	ja	60	verstorben
35T	13,8	m	IT	EII	subtotal	cht/rt	ja	50	lebend
7M	9,2	m	IT	EII	total	cht/rt	nein	88	lebend
36T	2,1	m	IT	EII	total	cht/rt	nein	61	lebend
20M	5,7	m	ST	EII	total	rt	nein	118	lebend
34M	9	m	ST	EII	subtotal	cht/rt	ja	234	lebend
R28	52,7	m	IT	EIII	subtotal	rt	ja	128	lebend
33M	3,1	m	IT	EIII	subtotal	cht/rt	nein	10	verstorben
18M	0,9	m	IT	EIII	subtotal	cht/rt	ja	60	verstorben
26M	3,75	w	IT	EIII	subtotal	cht/rt	nein	24	verstorben
R4	1	m	IT	EIII	total	cht/rt	ja	77	verstorben
28M	1	w	IT	EIII	subtotal	cht/rt	ja	48	verstorben
21M	2,25	m	IT	EIII	subtotal	cht/rt	ja	46	verstorben
12M	13,2	m	IT	EIII	subtotal	cht/rt	nein	101	lebend
45T	1,5	m	IT	EIII	subtotal	cht/rt	ja	44	lebend
48T	4,4	w	IT	EIII	subtotal	cht/rt	nein	30	lebend
46T	1,3	m	IT	EIII	total	cht/rt	ja	27	lebend
40T	1,4	w	IT	EIII	total	cht/rt	ja	57	lebend
25M	2,3	m	IT	EIII	subtotal	cht	ja	10	verstorben
R10	0,75	w	IT	EIII	subtotal	keine	nein	7	verstorben
93T	2,5	m	IT	EIII	total	cht/rt	nein	31	lebend
2M	6,5	m	ST	EIII	total	cht/rt	ja	108	lebend
1M	3,8	m	ST	EIII	total	cht/rt	nein	180	lebend
8M	2,4	m	ST	EIII	subtotal	cht/rt	ja	17	verstorben
R12	2,3	m	ST	EIII	subtotal	cht/rt	ja	120	lebend
80T	0,7	m	ST	EIII	subtotal	cht/rt	ja	42	lebend
R16-1	0,7	w	ST	EIII	subtotal	cht/rt	ja	135	lebend

Tabelle 2: Klinische Daten; m= männlich; w= weiblich; IT= infratentoriell; ST= supratentoriell; cht= Chemotherapie; rt= Radiotherapie; EI-III= Ependyom Grad I-III.

Alle Tumoren wurden nach den WHO-Kriterien eingeteilt und von zwei Neuropathologen unabhängig voneinander begutachtet.

Das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Patienten betrug 1,6:1 (29 männliche und 19 weibliche Patienten). Bei den Erwachsenen waren neun von 20 Patienten männlich (45%) und bei den Kindern 20 von 28 (71,4 %).

Neun der Patienten waren an einem myxopapillären Ependyom WHO-Grad I erkrankt (darunter ein Kind), 17 hatten ein Ependyom Grad II (sechs Kinder) und 22 ein anaplastisches Ependyom Grad III (21 Kinder). Subependyome wurden nicht untersucht.

22 Ependyome waren infratentoriell lokalisiert, darunter 18 kindliche Tumoren. Bei acht Patienten, ausschließlich Kinder, fand sich eine supratentorielle Lokalisation und bei 18 war der Tumor spinal aufgetreten. Dabei waren zwei der Patienten jünger als 18 Jahre. Genauere Angaben können der **Tabelle 3** entnommen werden.

Bei der Hälfte der Patienten konnte eine komplette Resektion erfolgen (24 Patienten). Eine Radiochemotherapie erhielten 25 Patienten, fünf wurden lediglich bestrahlt, einer wurde nur mit Chemotherapie behandelt und 17 wurden nach der Operation nicht weiter behandelt.

Diagnose	Lokalisation	Anzahl d. Fälle	Durchschnittsalter (Jahre)	Geschlecht (m/w)	Kind/Erwachsenen	Aberration auf Chr. 9
Myxopapilläres Ependyom	Spinal	9	39,5	3/6	1/8	6/9 (66,7%)
Ependyom	Spinal	8	46,2	4/4	0/8	4/8 (50%)
	IT	7	26,4	5/2	4/3	3/7 (42,9%)
	ST	2	7,4	2/0	2/0	2/2 (100%)
Anaplastisches Ependyom	Spinal	1	14,5	0/1	1/0	0/1 (0%)
	IT	15	6,1	10/5	14/1	9/15 (60%)
	ST	6	2,7	5/1	6/0	6/6 (100%)

Tabelle 3: Verteilung der Aberrationen für die einzelnen Tumortypen; IT= infratentoriell, ST= supratentoriell, m= männlich, w= weiblich.

3.2 Statistische Methoden

Die Korrelationen zwischen molekulargenetischen Ergebnissen und klinikopathologischen Variablen wurden mittels Chi-Quadrat-Test ermittelt. Die Analyse des Überlebens der Patienten wurde mit der Kaplan-Meier-Methode und mit Cox-Regression vorgenommen.

3.3 Klinikopathologische Korrelationen

Die statistischen Analyse zeigte, dass intrakranielle Tumoren bei Kindern häufiger waren als bei Erwachsenen, die hingegen öfter spinale Tumoren aufwiesen ($p < 0,01$). Die intraspinalen Tumoren waren hauptsächlich WHO Grad I und II (94,4%), während die intrakraniellen Tumoren weitgehend anaplastisch (WHO Grad III) waren (70%) ($p < 0,01$). Zwischen Alter und Geschlecht fand sich keine signifikante Korrelation ($p = 0,067$), wobei es bei den Kindern einen Trend zu Jungen (71,4%) und bei den Erwachsenen zu Frauen (55%) gab. Die intrakranielle Lokalisation war bei männlichen Patienten häufiger als bei weiblichen ($p = 0,018$). Anaplastische Ependymome Grad III waren bei Kindern mit 75% signifikant häufiger als bei Erwachsenen, bei denen die Mehrheit (95%) histologisch benigne, d.h. Grad I oder II war ($p < 0,01$). Zwischen Überleben und WHO-Grad fand sich keine Korrelation (siehe **Abbildung 9**).

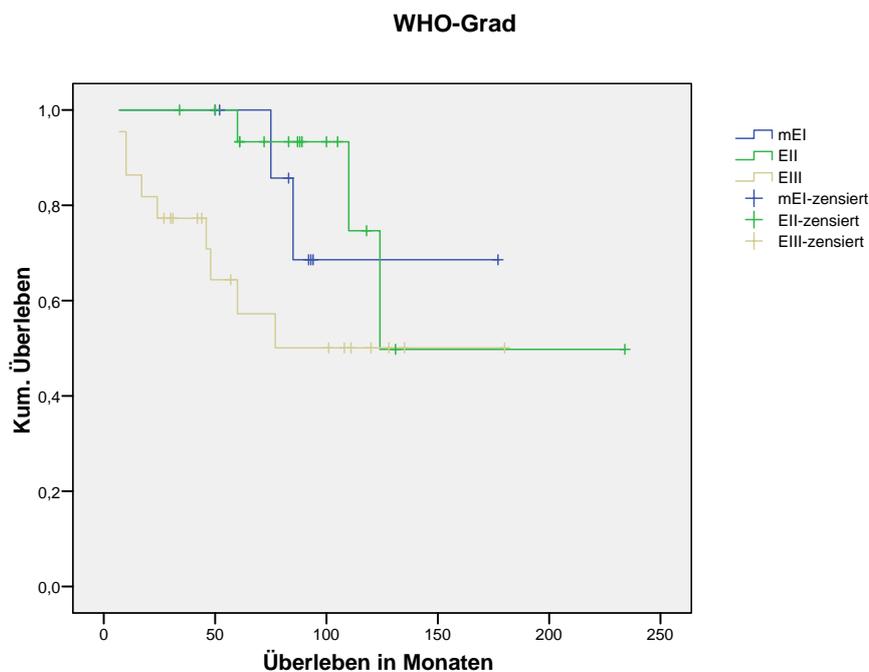


Abbildung 9: Graduierung; mEI= myxopapilläres Ependymom, EII= Ependymom, EIII= anaplastisches Ependymom.

Bei der Tumorlokalisation zeigte sich, dass Patienten mit infratentoriellen Tumoren das schlechteste Outcome hatten. Diejenigen mit supratentoriellen Ependymomen zeigten die beste Prognose, während spinale Tumoren dazwischen lagen ($p=0,015$) (**Abbildung 10**). Die Lokalisation war ein unabhängiger Faktor in der multivariaten Analyse.

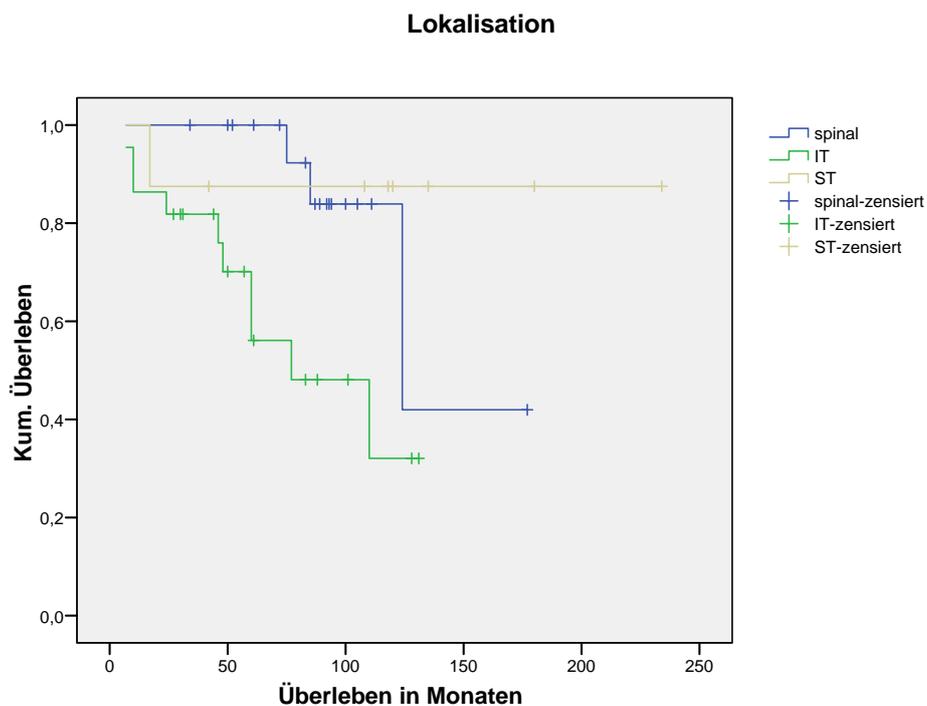


Abbildung 10: Lokalisation; IT= infratentoriell, ST= supratentoriell.

Der Resektionsstatus wirkte sich signifikant auf das Überleben aus ($p<0,01$): 54,2 % der Patienten, deren Tumor nur subtotal oder gar nicht reseziert worden war, starben. Dagegen verstarb im vorliegenden Beobachtungszeitraum bei kompletter Resektion nur ein Patient (**Abbildung 11**).

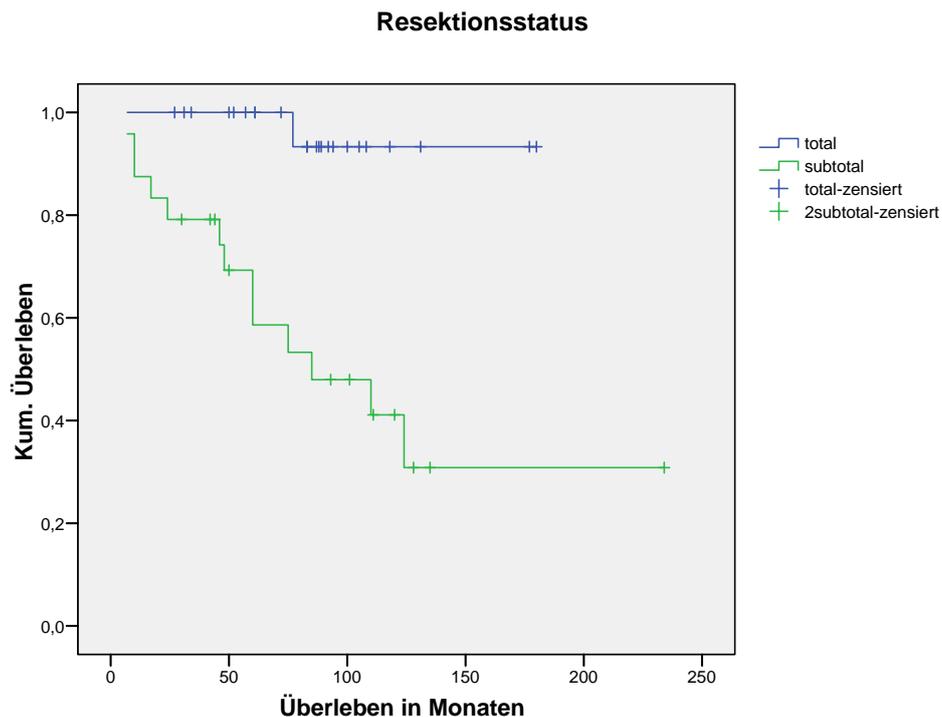


Abbildung 11: Resektionsstatus.

Spinale Tumoren konnten dabei signifikant öfter total reseziert werden als intrakranielle ($p=0,017$). Besonders infratentorielle Ependymome waren schlechter komplett zu entfernen als spinale ($p=0,024$), während der Unterschied zwischen spinalen und supratentoriellen nicht so groß war ($p=0,093$).

Abhängig vom Alter gab es keinen signifikanten Überlebensunterschied zwischen Kindern unter 18 Jahren und Erwachsenen. Bei zusätzlicher Unterteilung der Patientengruppe unter 18 in Kinder über und unter drei Jahren, war das Überleben signifikant unterschiedlich ($p= 0,005$). Das schlechteste Überleben zeigten Kinder unter drei Jahren. Erwachsene hatten ein besseres Outcome und Kinder von drei bis 18 Jahren überlebten am längsten (**Abbildung 12**). Dies war jedoch in der multivariaten Analyse kein unabhängiger Faktor, sondern darauf zurückzuführen, dass bei jüngeren Kindern der Tumor oft nur unvollständig reseziert werden konnte.

