

Aus dem Institut für Pathologie der
Universität Würzburg
- Abteilung Neuropathologie -

Direktor: Professor Dr. med. A. Rosenwald

Immunhistochemische Marker für die Prognose und Proliferation in Ependymomen bei Kindern und Erwachsenen

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Roland Gregor Stein

aus Grebenhain

Würzburg, Januar 2012

Referent: Prof. Dr. med. Wolfgang Roggendorf

Kolloquium: Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald (aufgrund des Todes von Prof. Dr. med. W. Roggendorf am 31.07.2012)

Koreferentin: Prof. Dr. med. Cordula Matthies

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 16.11.2012

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 Definition.....	1
1.2 Epidemiologie und Lokalisation.....	1
1.3 WHO-Klassifikation und Histologie von Ependymomen	2
1.4 Genetik und Prognoseparameter von Ependymomen	7
1.5 Problemstellung.....	9
1.5.1 Bezug zu vorherigen Veröffentlichungen	9
1.5.2 Aktueller Kenntnisstand	10
1.5.2.1 HCK.....	10
1.5.2.2 CDKN2b	12
1.5.2.3 MTAP	13
1.5.2.4 DBC1.....	13
1.6 Ziele der Arbeit	14
2 MATERIAL UND METHODEN.....	15
2.1 Fallauswahl	15
2.2 Vorbereitung der Gewebeproben	16
2.3 Grundlagen der Immunhistochemie [83]	17
2.3.1 Polyklonale Antikörper.....	17
2.3.2 Monoklonale Antikörper.....	18
2.3.3 Immunhistochemische Methoden.....	18
2.4 Schwierigkeiten und Fehlerquellen.....	21
2.5 Chromogene Reaktion.....	23
2.6 Allgemeine Schritte und Entwicklung.....	24
2.7 Spezielle Vorbehandlung	27
2.7.1 Ki67	27

2.7.2 HCK	27
2.7.3 CDKN2b.....	28
2.7.4 MTAP	28
2.7.5 DBC1	29
2.8 Kriterien der Auswertung.....	29
2.8.1 Ki67	29
2.8.2 CDKN2b.....	30
2.8.3 HCK.....	30
2.8.4 DBC1	31
2.8.5 MTAP	31
2.9 Statistische Methoden	31
3 ERGEBNISSE	32
3.1 Klinikopathologische Korrelation.....	32
3.2 HCK	40
3.3 CDKN2b.....	42
3.4 MTAP	43
3.5 DBC 1.....	43
4 DISKUSSION.....	48
4.1 HCK.....	48
4.2 CDKN2b und MTAP.....	50
4.3 DBC1	51
5 ZUSAMMENFASSUNG	55
6 ANHANG	57
6.1 Abkürzungsverzeichnis.....	57
6.2 Abbildungsverzeichnis.....	59
6.3 Tabellenverzeichnis	60
6.4 Literaturverzeichnis	61

1 EINLEITUNG

1.1 Definition

Ependymome sind hirneigene Tumoren, die aus den Ependymzellen des Ventrikelsystems und des spinalen Zentralkanals entstehen. Selten können sie sich aus versprengten embryonalen Residuen entwickeln.

1.2 Epidemiologie und Lokalisation

Die Gruppe der Ependymome macht etwa 5 bis 10% aller Gliome aus. Ependymome sind typische Tumoren des Kindes und des jungen Erwachsenen. Dabei sind Altersgipfel bei Kindern unter 10 Jahren sowie im Erwachsenenalter zwischen 30 und 40 Jahren zu beobachten [1, 2]. Bei Kindern sind sie die dritthäufigste Tumorentität im zentralen Nervensystem (ZNS), bei Erwachsenen findet man sie hingegen nur bei 2-3% der ZNS-Tumoren [3].

Ependymome liegen aufgrund der Lokalisation des Ausgangsgewebes meist im Ventrikelsystem oder in den ableitenden Liquorwegen, am häufigsten hierbei im vierten Ventrikel. Weitere typische Lokalisationen der Häufigkeit nach geordnet sind der Spinalkanal, die Seitenventrikel sowie der dritte Ventrikel. Sehr selten findet man auch außerhalb des Ventrikelsystems etwa intrazerebral oder sogar in extraneuraler Lokalisation (z.B. im Ovar) entstandene Ependymome [4-6].

Das myxopapilläre Ependymom ist typischerweise am Conus medullaris oder der Cauda equina lokalisiert. Es weist besonders bei Erwachsenen eine hohe Inzidenz auf [2].

Kinder entwickeln hingegen selten spinale, sondern vor allem infratentoriell gelegene Ependymome, welche vom Boden des vierten Ventrikels ausgehen. Von dort aus kann sich der Tumor zuweilen durch die lateralen und ventralen Foramina bis in die Fossa posterior ausbreiten.

Supratentorielle Ependymome findet man sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen ohne Geschlechtspräferenz. Sie liegen typischerweise in den Seitenventrikeln oder im Bereich der Mittellinie [1].

1.3 WHO-Klassifikation und Histologie von Ependymomen

Die 2007 von der World Health Organization (WHO) publizierte Tumorklassifikation [2] unterteilt Tumoren nach ihren histologischen Charakteristika in vier Gruppen mit ansteigender Malignität. WHO Grad I entspricht hierbei einem benignen, WHO Grad IV einem hochmalignen Tumor. Entsprechend dieser Einteilung existieren Ependymome in den WHO Graden I bis III (Abbildung 1). Das Subependymom und das myxopapilläre Ependymom sind nach WHO Grad I zu klassifizieren, WHO Grad II repräsentiert das Ependymom. Die Form mit höchster Malignität ist das anaplastische Ependymom des WHO Grades III.

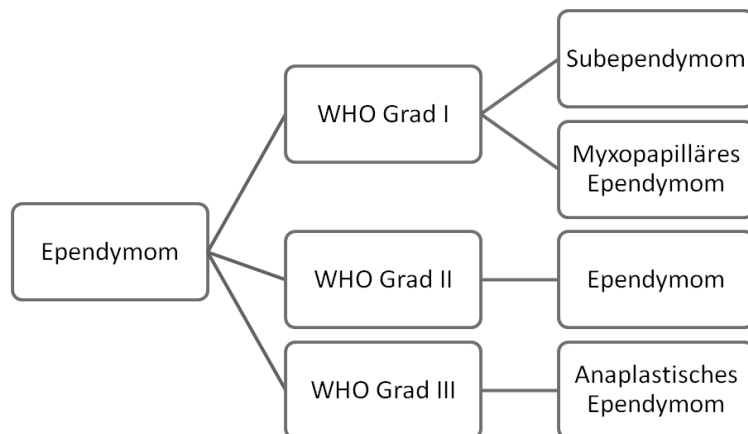


ABBILDUNG 1:WHO-GRAD-EINTEILUNG DER EPENDYMOE

Subependymom (WHO Grad I)

Diese Gruppe von benignen Ependymomen weist ein sehr langsames Wachstum auf. Ein Tumordurchmesser von 1 bis 2 Zentimetern wird selten überschritten. Das Tumorgewebe besteht aus Foci von monomorphen Tumorzellen in fibrillärer Matrix mit zum Teil mikrozystischen Veränderungen und manchmal makrovaskulärer Proliferation. Zum umliegenden Gewebe ist der Tumor klar abgegrenzt. Mitosen sind sehr selten oder nicht nachweisbar. Die Proliferationsindices liegen unter 1%. Mitunter sind Kalzifikationen oder Hämorrhagien vorhanden.

In manchen Subependymomen sind Bereiche höhergradiger Ependymome nachweisbar. Sie werden dann als ‚Mixed Ependymoma / Subependymoma‘ bezeichnet und entsprechend der Ependymomkomponente graduiert [2].

Subependymome sind typischerweise der Ventrikelwand adhärent. Da sie meist asymptomatisch bleiben, ist die tatsächliche Inzidenz schwer zu beurteilen. Sie wird mit 8,3% aller Ependymome angegeben [1].

Subependymome treten bevorzugt im mittleren und höheren Alter sowie häufiger bei Männern auf. Das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Patienten beträgt 2,3 zu 1 [2].

In 50 bis 60% der Fälle liegen Subependymome im vierten Ventrikel, in 30-40% in den Seitenventrikeln. Selten findet man Subependymome im dritten Ventrikel oder am Septum pellucidum. Auch intramedulläre zervikale oder zervikothorakale und sehr selten extramedulläre Lokalisationen sind beschrieben [18].

Die Prognose für Subependymome ist gut, da die chirurgische Entfernung meist bereits kurativ ist. Rezidive sind nur in einigen Fällen nach inkompletter Resektion bekannt [19].

Auch familiär auftretende Subependymome wurden beschrieben [20].

Über die von den anderen Ependymomen wohl unterschiedliche Histogenese liegen verschiedene Hypothesen vor. Am wahrscheinlichsten erscheinen subependymale Gliazellen als Ursprungsgewebe [21, 22]. Es liegen Hinweise auf die Entstehung aus Astrozyten der subependymalen Platte, ependymalen Zellen [23] oder einer Mischung aus Astrozyten und ependymalen Zellen [24] vor.

Myxopapilläres Ependymom (WHO Grad I)

Insgesamt sind 9-13% aller Ependymome myxopapilläre Ependymome [1, 7].

Typischerweise liegen sie in der Region von Conus medullaris, Cauda equina und Filum terminale. Selten wurden sie auch andernorts im ZNS nachgewiesen [8-10]. Eine spezielle Subgruppe bilden myxopapilläre Ependymome, die subkutan sacrococcygeal oder präsakral vermutlich aus ektopen Ependymzellresiduen entstehen [11]. Myxopapilläre Ependymome des Filum terminale scheinen häufiger bei Männern als bei Frauen aufzutreten (Ratio 2,2 : 1) [12].

Myxopapilläre Ependymome wachsen langsam und treten meist im jungen Erwachsenenalter auf. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 36,4 Jahren [12]. Eine Kapsel grenzt den Tumor meist klar zum umliegenden Gewebe ab, infiltratives Wachstum tritt gewöhnlich nicht auf.

Histologisch findet man Tumorzellen, die papillär um gefäßreiches, mukoides Stroma angeordnet sind. Ihre mitotische Aktivität ist meist gering bis nicht nachweisbar. Die Proliferationsindizes liegen zwischen 0,4 und 1,6% [13].

Für diese Subgruppe der Ependymome ist das Behandlungsergebnis gut. Sowohl nach totaler als auch nach partieller Resektion liegt die Überlebenszeit meist bei über zehn Jahren [14]. Nach inkompletter Resektion wurden jedoch in

einigen Fällen sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern Rezidive sowie Fernmetastasen beobachtet [15, 16].

Während wiederum bei kompletter Tumorresektion nicht mit Rezidiven oder Fernmetastasen zu rechnen ist [4], wurden bereits Disseminationen per continuitatem im Subarachnoidalraum festgestellt [17].

Die Subgruppe der subcutan sacrococcygealen Ependymome weist eine signifikante Rate von Rezidiven und Fernmetastasen auf [11]. Bei intrasakraler Lokalisation kann das myxopapilläre Ependymom klinisch als Chordom erscheinen, einem aus Residuen der Chorda dorsalis entstehenden Tumor.

Ependymom (WHO Grad II)

Die Inzidenz des Ependymoms beträgt 3 bis 9% aller neuroepithelialen Tumoren. Bei Kindern sind 6 bis 12% der intrakraniellen Tumoren Ependymome, bei Kindern unter drei Jahren sogar 30% [25].

50 bis 60% der spinalen Gliome sind Ependymome [26].

Man findet bei dieser Gruppe von Tumoren zwei Altersgipfel:

- der erste im Mittel bei 6,4 Jahren für die infratentorielle Lage [27].
- der zweite bei 30-40 Jahren für spinal gelegene Tumoren [2].

Insgesamt konnte bei einer Studie mit 298 Patienten ein Verhältnis von infratentoriellen zu supratentoriellen Tumoren von 58% zu 42% beschrieben werden [1].

Bei Erwachsenen treten infratentorielle und spinale Ependymome mit vergleichbarer Frequenz auf [28].

Bei spinaler Lage treten Ependymome im Gegensatz zu myxopapillären Ependymomen am ehesten im Bereich des zervikalen und thorakalen Rückenmarkes auf.

Patienten mit Neurofibromatose Typ 2 (NF 2) entwickeln typischerweise spinale Ependymome, sodass man von einer entscheidenden Rolle des NF2-Gens in der Genese von Ependymomen ausgehen kann.

Ependymome sind klar abgegrenzte Gliome mit moderater Zelldichte und monomorpher Kernbeschaffenheit. Mitosen sind selten. Als Ursprungsgewebe vermutet man radiale Gliazellen [21].

Histologisch unterscheidet man zelluläre, papilläre, klarzellige und tanzytische Varianten. Auch andere Differenzierungen wie z.B. lipomatöse Ependymome sind beschrieben.

Typisch ist der mikroskopische Nachweis perivaskulärer Pseudorosetten, ependymaler Rosetten oder ependymaler Kanäle.

Eine Pseudorosette ist eine Gruppe von radiär um ein Gefäß angeordneten Tumorzellen, deren Kerne jeweils am lumenfernen Zellpol liegen. Diese Formationen findet man in der überwiegenden Mehrzahl der Ependymome.

Die deutlich selteneren ependymalen Rosetten und Kanäle sind charakterisiert durch säulenartig um ein zentrales Lumen angeordnete Tumorzellen.

Häufig findet man eine Hyalinisierung der Tumorgefäße und zuweilen auch regressive Veränderungen, die myxoides Gewebe, Knochen, Knorpel oder Hämorrhagien aufweisen.

Anaplastisches Ependymom (WHO Grad III)

Es handelt sich hierbei um ein häufiger bei Kindern auftretendes malignes Gliom, welches mit einer schlechteren Prognose verbunden ist. Die mitotische

Aktivität ist deutlich erhöht und es finden sich auch Gefäßproliferate und Nekrosen mit Pseudopalisadenbildung.

Anaplastische Ependymome treten häufiger intrakraniell auf und sind in der Regel invasiv wachsend.

An histopathologischen Charakteristika sind vor allem die hier häufig auftretenden Pseudorosetten zu nennen. Echte ependymale Rosetten sind selten erkennbar [2].

Das mikroskopische Bild ist zellreich und die Zellen relativ schlecht differenziert. Zuweilen sind auch Mitosen nachweisbar.

In zwei Untersuchungen mit 298 Fällen stellte sich keine eindeutige Korrelation zwischen Überlebenszeit und den klassischen histopathologischen Malignitätszeichen dar [1].