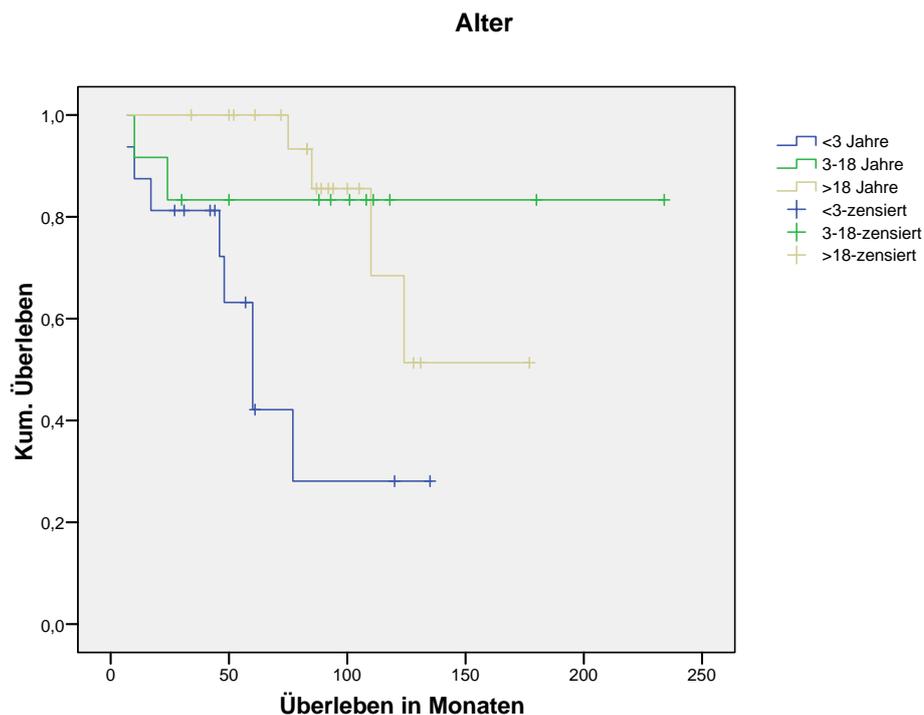


Abbildung 12: Alter der Patienten.

Eine adjuvante Therapie, also Radio- oder Chemotherapie oder beides, wurde hauptsächlich bei inkompletter Resektion gegeben und war kein unabhängiger prognostischer Faktor, sondern vom Resektionsstatus abhängig.

3.4 Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse

Für die Untersuchung auf Aberrationen waren nur die heterozygoten Genotypen informativ. In wenigen Fällen, wobei es sich ausschließlich um Tumorgewebe handelte, fand auch nach mehrfacher Wiederholung keine Amplifikation statt.

Bei vier Patienten wurden auch Rezidivtumoren bzw. nachreseziertes Tumorgewebe bei unvollständig reseziertem Tumor untersucht. Der erste Fall (4M) hatte im Rezidiv eine Aberration mehr als im Primärtumor. Bei einem zweiten Patienten (6M) war zweimal nachreseziert worden. Im zweiten Nachresektat wurde eine Aberration gefunden, nicht jedoch im vorher entfernten Gewebe. Ein weiterer Fall (R16) wies sowohl im Primärtumor als auch im Rezidiv gleich viele allelische Imbalancen auf, während sich beim Letzten (2M) im Primärtumor mehr Aberrationen zeigten als im Rezidiv.

Insgesamt zeigten 30 (62,5%) von 48 Patienten im Primärtumor genomische Aberrationen. Dies kann **Abbildung 13** entnommen werden.

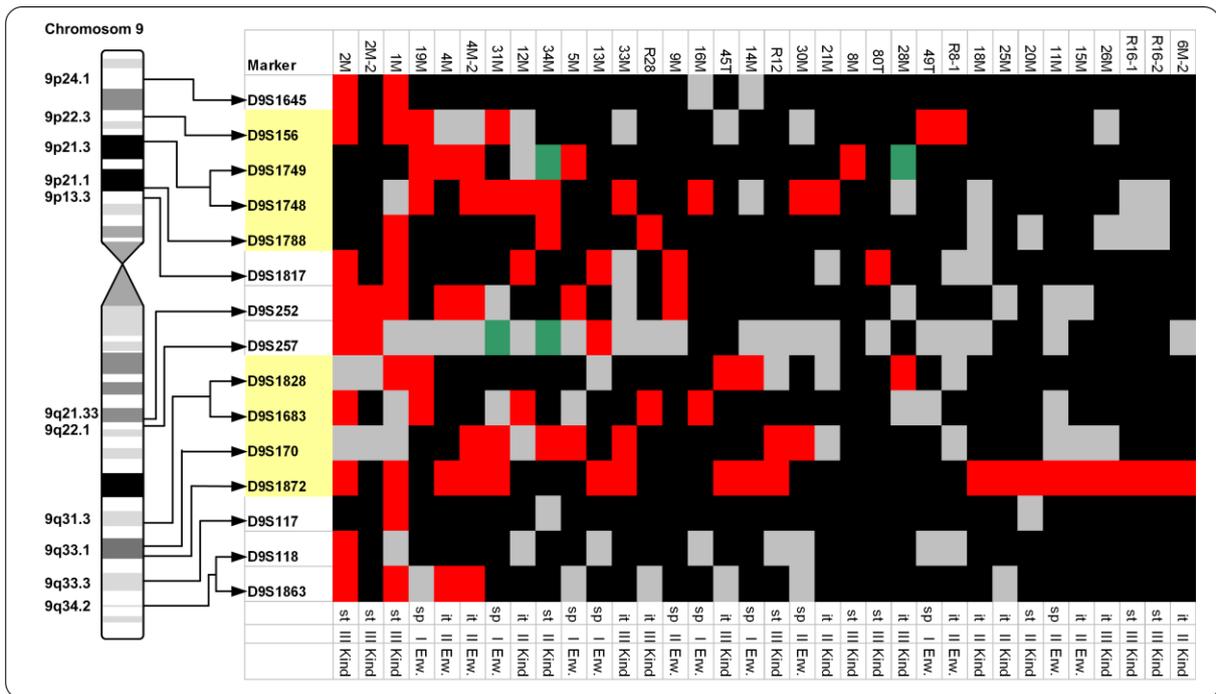


Abbildung 13: Alle Fälle mit Aberrationen; rot= Aberration, schwarz= heterozygot, grau= homozygot, grün= keine Amplifikation. Marker in Regionen, in denen sich Aberrationen häuften, sind gelb hinterlegt.

Die Erwachsenen wiesen in 70% der Fälle Aberrationen auf (14 Patienten), während es bei den Kindern mit 57,1% (16 Patienten) etwas weniger waren. Dabei waren bei Kindern unter drei Jahren mit 56,3% etwa gleich häufig Aberrationen aufgetreten wie bei älteren Kindern (58,3%). Die Kinder unter drei Jahren hatten aber im Gegensatz zu älteren Patienten im Einzelfall deutlich weniger allelische Imbalancen (maximal zwei pro Kind). Dagegen zeigten die älteren Kinder meist mehr Aberrationen.

Unter Berücksichtigung der Tumorggraduierung wurde festgestellt, dass sechs (26,1%) der 30 Patienten mit Aberrationen an einem myxopapillären Ependyomom erkrankt waren, neun hatten ein Ependyomom Grad II (30%) und 15 ein anaplastisches Ependyomom (50%).

Die Verteilung der Aberrationen für jeden Tumortyp war bei den myxopapillären Ependyomomen 6/9 (67%), bei den supratentoriellen Ependyomomen Grad II 1/2 (50%), bei infratentoriellen Ependyomomen Grad II 3/7 (42,9%) bei spinalen Ependyomomen WHO II, 4/8 (50%), 6/6 der supratentoriellen anaplastischen Ependyomome Grad III (100%), 9/15 der infratentoriellen anaplastischen Ependyomome Grad III (60%) und keine Aberration bei dem einzigen spinalen Ependyomom WHO Grad III. Insgesamt hatten neun von 17 Ependyomomen Grad II

Aberrationen (37,5 %) und 15 von 22 Ependymomen Grad III (68 %). Dies ist auch in **Tabelle 3** und **Abbildung 14** dargestellt.

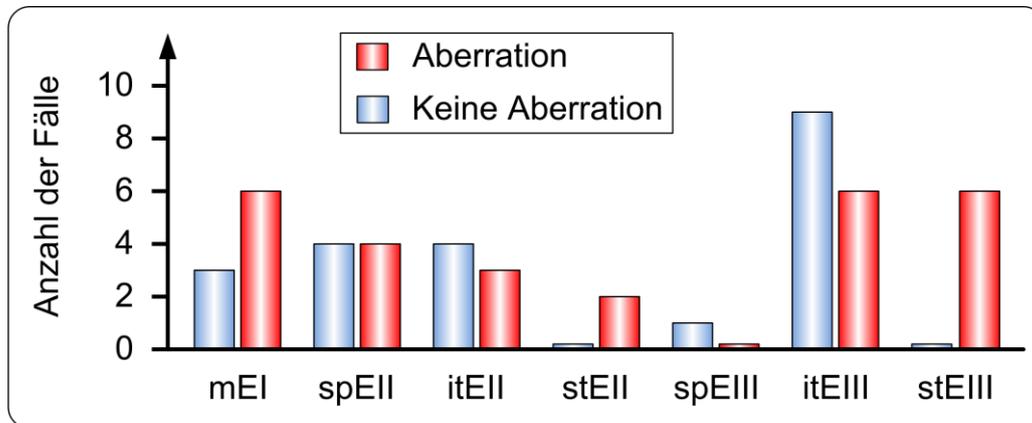


Abbildung 14: Anzahl der Fälle mit und ohne Aberrationen aufgetrennt nach WHO-Grad und Lokalisation; mEI= myxopapilläres Ependymom Grad I, spEII= spinales Ependymom Grad II, itEII= infratentorielles Ependymom Grad II, stEII= supratentorielles Ependymom Grad II, spEIII= spinales Ependymom Grad III, itEIII= infratentorielles Ependymom Grad III, stEIII= supratentorielles Ependymom Grad III.

Von den spinalen Tumoren hatten zehn von 18 Tumoren Aberrationen auf Chromosom 9 (55,6%) und von den insgesamt 30 intrakraniellen Tumoren waren es 20 (66,7%), wobei 54,5% der infratentoriellen (12 Fälle) und 100% der supratentoriellen Tumoren (8 Patienten) betroffen waren.

Tendenziell traten bei supratentoriellen Tumoren Aberrationen auf Chromosom 9 öfter auf als bei spinalen und infratentoriellen ($p=0,056$).

In der pädiatrischen Patientengruppe waren in supratentoriellen Ependymomen allelische Imbalancen auf Chromosom 9 signifikant häufiger als bei infratentoriellen Tumoren ($p=0,007$). Dieser Zusammenhang ist in **Abbildung 15** dargestellt.

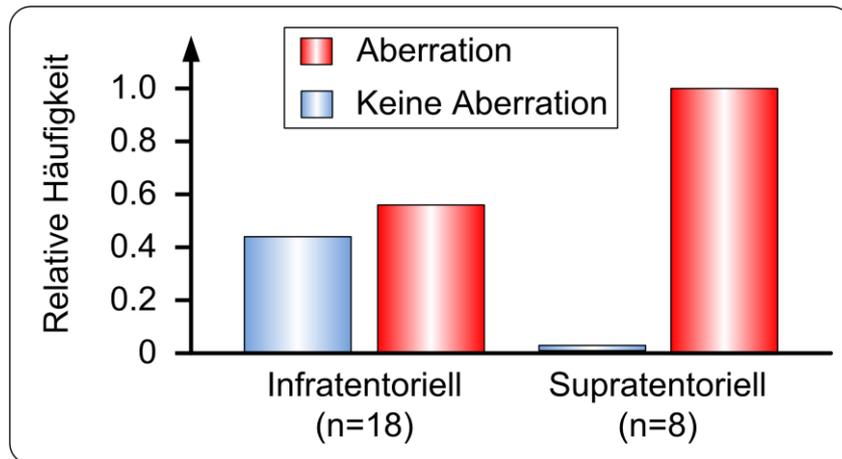


Abbildung 15: Relative Häufigkeit von Aberrationen bei Kindern unterteilt nach supratentoriellen und infratentoriellen Ependymomen.

Wie in **Abbildung 16** dargestellt, überlebten unter den erwachsenen Patienten die mit Aberrationen signifikant länger als diejenigen ohne allelische Imbalancen auf Chromosom 9 ($p=0,034$).

Aberrationsstatus bei Erwachsenen

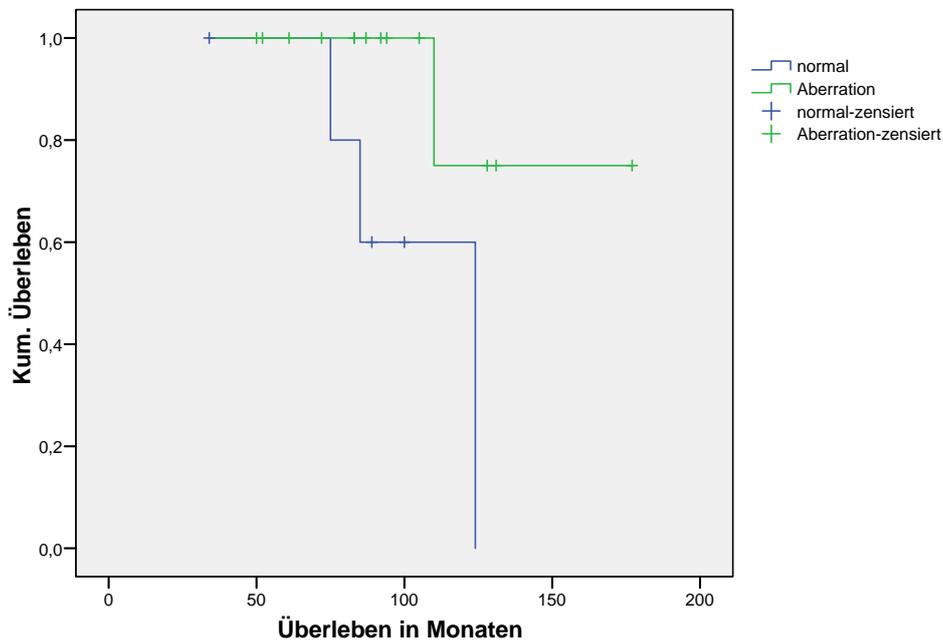


Abbildung 16: Aberrationsstatus bei Erwachsenen.

Dabei zeigten Erwachsene mit Aberrationen bei DBCCR1 schon eine Tendenz zu einem besseren Überleben (siehe **Abbildung 17**) ($p= 0,094$). Da aber in der Gruppe der Patienten ohne Aberration kein Patient starb und der Beobachtungszeitraum zu

3 Ergebnisse

kurz war, konnte ein Überlebensvorteil nicht statistisch bewiesen werden. Bei diesem Marker trat in drei Fällen Mikrosatelliteninstabilität auf (R12, 36T, 49T).