Die rezidivfreie Überlebenszeit von Patienten mit spinalen intramedullären Ependymomen wird entscheidend durch den Resektionsstatus bestimmt [29].

1.4 Genetik und Prognoseparameter von Ependymomen

Über die molekulargenetischen Veränderungen bei Entstehung und Progression von Ependymomen ist noch wenig Konkretes bekannt.

Verschiedene zytogenetische und molekulargenetische Studien zeigten strukturelle und numerische Aberrationen der Chromosomen 6, 7, 9, 10, 11, 13, 17 und 22 [30, 31]. Am häufigsten ist bei 30 % aller Ependymome eine Beteiligung von Chromosom 22 zu finden [32].

Häufig sind auch Verluste auf den Chromosomen 6q und 9q, wobei in supratentoriellen Ependymomen Chromosom 9 besonders betroffen ist [33-36].

Unter Verwendung der Comparative Genomic Hybridization (CGH) stellte man bei Ependymomen meist komplexe Aberrationsmuster fest. Am häufigsten

wurden Verluste auf Chromosom 1p, 4q, 6q, 9, 10, 13q, 16, 17, 19q, 20q und 22q entdeckt [35, 37-41].

Interessanterweise zeigen in der CGH nachgewiesene hohe Raten chromosomaler Imbalancen bei Ependymomen keine Korrelation mit höheren WHO-Graden [38].

Mit der Mikrosatellitenanalyse sind feinere molekulargenetische Analysen möglich. Ebenso wie Tong et al. [39] stellten Studien der Abteilung für Neuropathologie des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg Loss of Heterozygosity (LOH) Aberrationen auf 3p, 6q, 9p21, 9q34, 10q, 11q, 13q, 17p, 22q11.21-12.2 und 22q13.1-13.3 fest [42-44].

Welche Parameter für die Prognose bei Ependymomen relevant sind, wird kontrovers diskutiert. Klare Zusammenhänge existieren für folgende Faktoren:

1. **Alter:** Bei Kindern sind die Überlebensraten signifikant schlechter. Das liegt zum Teil an der bei Kindern häufiger vorkommenden Lokalisation in der Fossa posterior und den damit erschwerten Operationsbedingungen mit schlechterem Resektionsstatus (s.u.). Außerdem findet man im Kindesalter häufiger höhere Malignitätsgrade. Besonders schlecht ist die Prognose für Kinder unter 2 bzw. 3 Jahren [28, 45, 46]. Eine bessere Prognose fand man für Erwachsene, deren 5- und 10-Jahres-Überlebensraten bei 57,1% und 45% lagen [2].
2. Auch das **Ausmaß der operativen Resektion** scheint ein entscheidender Faktor zu sein, wobei inkomplette Resektion eine schlechtere Prognose bedeutet [45].
3. Ependymome in spinaler **Lokalisation** weisen auch aufgrund der besseren Resektibilität das beste Ergebnis in Bezug auf die Überlebenszeit auf, gefolgt von supratentoriellen und als letztes infratentoriellen Tumoren.
4. Von den **histopathologischen Kriterien** korrelieren nur der mitotische Index, Foci hyperzellulärer wenig differenzierter Areale oder vaskulärer

Proliferate mit einer schlechteren Prognose [1, 2, 47]. In einigen Publikationen wurde eine negative Korrelation zwischen dem Proliferationsindex und der Überlebenszeit festgestellt [33, 43, 48, 49]. Andere histologische Parameter konnten bisher von verschiedenen Studien nicht durch eindeutige Resultate bestätigt werden

5. Bei Kindern konnte u.a. ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von CSF - (cerebrospinal fluid) Metastasen und einem schlechten Behandlungsergebnis nachgewiesen werden [45].

Ein Korrelation zwischen WHO-Grad und Prognose konnte bisher lediglich für intrakranielle Ependymome im Kindesalter nachgewiesen werden [50].

Insgesamt ist neben Ki-67 noch kein praktikabler immunhistochemischer Parameter zur Einschätzung der Prognose bei Ependymomen bekannt.

1.5 Problemstellung

1.5.1 Bezug zu vorherigen Veröffentlichungen

In vorangegangenen Studien der Abteilung für Neuropathologie des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg wurden Ependymome sowohl mittels cDNA (complementary DNA) Microarray [51] als auch mittels Mikrosatellitenanalysen untersucht [44].

Lukashova-v. Zangen et al. [51] fanden beim Vergleich von Ependymomen mit hoher (über 15%) versus niedriger (unter 10%) Proliferationsrate bei der cDNA Microarray-Untersuchung heraus, dass u.a. das auf Chromosom 20q11-q12 lokalisierte HCK-Gen (Hematopoietic Cell Kinase - Gen) bei hochproliferativen Tumoren überexprimiert wird [51].

Schneider et al. [44] zeigten in der Mikrosatellitenanalyse von insgesamt 48 Ependymomen signifikante Aberrationen verschiedener Gene des Chromosoms

9. Unter anderem waren dies:

- Das DBC1-Gen auf 9q33.1 wies in 16 Tumoren nachweisbare Aberrationen auf. Die Fälle mit nachgewiesener Aberration fielen durch einen Trend zu besseren Überlebenszeiten auf, welcher aufgrund der kurzen Überwachungszeit nicht statistisch signifikant bewiesen werden konnte.
- Das CDKN2b-Gen und das MTAP-Gen auf 9p21.3 zeigten in 13 Fällen nachweisbare Aberrationen.

1.5.2 Aktueller Kenntnisstand

1.5.2.1 HCK

Bei HCK (Hematopoietic Cell Kinase) handelt es sich um eine Nicht-Rezeptortyrosinkinase aus der Src (Sarcoma) - Familie [52]. Die insgesamt neun Mitglieder dieser Enzymfamilie sind beteiligt an verschiedensten Prozessen der Zelle wie z.B. Proliferation, Differenzierung, Motilität und Adhäsion.

Das HCK-Gen liegt auf Chromosom 20q11-12, das Protein HCK besitzt einen aminoterminalen Zellmembrananker. [52] Es handelt sich dabei um ein Protoonkogen. [53]

HCK wird in Zellen der Hämatopoiese exprimiert, besonders in phagozytischen Zellen der myeloischen Linie wie etwa Granulozyten und Monozyten. [52, 54-56] Das Protein ist meist inaktiv, wird jedoch während der Mitose der Zelle aktiviert.

Es wird in unterschiedlichen Isoformen mit differentem Molekulargewicht exprimiert: Einem plasmamembranassoziierten oder zytoplasmatischen und einem lysosomen- und granulaassoziierten Protein [57]. Diese entstehen durch unterschiedliche Translation aus der gleichen mRNA [53, 58]. HCK scheint an der Signaltransduktion von Transmembranproteinen ins Zellinnere beteiligt zu sein [53, 59, 60].

In verschiedenen Studien wurden Verbindungen mit der Transformation von Zellen bei der Entstehung des CTCL (cutaneous T-cell lymphoma) beschrieben [61]. Eine direkte Interaktion von HCK mit dem BCR/ABL- Genprodukt (BCR = breakpoint cluster region; ABL = Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1) wurde bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) nachgewiesen [62]. Es handelt sich bei dem Genprodukt um ein Fusionsprotein, welches auf dem durch Translokation entstandenen Philadelphiachromosom codiert ist. Die aktivierte HCK phosphoryliert in CML-Zellen das STAT5B-Protein (Signal transducer and activator of transcription 5). STAT5 wird u.a. auch durch das BCR/ABL-Genprodukt aktiviert. Dies legt nahe, dass es sich hierbei um einen Aktivierungssignalweg handelt, der eventuell eine wichtige Rolle bei der BCR/ABL-abhängigen malignen Transformierung von myeloiden Zellen darstellt [63].

Für eine onkogene Aktivität des Genes scheinen sowohl die plasmamembran- als auch die lysosomenassoziierte Proteinisoform benötigt zu werden [64].

Beim Adenokarzinom des Pancreas wurde eine Korrelation unter anderem mit einer Amplifikation von HCK bei besonders hochmalignen Phänotypen augenscheinlich [65].

Auch in der Proliferation der Zellen beim Multiplen Myelom wurde der HCK eine Schlüsselrolle nachgewiesen [66].

HCK wirkt außerdem bei der Aktivierung der Mikroglia im ZNS mit [67].

Die Suszeptibilität von Makrophagen für die Infektion mit dem Humanen Immundefizienz Virus 1 (HIV 1) scheint durch HCK beeinflusst zu werden [68].

Es existiert mit Dasatinib ein medikamentöser Hemmer der Familie der src-Tyrosinkinase [69].

1.5.2.2 CDKN2b

Das Gen für CDKN2b (Cyclin dependent kinase inhibitor 2B) liegt auf Chromosom 9p21.

In der kindlichen akuten lymphatischen Leukämie (ALL) ist es häufig deletiert [70].

Durch Hannon und Beach [71] wurde erstmals das von CDKN2b kodierte Protein p15 beschrieben, welches in humanen Keratinozyten durch Applikation von TGF beta (Transforming growth factor beta) in seiner Konzentration 30-fach erhöht werden konnte. Dieser Wachstumsfaktor inhibiert die Proliferation durch Arrest der Zelle in der G1-Phase. Für die Mitose ist die Überwindung des G1-Phase Zellzyklusarrests nötig. Dies geschieht durch die beiden Proteine CDK4 und CDK6 (Cyclin dependent protein kinase 4 und 6) [72]. Nach Bildung eines Komplexes mit Cyclin D bzw Cyclin E phosphorylieren diese das Retinoblastomprotein (Rb). Dieses setzt daraufhin den vormals gebundenen Transkriptionsfaktor E2F frei, welcher besonders für die DNA-Synthese benötigte Gene aktiviert.

CDKN2b scheint also ein Effektor des TGF-beta-induzierten Zellzyklusarrests in der G1-Phase zu sein.

Genetische Aberrationen im Bereich von Chromosom 9p21 sind in verschiedenen Krebszelllinien nachgewiesen [71, 73].

Die ektope Expression von p15 inhibiert das Wachstum von Zellen, die von Tumoren abgeleitet sind [74]. Stone et al schlossen daraus, dass p15 eine Rolle bei der Wachstumsregulation spielt, bei der Tumorprogression aber von geringerer Bedeutung ist.

1.5.2.3 MTAP

Auch dieses Gen liegt auf Chromosom 9p21 direkt benachbart zu CDKN2b.

Das Enzym MTAP (Methylthioadenosinphosphorylase) spielt eine wichtige Rolle im Polyaminstoffwechsel. Es ist entscheidend für den Abbau von Adenin und Methionin [75, 76].

Nobori et al. wiesen häufige Deletionen des Gens bei akuten lymphoblastischen Leukämien der T-Zellreihe nach [77]. Entscheidend sei dafür jedoch mehr als die direkte Bedeutung bei der Tumorprogression die Nähe zu den Genen CDKN2a und CDKN2b auf Chromosom 9, denen die Autoren eine wichtigere Rolle zuwiesen.

1.5.2.4 DBC1

Das für die Expression von DBC1 (Deleted in bladder cancer 1) codierende Gen liegt auf Chromosom 9q32-33.

Sowohl in superfiziell papillärem Karzinom wie auch in invasivem Transitionalzellkarzinom der Blase ist es häufig aberriert oder durch Methylierung nicht mehr exprimiert. Habuchi et al. identifizierten 9q32-33 als häufig von LOH betroffene Region [78]. Sie wiesen nach, dass das DBC1-Gen zwar in den meisten normalen humanen Zellen exprimiert wird, dass aber in 5 von 10 Fällen bei Blasenkrebs-Zelllinien keine mRNA synthetisiert wurde [79].

Beetz et al. fanden bei der Untersuchung von Astrozytomen heraus, dass bei den meisten Tumoren die mRNA-Expression des DBC1-Gens deutlich reduziert war und eine Korrelation mit dem Tumorgrad bestand. Bei 21% konnte sogar ein Verlust des DBC1 bewiesen werden [80].

Die Autoren schlossen dadurch auf eine größere Wichtigkeit der Rolle von DBC1 bei der Tumorsuppression als bisher angenommen.

1.6 Ziele der Arbeit

Erstes Ziel der aktuellen Untersuchung war der Nachweis einer möglichen Korrelation zwischen immunhistochemischer Reaktivität der verschiedenen Ependymomgruppen für HCK und der Proliferation in Analogie zu den Ergebnissen von Lukashova et al [51].

Als zweites Ziel wurde der Nachweis von Effekten einer von Schneider et al [44] nachgewiesenen Aberration auf Proteinebene, also die Feststellung einer möglichen Korrelation zwischen der immunhistochemischen Reaktivität für die Genprodukte DBC1, CDKN2b und MTAP und der nachgewiesenen Aberration, festgelegt.

Das dritte Ziel war eine Untersuchung von Zusammenhängen zwischen immunhistochemischer Reaktivität und Parametern wie Proliferation, Tumorprogression, WHO-Grad und der Überlebenszeit.

Somit ließen sich eventuelle immunhistochemische Marker für die Einschätzung der Prognose eines Ependyompatienten identifizieren.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Fallauswahl

Zur Untersuchung gebracht wurden insgesamt 59 formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Ependymomproben von 23 pädiatrischen und 32 erwachsenen Ependymompatienten. Die Patienten wurden bis auf zwei Ausnahmen (A15s – Münster, C28it - Leipzig) an der Universitätsklinik für Neurochirurgie in Würzburg zwischen 1988 und 2005 operiert. Befunde und Einteilung in WHO-Grade wurden für die Proben im Pathologischen Institut der Universität Würzburg, Abteilung Neuropathologie, erstellt. Die pädiatrischen Patienten wurden nach dem HIT-Protokoll der deutschen Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie behandelt [81, 82]. Alle Gewebeproben von Primärtumoren wurden vor dem Beginn einer Bestrahlung und/oder Chemotherapie entnommen. Die Rezidivtumore waren nach Durchführung einer kombinierten Radiochemotherapie entfernt worden. Weitere Informationen über die Patienten, etwa über Weiterbehandlung und Verlauf der Erkrankung, stammen aus dem Archiv der Neurochirurgischen Klinik und der Kinderklinik der Universität Würzburg.

In dieser Arbeit wurde entsprechend dem Erkrankungsalter jedem Fall ein Kennbuchstabe (C für children mit einem Erkrankungsalter bis 18 Jahren, A für adult mit einem Erkrankungsalter über 18 Jahren) zugeordnet. Die Fälle wurden dann nummeriert und die jeweilige Tumorlokalisation mit den Buchstaben ‚s‘ für spinal, ‚st‘ für supratentoriell und ‚it‘ für infratentoriell gekennzeichnet.