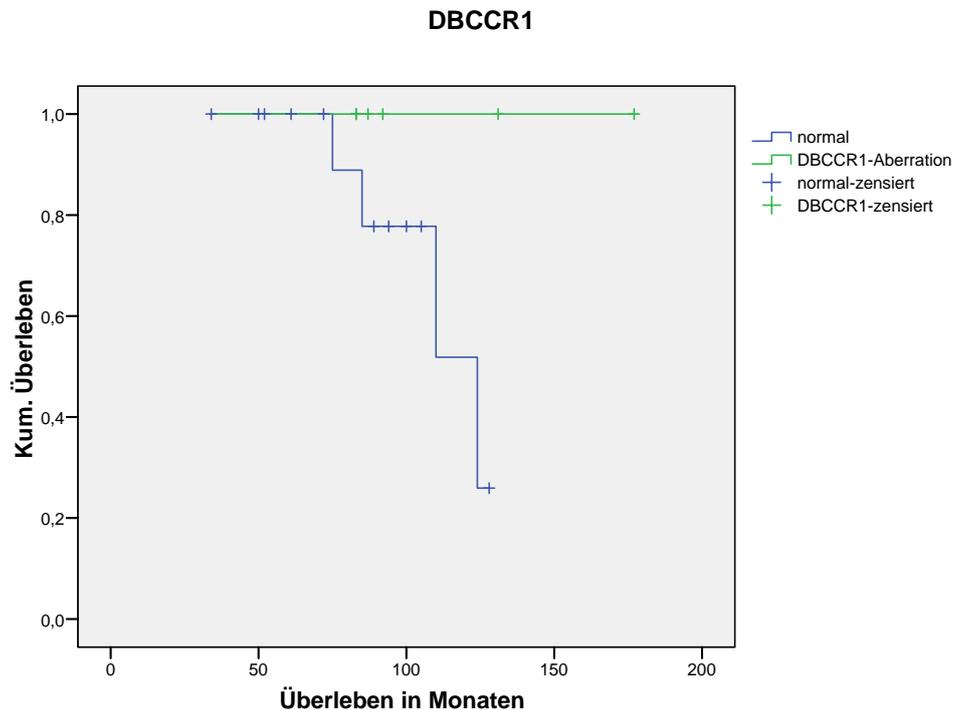


Abbildung 17: Aberrationsstatus von DBCCR1.

Des Weiteren konnten einige Regionen mit einer Häufung von Aberrationen beobachtet werden: 9p22.3-9p21.1 (16,8 Megabasen) mit 14 Fällen mit allelischen Imbalancen und 9q31.3-33.2 (8,5 Megabasen) mit 24 Fällen mit Aberrationen, beides in Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden. gelb hinterlegt. In 14 Fällen waren beide Regionen betroffen. Vier Fälle in 9p22.3-9p21.1 bzw. zehn Fälle in 9q31.3-33.1 betrafen nur eine der beiden Regionen.

Aberrationen bei den jeweils endständigen Markern waren mit insgesamt drei bei D9S1863 und zwei bei D9S1645 selten.

Beim Vergleich mit vorherigen Mikrosatellitenuntersuchungen auf Chromosom 6 und 22 zeigte sich, dass kein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von Aberrationen auf Chromosom 9 und dem jeweiligen anderen Chromosom feststellbar war.

4 Diskussion

Bei zahlreichen Hirntumoren sind Aberrationen auf Chromosom 9 bekannt. So beobachteten Lamont et al. (Lamont et al., 2004) einen Zusammenhang zwischen dem Verlust von 9q22 und der nodulären und der desmoplastischen Variante des Medulloblastoms. In pleomorphen Xanthoastrozytomen ist der Verlust von Chromosom 9 eine häufige Beobachtung (Weber et al., 2007). Außerdem sind Deletionen auf Chromosom 9 typisch für Glioblastome und mit einer schlechten Prognose assoziiert (Wemmert et al., 2005; Dehais et al., 2006). Da auch bei Ependymomen schon oft Auffälligkeiten dieses Chromosoms gefunden wurden (Bijlsma et al., 1995; Hirose et al., 2001; Scheil et al., 2001; Jeuken et al., 2002; Huang et al., 2003; Gilhuis et al., 2004; Rickert, 2004; Rickert and Paulus, 2004; Hirose and Yoshida, 2006; Modena et al., 2006), meist mit CGH, wurde nun mit einem Screening mit Hilfe der Mikrosatellitenanalyse eine genauere Analyse unternommen.

4.1 Marker

Die Marker mit zugehöriger Lokalisation auf Chromosom 9 und den Genen, bei denen sie liegen, sind in **Tabelle 4** zu finden.

Marker	Lokalisation	Gen	Zahl der aberrierten Fälle
D9S1645	9p24.1	PD-L2, MLANA	2
D9S156	9p22.3	BNC2, SNAP50	6
D9S1749, D9S1748	9p21.3	CDKN2A, CDKN2B, MTAP	13
D9S1788	9p21.1	TOPORS, BAG-1, B4GALNT2	3
D9S1817	9p13.3	CNTFR, UBAP1	6
D9S252	9q21.33	GAS1	7
D9S257	9q22.1	DAPK1	2
D9S1828	9q31.1	TXN	5
D9S1683	9q31.1	EDG2	5
D9S170	9q33.1	DEC1, TNC	7
D9S1872	9q33.1	DBCCR1	16
D9S117	9q33.3	NR6A1	1
D9S118, D9S1863	9q34.12	FUBP3, ABL1	4

Tabelle 4: Marker mit dazugehörigen Genen.

4.1.1 D9S1645

Bei dem Marker **D9S1645** findet sich das Gen **PD-L2** (programmed death ligand 2), das gemeinsam mit einem weiteren Liganden, PD1, die T-Zell-Aktivierung inhibiert und T-Zell-Antworten reguliert (Latchman et al., 2001). Weiterhin liegt hier das Gen **MLANA** (melanoma antigen recognized by T-cells 1), das eine wichtige Rolle in der menschlichen Melanogenese spielt (Hoashi et al., 2005). Da dieser Marker nur in den beiden Fällen aberriert war, in denen nahezu das ganze Chromosom 9 fehlte, ist diese Stelle bei Ependymomen zu vernachlässigen. Der Marker liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 am weitesten von Zentromer entfernt.

4.1.2 D9S156

Der Marker **D9S156** liegt in der Nähe des Gens **SNAP50** (snRNA-activating protein complex subunit 3), das eine Untereinheit des snRNA-aktivierenden Komplexes SNAPc kodiert und für die Transkription durch die menschliche RNA-Polymerase II und III benötigt wird. Diese sind für die Transkription von mRNA bzw. tRNA verantwortlich (Henry et al., 1996).

Insgesamt fanden sich an dieser Stelle sechs Aberrationen.

4.1.3 D9S1748 und D9S1749

D9S1748 und **D9S1749** liegen nahe beieinander auf 9p22.3-9p21.1 und schließen die Gene **CDKN2A** (p16, p14, cyclin dependent kinase inhibitor 2A), **CDKN2B** (cyclin dependent kinase inhibitor 2B) und **MTAP** (Methylthioadenosine Phosphorylase) ein. Der Marker D9S1748 wurde schon von Huang et al. verwendet (Huang et al., 2003). In dieser Arbeit wurden die Ergebnisse in den Fällen ergänzt, die seit jener Veröffentlichung hinzu gekommenen sind.

Das Gen **CDKN2A** ist z.B. in nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen, malignen Melanomen, Leukämien, pleomorphen Xanthoastrozytomen, Gangliogliomen, Medulloblastomen, sporadischen zerebellären Hämangioblastomen und Glioblastomen verändert (Sprenger et al., 2001; Yin et al., 2002; Lamont et al., 2004; Wemmert et al., 2005; Weber et al., 2007). Es sind mehrere Wege bekannt, auf denen CDKN2A als Tumorsuppressor im Zellzyklus wirken kann.

Dabei werden unter dem Begriff Zellzyklus die Vorgänge zwischen zwei Mitosen verstanden. Er besteht aus vier Schritten, einerseits der M-Phase und andererseits den drei Teilen der Interphase bestehend aus der G1-, S- und G2-Phase. Zentral für

den Übergang von der G1- in die S-Phase ist die sequenzielle Aktivierung der Zykline und ihrer katalytischen Partner, der CDKs (cyclin-dependent kinases) (Saab et al., 2006).

Zyclin-E-CDK und Zyclin-D-CDK (als Komplex mit CDK4 und CDK6) phosphorylieren das **Retinoblastomprotein**, das den Transkriptionsfaktor E2F gebunden hat und ihn daraufhin freisetzt. Dieser aktiviert insbesondere jene Gene, die die Zelle für die DNA-Synthese benötigt. Das Retinoblastomprotein kontrolliert auf diese Weise den Zellzyklus und das zugehörige Gen ist als „klassisches“ Tumorsuppressorgen für die Entstehung des Retinoblastoms verantwortlich. In menschlichen Tumoren sind Mutationen des Retinoblastomgens auch bei Mammakarzinomen, Rektumkarzinomen, Glioblastomen und vielen anderen nachweisbar (Böcker et al., 2004).

Das Alpha-Transkript von CDKN2A ist ein bekannter Tumorsuppressor, **p16** (INK4), der den Zellzyklus in der G1-Phase anhält, indem er die Phosphorylierung des **Retinoblastomproteins** (Stott et al., 1998) durch die cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 verhindert (Serrano et al., 1993).

Das Tumorsuppressorgen **P53** ist verantwortlich für die Entscheidung, ob eine Zelle nach einem DNA-Schaden reparabel ist und damit im Zellverband bleibt, oder ob der Weg der Apoptose beschritten werden muss. Das P53-Gen kodiert für den kurzlebigen nukleären Transkriptionsfaktor p53, der beim Auftreten eines genetischen Schadens im Genom der Zelle hochreguliert wird und eine Reihe von Zielgenen aktiviert. Diese bewirken eine Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase, die Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen und, wenn der DNA-Schaden nicht behoben werden kann, den Eintritt in die Apoptose. Das Genprodukt des Gens **WAF1** hat eine Bindungssequenz in seinem Promotorbereich für p53. Es bindet an den Komplex aus Zyclin und CDK und hemmt diese, so dass das Retinoblastomprotein nicht phosphoryliert werden kann. Dadurch wird der Zyklusablauf blockiert und der Eintritt der Zelle in die S-Phase verhindert, damit Reparaturgene aktiviert werden können, die den DNA-Schaden beseitigen. Nach Behebung eines DNA-Schadens wird von p53 schließlich das Gen **MDM2** (murine double minute) aktiviert, durch dessen Genprodukt p53 inaktiviert wird. So kann die Zelle nun nach Behebung des Genschadens in die Synthesephase eintreten. Mutationen im P53-Gen können zu einer Fehlfunktion oder zu einem Verlust des Proteins p53 führen, so dass diese Zellen die Reparaturmechanismen nicht mehr

aktivieren können, aber andererseits auch nicht apoptotisch werden. Die transformierten Zellen erhalten auf diese Weise Wachstumsvorteile und können genetische Schäden akkumulieren, wie es für zahlreiche maligne Tumoren typisch ist (Böcker et al., 2004). Das Beta-Transkript von CDKN2A, **p14** (ARF), bindet an MDM2 und baut es ab. Da MDM2 ein Antagonist von p53 ist, führt das zu einer Stabilisierung und Akkumulation von p53. Auf diese Weise reguliert CDKN2A die Spiegel von p53 (Pomerantz et al., 1998; Zhang et al., 1998). Es ist bekannt, dass eine aberrante p53-Expression bei Ependymomen einen hohen prognostischen Wert besitzt. Verminderte Expression von p14 ist mit Zeichen biologischer Aggressivität von Ependymomen assoziiert wie beispielsweise höherem Tumorgrad, erhöhtem Anteils wachsender Tumorteile und Akkumulation von p53 (Korshunov et al., 2001). Protoonkogene sind einer strengen Kontrolle unterworfen und normalerweise nur in Phasen embryologischen, regenerativen oder adaptivern Wachstums exprimiert (Riede, 2004). Ein bekanntes Protoonkogen ist **c-Myc**, das sowohl die Zellproliferation als auch die Apoptose fördern kann (Biliran et al., 2007). In Mausfibroblasten zeigten Qi et al. (Qi et al., 2004), dass p19 (ARF, entspricht p14 beim Menschen) c-Myc inhibieren kann. Wenn c-Myc ansteigt, bindet p19 an c-Myc und blockiert dessen Fähigkeit, die Transkription zu aktivieren und Hyperproliferation und Transformation zu induzieren, dramatisch. Im Gegensatz dazu war die Fähigkeit von c-Myc, die Transkription zu verhindern, nicht von p19 betroffen und die c-Myc-abhängige Apoptose war erhöht. Diese unterschiedlichen Effekte von p19 lassen vermuten, dass verschiedene molekulare Mechanismen die c-Myc-induzierte Hyperproliferation und Apoptose steuern. Dieser Checkpoint stellt einen p53-unabhängigen Feedback-Mechanismus dar, der die c-Myc-gesteuerte Tumorgenese verhindert. CDKN2A könnte auch in einem höheren Prozentsatz in Ependymomen betroffen sein, nicht nur durch Mutation, sondern auch durch veränderte Genexpression (Merlo et al., 1995; Gonzalez et al., 2006). So fanden Korshunov et al. (Korshunov et al., 2003) vermehrte Expression von CDKN2A in spinalen Ependymomen, führten dies aber vor allem auf genomische Aberrationen an dieser Stelle zurück.

CDKN2B liegt direkt neben dem Gen CDKN2A auf Chromosom 9 und ist unter anderem in der kindlichen akuten lymphatischen Leukämie häufig deletiert (Okuda et al., 1995). Es interagiert mit TGF-beta (transforming growth factor), einem Wachstumsfaktor, der die Zellproliferation inhibiert, indem er die Zelle in der G1-

Phase stoppt. Normale Progression durch die G1-Phase wird durch die cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 vorangetrieben (Saab et al., 2006). Hannon und Beach (Hannon and Beach, 1994) beschrieben das durch CDKN2B kodierte Protein **p15**, dessen Expression in menschlichen Keratinozyten durch Behandlung mit TGF-beta etwa 30-fach erhöht werden kann. Folglich könnte p15 als Effektor des TGF-beta-vermittelten Zellzyklusarrests agieren.

CDKN2A und CDKN2B sind in einem hohen Prozentsatz der etablierten menschlichen Krebszelllinien (Hannon and Beach, 1994; Nobori et al., 1994) mutiert. Wie Stone et al (Stone et al., 1995) feststellten, inhibiert ektope Expression von p15 das Wachstum von Zellen, die von Tumoren abgeleitet sind. Sie schlossen aus ihren Beobachtungen, dass p15 bei der Wachstumsregulation eine Rolle spielt, aber nur von begrenzter Bedeutung für die Tumorprogression ist.