Zur Bestimmung des Proliferationsindex lagen bereits bei jedem Ependymom angefertigte Ki67-Untersuchungen vor. Diese wurden erneut ausgewertet.

Des Weiteren wurde eine Einteilung der Präparate in Gruppen nach Lokalisation und WHO Grad vorgenommen. Dies ist in Abbildung 2 erkennbar.

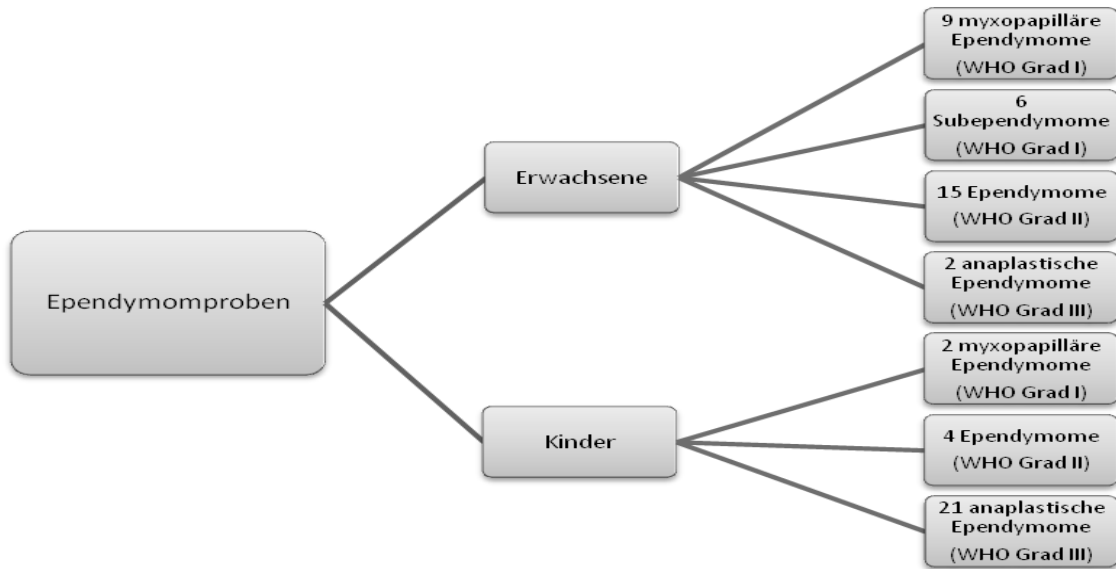


ABBILDUNG 2: VERTEILUNG DER UNTERSUCHTEN PROBEN NACH ALTER UND WHO-GRAD

2.2 Vorbereitung der Gewebeproben

Schneiden der Gewebelöcke

Zu Beginn wurden von den bereits formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Ependymomproben an einem Leica SM 2000 R Microtom 4µm dünne Schnitte angefertigt, die auf spezielle Super Frost Objektträger aufgezogen wurden. Diese Objektträger haben durch ihre Beschichtung eine permanent positive Oberflächenladung und sorgen so für eine Adhäsion von paraffineingebettetem Gewebe. Das verhindert ein leichtes Abschwimmen der Schnitte beim Färbeprozess und ermöglicht gleichzeitig ein Erhitzen der Proben. Die angefertigten Schnitte wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Entparaffinieren der Gewebsschnitte

Nach zwei mal 10 Minuten in Xylol wurden die Schnitte zwei mal 5 Minuten in 100% Ethanol, zwei mal 5 Minuten in 96% Ethanol und zwei mal 5 Minuten in 70% Ethanol entparaffiniert und zum Schluss mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) gespült.

2.3 Grundlagen der Immunhistochemie [83]

2.3.1 Polyklonale Antikörper

Kommen die B-Lymphozyten eines Tieres, meist Kaninchen oder Ziege, in Kontakt mit einem ihnen unbekanntem Antigen, so entwickeln sie sich zu einem Klon von Plasmazellen und beginnen mit der Produktion von Antikörpern gegen ein Epitop des jeweiligen Antigens. Zur Stimulation der Antikörperproduktion wird das Antigen dem Tier oft intradermal oder subkutan injiziert. Jedoch ist auch eine Applikation in die Muskulatur oder den Peritonealraum möglich. Das Antigen wird hierbei meist in komplettem oder inkomplettem Freund'schem Adjuvans suspendiert, um eine intensivere Immunreaktion hervorzurufen.

Dabei können verschiedene B-Lymphozyten Antigene gegen unterschiedliche Epitope ein und desselben Antigens produzieren. So bilden sich verschiedene Klone von Plasmazellen, die differierende Antikörper produzieren.

Die so sezernierten Antikörper können nachfolgend aus dem Blut des Tieres extrahiert werden.

2.3.2 Monoklonale Antikörper

Diese werden von Plasmazellklonen gebildet. Antikörper eines Klons sind immunchemisch identisch. Sie besitzen Affinität zu demselben Epitop.

Die Herstellung monoklonaler Antikörper findet fast ausschließlich in Mäusen statt. Nach der Applikation des jeweiligen Antigens werden etwa aus den Lymphknoten oder der Milz der Maus B-Lymphozyten gewonnen. Diese fusioniert man mit nicht-sekretorischen Maus-Myelomzellen. So entstehen immortale sekretorische Hybridomzellen, die nach Kultivierung auf ihre spezifische Reaktivität überprüft werden.

Die weitere Vermehrung der Zellen findet in Kulturmedien oder nach Einbringen in den Peritonealraum einer syngenetischen Maus statt.

Die homogenen Antikörper können dann aus dem Aszites der Maus gewonnen werden. Sie zeichnen sich durch das Fehlen unspezifischer Antikörper aus.

2.3.3 Immunhistochemische Methoden

Die Immunhistochemie basiert auf der spezifischen Bindung von Primärantikörpern an ein Epitop eines Antigens. Der Primärantikörper ist somit gegen einen Teil des Zielproteins gerichtet, an den er spezifisch bindet. Im Gewebe präzipitierte Antikörper können nun mit verschiedenen Methoden nachgewiesen werden.

Welche Farbe bei der enzymatischen Umsetzung entsteht, hängt vom verwendeten Chromogen ab [84-86]. Für unsere Untersuchungen wurde 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) eingesetzt, welches ein rotes Reaktionsprodukt ergibt.

Eine gängige immunhistochemische Untersuchungsmethode ist die **Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode)**. Sie beruht auf der starken Affinität von Avidin zu dem Vitamin Biotin (Dissoziationskonstante 10^{-19}M). Das

Glykoprotein Avidin hat vier Bindungsstellen und ein Molekulargewicht von 68kDa. Sein isoelektrischer Punkt (IEP) liegt bei 10. Um die durch den hohen IEP und die Zuckeranteile des Moleküls verursachte relativ starke unspezifische Bindung im Gewebe zu verringern, bedient man sich eines analogen Proteins, des von *Streptomyces avidinii* produzierten Streptavidins. Dieses hat durch einen im sauren pH-Bereich liegenden IEP und ein Molekulargewicht von 60kDa sowie die fehlende Zuckergruppe optimierte Eigenschaften [87]. Biotin als wasserlösliche Vitamin-H-Form ist mit einem Molekulargewicht von 244Da ein sehr kleines Molekül. Somit können pro Antikörpermolekül mehrere Biotinmoleküle gebunden werden. Auch bei dieser Methode bindet ein unkonjugierter Primärantikörper an das Gewebsantigen. Der gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtete Sekundärantikörper ist biotinyliert. An diesen bindet der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex und ermöglicht so am Ende die chromogene Reaktion.

Bei den aktuellen Untersuchungen wurde eine ABC-Modifikation verwendet: Die **Labelled Avidin Biotin-Methode (LAB-Methode, siehe auch Abbildung 3)**. Hier wird anstelle des ABC nur ein Komplex aus Streptavidin und Peroxidase eingesetzt. Die LAB-Methode ist 4-8 mal sensitiver als die ABC-Methode [88].

Das verwendete Super Sensitive IHC Detection System von BioGenex besteht aus einer Multi-Link- und einer Label-Lösung.

Die Multi-Link-Lösung enthält polyklonale IgG-Sekundärantikörper aus der Ziege. Diese reagieren mit den Fc-Fragmenten von Antikörpern aus der Maus, dem Kaninchen, dem Meerschweinchen und der Ratte, welche an ihrem Fc-Fragment biotinyliert sind.

Die Label-Lösung enthält mit Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase, HRP) konjugierte Streptavidinmoleküle (LAB = Labelled Avidin Biotin Technique).

Bei der Inkubation des Primärantikörpers bindet dieser spezifisch an sein Epitop. Die überstehende Lösung wird abgespült. Im zweiten Schritt wird dann die Link-Lösung aufgetragen. Nun bindet während der 30-minütigen

2 MATERIAL UND METHODEN

Inkubationszeit der biotinylierte Sekundärantikörper an das Fc-Fragment des Primärantikörpers. Auch hier wird der Überstand an Lösung ab gespült. Im dritten Schritt wird durch Zugabe der Label-Lösung für 30 Minuten die Bindung der Meerrettichperoxidase-gebundenen Streptavidinmoleküle an die Biotin-Gruppe des Sekundärantikörpers ermöglicht. Erneut spült man die übrige Lösung ab. Die indirekt präzipitierte Meerrettichperoxidase kann dann durch Zugabe eines chromogenen Substrates nachgewiesen werden.

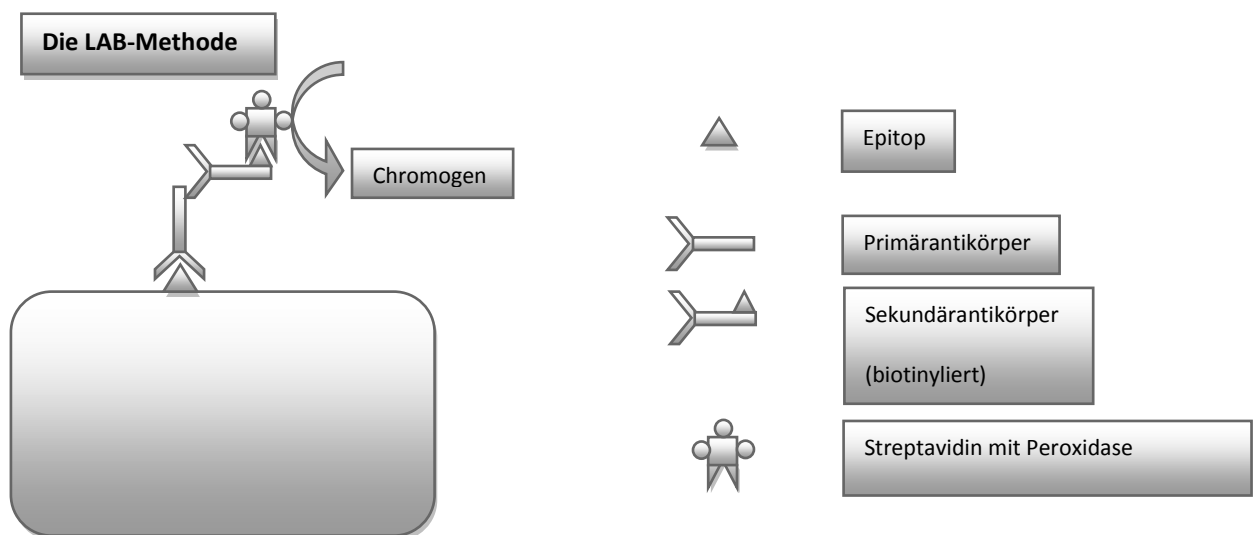


ABBILDUNG 3: DIE LAB-METHODE

2.4 Schwierigkeiten und Fehlerquellen

Unspezifische Hintergrundanfärbung

Da Antikörper neben ihrer spezifischen Bindung an ein Epitop eines Antigens auch aufgrund verschiedener Interaktionen unspezifisch im Gewebe binden können und diese Bindung ebenfalls durch das Chromogen nachgewiesen wird, ist es nötig, die unspezifische Bindung der Antikörper weitgehend zu minimieren. Hierzu gibt es verschiedene Möglichkeiten der Einflussnahme:

Endogene Enzymaktivitäten

Viele Gewebe enthalten endogene Peroxidasen, die zu einer unspezifischen Anfärbung der Probe führen können. Beispiele hierfür sind etwa Hämoglobin (besonders in Erythrozyten), Myoglobin (besonders in Muskelzellen), Zytochrome (besonders in Granulozyten, Monozyten) oder Katalasen (besonders in Leber und Nieren). Sie enthalten wie die HRP eine Hämgruppe.

Um dies zu verhindern wird die endogene Peroxidase durch Zugabe eines Substratüberschusses [Wasserstoffperoxid (H_2O_2) - Lösung für 10 Minuten] gehemmt.

Hydrophobe Interaktionen

Viele Proteine sind durch ihren Gehalt an neutralen aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin) hydrophob. Diese Eigenschaft wird durch die Fixation des Gewebes mit aldehydhaltigen Lösungen wie etwa Formalin oder Glutaraldehyd noch verstärkt, da hierbei Vernetzungen reaktiver Alpha- und Epsilon-Aminosäuren sowohl innerhalb eines als auch zwischen benachbarten Proteinmolekülen entstehen. Durch optimale Fixationsbedingungen kann dieser Effekt allerdings verringert werden.

Da aber gerade die Immunglobuline eine besonders starke Hydrophobie aufweisen, können diese Interaktionen eine Verschlechterung des Färbeergebnisses bewirken. Um die Hydrophobie zu verringern bedient man sich zweier verschiedener Einflussgrößen: Ionen können die Hydrophobie vermindern. Dies funktioniert z.B. über Phosphat-, Sulfat-, Chlorid-, Nitrat-, Thiozyanat-, Ammonium-, Kalium-, Natrium- oder Calciumionen.

Durch Zugabe einer Proteinlösung (hier Ziegenserum) können die hydrophoben Bindungsstellen im Gewebe blockiert werden. Dies funktioniert nur, wenn die Proteinlösung vom gleichen Tier stammt wie die Sekundärantikörper. So wird auch eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers im Gewebe verhindert.

Durch diese Maßnahmen kann eine unspezifische Hintergrundanfärbung minimiert werden.

Elektrostatische Interaktionen

IgG-Antikörper haben einen IEP zwischen 5,8 und 7,3. Bei einem pH zwischen 7 und 7,8 liegen so überwiegend negative Oberflächenladungen vor. Mit positiv geladenen Gewebsproteinen ist dadurch eine unspezifische Interaktion möglich.