Als drittes Gen an dieser Stelle ist **MTAP** zu nennen. Das Enzym MTAP spielt eine wichtige Rolle in Polyaminstoffwechsel und ist wichtig für den Abbau von Adenin und Methionin (OMIM, 2007). Nobori et al. (Nobori et al., 1996) stellten fest, dass dieses Gen in akuten lymphoblastischen Leukämien der T-Zellreihe häufig deletiert war. Der Grund für häufige Deletionen von MTAP in Krebszellen lag für sie aber in der Nähe zu CDKN2A und CDKN2B und nicht in seiner Bedeutung bei der Tumorprogression.

D9S1748 zeigt mit neun Aberrationen die zweithöchste Anzahl an allelischen Imbalancen. Des Weiteren wurden Aberrationen an **D9S1749** in vier Fällen nachgewiesen. Das lässt vermuten, dass vor allem das Gen CDKN2A mit seinen vielfältigen Möglichkeiten, in den Zellzyklus einzugreifen, eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression von Ependymomen spielt. CDKN2B könnte als Effektor des TGF-beta-vermittelten Zellzyklusarrests agieren und ist wohl vor allem bei der Wachstumsregulation von Bedeutung und weniger für die Tumorprogression. Dagegen findet man Aberrationen von MTAP wohl eher auf Grund der Nähe zu CDKN2A als wegen seiner Bedeutung für die Entstehung von Tumoren. Durch die geringe Fallzahl konnte kein statistischer Zusammenhang zwischen Überleben und Aberrationen dieser Gene gefunden werden.

4.1.4 D9S1788

D9S1788 liegt bei dem Gen **TOPORS**, das die Topoisomerase I kodiert. Dieses Enzym ist vermutlich in die Transkription involviert.

Als weiteres interessantes Gen in dieser Region ist **BAG-1** (BCL2-associated athanogene) zu nennen. Es schützt Zellen vor der Apoptose und interagiert mit BCL2 (B-cell CLL/lymphoma 2). Überexpression von BCL2 blockiert den programmierten Zelltod einer Pro-B-Lymphozyten-Zelllinie. Dieses Protoonkogen ist in den Mitochondrien lokalisiert und beeinträchtigt die Apoptose unabhängig von der Zellteilung. Wenn beide Gene überexprimiert sind, ist die Resistenz der Zellen gegen den Zelltod noch größer, als wenn nur eines der zugehörigen Proteine erhöht ist (Hockenbery et al., 1990).

Des Weiteren ist das Gen **B4GALNT2** in dieser Stelle zu finden, dessen Genprodukt eine N-Acetylgalactosaminyltransferase ist. Diese legt die Expression der Carbohydratstruktur der Sda-Blutgruppe fest, welche in der gastrointestinalen Mukosa zu finden ist und die in Krebsgewebe drastisch unterexprimiert ist. Eine verminderte Transkription dieses Gens führt zum Verschwinden des Epitops der Sda-Blutgruppe (Dohi et al., 1996).

Bei diesem Marker fanden sich in drei Fällen der verwendeten Tumorproben Aberrationen.

4.1.5 D9S1817

Das Gen **CNTFR**, das für den Rezeptor des ciliary neurotrophic factor, also einen neurotrophen Faktor, kodiert, liegt bei dem Marker **D9S1817**. Neurotrophe Faktoren wurden ursprünglich auf der Basis ihrer Fähigkeit, das Überleben von Neuronen zu unterstützen, isoliert. Inzwischen wird angenommen, dass sie viele Aspekte der Entwicklung und Aufrechterhaltung des Nervensystems beeinflussen (Davis et al., 1991) Korshunov et al. fanden in ihren Untersuchungen eine niedrige Expression dieses Gens in Ependymomen (Korshunov et al., 2003). Das könnte ein Hinweis sein, dass dieses Gen hier eine Rolle spielt.

Des Weiteren liegt das Gen **UBAP1** (Ubiquitin-associated protein 1) bei diesem Marker. Aberrationen dieses Gens treten häufig in Nasopharyngealkarzinomen auf (Xiao et al., 2006). Auch ist die Genexpression von UBAP1 in vielen neoplastischen Geweben wie in Hirntumoren, Mammakarzinom und Kolonkarzinom erniedrigt (Qian et al., 2002). Es ist möglicherweise in den Proteinabbau durch Ubiquitin involviert (Qian et al., 2001). Ubiquitin markiert hierbei für die Degradation bestimmte Proteine und dient als Regulator des Zellzyklus. Ein Beispiel hierfür ist der Abbau des Zyklins

nach Beendigung der Mitose. Außerdem kann Ubiquitin Proteine für den Abbau markieren, die sich in der Zellmembran befinden (z. B. Ionenpumpen) (Löffler, 2002). Der Marker liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 9 am nächsten beim Zentromer und zeigt in 6 Fällen eine Aberration.

4.1.6 D9S252

Der Marker **D9S252** wurde wegen seiner Nachbarschaft zum Gen **GAS1** ausgesucht, die Abkürzung für Growth Arrest-Specific 1. Del Sal et al. (Del Sal et al., 1994) zeigten, dass die Überexprimierung des menschlichen GAS1 in der Lage ist, die Zellproliferation in Lungen- und Blasenkarzinom-Zelllinien zu blockieren. 1992 hatten Del Sal et al. vermutet, dass das Retinoblastomgen und p53 eine aktive Rolle dabei spielen den wachstumshemmenden Effekt von GAS1 zu regeln (Del Sal et al., 1992).

D9S252 war in fünf Fällen alteriert.

4.1.7 D9S257

Der Marker **D9S257** wurde gewählt, weil an dieser Stelle das Gen **DAPK1** (Death-associated Protein Kinase 1) liegt. In der Studie von Inbal et al. (Inbal et al., 1997) exprimierten Lungenkarzinomklone von Mäusen, die aggressiv metastasierten, kein DAPK1. Außerdem erhöhte die DAPK1-Expression die Häufigkeit von Apoptose in vivo. Raveh et al. (Raveh et al., 2001) schlossen aus ihren Experimenten, dass DAPK1 in einen frühen p53-abhängigen Checkpoint involviert ist, der dazu dient, prämaligne Zellen vor der Krebsentstehung zu eliminieren. Simpson et al. (Simpson et al., 2002) untersuchten 32 sporadische Pinealistumoren. In ihrer Studie war ein Verlust der DAP-Kinase, des Genprodukts von DAPK1, signifikant mit invasiven Tumoren assoziiert.

Zwei der in der Versuchsreihe untersuchten Ependymome zeigten eine Aberration an dieser Stelle. Letztendlich waren bei diesem Marker nur 17 Fälle (35,4%) heterozygot und somit aussagekräftig. Auf Grund dieser geringen Zahl lässt sich unter Verwendung dieses Markers nur wenig darüber sagen, ob das zugehörige Gen in der Entstehung von Ependymomen eine Rolle spielt.

4.1.8 D9S1828

Der Marker **D9S1828** ist nahe bei dem Gen **TXN** (Thioredoxin) zu finden, das mit dem Gen **ASK1** (Apoptosis signal-regulating Kinase 1) interagiert. Expression von TXN inhibiert die ASK1-abhängige Apoptose, während Inhibierung von TXN in einer Aktivierung der endogenen ASK1-Aktivität resultiert. Saitoh et al. (Saitoh et al., 1998) schlossen daraus, dass TXN ein physiologischer Inhibitor von ASK1 ist und in die Redox-Regulation des Signaltransduktionswegs der Apoptose involviert sein könnte. Korshunov et al. (Korshunov et al., 2003) hatten sich ebenfalls mit dem Gen TXN beschäftigt und unter Verwendung von Microarrays entdeckt, dass TXN niedrig exprimiert war. Dies bedeutet logischerweise eine Steigerung der ASK1-abhängigen Apoptose und damit eher eine Behinderung der Tumorentstehung. Mit der Mikrosatellitenanalyse ohne Standardmarker lässt sich nicht sagen, ob es sich bei Aberrationen um Deletionen oder Amplifikationen handelt. Deshalb kann man nur begrenzte Aussage darüber treffen, ob die fünf Aberrationen, die hier gefunden wurden, wie bei Korshunov eine Minderexpression bedeuten und die Apoptose fördern oder sie eher behindern. Eine Minderexpression oder Deletion ließe sich aber gut mit einer besseren Prognose in Einklang bringen. Ob dieses Gen prognostischen Wert besitzt, kann mit den vorliegenden Daten nicht beurteilt werden, da der Marker mit fünf Aberrationen zu selten betroffen war. Dazu wären weitere Studien an einer größeren Patientengruppe nötig.

4.1.9 D9S1683

Bei **D9S1683** findet man das Gen **EDG2** (Endothelial differentiation Gene 2), das einen Rezeptor für Lysophosphatsäure kodiert, welcher in neurogenen Regionen des sich entwickelnden zerebralen Kortex exprimiert wird. Lysophosphatidsäuren und deren Rezeptor sind im Gehirn in hoher Konzentration vorhanden. In kultivierten Astrozyten und aus Gliomen stammenden Zellen erhöht Lysophosphatidsäure das intrazelluläre Calcium und verursacht morphologische Veränderungen und induziert die Migration von Gliomzellen (Hecht et al., 1996; Steiner et al., 2002). Eine Veränderung des Markers findet sich in fünf Fällen.

4.1.10 D9S170

Der Marker **D9S170** liegt nahe bei dem Gen **DEC1** (deleted in esophageal cancer 1), das oft in adenosquamösem Karzinomen des Ösophagus deletiert ist (Miura et al.,

1996; Nishiwaki et al., 2000). Die Expression dieses Gens ist in Ösophaguskarzinomen reduziert. Man findet auch häufig LOH an dieser Stelle in Ösophaguskarzinomen. In vitro kann darüber hinaus cDNA von DEC1 das Wachstum einiger Krebszellen hemmen. Auch in adenosquamösen Karzinomen von entwicklungsgeschichtlich verwandten Geweben wie Blase, Lunge, Kopf und Hals sind LOHs von 9q32 nicht selten (Nishiwaki et al., 2000).

Weiterhin liegt an dieser Stelle auch das Gen **TNC** (Tenascin-C), von dem bekannt ist, dass es in die Embryogenese des ZNS involviert ist (Garcion et al., 2004). Außerdem wurde eine Überexpression schon in mehreren malignen Hirntumoren festgestellt, wo sie mit einer erhöhten Vaskularisierung, Rezidiven nach kurzer Zeit und einer schlechten Prognose assoziiert war (Herold-Mende et al., 2002; Korshunov et al., 2002; Godard et al., 2003). Puget et al. (Puget et al., 2009) fanden eine starke Überexpression von TNC in pädiatrischen Ependymomen in der Array-CGH (Array Comparative Genomic Hybridization) und zusätzliche Kopien von 9q33 und 9q34 in der FISH. Diese waren mit einem Alter über drei Jahren, Tumorrezidiven und infratentorieller Lokalisation assoziiert.

Der Marker D9S170 zeigte in sechs Fällen Aberrationen, also in 15% der heterozygoten Fälle. Diese Ergebnisse passen zu denen von Puget et al. (Puget et al., 2009). Wie von ihnen vorgeschlagen könnte TNC in der Zukunft einen therapeutischen Ansatzpunkt darstellen, nachdem TNC-Antikörper schon in malignen Gliomen bei Erwachsenen viel versprechende Ergebnisse gezeigt haben (Reardon et al., 2006). Auf Grund der relativ geringen Aberrationszahl ließen sich keine klinischen Korrelationen untersuchen. Von den Rezidivtumoren wies einer (4M-2) im Gegensatz zum Primärtumor eine zusätzliche Aberration an dieser Stelle auf. Der Marker wurde auch schon von Huang et al. (Huang et al., 2003) verwendet.

4.1.11 D9S1872

Der Marker **D9S1872** liegt bei dem Gen **DBCCR1** (DCR1, deleted in bladder cancer chromosomal Region 1), das häufig in Übergangszellkarzinomen der Blase aberriert ist oder durch Methylierung nicht mehr exprimiert wird. Beetz et al. (Beetz et al., 2005) untersuchten Gliome, insbesondere Astrozytome, und fanden heraus, dass die mRNA-Expression in den meisten Tumoren merklich reduziert war und signifikant mit dem Tumorgrad korrelierte. Ein Verlust von DBCCR1 war in 21 % der Fälle zu finden. Ihrer Vermutung nach spielt DBCCR1 eine allgemeinere Rolle bei der

Tumorsuppression als bisher angenommen mit je nach Tumortyp unterschiedlichen Mechanismen der Inaktivierung.

Mit 16 Aberrationen war dieser Marker am häufigsten aberriert. Eine Aberration an diesem Marker zeigte schon einen Trend zu einem Überlebensvorteil bei Erwachsenen ($p=0,094$) bei allerdings kleiner Fallzahl. Dies steht aber nicht im Einklang mit der These von Beetz et al. (Beetz et al., 2005), dass es sich bei DBCCR1 um ein Tumorsuppressorgen handelt. Eine genauere Untersuchung dieses Gens bei Ependymomen erscheint viel versprechend und sollte sich an diese Arbeit anschließen.

4.1.12 D9S117

Der Marker **D9S117** erwies sich als problematisch bei der Auswertung, so dass man kaum eine Aussage darüber treffen kann, wie viele Aberrationen sich an dieser Stelle vorhanden sind. Nur in einem Fall konnte eine Aberration auch bei einem zweiten Versuch bestätigt werden. Der Marker wurde wegen seiner Nähe zu dem Gen **NR6A1** (nuclear receptor subfamily 6, group A, member 1) gewählt. Die Genfamilie der nuklären Rezeptoren von ligandenaktivierten Transkriptionsfaktoren ist in die Regulation von Entwicklung, Wachstum und Reproduktion involviert (Agoulnik et al., 1998).

4.1.13 D9S1863 und D9S118

D9S1863 und **D9S118** liegen in der Nähe des Gens **ABL1**. Dieses Gen ist bei der für chronische myeloische Leukämien typischen Translokation $t(9; 22)$ mit Entstehung des Genprodukts BCR-ABL involviert (Szczylik et al., 1991). Es finden sich in der Literatur Hinweise darauf, dass dieses Gen an der Entstehung von Ependymomen beteiligt sein könnte. Scheil et al. (Scheil et al., 2001) fanden in sieben von 26 Ependymomen die Region 9q34 amplifiziert. Die mit dieser Doktorarbeit gewonnenen Daten können das nicht bestätigen. In nur drei Fällen fanden sich Aberrationen an dieser Stelle, wobei in zweien dieser Fälle nahezu das gesamte Chromosom 9 Aberrationen aufwies. Dies weist darauf hin, dass ein komplettes Chromosom entweder deletiert oder amplifiziert ist. Somit ist eine Aberration in diesen Fällen nicht aussagekräftig. Auch Patt et al. war es wiederholt nicht gelungen eine veränderte Expression dieses Gens in Ependymomen nachzuweisen (Patt and Cervos-Navarro, 1992; Patt et al., 1993).