Allgemein können elektrostatische Wechselwirkungen durch die Verwendung von Puffern mit hohen Ionenkonzentrationen – etwa Natriumchlorid – vermindert werden.

Natürliche Antikörper

Es können auf physiologischem Wege während der Antikörperproduktion im Tier durch Applikation von Freund'schem Adjuvans auch Antikörper gegen natürliche Antigene vermehrt gebildet werden und im Antiserum enthalten sein. Diese führen eventuell zu unspezifischer Anfärbung. Meist sind die natürlichen Antikörper nicht präzipitierend und nur in so geringer Konzentration vorhanden,

dass ihr Effekt durch ausreichende Verdünnung des Antiserums und kurze Inkubationszeiten minimiert ist.

Technische Fehler

Während der Aufarbeitung und Färbung der Schnitte ist zu beachten, dass das Gewebe eine möglichst geringe Dicke aufweisen sollte. Beim Färbeprozess soll auch ein Austrocknen der Schnitte verhindert werden, da man sonst mit falsch negativen Ergebnissen rechnen muss [86].

Das Abschwimmen der Gewebsschnitte im Puffer wird durch die SuperFrost/Plus Objektträger verhindert (s.o.).

2.5 Chromogene Reaktion

Zur Entwicklung wurde das Romulin AEC Chromogen Kit von Biocare Medical (Concord, CA 94529) verwendet. Hierbei handelt es sich um den bekannten Farbstoff 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) in Lösung mit Romulin. Dieser Zusatz bewirkt eine Unlöslichkeit des Chromogens in Alkohol und Xylol, sodass die Schnitte alkoholisch entwässert und mit Xylol eingedeckt werden können. Außerdem verhindert Romulin das Ausbleichen der Färbung.

Eine Farbreaktion entsteht wie folgt:

Die streptavidin gebundene Meerrettichperoxidase bildet mit dem Elektronendonator AEC einen Enzym-Substrat-Komplex. Dann wird durch die Hämgruppe der HRP eine Bindung mit Wasserstoffperoxid aufgebaut, die unter Bildung von Wasser und atomarem Sauerstoff zerfällt.

Die Farbreaktion entsteht durch Oxidation des Elektronendonors AEC, der sich so in eine rote Verbindung umwandelt.

2.6 Allgemeine Schritte und Entwicklung

Die immunhistochemische Reaktion erfolgte an in absteigender Alkoholreihe entparaffinierten Schnitten. Neben den zu untersuchenden Ependymomproben wurden jeweils vom Hersteller empfohlene Gewebe, die das gesuchte Antigen exprimieren, als Positivkontrolle und Negativkontrolle mitbehandelt. Eine Positivkontrolle wurde in allen Schritten gleich behandelt, während die Negativkontrolle statt mit einem Primärantikörper mit purem bovinem Serumalbumin (BSA) in Tris-Buffered Saline - (TBS) Lösung ohne Primärantikörper inkubiert wurde. Voraussetzung zur Auswertung war eine spezifisch reaktive Positivkontrolle und eine nicht reaktive Negativkontrolle.

Für jeden Antikörper wurde eine optimale Vorbehandlung der Schnitte zum Demaskieren der Antigene (s.u.) ausgetestet und angewendet.

Als Waschpuffer diente TBS - Lösung. Die Stammlösung wurde aus 121,1g Tris - [Tris(hydroxymethyl)aminomethan] Puffer (0,05M), 169,4g NaCl (0,145M) und 80ml Salzsäure (HCL) (25%), aufgefüllt mit zweifach destilliertem Wasser (Aqua bidest.) auf 2000ml hergestellt, auf pH 7,6 eingestellt und nachfolgend vor Gebrauch noch 1:10 verdünnt.

Als Kochpuffer wurde ein Citratpuffer angefertigt. Dazu nahm man 10,5g Zitronensäure-Monohydrat (MG: 210, 14g/mol) und 5g Natriumhydroxidplätzchen. Diese füllte man mit Aqua bidest. auf 2500ml auf und stellte den pH auf 6,0 ein.

Zur Verdünnung der Antikörperlösungen wurde eine 0,1%ige Lösung von BSA in TBS angefertigt. Das BSA dient hier auch wieder der Minimierung unspezifischer Bindung der Immunglobuline im Gewebe.

Nach der speziellen Vorbehandlung (s.u.) erfolgte am ersten Tag einer jeden immunhistochemischen Untersuchung ein zwei mal zweiminütiges Spülen in Aqua dest. Nach 10 Minuten im Waschpuffer wurde dies nochmals wiederholt.

2 MATERIAL UND METHODEN

Der folgende Block der gewebsendogenen Peroxidasen wurde mittels 2,34%iger wässriger Wasserstoffperoxidlösung 15 Minuten lang durchgeführt.

Nach erneutem Spülen in Aqua dest. und TBS für 10 Minuten wurde mit Ziegen Serum ein Proteinblock gegen unspezifische Antikörperbindung angewendet. Für eine Inkubationszeit von 20 Minuten in der feuchten Kammer wurden die Gewebeschnitte mit 2-3 Tropfen Biogenex HK 112-9K bei Raumtemperatur benetzt.

Das Ziegen Serum konnte danach entfernt und die vorher angefertigte, mit BSA in TBS verdünnte Lösung des Primärantikörpers auf die Gewebeproben aufgebracht werden. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht in der feuchten Kammer, um hier die spezifische Bindung des Primärantikörpers an das jeweilige Epitop zu ermöglichen.

Der erste Arbeitsschritt des nächsten Tages war das Abspülen und Waschen der Schnitte in TBS für 10 Minuten.

Die weitere immunhistochemische Reaktion erfolgte unter Verwendung des Biogenex Super Sensitive IHC Detections System (San Ramon, CA 94583).

Wie in Abschnitt 2.3.3 **Immunhistochemische Methoden** beschrieben wurde die Multi-Link-Antikörperlösung auf die Gewebsschnitte appliziert. Während der 20-minütigen Inkubationszeit in der feuchten Kammer konnte so die Bindung an den Primärantikörper vonstatten gehen. Die überschüssige Lösung wurde abgespült und nach einem Waschvorgang wurden die Proben mit der Label-Lösung benetzt und erneut für 20 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert.

Der dabei entstandene Antigen-Antikörper-Enzymkomplex konnte nun mittels eines chromogenen Substrates nachgewiesen werden. Im verwendeten Kit war das streptavidin gebundene Enzym eine Meerrettichperoxidase, die zur Umsetzung des Chromogens AEC benutzt wurde. Nach dem Abspülen der Proben und einem erneuten Waschvorgang (10 Minuten TBS und kurz Aqua

2 MATERIAL UND METHODEN

dest.) wurden die Schnitte mit AEC-Romulin für 10 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert. Hier bildete sich das endgültige hellrote Reaktionsprodukt.

Die immunhistochemischen Reaktionsschritte waren hiermit abgeschlossen. Es folgte eine Kernfärbung durch einminütige Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun. Nach 10 Minuten Bläuen unter fließendem Wasser konnten die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und mit xylollöslichem Pertex der Firma medite GmbH (Burgdorf, Deutschland) eingedeckt werden.

2.7 Spezielle Vorbehandlung

2.7.1 Ki67

Von allen Tumoren wurden bereits im Institut für Pathologie der Universität Würzburg im Routinelabor mit monoklonalem IgG1-Mausantikörper des MIB1-Klons der Firma Dako (Glostrup, Dänemark) behandelte Schnitte verwendet. Das hierfür verwendete Immunglobulin bindet an das humane Ki67-Antigen die Nuclei der proliferierenden Zellen. Das Ki67-Antigen wird in zwei Isoformen von Zellen in der G1-, S-, G2- und der M-Phase exprimiert, nicht aber in ruhenden G0-Zellen. Es ist auf Chromosom 10 codiert und stellt einen bimolekularen Komplex mit einem Molekulargewicht von 345 und 395kDa dar.

Die Gewebeschnitte wurden zur Antigendemaskierung in Citratpuffer bei pH6 für 22 Minuten gekocht. Nach anschließendem Abkühlen und Überführen in Phosphate-Buffered Saline - (PBS) Puffer erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Positivkontrolle erfolgte an hochproliferativem Gewebe (Kleinzelliges Bronchialkarzinom).

Die nachfolgenden Schritte erfolgten wie in Kapitel 2.6 beschrieben.

2.7.2 HCK

Dieser polyklonale IgG-Antikörper der Firma Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA 95060) stammt aus dem Kaninchen.

Geeignet ist er zum Nachweis von zwei durch HCK kodierten Proteinisoformen beim Menschen. Als positiv gewertet wird eine zytoplasmatische Anfärbung. Als Positivkontrolle wurde ein Tonsillenpräparat verwendet.

Nach Austestung wurden die besten Ergebnisse mit Antigendemaskierung durch 10 Minuten Kochen der Schnitte im Dampfdrucktopf (DDT) bei 120°C in Citratpuffer pH6 erreicht.

Der Antikörper in 1:100 Verdünnung wurde zur Inkubation über Nacht in der feuchten Kammer bei 4°C aufgebracht.

Wie oben beschrieben erfolgt das weitere Procedere.

2.7.3 CDKN2b

Der von der Firma Abcam (Cambridge, UK) produzierte monoklonale Maus-Antikörper der Subklasse IgG1 wurde als vorverdünnte Lösung geliefert. Die Gewinnung erfolgte durch Protein G aus Aszites.

Als Positivität wurde eine nukleäre Reaktivität der Zellen gewertet. Die Positivkontrolle erfolgte über Proben eines Rektumkarzinoms.

Zehnminütiges Kochen im DDT bei 120°C in Citratpuffer bei pH6 führte auch hier zu den besten Ergebnissen.

Die Inkubation der gebrauchsfertigen Lösung erfolgte über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer. Die weiteren Schritte wurden wie o.g. durchgeführt.

2.7.4 MTAP

Dieser Antikörper der Firma ProteinTech Group, Inc (Manchester, UK) stammt aus dem Kaninchen. Es handelt sich dabei um polyklonales IgG in PBS mit 0,1% Natriumacid, 50% Glycerol bei pH 7,3 zum Nachweis des humanen MTAP. Verwendet wurde eine Rektumkarzinomprobe als Positivkontrolle.

Wieder erzielte das 10-minütige Kochen im DDT bei 120°C in Citratpuffer pH6 die besten Ergebnisse.

Als Positivität werteten wir eine zytoplasmatische Reaktivität.

Der Antikörper wurde in 1:200 Verdünnung angewendet und bei 4°C über Nacht in der feuchten Kammer inkubiert.

2.7.5 DBC1

Auch dieser polyklonale IgG-Antikörper wurde von der Firma ProteinTech Group (Chicago, IL 60612) produziert. Er stammt aus dem Kaninchen. Als Positivkontrolle wurde ein Glioblastoma multiforme – Präparat verwendet. Das Ergebnis war positiv bei zytoplasmatischer Reaktivität.

Maximale Reaktivität wurde hier durch einstündige Vorbehandlung mit Ameisensäure erreicht.

Der Antikörper musste in 1:100 Verdünnung bei 4°C über Nacht in der feuchten Kammer inkubiert werden.

2.8 Kriterien der Auswertung

2.8.1 Ki67

An den bereits vorliegenden auf Ki67 untersuchten Schnitten wurde eine erneute Auswertung durchgeführt. Der Proliferationsindex wurde hierzu durch Ermittlung des Prozentsatzes von Zellen mit nukleärer Reaktivität für Ki67 bestimmt. In Tumoranteilen mit der höchsten Reaktivität wurde semiquantitativ in 5 Gesichtsfeldern bei 200-facher Vergrößerung der Anteil positiver Zellkerne

ausgezählt. Ein PI von 20% entsprach somit 20% positiv reaktiver Kerne. Dann wurde eine Einteilung in Gruppen vorgenommen. So erhielten Tumoren mit einem PI von <1% einen Score von 1, Tumoren mit einem PI zwischen 1 und 15% einen Score von 2 und Tumoren mit einem PI von >15% einen Score von 3.

2.8.2 CDKN2b

Zur Auswertung wurde in 5 Gesichtsfeldern bei 200-facher Vergrößerung bestimmt, welcher Anteil der Nuclei insgesamt positiv reagierte.

Nach diesen Ergebnissen wurde den Proben jeweils für die gefärbten Kerne ein Score zugeteilt (vgl Tabelle 1).

Score	Anteil positiver Kerne
0	0%
1	<10%
2	>10%

TABELLE 1: AUSWERTUNGSSCORE FÜR CDKN2B

2.8.3 HCK

Hier wurde in Bezug auf zwei verschiedene Formen der zytoplasmatischen Positivität semiquantitativ bei 200-facher Vergrößerung untersucht:

Die diffuse Positivität der einzelnen Zellen wurde in vier Stufen eingeteilt. Ein Wert von 0 entsprach Negativität, 1 bedeutete eine schwach positive, 2 eine moderate und 3 eine starke diffuse Positivität der Proben.

Bei der punktförmigen Positivität unterschieden wir lediglich drei Gruppen mit 0 entsprechend einer fehlenden, 1 entsprechend einer schwachen und 2 entsprechend einer starken punktförmigen Positivität. Zur Auswertung wurden die intensivsten positiven, nicht randnah gelegenen Bereiche eines jeden Schnittes ausgewählt.

2.8.4 DBC1

Aufgrund sehr heterogener zytoplasmatischer Positivität mit z.T. erkennbarem filamentärem Zellgerüst entschieden wir uns bei der Auswertung, ausschließlich zwischen Positivität und Negativität zu unterscheiden.

Für die Auswertung wurde wiederum der jeweils am stärksten positive, randferne Bereich des Gewebes bei 200-facher Vergrößerung beurteilt.

2.8.5 MTAP

Auch diese Reaktion erzielt eine zytoplasmatische Positivität. Die Auswertung erfolgte in 3 Stufen (vgl Tabelle 2).

Score	Reaktion
0	Negativ
1	Schwach positiv
2	Stark positiv

TABELLE 2: AUSWERTUNGSSCORE FÜR MTAP

2.9 Statistische Methoden

Die statistische Korrelation zwischen immunhistochemischen Merkmalen und klinikopathologischen Variablen erfolgte mittels Chi-Quadrat-Test. Das Überleben der Patienten wurde mittels Kaplan-Meier-Methode und Cox-Regression untersucht.

3 ERGEBNISSE

3.1 Klinikopathologische Korrelation

Zu den untersuchten Patienten wurden verschiedene klinische Daten bezüglich des Alters, der Lokalisation des Tumors, des Ausmaßes chirurgischer Resektionen sowie der Überlebenszeit gesammelt. Die Überlebenszeit der Patienten in Jahren und Monaten wurde bis einschließlich 2006 ermittelt. Alle Ependymome wurden von zwei Neuropathologen unabhängig voneinander beurteilt und nach WHO-Kriterien klassifiziert.

Es lagen Gewebeproben von 23 pädiatrischen und 32 erwachsenen Ependymompatienten vor. Mit den von drei Tumoren vorliegenden Rezidiven (s.u.) bestand das untersuchte Kollektiv aus insgesamt 59 Ependymomen.

Als Erkrankungsalter wurde bei pädiatrischen Patienten das Alter in Jahren als Dezimalzahl und bei erwachsenen Patienten das Erkrankungsalter in ganzen Jahren verwendet.

In der untersuchten Kohorte befanden sich auch drei Tumoren mit ihren Rezidiven (Primärtumor an erster Stelle: C15it, C16it und C25it, c24it, C26it sowie C29it, C30it). Hier wurde zur Berechnung jeweils das Alter bei Erstdiagnose verwendet. Bei allein drei Tumoren handelt es sich um infratentoriell lokalisierte anaplastische Ependymome WHO Grad III. In zwei der drei Fälle lag das Alter bei Primärdiagnose unter drei Jahren. In einem Fall konnte operativ lediglich eine subtotale Resektion erreicht werden. Alle Patienten wurden nach dem HIT-Protokoll der deutschen Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie behandelt [81, 82]. Der Zeitabstand zwischen Primärtumor und Rezidiv bzw. zweitem Rezidiv lag zwischen einem und sechs Jahren. Es fiel auf, dass in zwei Fällen der Ki67-Score als Indikator des Proliferationsindex bei den Rezidiven gestiegen war.

3 ERGEBNISSE

Das durchschnittliche Alter der Kindergruppe lag bei 4,49 Jahren, das der Erwachsenen bei 50,88 Jahren. Insgesamt befand sich der Altersdurchschnitt der Kohorte bei 31,47 Jahren.

Die so ermittelten Daten sind zusammen mit den bei der Auswertung unserer immunhistochemischen Untersuchungen ermittelten Scores aus Tabelle 3 ersichtlich.

StudienNr	WHOGrad	Resektion	Überleben	Ki67Score	MTAP	HCKPunkt	HCKDiffus	CDKN2b	DBC1	AbDBC1	AbStatMTAP/CDKN2b
A1s	mE I	1	7,1	3	1	2	2	2	1	2	2
A2s	mE I	2	4,4	1	1	2	3	2	0	2	1
A3s	mE I	2	12,1	1	1	1	1	2	1	1	1
A4s	mE I	2	4,5	1	2	2	0	1	0	1	2
A5s	mE I	2	0,7	1	0	1	1	2	1	2	2
A6s	mE I	1	6,5	1	1	2	3	2	0	2	2
A8s	E II	2	5,7	2	1	1	0	2	1	2	1
A9s	E II	2	4,4	1	1	1	1	2	1	1	2
A10s	E II	1	10,4	1	1	1	1	2	1	2	2
A11s	E II	2	3,7	1	1	2	2	2	0	2	1
A12s	SE	1	5,1	1	0	2	0	2	0	n.d.	n.d.
A13s	mE I	2	2,6	1	1	1	1	2	0	n.d.	n.d.
A14s	mE I	2	12	1	1	0	1	2	0	n.d.	n.d.
A16s	mE I	2	7,1	1	1	2	1	2	0	n.d.	n.d.
A18s	E II	2	0,8	1	1	1	2	2	1	n.d.	n.d.
A19s	E II	2	11,8	1	1	0	2	2	0	n.d.	n.d.
A20s	E II	2	5,1	1	1	1	1	2	0	n.d.	2
A21s	E II	2	4,6	2	2	1	3	2	1	n.d.	2
A22s	E II	1	4,8	2	1	1	1	0	0	n.d.	n.d.
A23s	E II	2	8,9	2	1	1	1	2	1	n.d.	n.d.
A24s	E II	1	0,2	1	1	1	1	2	0	2	2
A26st	SE	2	8	1	1	1	0	2	0	n.d.	n.d.
A27st	SE	2	4	1	1	2	1	2	0	n.d.	n.d.
A28st	SE	2	13,4	1	0	1	1	2	0	n.d.	n.d.
A29st	E III	1	7,7	1	1	1	1	2	0	n.d.	n.d.
A31it	SE	12	13	1	1	1	1	2	0	n.d.	n.d.
A32it	SE	2	12,1	1	1	1	0	0	0	n.d.	n.d.
A33it	E II	2	4,4	2	1	2	1	2	1	1	2
A34it	E II	12	7,7	2	0	2	2	2	0	1	1
A35it	E II	1	7	2	1	1	0	2	1	n.d.	2
A36it	E II	11	10,1	3	1	2	1	2	0	n.d.	n.d.

StudienNr	WHOGrad	Resektion	Überleben	Ki67Score	MTAP	HCKPunkt	HCKDiffus	CDKN2b	DBC1	AbDBC1	AbStatMTAP/CDKN2b
A37it	E III	1	7,4	3	1	2	3	2	0	2	2
C1s	mEI	1	12,7	2	2	2	3	2	1	n.d.	2
C2s	mEI	2	10,6	2	2	0	3	2	0	n.d.	n.d.
C6st	E III	2	8,2	3	1	0	1	2	0	2	2
C8st	E III	1	1,5	3	0	0	0	2	0	2	1
C10st	E III	1	1,6	2	1	1	1	2	1	2	2
C11st	E III	1	11,5	2	2	2	1	0	0	1	n.d.
C12st	E III	1	1,6	3	1	1	1	2	1	1	2
C13it	E II	1	2,1	2	1	1	2	1	1	2	2
C14it	E II	1	14,6	2	0	1	2	2	1	n.d.	n.d.
C15it	E III	2	1,3	2	0	0	0	2	1	2	2
C16it	E III	n.b.		3	1	0	2	2	0	2	n.d.
C17it	E III	1	0,1	3	2	2	2	2	1	1	1
C20it	E II	2	7,3	3	n.d.	0	2	2	1	2	2
C21it	E II	2	1,7	2	1	0	0	2	1	2	2
C22it	E III	1	5	3	1	0	1	2	1	1	n.d.
C23it	E III	1	2	3	1	0	0	2	1	1	2
C24it	E III	1	6,5	3	1	1	0	2	1	2	2
C25it	E III	n.b.		1	1	1	1	2	1	n.d.	n.d.
C26it	E III	n.b.		3	1	0	0	2	1	n.d.	n.d.
C28it	E III	1	3,9	2	0	0	0	2	1	2	1
C29it	E III	1	7,4	3	1	1	1	2	1	2	1
C30it	E III	n.b.		1	0	1	1	2	0	n.d.	n.d.
C31it	E III	1	1,8	2	0	0	0	2	0	1	2
C32it	E III	2	0,9	2	1	0	0	0	1	2	2
C33it	E III	n.b.	0,9	2	0	1	0	1	0	1	2
C34it	E III	1	0,7	1	0	1	0	2	1	2	2
C35it	E III	2	2,4	2	1	1	0	2	1	1	2

TABELLE 3: ERGEBNISSE. WHO-Grad: Me I = Myxopapilläres Ependymom, SE = Subependymom, E II = Ependymom, E III = Anaplastisches Ependymom. Resektion: 1 = subtotal, 2 = komplett, n.b. = nicht bekannt. n.d. = nicht durchgeführt. ERGEBNISSE DER VORANGEGANGENEN STUDIEN: AbStatDBC1 bzw. AbStatCDKN2b/MTAP = Aberrationsstatus DBC1 bzw. CDKN2b/MTAP, 1 = Aberration, 2 = keine Aberration.

3 ERGEBNISSE

Bei der Einteilung in Altersgruppen fiel auf, dass die bei der Fallauswahl im Kindesalter am meisten betroffene Gruppe die der unter 3-Jährigen ist. Im Erwachsenenalter lag der Schwerpunkt bei den 50-70-Jährigen (siehe Abbildung 4).

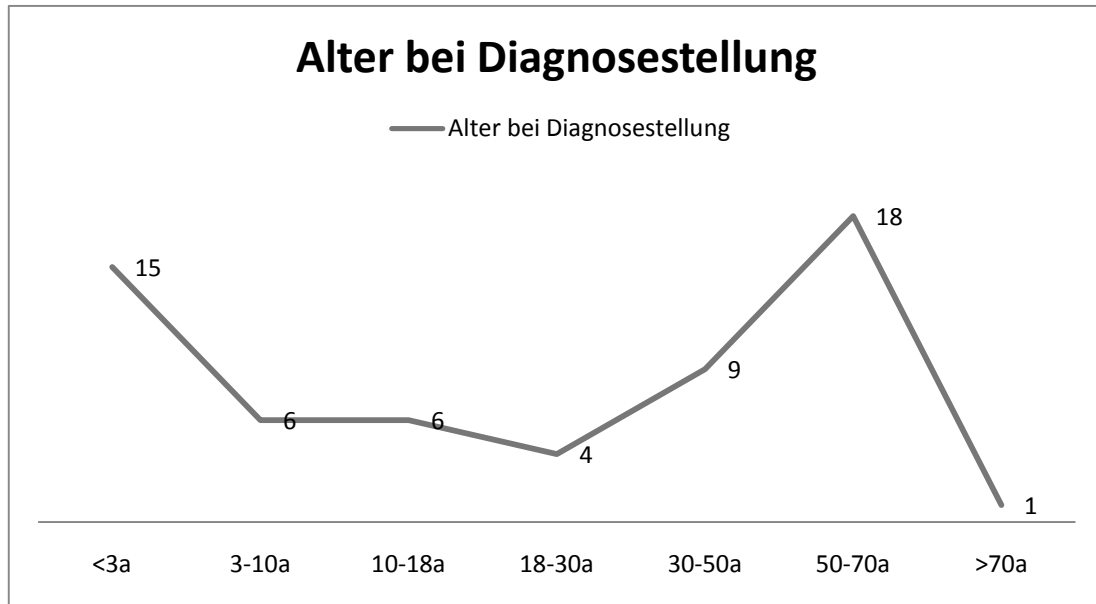


ABBILDUNG 4: IN DER ALTERSVERTEILUNG BEI DIAGNOSESTELLUNG ZEIGTEN SICH ALTERSGIPFEL UNTER 3 SOWIE ZWISCHEN 50 UND 70 JAHREN.

Das Verhältnis männlich zu weiblich betrug 1,2 : 1.

Es wurde die Verteilung der Tumorlokalisation in den beiden Gruppen Kinder und Erwachsene sowie insgesamt ermittelt (siehe Tabelle 4 sowie Abbildung 5).

	Spinal	Supratentoriell	Infratentoriell	Summe
Kinder	2	5	20	27
Erwachsene	21	4	7	32
Summe	23	9	27	59

TABELLE 4: GEGENÜBERSTELLUNG DER TUMORLOKALISATION IN DEN GRUPPEN ‚ERWACHSENE‘ UND ‚KINDER‘

3 ERGEBNISSE

Insgesamt war die spinale Lokalisation mit ungefähr 39% vertreten. Supratentoriell fanden sich 15,3%, infratentoriell lokalisiert waren 45,8% der Ependymome.

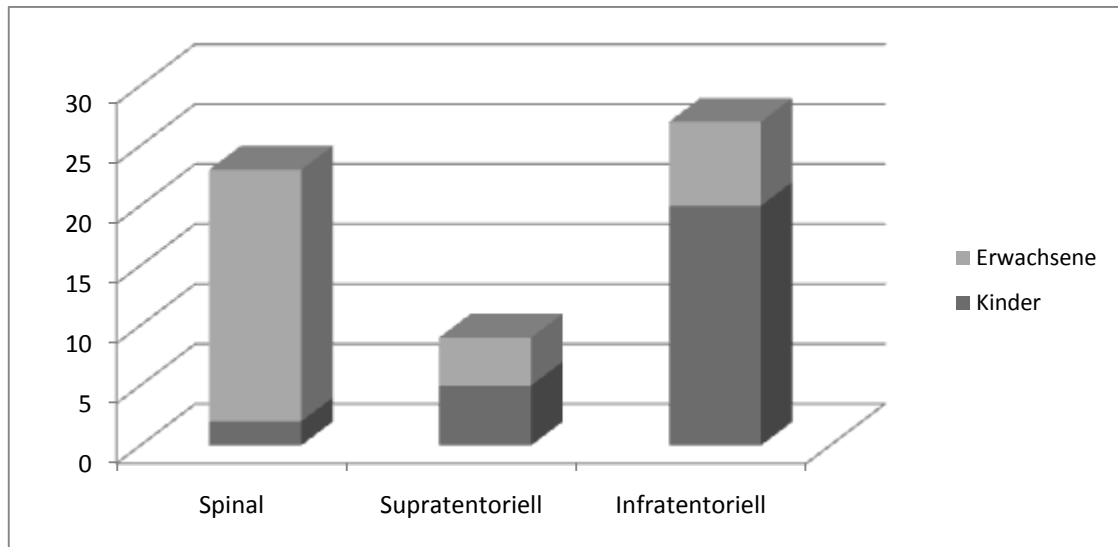


ABBILDUNG 5: DIE GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER TUMORLOKALISATION BEI KINDERN UND ERWACHSENEN ZEIGT EINE DEUTLICHE TENDENZ ZU SPINALEN EPENDYMOGEN BEI ERWACHSENEN UND INFRATENTORIELLER LOCALISATION BEI KINDERN.

In der Gruppe der Erwachsenen war die spinale Lokalisation mit ungefähr 65,6% mit Abstand am häufigsten. Nur 12,5% der Erwachsenen wiesen ein supratentorielles und 21,9% ein infratentorielles Ependymom auf. Bei den Kindern waren ungefähr 7,4% der Ependymome spinal lokalisiert. Circa 18,5% zeigten eine supra- und ungefähr 74% eine infratentorielle Lokalisation.