Das Gen **FUBP3** (Far upstream element binding protein 3) liegt ebenfalls in der Nähe der Marker D9S118 und D9S1863. Far upstream element binding proteins regulieren die Expression von c-Myc (siehe 4.1.3), indem sie an das weit vorgeschaltete Element des c-Myc-Gens binden. Die beiden anderen Varianten dieser Proteine FAB1 und FAB2 wurden in Medulloblastomen gefunden (Engidawork et al., 2006). Auf Grund der geringen Rate an Aberrationen in dieser Region scheint FUBP3 für die Entstehung von Ependymomen ebenfalls keine Rolle zu spielen.

4.2 Verteilung der Aberrationen

Die Aberrationen auf Chromosom 9 sind unterschiedlich verteilt. Die endständigen Marker D9S1645 auf 9p24.1 und D9S118 und D9S1863 auf 9q34.2 zeigten kaum Aberrationen.

Bijlsma et al. (Bijlsma et al., 1995) hatten zwei Marker auf 9p benutzt, nämlich D9S50 auf 9p13.2 und D9S54 auf 9p24.2, und dabei aber nur in einem von 17 Fällen eine Aberration auf Chromosom 9 gefunden. D9S54 liegt noch weiter peripher als der Marker D9S1645. Dies deutet darauf hin, dass das periphere Ende von 9p bei der Entstehung von Ependymomen eher nicht involviert ist.

Auf 9q hingegen fanden Scheil et al. (Scheil et al., 2001) eine Amplifikation von 9q34.2, wo auch die Marker D9S118 und D9S1863 liegen, in sieben von 26 Fällen. Puget et al. (Puget et al., 2009) wiesen mit aCGH und FISH zusätzliche Kopien von 9q33 in 27% und von 9q34 in 36% der Fälle nach. Dabei zeigte sich insbesondere das Notch1-Gen in vielen Fällen mutiert. Dieses liegt sehr weit peripher, auf 9qter. In dieser Region wurden keine Marker gewählt, so dass diese Studie hierzu keine Aussage treffen kann.

Frühere Untersuchungen unter Verwendung von CGH (Hirose et al., 2001; Jeuken et al., 2002; Rickert and Paulus, 2004) fanden Aberrationen von 9q, 9p oder des ganzen Chromosoms. Genauere Aussagen zur Lokalisation von Imbalancen finden sich nur selten wie bei Scheil et al. (9q34) und Bijlsma et al. (9p13.2, 9p24.2) (Bijlsma et al., 1995; Scheil et al., 2001).

Korshunov et al. (Korshunov et al., 2003) berichten über Genexpressionsmuster und untersuchten auch mehrere Gene auf Chromosom 9. Sie fanden eine erhöhte Expression von CDKN2A in spinalen Ependymomen, während CNTFR, RAGA, TXN, AMBP und HSPA5 auf Chromosom 9 konstant niedrig exprimiert waren. CNTFR ist bei D9S1817 besprochen (siehe 4.1.5). TXN liegt in der Nähe von D9S1828 und wird

in 4.1.8 behandelt. Die anderen Gene sind nicht nahe bei einem der hier verwendeten Marker gelegen.

Es konnten zwei Regionen definiert werden, in denen Aberrationen häufiger waren als an anderer Stelle. Ein Abschnitt mit 14 Aberrationen zwischen D9S156 und D9S1817 enthält die Tumorsuppressorgene CDKN2A und CDKN2B, deren wichtige Rolle in der Zellzyklusregulation und Tumorentstehung bekannt ist (siehe 4.1.3).

Eine weitere auffällige Region fand sich zwischen D9S1828 und D9S1872 mit den Genen TXN (Inhibitor der Apoptose) und EDG2, das eine Rolle bei der Wanderung von Gliomzellen spielt. Darüber hinaus liegt bei D9S1872 das Gen DBCCR1, das in Übergangszellkarzinomen der Blase häufig aberriert ist. Die Expression dieses Gens ist auch in Gliomen merklich reduziert und korreliert mit dem Tumorgrad. Bei D9S170 befindet sich das Gen TNC, das bei Ependymomen oft überexprimiert ist. Die Region zwischen D9S1828 und D9S1872 war in 24 Fällen auffällig.

Auf Grund der Häufigkeit der Aberrationen in diesen jeweiligen Regionen ist zu vermuten, dass diese für die Tumorprogression wichtig sein könnten. Weitere Untersuchungen könnten bei den Markern D9S252 und D9S257 erfolgen, die nahe beieinander liegen und insgesamt acht Aberrationen aufwiesen. Möglicherweise wären hier noch mehr Auffälligkeiten zu finden, nachdem der Marker D9S257 nur in wenigen Fällen überhaupt aussagekräftig war.

4.3 Aberrationen von Chromosom 9 im Vergleich mit Chromosom 6 und 22

Hirose et al. (Hirose et al., 2001) fanden unter Verwendung von CGH heraus, dass sich Aberrationen auf 6q und 9 gegenseitig ausschlossen. Huang et al. (Huang et al., 2003) fanden dieselbe Beziehung mit Mikrosatellitenanalyse, wobei sie die Signifikanz knapp verfehlten. Beim Vergleich zwischen den von Huang et al. erhobenen Daten mit den Ergebnissen dieser Doktorarbeit fand sich jedoch kein statistischer Zusammenhang.

Ebenso korreliert das Vorliegen von Aberrationen auf Chromosom 9 und 22 nicht miteinander (Daten aus der Arbeit von Huang et al.) (Huang et al., 2002).

4.4 Rezidive

Die untersuchten Rezidivtumoren zeigten alle allelische Imbalancen. Im Rezidiv des Falls 4M fanden sich zwei Aberrationen mehr als im Primärtumor. Eine davon wurde

durch den Marker D9S1748 nachgewiesen, bei dem die Tumorsuppressorgene CDKN2A und CDKN2B liegen. Auf Grund der schon weiter oben geschilderten großen Bedeutung dieser Gene könnte diese Aberration auf eine weitere Tumorprogression hindeuten. Bei Fall 6M fanden sich in nur im zuletzt gewonnen Resektat eine Aberration bei DBCCR1. Auch dies könnte für eine Tumorprogression mit Akquirierung weiterer Aberration sprechen.

Der Primärtumor des Falles 2M zeigte Aberrationen bei acht Markern. Dies weist darauf hin, dass ein Großteil eines Chromosoms 9 in diesem Tumor entweder verloren ging oder amplifiziert wurde. Im Gegensatz dazu hatte das Rezidiv nur zwei Aberrationen auf 9q31.3-33.3. Der Tumor bei diesem Patienten war zunächst partiell entfernt worden, die komplette Resektion fand erst zehn Monate später nach adjuvanter Therapie statt. Daraus lässt sich möglicherweise schließen, dass das Rezidiv nicht aus dem im Primärtumor hauptsächlich vorliegenden neoplastischen Klon hervorgegangen ist, sondern aus einer anderen Tumorzelle, die gegenüber Radiochemotherapie resistenter war.

4.5 Mikrosatelliteninstabilität

Das HNPCC-Syndrom (hereditäres Kolorektalkarzinom ohne generalisierte Polypose) und auch verschiedene andere sporadische menschliche Tumoren sind durch Mikrosatelliteninstabilität charakterisiert. Dabei kommt es zu Längenveränderungen innerhalb kurzer, repetitiver DNA-Sequenzen als Folge defekter DNA-Reparaturproteine. Normalerweise wird der Einbau von falschen Basen («mismatch») in neu hergestellten DNA-Strängen bei der DNA-Replikation durch Reparaturproteine entdeckt und korrigiert, zum Beispiel durch die DNA-Polymerase (so genanntes mismatch repair). Wenn die Gene für diese Reparaturproteine (hMLH1, hMSH2, hMSH6, hPMS1, hPMS2) defekt sind, kann es zum Ausfall des Reparatursystems kommen und in der neu replizierten DNA häufen sich mit der Zeit Mutationen an.

In Gliomen findet sich speziell in Glioblastomen und Oligodendrogliomen gelegentlich Mikrosatelliteninstabilität. Die Autoren sind sich jedoch einig, dass Mikrosatelliteninstabilität in der Onkogenese von hirneigenen Tumoren keine größere Rolle spielt (Dams et al., 1995; Zhu et al., 1996; Lundin et al., 1998; Alvino et al., 2000) und eher als Erwerbung in der Tumorgenese betrachtet werden sollte (van de Kelft and Verlooy, 1994).

Mikrosatelliteninstabilität trat bei Marker D9S1872 in drei Fällen auf. Bei Ependymomen findet sich bis jetzt kein Bericht über Mikrosatelliteninstabilität. Deshalb und auch weil sie in dieser Doktorarbeit nur selten auftraten, ist davon auszugehen, dass sie in der Onkogenese ependymaler Tumoren wie bei anderen Gliomen keine Rolle spielt.

4.6 Resektionsstatus

Die komplette Resektion des Tumors war der bei weitem aussagekräftigste Überlebensfaktor. Dies bestätigt weitere Studien, in denen der Resektionsstatus als wichtiger prognostischer Faktor genannt wurde (Nazar et al., 1990; Vanuytsel et al., 1992; Pollack et al., 1995; Bouffet et al., 1998; Robertson et al., 1998; Horn et al., 1999; Maksoud et al., 2002; van Veelen-Vincent et al., 2002; Shu et al., 2007; Garces-Ambrossi et al., 2009). Nur bei einer Minderheit der Autoren stellt die vollständige Entfernung des Tumors keinen signifikanten Überlebensvorteil dar, z. B. Needle et al. (Needle et al., 1997).

4.7 Adjuvante Therapie

Verschiedene Autoren haben gezeigt, dass eine Bestrahlung die Prognose verbessert (Nazar et al., 1990; Healey et al., 1991; Vanuytsel et al., 1992; Needle et al., 1997; Bouffet et al., 1998; Carter et al., 2002; van Veelen-Vincent et al., 2002; Shu et al., 2007). In der vorliegenden Versuchsreihe war die adjuvante Therapie jedoch kein unabhängiger Überlebensfaktor, sondern hing vom Resektionsstatus ab.

4.8 Lokalisation

Kinder hatten signifikant häufiger intrakranielle Tumoren als Erwachsene, die hingegen öfter an spinalen Tumoren erkrankten, ähnlich wie es beispielsweise auch Schiffer et al. beschreiben (Schiffer et al., 1991). Das ist darauf zurückzuführen, dass bei Erwachsenen myxopapilläre Ependymome häufig sind. Diese findet man meist im Rückenmark, dem Filum terminale und der Cauda equina. Bei Kindern sind sie sehr selten.

Modena et al. (Modena et al., 2006) fanden eine signifikant unterschiedliche Genexpression in supratentoriellen und infratentoriellen Ependymomen. Auch Jeuken et al. (Jeuken et al., 2002) stellten unter Verwendung von CGH einen

Unterschied zwischen den verschiedenen Tumorlokalisationen fest. Ein Verlust von Chromosom 9 lag bei der Hälfte der supratentoriellen Ependymomen ihrer Studie vor, während in infratentoriellen Tumoren eher, hauptsächlich bei Erwachsenen, eine Amplifikation von Chromosom 9 gefunden wurde. So vermuteten sie alters- und lokalisationsabhängig verschiedene Entstehungswege der unterschiedlich lokalisierten Tumoren. Auch Carter et al. und Grill et al. fanden in ihrer CGH-Studie einen Verlust von Chromosom 9 hauptsächlich in supratentoriellen Tumoren (Carter et al., 2002; Grill et al., 2002). Darüber hinaus postulierten Taylor et al. (Taylor et al., 2005), die Microarrays verwendet hatten, dass supratentorielle, infratentorielle und spinale Tumoren von verschiedenen Vorläuferzellen abstammen, da spinale und supratentorielle Tumoren dieselbe Genexpression wie murine embryonale Radialglia in der supraventrikulären Zone des lateralen Ventrikels und des Spinalkanals aufwiesen.

In dieser Doktorarbeit zeigten bei Kindern supratentorielle Tumoren signifikant häufiger Aberrationen auf Chromosom 9 als infratentorielle. Dies weist ebenfalls auf unterschiedliche Entstehungswege bei Ependymomen hin. Es ist zu vermuten, dass es unterschiedliche Subtypen von Ependymomen gibt, die, wie schon von Jeuken et al. (Jeuken et al., 2002) angenommen, teilweise von Alter und Lokalisation determiniert werden. Hier spielen bei Kindern offenbar Aberrationen auf Chromosom 9 in infratentoriellen Tumoren im Gegensatz zu supratentoriellen eine eher untergeordnete Rolle.

Hirose et al. (Hirose et al., 2001) fanden in spinalen Tumoren wesentlich mehr Veränderungen der Anzahl der vorliegenden Chromosomen 9 als in intrakraniellen Ependymomen. Das konnte in der Mikrosatellitenanalyse nicht beobachtet werden. Aberrationen wurden jeweils in 55,5% der spinalen Ependymome und 66,7% der intrakraniellen Tumoren gefunden, was aber keinen signifikanten Unterschied darstellt. Auch Hirose et al. schlossen auf Grund ihre Ergebnisse auf verschiedene Entstehungswege von intrakraniellen und spinalen Ependymomen. Sie fanden einen Verlust von Chromosom 9 zusammen mit einer zusätzlichen Kopie von 1q in spinalen Tumoren, nicht aber in intrakraniellen.

Abhängig von der Lokalisation zeigte sich in der vorliegenden Studie, dass das Überleben der Patienten mit supratentoriellen Tumoren am besten war, gefolgt von spinalen Tumoren. Infratentorielle Ependymome zeigten das schlechteste Outcome. Dies war unabhängig von Resektionsstatus. Dieselben Ergebnisse hatten Sowar et

al. (Sowar et al., 2006). Ebenso stellten Ernestus et al. (Ernestus et al., 1996) bei supratentoriellen Tumoren ein besseres Überleben fest als bei Ependymomen der Fossa posterior. Eine Tendenz zu einem Überlebensvorteil von Patienten mit supratentoriellen Tumoren im Vergleich zu infratentoriellen berichteten auch Marie-Lise van Veelen-Vincent et al. (van Veelen-Vincent et al., 2002). Es gibt aber auch gegensätzliche Ergebnisse (Rousseau et al., 1994). Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass es sich um unterschiedliche Subgruppen von Ependymomen handelt, die verschiedene Entstehungswege haben.