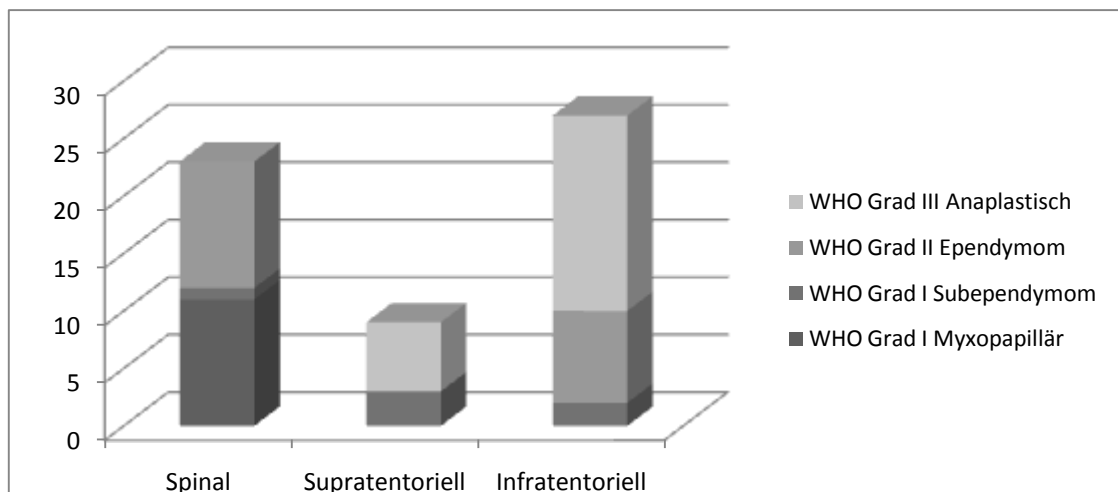


ABBILDUNG 6: IM VERGLEICH VON LOCALISATION UND WHO-GRAD FIEL BEI DEN SPINALEN EPENDYMOGEN EIN TREND ZU NIEDRIGEN WHO-GRADEN AUF. IM KONTRAST DAZU ENTSPRACHEN DIE INFRATENTORIELLEN EPENDYMOGE IN 63% DER FÄLLE WHO GRAD III.

3 ERGEBNISSE

Betrachtet man beim gesamten Patientenkollektiv den Zusammenhang zwischen Lokalisation des Ependymoms und dem WHO-Grad (siehe Abbildung 6), so fällt auf, dass keines der spinalen Ependymome einem WHO Grad III entspricht. Mit jeweils 47,8% waren gleich viele myxopapilläre Ependymome WHO Grad I und Ependymome WHO Grad II mit spinaler Lokalisation vertreten. In supratentorieller Lage imponierten sowohl drei Subependymome WHO Grad I als auch sechs anaplastische Ependymome WHO Grad III. Eine noch deutlichere Verschiebung in Richtung höherer WHO-Grade war in der Gruppe der infratentoriellen Ependymome zu finden. Hier fanden sich 63% anaplastische Ependymome WHO Grad III und 29,6% Ependymome WHO Grad II. Der Rest entfiel auf Subependymome WHO Grad I.

Bei differenzierter statistischer Betrachtung des Kinderkollektivs (Abbildung 7) entsprach mit 80% die überwiegende Mehrheit der infratentoriellen Tumorproben einem anaplastischen Ependymom WHO Grad III, die verbleibenden 20% wurden WHO Grad II zugeteilt. Es gab im verwendeten Kollektiv nur zwei spinale Ependymome im Kindesalter, sodass hier keine Gruppe zustande kam. Beide spinalen Ependymome entsprachen myxopapillären Ependymomen WHO Grad I. Insgesamt waren also von den 27 untersuchten Tumorproben pädiatrischer Patienten 92,6% an cerebral lokalisierten Ependymomen erkrankt. 74,1% der untersuchten pädiatrischen Ependymome waren anaplastische Ependymome WHO Grad III.

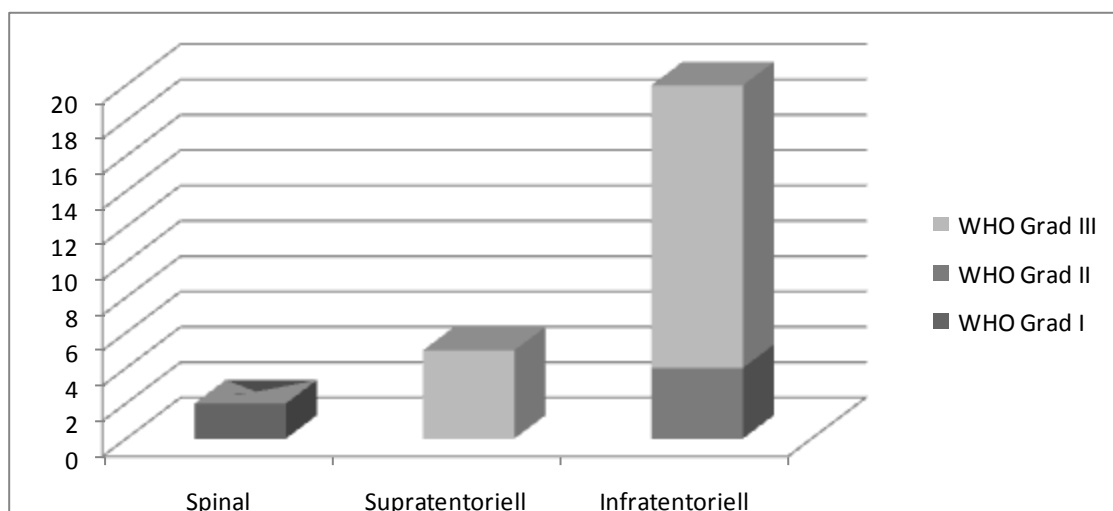


ABBILDUNG 7: LOKALISATION UND WHO-GRAD DER GRUPPE 'KINDER'. INSGESAMT ÜBERWIEGEN HIER INFRATENTORIELLE LOKALISATION UND HÖHERER WHO-GRAD.

3 ERGEBNISSE

Bei den Erwachsenen (siehe auch Abbildung 8) handelte es sich in der Gruppe spinaler Ependymome in 47,6% der Fälle um WHO Grad I, hiervon 90% myxopapilläre Ependymome und 10% Subependymome, und in 52,4% um Ependymome WHO Grad II. Die supratentoriellen und infratentoriellen Ependymome der Erwachsene entsprachen einem WHO Grad I bis III.

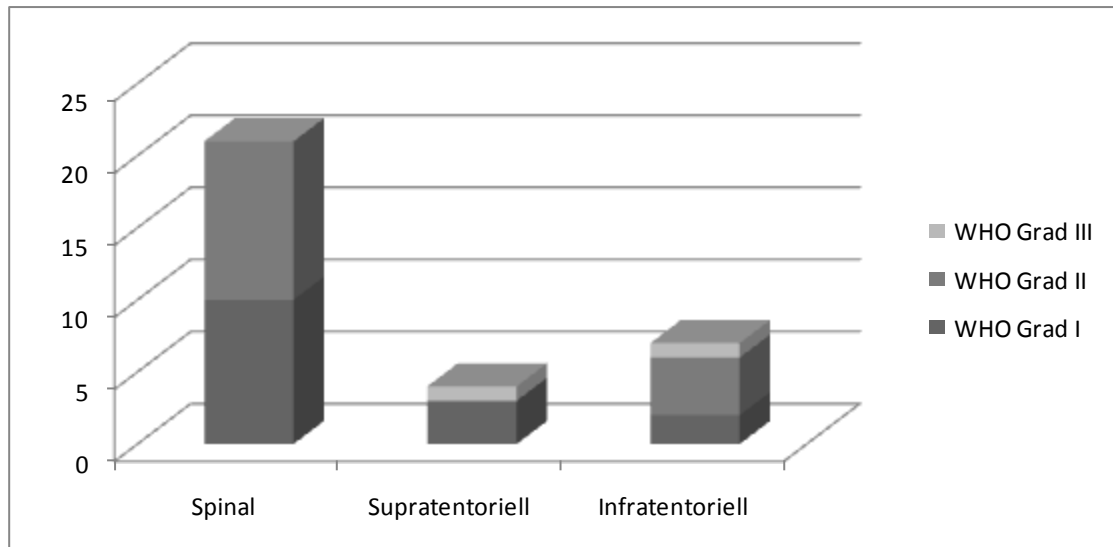


ABBILDUNG 8: VERTEILUNG - LOKALISATION UND WHO-GRAD DER GRUPPE 'ERWACHSENE'. HIER LAG DER SCHWERPUNKT AUF SPINALEN EPENDYMOMEN UND NIEDRIGEREM WHO-GRAD.

Wir haben die Expression der bei Schneider et al. [44] in der Mikrosatellitenanalyse von Aberrationen betroffenen Gene mittels Immunhistochemie auf Proteinebene untersucht und die ermittelten Daten miteinander verglichen.

Die Daten bezüglich der Aberration von CDKN2b entsprechen denen von MTAP, da die beiden Gene auf Chromosom 9p21.3 nebeneinander liegen und mit den gleichen Mikrosatellitenmarkern D9S1749, D9S1748 nachgewiesen wurden. Da nicht alle Fälle, die in dieser Arbeit verwendet wurden, auch in der Publikation von Schneider et al. [44] untersucht wurden, existieren auch nicht zu allen Daten über den Aberrationsstatus der Mikrosatellitenmarker.

3.2 HCK

Die Auswertung des immunhistochemischen zytoplasmatischen Nachweises von HCK erfolgte wie oben genannt, eine Übersicht der Ergebnisse ist in Tabelle 3 ersichtlich. Abbildung 9 präsentiert beispielhaft die unterschiedlichen Reaktionen.

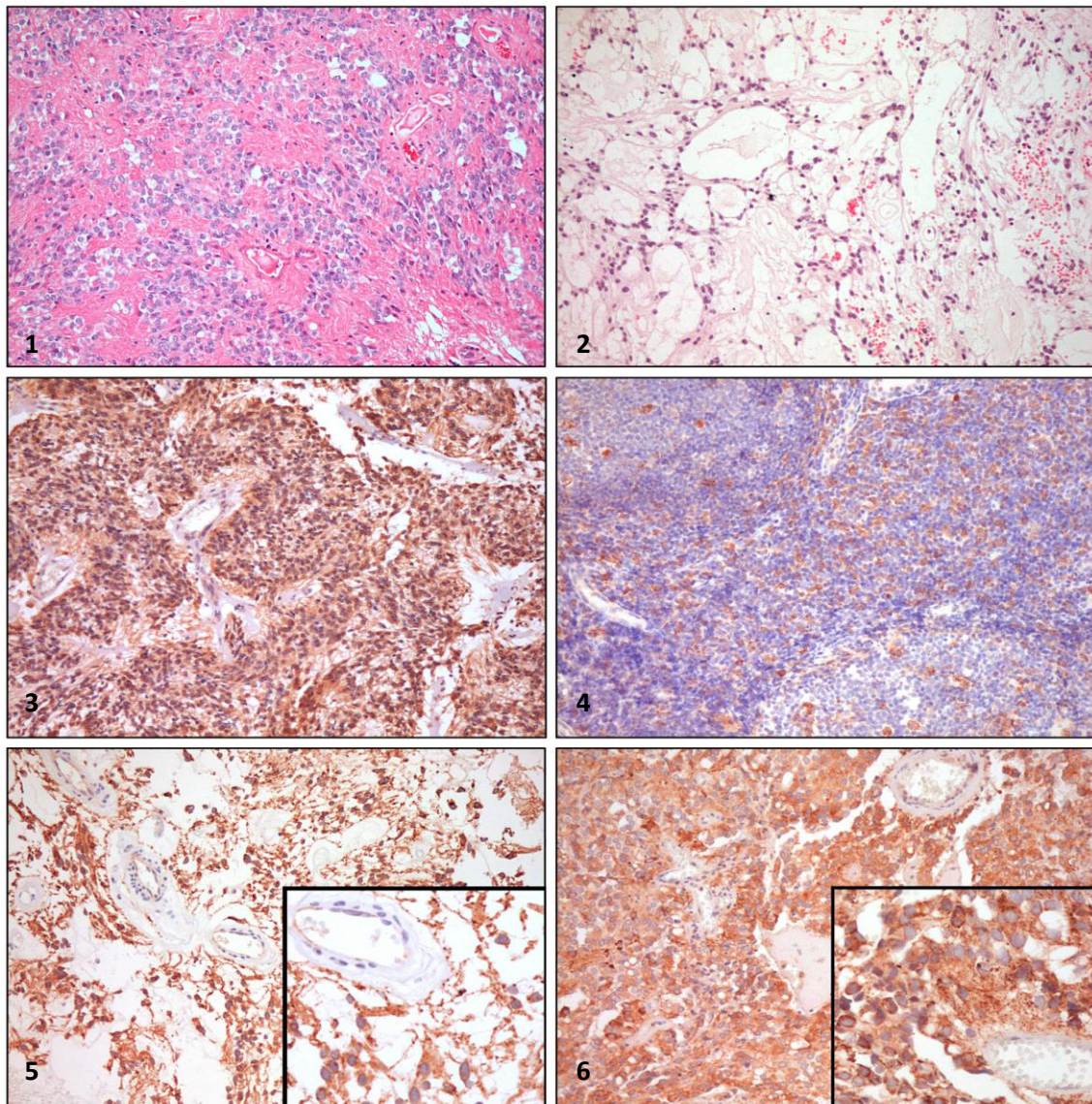


ABBILDUNG 9: HCK IMMUNHISTOCHEMIE. 1: HE EINES EPENDYMOMS WHO GRAD II 100FACH, 2: HE EINES MYXOPAPILLÄREN EPENDYMOMS WHO GRAD I 100FACH. 3: DIFFUSE POSITIVITÄT VON HCK EINES EPENDYMOMS WHO GRAD II 100FACH. 4: POSITIVKONTROLLE TONSILLE 100FACH. 5: PUNKTFÖRMIGE POSITIVITÄT VON HCK EINES MYXOPAPILLÄREN EPENDYMOMS WHO GRAD I 100FACH/INSET 200FACH. 6: PUNKTFÖRMIGE POSITIVITÄT EINES EPENDYMOMS WHO GRAD II 100FACH/INSET 200FACH.

3 ERGEBNISSE

Nachdem in vorangegangenen Publikationen [51] ein Zusammenhang zwischen hohem Proliferationsindex und einer Überexpression von HCK in der RT PCR-Analyse augenscheinlich wurde, untersuchten wir, ob eine vergleichbare Korrelation auch zwischen immunhistochemischer Positivität und dem verwendeten Ki-67-Score vorliegt. Der Ki-67-Score soll hier durch seine Einteilung der Proliferationsindices in Gruppen ein statistisch praktikables Ergebnis ermöglichen.