4.9 Graduierung

Die WHO-Klassifikation der sehr heterogenen Ependymome hat sich als problematisch erwiesen. Im Gegensatz zu anderen Gliomen lässt sich nicht immer ein Zusammenhang zwischen Grading und Outcome in der Klinik erkennen. Kurt et al. (Kurt et al., 2006), Ernestus et al. (Ernestus et al., 1996), Schiffer et al. (Schiffer et al., 1991) sowie Marie-Lise van Veelen-Vincent et al. (van Veelen-Vincent et al., 2002) konnten keinen Einfluss der Graduierung auf das Überleben der Patienten feststellen, während Waldron et al. (Waldron et al., 1993) Korshunov et al. (Korshunov et al., 2004), Ho et al. (Ho et al., 2001), Horn et al. (Horn et al., 1999) und Stüben et al. (Stüben et al., 1997) sie als prognostischen Faktor nannten. Tatsächlich ist es für den Neuropathologen nicht einfach, Ependymome den verschiedenen WHO-Klassen zuzuordnen, so dass es beispielsweise in Frankreich wesentlich mehr Grad-II-Ependymome gibt als in Deutschland, wo häufiger Ependymome Grad III diagnostiziert werden. Eine einheitlichere und prognostisch aussagekräftigere Einteilung wird schon länger gefordert und könnte auch molekulare Marker beinhalten.

Angesichts dieser problematischen Einteilung von Ependymomen überrascht es nicht, dass auch in dieser Arbeit keine signifikante Korrelation zwischen WHO-Grad und Überleben gefunden wurde.

Hirose et al. (Hirose et al., 2001) stellten fest, dass der Verlust von Chromosom 9 vorzugsweise mit dem Grad 3 nach WHO-Klassifikation assoziiert war. Dies konnte hier nicht bestätigt werden.

In dieser Versuchsreihe wiesen infratentorielle anaplastische Ependymome tendenziell weniger Aberrationen auf als supratentorielle. Allerdings handelt es sich bei den anaplastischen Ependymomen fast ausschließlich um Kinder, bei denen sich

ja die Lokalisationen signifikant in ihrer Häufigkeit von Aberrationen auf Chromosom 9 unterschieden.

4.10 Alter

Die Versuche zeigten, dass Aberrationen auf Chromosom 9 bei Erwachsenen etwas häufiger waren als bei Kindern. Dies deckt sich mit einer früheren Arbeit aus der Neuropathologie Würzburg (Huang et al., 2003) mit 15 Markern auf Chromosom 6 und 9 und 30 der 48 Fälle, die auch in dieser Arbeit untersucht wurden. Darin wiesen Erwachsene in 93,3% der Fälle Aberrationen auf im Gegensatz zu nur 72,2% bei den Kindern. Dies war aber nicht statistisch signifikant.

Auch Monoranu et al. (Monoranu, 2008), die dieselben Fälle wie in dieser Arbeit untersuchten, fanden bei Kindern weniger Aberrationen auf Chromosom 6 als bei Erwachsenen. Ebenso wiesen Jeuken et al. (Jeuken et al., 2002) bei Kindern weniger Aberrationen nach als bei Erwachsenen. Auch Carter et al. (Carter et al., 2002) stellten mit CGH fest, dass Kinder signifikant häufiger ein balanciertes genomisches Profil hatten als Erwachsene. Dies ist ein Hinweis auf unterschiedliche Entstehungswege von Ependymomen bei Kindern und Erwachsenen. Ein weiterer Anhaltspunkt dafür ist die signifikante Korrelation von Lokalisation und positivem Aberrationsstatus von Chromosom 9 bei Kindern, nicht aber bei Erwachsenen. Außerdem wirkten sich bei Kindern Aberrationen nicht auf das Überleben aus, bei Erwachsenen hingegen schon.

Weiter kann man die pädiatrischen Patienten nach dem Alter in Kinder unter drei und über drei Jahren einteilen. Während der Prozentsatz der Fälle mit Aberrationen in diesen beiden Altersgruppen annähernd gleich war, fällt auf, dass Kinder über drei Jahren und Erwachsene meist mehr als eine Aberration hatten, dagegen Kleinkinder unter drei höchstens zwei. Auch Rickert et al. (Rickert and Paulus, 2004) fanden in ihrer CGH-Studie bei Kindern unter drei eher ein balanciertes genetisches Profil, während ältere Kinder und Erwachsene in der überwiegenden Mehrzahl strukturelle oder numerische Aberrationen aufwiesen. Dies deutet ebenfalls auf unterschiedliche Entstehungswege von Ependymomen bei jungen Kindern und älteren Patienten hin. Nach den Berichten vieler Autoren haben Kinder, besonders unter zwei bis drei Jahren, eine schlechtere Prognose als Erwachsene (Kudo et al., 1990; Nazar et al., 1990; Lyons and Kelly, 1991; Schiffer et al., 1991; Pollack et al., 1995; Horn et al., 1999). Es finden sich aber auch Autoren, die das Alter nicht als prognostischen

Faktor nennen (Rousseau et al., 1994; van Veelen-Vincent et al., 2002; Kurt et al., 2006). Der Grund für ein besseres Überleben älterer Kinder im Gegensatz zu jüngeren in der vorliegenden Arbeit liegt vor allem darin, dass bei älteren Kindern häufiger eine komplette Resektion erreicht werden konnte. Eine längeres Überleben bei Erwachsenen lässt sich mit der höheren Inzidenz meist gut operabler spinaler Ependymome myxopapillärer Histologie erklären, die eine bessere Prognose besitzen als die bei Kindern häufigen infratentoriellen Tumoren, die schlechter resezierbar sind.

4.11 DBCCR1 als möglicher prognostischer Faktor

Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit war, dass Erwachsene mit Aberrationen auf Chromosom 9 signifikant länger überlebten. Insbesondere Aberrationen des Markers D9S1872 bei DBCCR1 zeigten allein schon einen Trend zu einem besseren Überleben. Bis heute sind keine verlässlichen Marker für die risikoadaptierte Patientenstratifizierung vorhanden und die Histologie allein korreliert, wie schon in 4.9 beschrieben, nicht notwendigerweise mit dem klinischen Verhalten dieser sehr heterogenen Tumorgruppe. Lichter et al. konnten zeigen, dass der Status von 1q25 und EGFR bei intrakraniellen Ependymomen ein unabhängiger prognostischer Faktor war. Monoranu et al. (Monoranu, 2008) untersuchten Chromosom 6 bei denselben Fällen wie in dieser Doktorarbeit mit Mikrosatellitenanalyse und fanden für Kinder mit intrakraniellen Ependymomen einen Überlebensvorteil, wenn sie eine Deletion bei 6q25.3 aufwiesen. Nach dem Bericht anderer Autoren ist die Expression von hTERT (human reverse transcriptase) ein prognostischer Marker für Progression und Überleben bei pädiatrischen intrakraniellen Ependymomen (Tabori et al., 2006). Sollte sich der Aberrationsstatus von DBCCR1 bei Erwachsenen als Prognosefaktor in einer größeren Patientengruppe bestätigen, dann könnte er zusammen in dem Status von 1q25 und 6q25.3 zur prognostischen Einteilung von Ependyompatienten in der Klinik eingesetzt werden.

5 Zusammenfassung

Noch immer ist es ein Problem die sehr heterogenen Ependymome prognostisch einzuordnen. Dabei hilft die WHO-Klassifikation oft nicht weiter. Bei erwachsenen Patienten konnte gezeigt werden, dass Aberrationen auf Chromosom 9 die Prognose verbessern. Speziell der Marker D9S1872 bei DBCCR1 war in einem Drittel aller Fälle aberriert und zeigte einen Trend zu einem Überlebensvorteil bei Erwachsenen. Deshalb könnte er, falls er auch in einer größeren Patientengruppe ähnliche Ergebnisse liefert, in Zukunft zur prognostischen Einteilung von Ependymompatienten in der Klinik beitragen.

Des Weiteren konnten bei Kindern in supratentoriellen Tumoren signifikant mehr Aberrationen gefunden wurden als in infratentoriellen. Dies deutet darauf hin, dass Ependymome zumindest bei Kindern abhängig von der Lokalisation unterschiedliche Entstehungswege haben.

Es konnten zwei Regionen identifiziert werden, in denen sich häufig Aberrationen fanden: 9p21.1-22.3 mit den Tumorsuppressorgenen CDKN2A und CDKN2B, die häufig in Gliomen deletiert sind, und 9q31.3-33.3, wo sich die Gene TXN (Apoptoseinhibitor), DBCCR1 (in Astrozytomen unterexprimiert), TNC (in pädiatrischen Ependymomen überexprimiert) und EDG2, das eine Rolle bei der Migration von Gliomzellen spielt, befinden.

Weiterhin konnten Lokalisation und Resektionsausmaß als unabhängige Prognosefaktoren bestätigt werden.

6 Anhang

6.1 Verwendete Abkürzungen

ABL1	Abelson murine Leukemia viral Oncogene Homolog 1
AMBP	Alpha-1 Microglobulin Precursor
ASK1	Apoptosis signal-regulating Kinase 1
B4GALNT2	N-Acetylgalactosaminyltransferase, kodiert das Epitop der Sda-Blutgruppe
BAG-1	BCL2-associated athanogene
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
BCR	Breakpoint Cluster Region
BCR-ABL	Translokation mit Entstehung eines Fusionsgen aus BCR und ABL1
CDK4	Zyclin-abhängige Kinase 4
CDK6	Zyclin-abhängige Kinase 6
CDKN2A	p16 (INK4), p14 (ARF), Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2 A
CDKN2B	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2 B, p15
cDNA	Copy Deoxyribonukleinsäure
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CLL	chronisch-lymphatische Leukämie
c-Myc	Protoonkogen
CNTFR	Ciliary neurotrophic Factor
DAPK1	Death-associated Protein Kinase 1
DBCCR1	auch DCR1, Deleted in bladder cancer chromosomal Region1
DEC1	Deleted in esophageal cancer
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E2F	ein Transkriptionsfaktor
EDG2	Endothelial differentiation Gene 2
FISH	Fluoreszenz- in-situ-Hybridisierung
FUBP3	Far upstream Element binding Protein
G1-Phase	Gap1-Phase
G2-Phase	Gap2-Phase
GAS1	Growth Arrest-Specific 1

GFAP	Glial fibrillary acidic protein, Saures Gliafaserprotein
HSPA5	Heat Shock 70kDa Protein 5
LOH	Loss of Heterozygosity
MDM2	Murine Double Minute
Mbp	Megabasepaare
MLANA	Melanoma Antigen Recognized by T-cells 1
M-Phase	Mitose-Phase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MTAP	Methylthioadenosine Phosphorylase
NR6A1	Nuclear Receptor Subfamily 6, Group A, Member 1
p19	ARF, entspricht p14 bei Mäusen
P53	ein Tumorsuppressorgen
p53	von P53 kodierter Transkriptionsfaktor
PD-L2	Programmed Death Ligand
RAGA	Ras-related GTP binding A
Sda	Sid Blood Group Antigen
SNAP50	snRNA-activating Protein Complex Subunit 3
SNAPc	snRNA-activating Protein Complex
snRNA	snare Ribonukleinsäure
S-Phase	Synthesephase
TBE	Tris, Borat und EDTA
TGF-beta	Transforming Growth Factor beta
TNC	Tenascin-C
TOPORS	Topoisomerase I
tRNA	Translation Ribonukleinsäure
TXN	Thioredoxin
UBAP1	Ubiquitin-associated Protein 1
WAF1	vermutlich ein Fragment des Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1A
WHO	World Health Organization
Zyclin-D-CDK	Zyclin D im Komplex mit einer zyclinabhängigen Kinase
Zyclin-E-CDK	Zyclin E im Komplex mit einer zyclinabhängigen Kinase

6.2 PCR-Ansätze und PCR-Programme

PCR-Ansatz:

2 µl 10x PCR-Puffer II (100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl)

3,6 µl MgCl₂ (25mM)

4 µl dNTP (1,25mM)

0,1 µl AmpliTaqGold Polymerase (5U/µl)

je 0,4 µl Primer (3' und 5' Primer in einer Konzentration von 50 pmol/µl)

bis zu 4 µl DNA-Lösung mit mindestens 50 ng DNA

Auffüllen mit autoklaviertem bidestilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl

PCR-Programm:

Hotstart 13 min bei 95°C

10 Zyklen 30 sec bei 95°C (Denaturierung)

1 min bei spezifischer Annealingtemperatur

1 min bei 72°C (Extension)

20 Zyklen 30 sec bei 91°C (Denaturierung)

1 min bei spezifischer Annealingtemperatur

1 min bei 72°C (Extension)

Ende 10 min bei 72°C, dann Herunterkühle auf 4°C

6.3 Zusammensetzung der formamidhaltigen Gellösung

Formamidhaltige (28,8 %) Gellösung für einen Gellauf:

13,4 g Harnstoff-Pulver

4,5ml Aqua destillata

8 ml 5x TBE

12,8ml Formamid

1 g Amberlite Ionenaustauscher

5 ml Acrylamidlösung 40 %

7 Literaturverzeichnis

- Agoulnik IY, Cho Y, Niederberger C, Kieback DG, Cooney AJ (1998) Cloning, expression analysis and chromosomal localization of the human nuclear receptor gene GCNF. *FEBS Lett* 424:73-78.
- Alvino E, Fernandez E, Pallini R (2000) Microsatellite instability in primary brain tumors. *Neurol Res* 22:571-575.
- Beetz C, Brodoehl S, Patt S, Kalff R, Deufel T (2005) Low expression but infrequent genomic loss of the putative tumour suppressor DBCCR1 in astrocytoma. *Oncol Rep* 13:335-340.
- Bhattacharjee MB, Armstrong DD, Vogel H, Cooley LD (1997) Cytogenetic analysis of 120 primary pediatric brain tumors and literature review. *Cancer Genet Cytogenet* 97:39-53.
- Bijlsma EK, Voesten AM, Bijleveld EH, Troost D, Westerveld A, Merel P, Thomas G, Hulsebos TJ (1995) Molecular analysis of genetic changes in ependymomas. *Genes Chromosomes Cancer* 13:272-277.
- Biliran H, Jr., Banerjee S, Thakur A, Sarkar FH, Bollig A, Ahmed F, Wu J, Sun Y, Liao JD (2007) c-Myc-induced chemosensitization is mediated by suppression of cyclin D1 expression and nuclear factor-kappa B activity in pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 13:2811-2821.
- Böcker W, Denk H, Heitz PU (2004) *Pathologie*. Amsterdam in den Niederlanden: Urban und Fischer bei Elsevier.
- Bouffet E, Perilongo G, Canete A, Massimino M (1998) Intracranial ependymomas in children: a critical review of prognostic factors and a plea for cooperation. *Med Pediatr Oncol* 30:319-329; discussion 329-331.
- Carter M, Nicholson J, Ross F, Crolla J, Allibone R, Balaji V, Perry R, Walker D, Gilbertson R, Ellison DW (2002) Genetic abnormalities detected in ependymomas by comparative genomic hybridisation. *Br J Cancer* 86:929-939.
- Dams E, Van de Kelft EJ, Martin JJ, Verlooy J, Willems PJ (1995) Instability of microsatellites in human gliomas. *Cancer Res* 55:1547-1549.
- Database G (2007) In: <http://www.gdb.org>.
- Davis S, Aldrich TH, Valenzuela DM, Wong VV, Furth ME, Squinto SP, Yancopoulos GD (1991) The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science* 253:59-63.