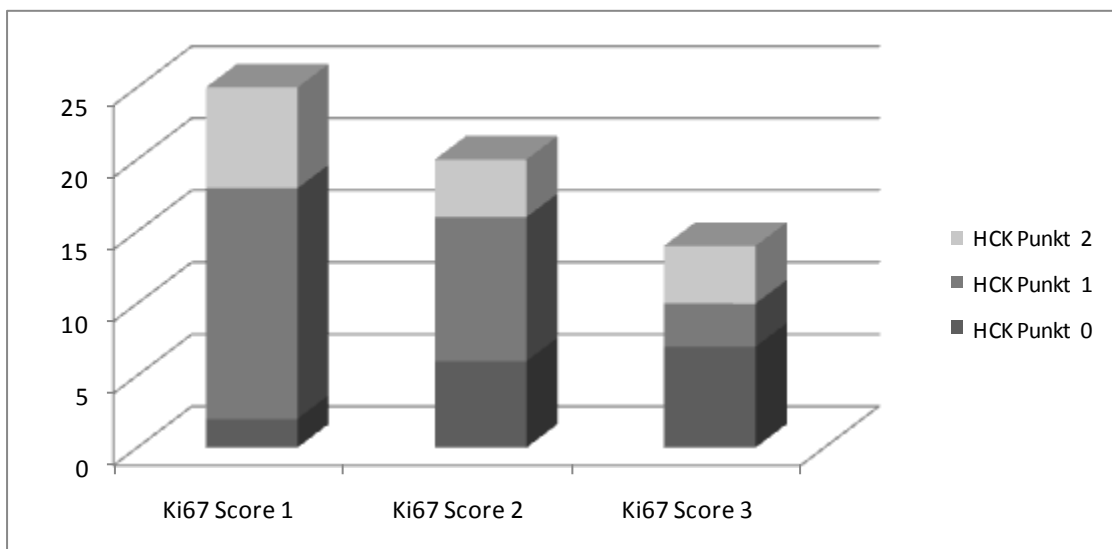


ABBILDUNG 10: DIE PUNKTFÖRMIGE ANFÄRBUNG VON HCK ZEIGTE EINEN DEUTLICHEN TREND ZU SCHWÄCHERER ANFÄRBBARKEIT BEI HÖHEREM KI-67-SCORE (P = 0,067).

Wie oben beschrieben fielen bei der Auswertung der HCK-Untersuchung zwei unterschiedliche Muster der Positivität auf: Einerseits eine gleichmäßige diffuse und andererseits eine punktförmig bis granulär imponierende Positivität. Es konnten jeweils verschiedene Farbintensitäten abgegrenzt werden.

Beim Vergleich der Ergebnisse der diffusen Positivität von HCK ergab sich gegenüber dem Ki67-Score kein statistisch signifikanter Zusammenhang.

Die punktförmig positiven Proben zeigten nach Anwendung des Chi-Quadrat-Tests einen deutlichen Trend zu schwächerer Positivität bei höherem Ki-67-Score (p = 0,067, siehe auch Abbildung 10).

3.3 CDKN2b

Wie oben beschrieben erfolgte auch die Auswertung der nukleären immunhistochemischen Reaktion. Die Resultate sind ebenfalls in Tabelle 3 enthalten.

Stellt man die beiden Gruppen Aberration positiv und Aberration negativ gegenüber, so zeigen sich in der Gruppe ‚Aberration positiv‘ insgesamt neun Fälle, in der Gruppe ‚Aberration negativ‘ 23 Fälle.

Alle neun Fälle mit positiver Aberration zeigten eine starke Positivität von CDKN2b und fanden sich somit alle in der Score 2 Gruppe. Bei den Fällen mit fehlender Aberration des CDKN2b-Genes fanden sich trotz insgesamt auch starker Positivität vier Fälle, die nicht oder nur mäßig reagierten.

Nach der statistischen Auswertung - dargestellt in Abbildung 11 - konnte jedoch keine Korrelation zwischen den in der Mikrosatellitenanalyse nachgewiesenen Aberrationen und der Positivität für CDKN2b bestätigt werden. Auch im Vergleich zur Überlebenszeit nach Kaplan-Meier ergab sich keine Tendenz.

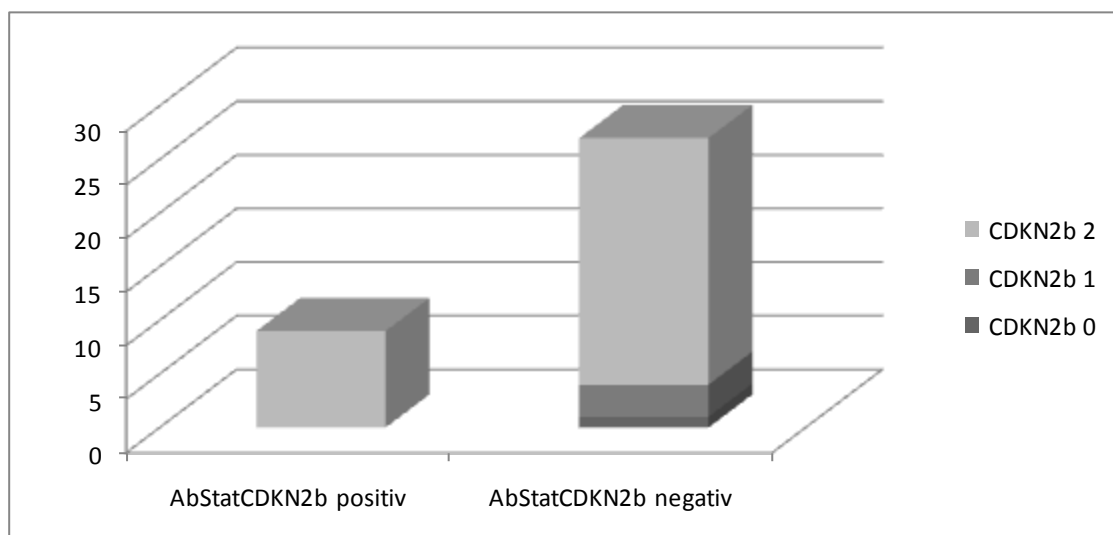


ABBILDUNG 11: ES KONNTE KEINE SIGNIFIKANTE KORRELATION ZWISCHEN DEN IN DER MIKROSATELLITENANALYSE NACHGEWIESENEN ABERRATIONEN VON CDKN2B UND DER REAKTIVITÄT FÜR CDKN2B GEZEIGT WERDEN.

3.4 MTAP

Wie oben genannt erfolgte die Auswertung der immunhistochemischen zytoplasmatischen Reaktion des Proteins MTAP. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Beim Vergleich der so ermittelten Daten mit den Ergebnissen der Publikation von Schneider et al. ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Reaktivität der Gewebeschnitte für MTAP und dem mittels Mikrosatellitenanalyse ermittelten Aberrationsstatus. Ebenfalls konnte keine Korrelation zwischen Reaktivität und der Überlebenszeit nach Kaplan-Meier festgestellt werden.

Das Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchungen von CDKN2b und MTAP ist in Abbildung 12 exemplarisch dargestellt.

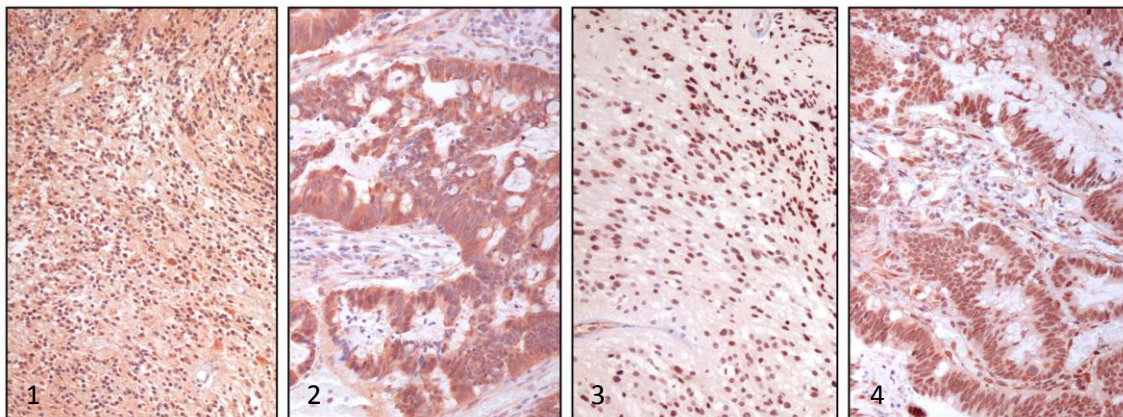


ABBILDUNG 12: CDKN2B UND MTAP IMMUNHISTOCHEMIE 100FACH: 1 REAKTIVITÄT FÜR MTAP EINES ANAPLASTISCHEN EPENDYMOMS WHO GRAD III, 2 UND 4 POSITIVKONTROLLE REKTUMKARZINOM. 3 REAKTIVITÄT FÜR CDKN2B EINES EPENDYMOMS WHO GRAD II.

3.5 DBC 1

Auch die immunhistochemische cytoplasmatische Reaktion von DBC1 wurde wie oben beschrieben ausgewertet und die Daten in Tabelle 3 zusammengefasst.

Beispielhaft repräsentiert Abbildung 13 ein Ergebnis der Reaktion von DBC1.

3 ERGEBNISSE

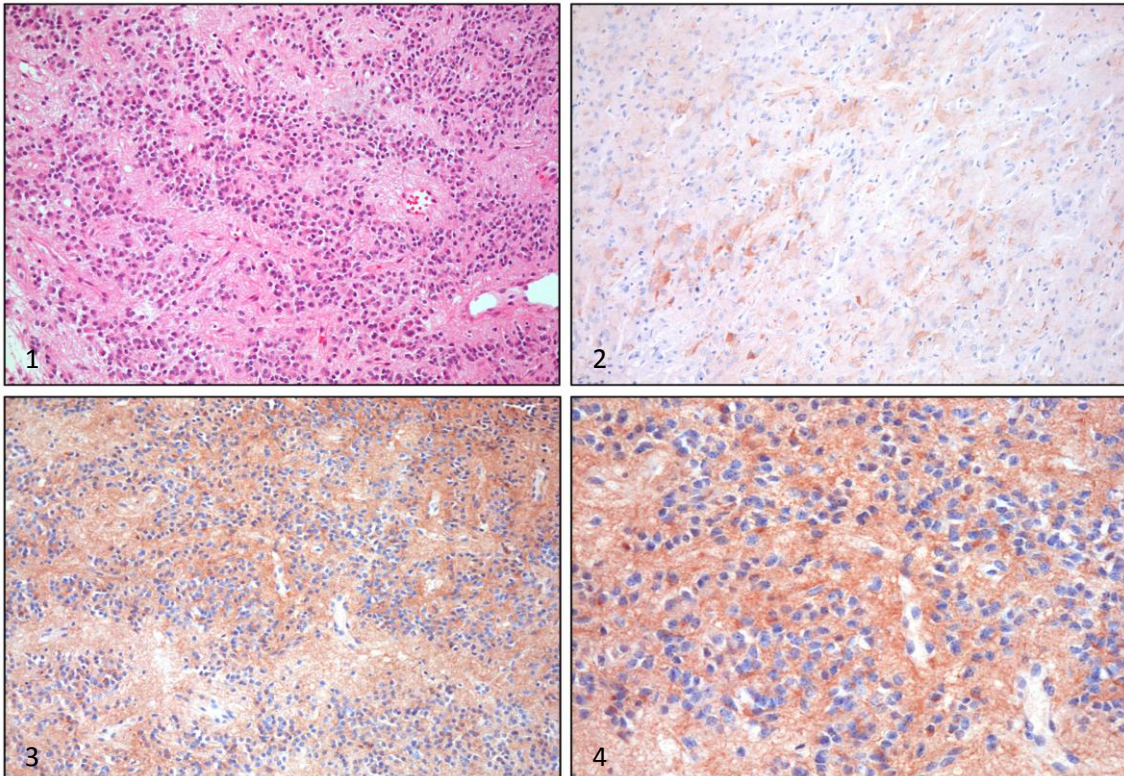


ABBILDUNG 13: DBC1 IMMUNHISTOCHEMIE 100FACH: 1 HE EINES EPENDYMOMS WHO GRAD II 100FACH. 2 POSITIVKONTROLLE GLIOBLASTOMA MULTIFORME 100FACH. 3 POSITIVITÄT FÜR DBC1 EINES EPENDYMOMS WHO GRAD II 100FACH. SOWIE 4 200FACH.

Überlebensfunktionen

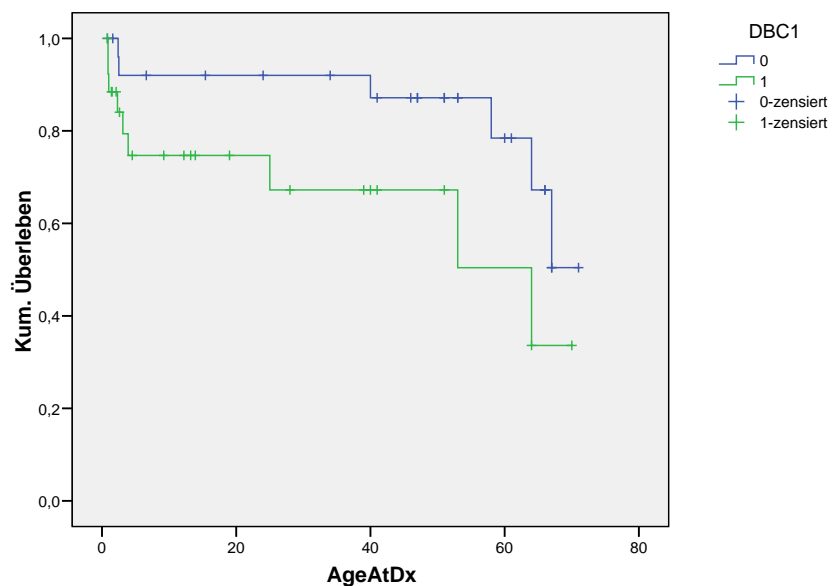


ABBILDUNG 14: DIE KAPLAN-MEIER-ANALYSE ERGAB MIT $P = 0,057$ EINEN TREND ZU VERLÄNGERTER ÜBERLEBENSZEIT BEI NEGATIVITÄT FÜR DBC1. DIE POSITIVITÄT FÜR DBC1 STELLT HIERBEI EINEN UNABHÄNGIGEN RISIKOFAKTOR FÜR KÜRZERES ÜBERLEBEN DAR.

3 ERGEBNISSE

Beim Vergleich der Positivität für DBC1 mit dem Überlebensstatus nach Kaplan-Meier fiel mit $p = 0,057$ ein deutlicher Trend zu verlängerter Überlebenszeit bei Negativität für DBC1 auf (Abbildung 14).