- Dehais C, Laigle-Donadey F, Marie Y, Kujas M, Lejeune J, Benouaich-Amiel A, Pedretti M, Polivka M, Xuan KH, Thillet J, Delattre JY, Sanson M (2006) Prognostic stratification of patients with anaplastic gliomas according to genetic profile. *Cancer* 107:1891-1897.
- Del Sal G, Ruaro ME, Philipson L, Schneider C (1992) The growth arrest-specific gene, *gas1*, is involved in growth suppression. *Cell* 70:595-607.
- Del Sal G, Collavin L, Ruaro ME, Edomi P, Saccone S, Valle GD, Schneider C (1994) Structure, function, and chromosome mapping of the growth-suppressing human homologue of the murine *gas1* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1848-1852.
- Dohi T, Yuyama Y, Natori Y, Smith PL, Lowe JB, Oshima M (1996) Detection of N-acetylgalactosaminyltransferase mRNA which determines expression of Sda blood group carbohydrate structure in human gastrointestinal mucosa and cancer. *Int J Cancer* 67:626-631.
- Engidawork E, Afjehi-Sadat L, Yang JW, Slavic I, Lubec G (2006) Protein chemical identification and characterization of the human variants of far upstream element binding protein in medulloblastoma DAOY cell line. *Int J Oncol* 29:721-736.
- Ernestus RI, Schroder R, Stutzer H, Klug N (1996) Prognostic relevance of localization and grading in intracranial ependymomas of childhood. *Childs Nerv Syst* 12:522-526.
- Garces-Ambrossi GL, McGirt MJ, Mehta VA, Sciubba DM, Witham TF, Bydon A, Wolinsky JP, Jallo GI, Gokaslan ZL (2009) Factors associated with progression-free survival and long-term neurological outcome after resection of intramedullary spinal cord tumors: analysis of 101 consecutive cases. *J Neurosurg Spine* 11:591-599.
- Garcion E, Halilagic A, Faissner A, French-Constant C (2004) Generation of an environmental niche for neural stem cell development by the extracellular matrix molecule tenascin C. *Development* 131:3423-3432.
- Gilhuis HJ, van der Laak J, Wesseling P, Boerman RH, Beute G, Teepen JL, Grotenhuis JA, Kappelle AC (2004) Inverse correlation between genetic aberrations and malignancy grade in ependymal tumors: a paradox? *J Neurooncol* 66:111-116.

- Godard S, Getz G, Delorenzi M, Farmer P, Kobayashi H, Desbaillets I, Nozaki M, Diserens AC, Hamou MF, Dietrich PY, Regli L, Janzer RC, Bucher P, Stupp R, de Tribolet N, Domany E, Hegi ME (2003) Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes. *Cancer Res* 63:6613-6625.
- Goldstein DB, Ruiz Linares A, Cavalli-Sforza LL, Feldman MW (1995) An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics* 139:463-471.
- Gonzalez S, Klatt P, Delgado S, Conde E, Lopez-Rios F, Sanchez-Cespedes M, Mendez J, Antequera F, Serrano M (2006) Oncogenic activity of Cdc6 through repression of the INK4/ARF locus. *Nature* 440:702-706.
- Grill J, Avet-Loiseau H, Lellouch-Tubiana A, Sevenet N, Terrier-Lacombe MJ, Venuat AM, Doz F, Sainte-Rose C, Kalifa C, Vassal G (2002) Comparative genomic hybridization detects specific cytogenetic abnormalities in pediatric ependymomas and choroid plexus papillomas. *Cancer Genet Cytogenet* 136:121-125.
- Hamilton RL, Pollack IF (1997) The molecular biology of ependymomas. *Brain Pathol* 7:807-822.
- Hannon GJ, Beach D (1994) p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371:257-261.
- Healey EA, Barnes PD, Kupsky WJ, Scott RM, Sallan SE, Black PM, Tarbell NJ (1991) The prognostic significance of postoperative residual tumor in ependymoma. *Neurosurgery* 28:666-671; discussion 671-662.
- Hecht JH, Weiner JA, Post SR, Chun J (1996) Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *J Cell Biol* 135:1071-1083.
- Henry RW, Ma B, Sadowski CL, Kobayashi R, Hernandez N (1996) Cloning and characterization of SNAP50, a subunit of the snRNA-activating protein complex SNAPc. *Embo J* 15:7129-7136.
- Hentze MW, Kulozik, A. E., Bartram, C. R., Hagemeyer C. (2000) *Molekulare Medizin: Grundlagen, Pathomechanismen, Klinik*: Walter de Gruyter.
- Herold-Mende C, Mueller MM, Bonsanto MM, Schmitt HP, Kunze S, Steiner HH (2002) Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression. *Int J Cancer* 98:362-369.

- Hirose Y, Yoshida K (2006) Chromosomal abnormalities subdivide neuroepithelial tumors into clinically relevant groups. *Keio J Med* 55:52-58.
- Hirose Y, Aldape K, Bollen A, James CD, Brat D, Lamborn K, Berger M, Feuerstein BG (2001) Chromosomal abnormalities subdivide ependymal tumors into clinically relevant groups. *Am J Pathol* 158:1137-1143.
- Ho DM, Hsu CY, Wong TT, Chiang H (2001) A clinicopathologic study of 81 patients with ependymomas and proposal of diagnostic criteria for anaplastic ependymoma. *J Neurooncol* 54:77-85.
- Hoashi T, Watabe H, Muller J, Yamaguchi Y, Vieira WD, Hearing VJ (2005) MART-1 is required for the function of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 and the maturation of melanosomes. *J Biol Chem* 280:14006-14016.
- Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348:334-336.
- Horn B, Heideman R, Geyer R, Pollack I, Packer R, Goldwein J, Tomita T, Schomberg P, Ater J, Luchtman-Jones L, Rivlin K, Lamborn K, Prados M, Bollen A, Berger M, Dahl G, McNeil E, Patterson K, Shaw D, Kubalik M, Russo C (1999) A multi-institutional retrospective study of intracranial ependymoma in children: identification of risk factors. *J Pediatr Hematol Oncol* 21:203-211.
- Huang B, Starostik P, Kuhl J, Tonn JC, Roggendorf W (2002) Loss of heterozygosity on chromosome 22 in human ependymomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 103:415-420.
- Huang B, Starostik P, Schraut H, Krauss J, Sorensen N, Roggendorf W (2003) Human ependymomas reveal frequent deletions on chromosomes 6 and 9. *Acta Neuropathol (Berl)* 106:357-362.
- Inbal B, Cohen O, Polak-Charcon S, Kopolovic J, Vadai E, Eisenbach L, Kimchi A (1997) DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature* 390:180-184.
- Jeuken JW, Sprenger SH, Gilhuis J, Teepen HL, Grotenhuis AJ, Wesseling P (2002) Correlation between localization, age, and chromosomal imbalances in ependymal tumours as detected by CGH. *J Pathol* 197:238-244.
- Korshunov A, Golanov A, Timirgaz V (2001) p14ARF protein (FL-132) immunoreactivity in intracranial ependymomas and its prognostic significance: an analysis of 103 cases. *Acta Neuropathol* 102:271-277.

- Korshunov A, Golanov A, Timirgaz V (2002) Immunohistochemical markers for prognosis of ependymal neoplasms. *J Neurooncol* 58:255-270.
- Korshunov A, Golanov A, Sycheva R, Timirgaz V (2004) The histologic grade is a main prognostic factor for patients with intracranial ependymomas treated in the microneurosurgical era: an analysis of 258 patients. *Cancer* 100:1230-1237.
- Korshunov A, Neben K, Wrobel G, Tews B, Benner A, Hahn M, Golanov A, Lichter P (2003) Gene expression patterns in ependymomas correlate with tumor location, grade, and patient age. *Am J Pathol* 163:1721-1727.
- Krebsgesellschaft, Deutsche, Ependymome. In:
<http://www.krebsgesellschaft.de/ependymome,18594.html>.
- Kudo H, Oi S, Tamaki N, Nishida Y, Matsumoto S (1990) Ependymoma diagnosed in the first year of life in Japan in collaboration with the International Society for Pediatric Neurosurgery. *Childs Nerv Syst* 6:375-378.
- Kurt E, Zheng PP, Hop WC, van der Weiden M, Bol M, van den Bent MJ, Avezaat CJ, Kros JM (2006) Identification of relevant prognostic histopathologic features in 69 intracranial ependymomas, excluding myxopapillary ependymomas and subependymomas. *Cancer* 106:388-395.
- Lamont JM, McManamy CS, Pearson AD, Clifford SC, Ellison DW (2004) Combined histopathological and molecular cytogenetic stratification of medulloblastoma patients. *Clin Cancer Res* 10:5482-5493.
- Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Bousiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ (2001) PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2:261-268.
- Löffler G (2002) Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. In, pp 228, 229: Springer Verlag.
- Lundin DA, Blank A, Berger MS, Silber JR (1998) Microsatellite instability is infrequent in sporadic adult gliomas. *Oncol Res* 10:421-428.
- Lyons MK, Kelly PJ (1991) Posterior fossa ependymomas: report of 30 cases and review of the literature. *Neurosurgery* 28:659-664; discussion 664-655.
- Maksoud YA, Hahn YS, Engelhard HH (2002) Intracranial ependymoma. *Neurosurg Focus* 13:e4.

- Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D (1995) 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1:686-692.
- Miura K, Suzuki K, Tokino T, Isomura M, Inazawa J, Matsuno S, Nakamura Y (1996) Detailed deletion mapping in squamous cell carcinomas of the esophagus narrows a region containing a putative tumor suppressor gene to about 200 kilobases on distal chromosome 9q. *Cancer Res* 56:1629-1634.
- Modena P, Lualdi E, Facchinetti F, Veltman J, Reid JF, Minardi S, Janssen I, Giangaspero F, Forni M, Finocchiaro G, Genitori L, Giordano F, Riccardi R, Schoenmakers EF, Massimino M, Sozzi G (2006) Identification of tumor-specific molecular signatures in intracranial ependymoma and association with clinical characteristics. *J Clin Oncol* 24:5223-5233.
- Monoranu (2008) Correlation between chromosome 6q25.3 deletion status and survival in pediatric intracranial ependymomas. *Cancer Genet Cytogenet*.
- Nazar GB, Hoffman HJ, Becker LE, Jenkin D, Humphreys RP, Hendrick EB (1990) Infratentorial ependymomas in childhood: prognostic factors and treatment. *J Neurosurg* 72:408-417.
- Needle MN, Goldwein JW, Grass J, Cnaan A, Bergman I, Molloy P, Sutton L, Zhao H, Garvin JH, Jr., Phillips PC (1997) Adjuvant chemotherapy for the treatment of intracranial ependymoma of childhood. *Cancer* 80:341-347.
- Nishiwaki T, Daigo Y, Kawasoe T, Nakamura Y (2000) Isolation and mutational analysis of a novel human cDNA, DEC1 (deleted in esophageal cancer 1), derived from the tumor suppressor locus in 9q32. *Genes Chromosomes Cancer* 27:169-176.
- Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA (1994) Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 368:753-756.
- Nobori T, Takabayashi K, Tran P, Orvis L, Batova A, Yu AL, Carson DA (1996) Genomic cloning of methylthioadenosine phosphorylase: a purine metabolic enzyme deficient in multiple different cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6203-6208.
- Okuda T, Shurtleff SA, Valentine MB, Raimondi SC, Head DR, Behm F, Curcio-Brint AM, Liu Q, Pui CH, Sherr CJ, et al. (1995) Frequent deletion of

- p16INK4a/MTS1 and p15INK4b/MTS2 in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 85:2321-2330.
- OMIM (2007) Methyladenosine Phosphorylase; MTAP. In: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=156540>.
- Patt S, Cervos-Navarro J (1992) Combined erbB gene overexpression and decreased H-ras gene expression in human gliomas. *Acta Histochem Suppl* 42:131-138.
- Patt S, Thiel G, Maas S, Lozanova T, Prosenc N, Cervos-Navarro J, Witkowski R, Blumenstock M (1993) Chromosomal changes and correspondingly altered proto-oncogene expression in human gliomas. Value of combined cytogenetic and molecular genetic analysis. *Anticancer Res* 13:113-118.
- Pollack IF, Gerszten PC, Martinez AJ, Lo KH, Shultz B, Albright AL, Janosky J, Deutsch M (1995) Intracranial ependymomas of childhood: long-term outcome and prognostic factors. *Neurosurgery* 37:655-666; discussion 666-657.
- Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlov I, Lee HW, Cordon-Cardo C, DePinho RA (1998) The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 92:713-723.
- Puget S, Grill J, Valent A, Bieche I, Dantas-Barbosa C, Kauffmann A, Dessen P, Lacroix L, Georger B, Job B, Dirven C, Varlet P, Peyre M, Dirks PB, Sainte-Rose C, Vassal G (2009) Candidate genes on chromosome 9q33-34 involved in the progression of childhood ependymomas. *J Clin Oncol* 27:1884-1892.
- Qi Y, Gregory MA, Li Z, Brousal JP, West K, Hann SR (2004) p19ARF directly and differentially controls the functions of c-Myc independently of p53. *Nature* 431:712-717.
- Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit. In.
- Qian J, Zhang XH, Yang JB, Wang JR, Zhang BC, Tang K, Li GY (2001) Cloning and Expression Analysis of a Novel Gene, UBAP1, Possibly Involved in Ubiquitin Pathway. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 33:147-152.
- Qian J, Zhang XM, Li XL, Wang JR, Li WF, Wang R, Li GY (2002) [Identification of digital differential expression patterns of a novel human gene (UBAP1) by an expressed sequence tag strategy]. *Ai Zheng* 21:225-228.

- Raveh T, Droguett G, Horwitz MS, DePinho RA, Kimchi A (2001) DAP kinase activates a p19ARF/p53-mediated apoptotic checkpoint to suppress oncogenic transformation. *Nat Cell Biol* 3:1-7.
- Reardon DA, Akabani G, Coleman RE, Friedman AH, Friedman HS, Herndon JE, 2nd, McLendon RE, Pegram CN, Provenzale JM, Quinn JA, Rich JN, Vredenburgh JJ, Desjardins A, Gururangan S, Badruddoja M, Dowell JM, Wong TZ, Zhao XG, Zalutsky MR, Bigner DD (2006) Salvage radioimmunotherapy with murine iodine-131-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 for patients with recurrent primary and metastatic malignant brain tumors: phase II study results. *J Clin Oncol* 24:115-122.
- Rickert CH (2004) Prognosis-related molecular markers in pediatric central nervous system tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:1211-1224.
- Rickert CH, Paulus W (2004) Comparative genomic hybridization in central and peripheral nervous system tumors of childhood and adolescence. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:399-417.
- Riede (2004) *Allgemeine und spezielle Pathologie*, 5 Edition. Stuttgart: Thieme.
- Robertson PL, Zeltzer PM, Boyett JM, Rorke LB, Allen JC, Geyer JR, Stanley P, Li H, Albright AL, McGuire-Cullen P, Finlay JL, Stevens KR, Jr., Milstein JM, Packer RJ, Wisoff J (1998) Survival and prognostic factors following radiation therapy and chemotherapy for ependymomas in children: a report of the Children's Cancer Group. *J Neurosurg* 88:695-703.
- Rousseau P, Habrand JL, Sarrazin D, Kalifa C, Terrier-Lacombe MJ, Rekacewicz C, Rey A (1994) Treatment of intracranial ependymomas of children: review of a 15-year experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 28:381-386.
- Saab R, Bills JL, Miceli AP, Anderson CM, Khoury JD, Fry DW, Navid F, Houghton PJ, Skapek SX (2006) Pharmacologic inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 activity arrests proliferation in myoblasts and rhabdomyosarcoma-derived cells. *Mol Cancer Ther* 5:1299-1308.
- Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, Kawabata M, Miyazono K, Ichijo H (1998) Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *Embo J* 17:2596-2606.
- Scheil S, Bruderlein S, Eicker M, Herms J, Herold-Mende C, Steiner HH, Barth TF, Moller P (2001) Low frequency of chromosomal imbalances in anaplastic

- ependymomas as detected by comparative genomic hybridization. *Brain Pathol* 11:133-143.
- Schiffer D, Chio A, Giordana MT, Migheli A, Palma L, Pollo B, Soffietti R, Tribolo A (1991) Histologic prognostic factors in ependymoma. *Childs Nerv Syst* 7:177-182.
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366:704-707.
- Shu HK, Sall WF, Maity A, Tochner ZA, Janss AJ, Belasco JB, Rorke-Adams LB, Phillips PC, Sutton LN, Fisher MJ (2007) Childhood intracranial ependymoma: twenty-year experience from a single institution. *Cancer* 110:432-441.
- Simpson DJ, Clayton RN, Farrell WE (2002) Preferential loss of Death Associated Protein kinase expression in invasive pituitary tumours is associated with either CpG island methylation or homozygous deletion. *Oncogene* 21:1217-1224.
- Sowar K, Straessle J, Donson AM, Handler M, Foreman NK (2006) Predicting which children are at risk for ependymoma relapse. *J Neurooncol* 78:41-46.
- Sprenger SH, Gijtenbeek JM, Wesseling P, Sciort R, van Calenbergh F, Lammens M, Jeuken JW (2001) Characteristic chromosomal aberrations in sporadic cerebellar hemangioblastomas revealed by comparative genomic hybridization. *J Neurooncol* 52:241-247.
- Steiner MR, Urso JR, Klein J, Steiner SM (2002) Multiple astrocyte responses to lysophosphatidic acids. *Biochim Biophys Acta* 1582:154-160.
- Stone S, Dayananth P, Jiang P, Weaver-Feldhaus JM, Tavtigian SV, Cannon-Albright L, Kamb A (1995) Genomic structure, expression and mutational analysis of the P15 (MTS2) gene. *Oncogene* 11:987-991.
- Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Palmero I, Ryan K, Hara E, Vousden KH, Peters G (1998) The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *Embo J* 17:5001-5014.
- Stuben G, Stuschke M, Kroll M, Havers W, Sack H (1997) Postoperative radiotherapy of spinal and intracranial ependymomas: analysis of prognostic factors. *Radiother Oncol* 45:3-10.
- Szczylik C, Skorski T, Nicolaidis NC, Manzella L, Malaguarnera L, Venturelli D, Gewirtz AM, Calabretta B (1991) Selective inhibition of leukemia cell

- proliferation by BCR-ABL antisense oligodeoxynucleotides. *Science* 253:562-565.
- Tabori U, Ma J, Carter M, Zielenska M, Rutka J, Bouffet E, Bartels U, Malkin D, Hawkins C (2006) Human telomere reverse transcriptase expression predicts progression and survival in pediatric intracranial ependymoma. *J Clin Oncol* 24:1522-1528.
- Taylor MD, Poppleton H, Fuller C, Su X, Liu Y, Jensen P, Magdaleno S, Dalton J, Calabrese C, Board J, Macdonald T, Rutka J, Guha A, Gajjar A, Curran T, Gilbertson RJ (2005) Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma. *Cancer Cell* 8:323-335.
- Timmermann B, Kortmann RD, Kuhl J, Rutkowski S, Dieckmann K, Meisner C, Bamberg M (2005) Role of radiotherapy in anaplastic ependymoma in children under age of 3 years: results of the prospective German brain tumor trials HIT-SKK 87 and 92. *Radiother Oncol* 77:278-285.
- Timmermann B, Kortmann RD, Kuhl J, Rutkowski S, Meisner C, Pietsch T, Deinlein F, Urban C, Warmuth-Metz M, Bamberg M (2006) Role of radiotherapy in supratentorial primitive neuroectodermal tumor in young children: results of the German HIT-SKK87 and HIT-SKK92 trials. *J Clin Oncol* 24:1554-1560.
- Tong CY, Zheng PP, Pang JC, Poon WS, Chang AR, Ng HK (2001) Identification of novel regions of allelic loss in ependymomas by high-resolution allelotyping with 384 microsatellite markers. *J Neurosurg* 95:9-14.
- van de Kelft E, Verlooy J (1994) Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human gliomas. *J Neurosurg Sci* 38:203-208.
- van Veelen-Vincent ML, Pierre-Kahn A, Kalifa C, Sainte-Rose C, Zerah M, Thorne J, Renier D (2002) Ependymoma in childhood: prognostic factors, extent of surgery, and adjuvant therapy. *J Neurosurg* 97:827-835.
- Vanuytsel LJ, Bessell EM, Ashley SE, Bloom HJ, Brada M (1992) Intracranial ependymoma: long-term results of a policy of surgery and radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 23:313-319.
- Waldron JN, Laperriere NJ, Jaakkimainen L, Simpson WJ, Payne D, Milosevic M, Wong CS (1993) Spinal cord ependymomas: a retrospective analysis of 59 cases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 27:223-229.
- Weber RG, Hoischen A, Ehrler M, Zipper P, Kaulich K, Blaschke B, Becker AJ, Weber-Mangal S, Jauch A, Radlwimmer B, Schramm J, Wiestler OD, Lichter

- P, Reifenberger G (2007) Frequent loss of chromosome 9, homozygous CDKN2A/p14(ARF)/CDKN2B deletion and low TSC1 mRNA expression in pleomorphic xanthoastrocytomas. *Oncogene* 26:1088-1097.
- Wemmert S, Ketter R, Rahnenfuhrer J, Beerenwinkel N, Strowitzki M, Feiden W, Hartmann C, Lengauer T, Stockhammer F, Zang KD, Meese E, Steudel WI, von Deimling A, Urbschat S (2005) Patients with high-grade gliomas harboring deletions of chromosomes 9p and 10q benefit from temozolomide treatment. *Neoplasia* 7:883-893.
- WHO LDN, Ohgaki H, Wiestler O D, Cavenee W K (2007) WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System: WHO Classification of Tumours v. 1 (WHO Classification of Tumours).
- Xiao B, Fan S, Zeng Z, Xiong W, Cao L, Yang Y, Li W, Wang R, Tang K, Qian J, Shen S, Li X, Li G (2006) Purification of novel UBAP1 protein and its decreased expression on nasopharyngeal carcinoma tissue microarray. *Protein Expr Purif* 47:60-67.
- Yin XL, Hui AB, Pang JC, Poon WS, Ng HK (2002) Genome-wide survey for chromosomal imbalances in ganglioglioma using comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 134:71-76.
- Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG (1998) ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* 92:725-734.
- Zhu J, Guo SZ, Beggs AH, Maruyama T, Santarius T, Dashner K, Olsen N, Wu JK, Black P (1996) Microsatellite instability analysis of primary human brain tumors. *Oncogene* 12:1417-1423.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Myxopapilläres Ependymom. Tumorzellen, die papillär um vaskularisiertes Bindegewebe angeordnet sind. Mukoide Matrix zwischen Tumorzellen und Blutgefäßen.	3
Abbildung 2: Ependymom WHO-Grad II mit Pseudorosetten.	4
Abbildung 3: Anaplastisches Ependymom. Gesteigerte Zelldichte und eine deutlich erhöhte Mitoserate.	5
Abbildung 4: Heterozygoter Fall ohne Aberration; (1)= erstes Allel, (2)= zweites Allel. Das Verhältnis beider Allele zueinander ist gleich groß bei Tumor und Kontrolle.	12
Abbildung 5: Homozygoter Fall. Nur ein Allel ist vorhanden.	13
Abbildung 6: Aberration (Pfeil). Da im Tumor ein Allel aberriert ist, ist das Verhältnis beider Allele zueinander nicht mehr in Tumor und Kontrolle gleich.	13
Abbildung 7: Mikrosatelliteninstabilität; (1)= erstes Allel, (2)= zweites Allel. Der Pfeil zeigt auf einen zusätzlichen Peak, der in der Kontrolle nicht vorhanden ist und Mikrosatelliteninstabilität bedeutet.	13
Abbildung 8: Altersverteilung.	14
Abbildung 9: Graduierung; mEI= myxopapilläres Ependymom, EI= Ependymom, EIII= anaplastisches Ependymom.	17
Abbildung 10: Lokalisation; IT= infratentoriell, ST= supratentoriell.	18
Abbildung 11: Resektionsstatus.	19
Abbildung 12: Alter der Patienten.	20
Abbildung 13: Alle Fälle mit Aberrationen; rot= Aberration, schwarz= heterozygot, grau= homozygot, grün= keine Amplifikation. Marker in Regionen, in denen sich Aberrationen häuften, sind gelb hinterlegt.	21
Abbildung 14: Anzahl der Fälle mit und ohne Aberrationen aufgetrennt nach WHO-Grad und Lokalisation; mEI= myxopapilläres Ependymom Grad I, spEI= spinales Ependymom Grad II, itEI= infratentorielles Ependymom Grad II, stEI= supratentorielles Ependymom Grad II, spEIII= spinales Ependymom Grad III, itEIII= infratentorielles Ependymom Grad III, stEIII= supratentorielles Ependymom Grad III.	22
Abbildung 15: Relative Häufigkeit von Aberrationen bei Kindern unterteilt nach supratentoriellen und infratentoriellen Ependymomen.	23

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 16: Aberrationsstatus bei Erwachsenen.	23
Abbildung 17: Aberrationsstatus von DBCCR1.	24

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Mikrosatellitenmarker.	10
Tabelle 2: Klinische Daten; m= männlich; w= weiblich; IT= infratentoriell; ST= supratentoriell; cht= Chemotherapie; rt= Radiotherapie; EI-III= Ependyom Grad I-III.	15
Tabelle 3: Verteilung der Aberrationen für die einzelnen Tumortypen; IT= infratentoriell, ST= supratentoriell, m= männlich, w= weiblich.	16
Tabelle 4: Marker mit dazugehörigen Genen.....	25

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben, ganz herzlich bedanken.

Herrn Professor Roggendorf danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, für die stete Diskussionsbereitschaft und wertvolle Anregungen zu dieser Arbeit und der damit verbundenen Veröffentlichung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Camelia-Maria Monoranu für die Unterstützung in der Einarbeitungsphase, für die Hilfe beim Verfassen und der Einreichung der Veröffentlichung und für die motivierende und gute Zusammenarbeit während der gesamten Entstehungsphase dieser Arbeit. Wenn irgendwelche Probleme auftraten oder es Diskussionsbedarf gab, konnte ich immer darauf zählen, dass sie Zeit für mich fand.

Frau Hannelore Schraud danke ich für die Beratung und Unterstützung bei den Laborarbeiten und für die vielen Telefonanrufe, die sie für mich unternommen hat, um Patientendaten zu aktualisieren.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Bernhard Puppe, der den allergrößten Teil der statistischen Auswertung durchgeführt hat.

Nur durch die Unterstützung meiner Eltern war mein Medizinstudium und damit die Erstellung dieser Dissertation überhaupt möglich. Dafür vielen Dank!

Und ganz besonders danke ich noch meinem Mann Reinhard Gentner für die tatkräftige Unterstützung, die vielen Stunden vor dem Computer u.a. bei Erstellung der Graphiken und alle wertvollen Anregungen.

Lebenslauf

Name Doreen Karin Gentner, geb. Schneider
Geburtsdatum 01.11.1983
Geburtsort Donauwörth

Familiäre Verhältnisse

Eltern **Johann Schneider**, Rechtsanwalt
Andrea Schneider, Rechtsanwältin

Geschwister **Kathrin Schneider**, Studentin
Johannes Schneider, Schüler

Ehemann **Reinhard Gentner**, Dr.-Ing., Dipl.-Wirtsch.-Ing.

Ausbildung

09/1990-08/1994 Grundschule Huisheim-Gosheim
09/1994-07/2003 Gymnasium Donauwörth
05/2003 Abitur
10/2003 Beginn des Medizinstudiums an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg:
08/05 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
03/06 Beginn der Dissertation bei Prof. Dr. med. Wolfgang Roggendorf in der Abteilung Neuropathologie des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg mit dem Thema „Chromosom 9 in Ependymomen – Eine Mikrosatellitenanalyse“
08/08-10/08 PJ in der Uniklinik Würzburg (Innere Medizin)

10/08-12/08	PJ im Queen-Elizabeth-Hospital der University of the West Indies, Bridgetown, Barbados (Innere Medizin)
12/08-06/09	PJ im Klinikum Coburg (Pädiatrie/Chirurgie)
10/09	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Würzburg, 29.12.09

Doreen Gentner