In der danach unter Verwendung der Cox-Regression durchgeführten Multivarianzanalyse ergab sich, dass der komplette Resektionsstatus zwar mit $p = 0,004$ eine bessere Aussagekraft bezüglich des Überlebens hat, dass jedoch **die Positivität für DBC1 einen unabhängigen Risikofaktor für kürzeres Überleben darstellt.**

Im Vergleich von DBC1 mit dem ermittelten Ki67-Score zeigte sich eine mit $p = 0,013$ signifikante Korrelation zwischen Negativität von DBC1 und niedrigen Ki67-Scores (Abbildung 15). Erhöhte Ki67 Scores imponierten besonders mit Positivität für DBC1.

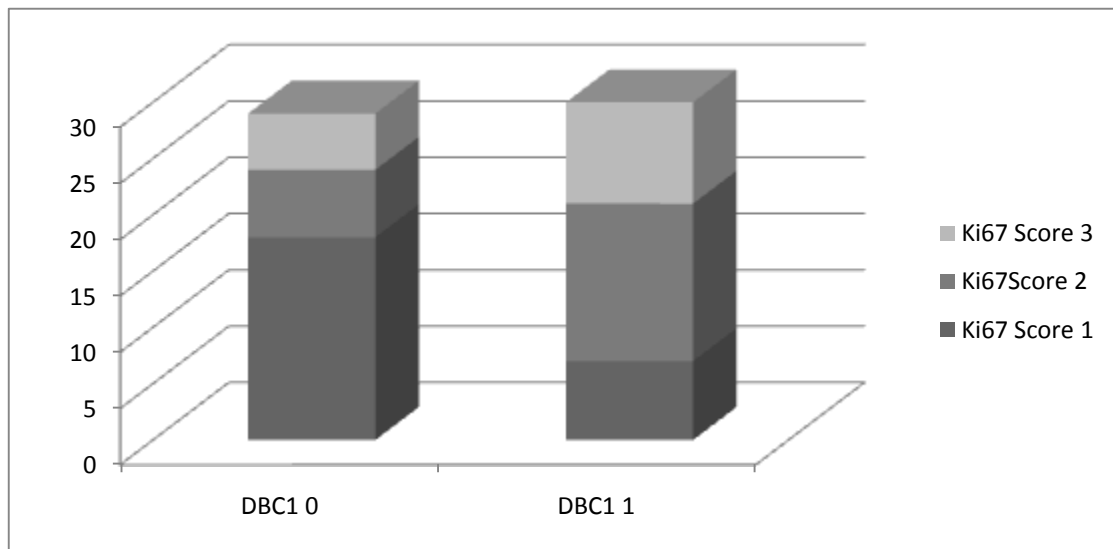


ABBILDUNG 15: ZWISCHEN NEGATIVITÄT VON DBC1 UND NIEDRIGEN KI67-SCORES KONNTE MIT $P = 0,013$ EINE SIGNIFIKANTE KORRELATION NACHGEWIESEN WERDEN.

3 ERGEBNISSE

Die Gegenüberstellung der Immunhistochemie und des WHO Grades der Tumoren (Abbildung 16) zeigte mit $p = 0,009$ eine signifikante Korrelation zwischen Positivität für DBC1 und einem höheren WHO Grad.

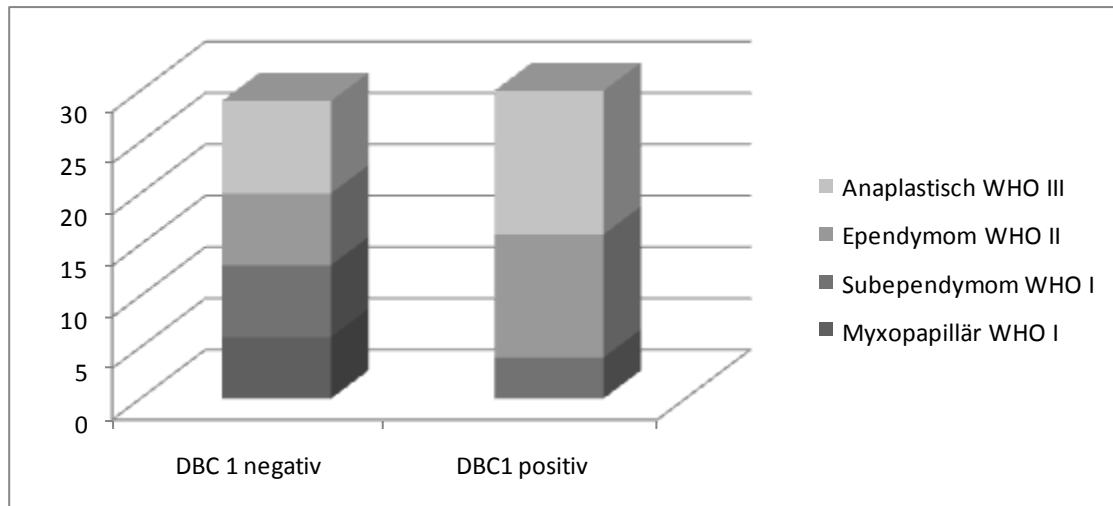


ABBILDUNG 16: DBC1 VS WHO-GRAD ZEIGTE MIT $P = 0,009$ EINE SIGNIFIKANTE KORRELATION ZWISCHEN POSITIVITÄT FÜR DBC1 UND EINEM HÖHEREN WHO-GRAD.

Bei der Auswertung der Untersuchung im Vergleich mit der Tumorlokalisation konnte man eine deutliche Tendenz zu positiver Reaktivität in infratentoriellen Ependymomen erkennen, während die spinalen und supratentoriellen Tumoren häufiger negativ blieben (siehe Abbildung 17).

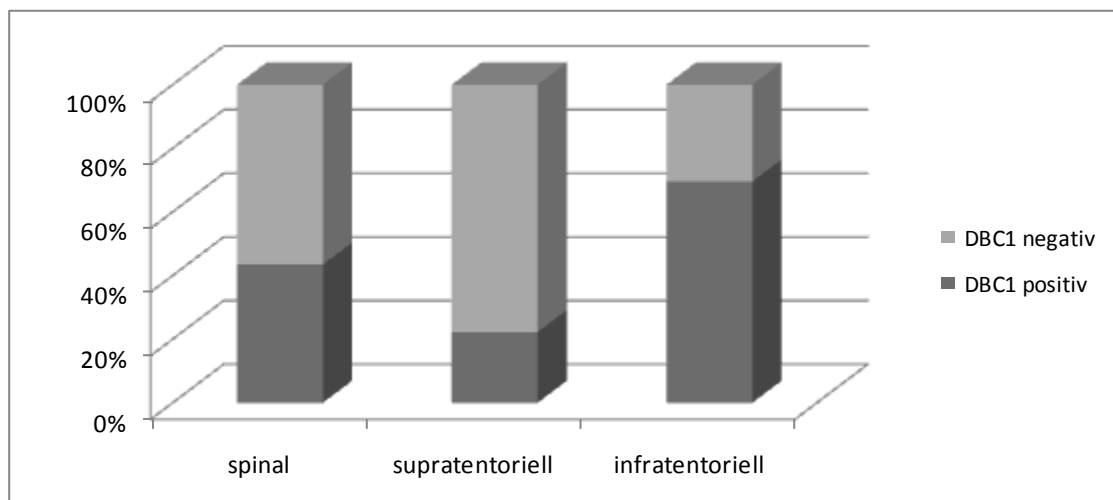


ABBILDUNG 17: POSITIVITÄT WURDE BESONDERS IN INFRATENTORELLEN EPENDYOMEN BEOBACHTET.

3 ERGEBNISSE

Der mit 56,52% überwiegende Anteil der spinalen Ependymome war dabei negativ. Ebenso zeigten sich 77,78% der supratentoriellen Ependymome keine Reaktivität, wogegen 69,57% der infratentoriellen Ependymome ein positives Ergebnis für DBC1 erbrachten.

Zwischen der immunhistochemischen Reaktivität für DBC1 und dem bei Schneider et al. [44] nachgewiesenen Aberrationsstatus konnte keine Korrelation festgestellt werden.

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde die Korrelation der immunhistochemisch nachweisbaren Expression verschiedener Marker mit klinikopathologischen Daten von Ependymomen bei Kindern und Erwachsenen untersucht. Da es sich bei Ependymomen um eine sehr heterogene Gruppe von Tumoren handelt, bei denen allein über die WHO-Graduierung keine prognostischen Aussagen möglich sind, war eines der Ziele dieser Arbeit, potenziell prognostisch relevante Marker zu definieren, die eine einfache Anwendung im Routinelabor finden könnten.

Die Auswahl der Marker beruht auf Ergebnissen vorangegangener Studien aus der Abteilung Neuropathologie des Instituts für Pathologie der Universität Würzburg, in denen durch molekulargenetische Untersuchungen bei Ependymomen bestimmte Genveränderungen beschrieben wurden [44, 51].

4.1 HCK

So wurde in einer dieser Studien [51] unter Anwendung von cDNA-Microarray-Analyse eine relative Überexpression von HCK bei Fällen mit erhöhtem Proliferationsindex (PI über 15%) im Vergleich zu Fällen mit niedrigem PI (unter 10%) festgestellt. Dabei wurden allerdings lediglich fünf versus fünf Fälle gegenübergestellt. Des Weiteren wurde durch die Wahl der Grenzen beim Proliferationsindex nur eine grobe Einteilung unter Ausschluss von Proliferationsindices zwischen 10 und 15% gewählt. Ependymome des WHO-Grades I fanden keine Berücksichtigung.

In unserer Untersuchung wurde wie oben beschrieben eine mit 59 Ependymomproben deutlich größere Stichprobe beurteilt. Durch Verwendung eines Ki67-Scores mit drei Gruppen war eine Unterscheidung zwischen

niedriger (Ki67-Index <1% entsprechend einem Score von 1), mittlerer (Ki67-Index 1-15% entsprechend einem Score von 2) und hoher Proliferationsrate (Ki67-Index >15% entsprechend einem Score von 3) möglich. Der Score 3 entspricht somit der Gruppe mit hoher Proliferationsrate in der erwähnten Studie. Wir schlossen somit keine Proben aus und bezogen auch die Ependymome mit WHO-Grad I ein.

Auf immunhistochemischer Ebene stellten wir bei niedrigem Ki67-Score einen deutlichen Trend zu stärkerer punktförmiger Anfärbung fest (p = 0,067).

Hingegen zeigte die diffuse Positivität für HCK keine Korrelation zu Ki67.

Der Trend der punktförmigen Positivität setzte sich nach Trennung des Kollektivs in der Gruppe der Erwachsenen fort (p = 0,073), während sich bei den Kindern separat keine Tendenz zeigte. Hierbei ist zu bedenken, dass es sich in der Erwachsenengruppe bei ca. 28% der Proben um myxopapilläre Ependymome handelte, während es in der Kindergruppe nur ca. 8% waren.

Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Expression von HCK besonders bei myxopapillären Ependymomen des Erwachsenen eine Rolle spielt.

In verschiedenen Studien [35, 37-41] wurden Verluste auf den Chromosomen 1p, 4q, 6q, 9, 10, 13q, 16, 17, 19q, 20q und 22q entdeckt. Auf Chromosom 20q11-12 befindet sich das HCK-Gen, welches bereits als Protoonkogen bekannt ist [53]. Das HCK-Genprodukt wird in Zellen der Hämatopoiese exprimiert, besonders in phagozytischen Zellen der myeloischen Linie wie etwa Granulozyten und Monozyten [52, 54-56]. Es wird während der Mitose der Zelle aktiviert. HCK scheint an der Signaltransduktion von Transmembranproteinen ins Zellinnere beteiligt zu sein [53, 59, 60].

In verschiedenen Studien wurden bereits Verbindungen mit der Transformation von Zellen bei der Entstehung des CTCL beschrieben [61]. Eine direkte

Interaktion von HCK mit dem BCR/ABL- Genprodukt wurde bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) bereits nachgewiesen [62].

Beim Adenokarzinom des Pankreas zeigte sich eine Korrelation unter anderem mit einer Amplifikation von HCK bei besonders bei hochmalignen Phänotypen [65]. Auch in der Proliferation der Zellen beim Multiplen Myelom wurde für HCK eine Schlüsselrolle nachgewiesen [66].

Bei Mutation dieses Protoonkogens während der Tumorgenese bzw. – progression und somit veränderter Proteinexpression oder –struktur könnte man sich eine verringerte Anfärbung des HCK in höhergradigen Ependymomen erklären.

Nachdem sich der genannte Trend nur bei punktförmiger Anfärbung sowohl in der Gesamtgruppe als auch bei der Untergruppe Erwachsene offenbarte, bleibt die Frage nach der Bedeutung der punktförmigen und diffusen HCK-Anfärbung in Ependymomen noch zu klären.

4.2 CDKN2b und MTAP

Die Mikrosatellitenanalyse auf Chromosom 9 [44] zeigte vermehrte Aberrationen bei supratentoriellen pädiatrischen Ependymomen. Die Gruppe der erwachsenen Patienten mit Aberrationen auf Chromosom 9 wies jedoch ein signifikant längeres Überleben auf.

Wir fanden keine Korrelation zwischen der immunhistochemischen Positivität von CDKN2b oder MTAP und dem Aberrationsstatus der jeweiligen Gene.

Es muss darauf hingewiesen werden, dass es sich bei den Ergebnissen der Mikrosatellitenanalyse nicht um nachgewiesene Deletionen, sondern lediglich um Aberrationen handelt. Selbst die mögliche Deletion eines der beiden Allele eines Genes bedeutet ebenso keine zwangsläufige Reduktion der Genproduktmenge, da diese noch an weiteren Punkten der Genexpression,

beispielsweise bei der Transkription, dem Spleißen und der Translation reguliert wird.

Somit ergibt sich nicht eindeutig ein Zusammenhang zwischen genetischer Aberration und immunhistochemisch nachweisbarer Proteinexpression. Von einer Verwendung der immunhistochemischen Färbung für die beiden Proteine CDKN2b und MTAP als Nachweis für eine mit längerer Überlebenszeit assoziierten Aberration auf Chromosom 9 kann also nicht ausgegangen werden.

4.3 DBC1

In der Mikrosatellitenanalyse von Schneider et al. [44] lag die häufigste Aberration im DBC1-Gen bei 16 von 48 Ependymomen vor.

Die Fälle mit nachgewiesener Aberration fielen durch einen Trend zu besseren Überlebenszeiten auf, welcher aufgrund der kurzen Beobachtungszeit nicht statistisch signifikant bewiesen werden konnte.

In Transitionalzellkarzinomen der Harnblase wurden bereits von Habuchi et al. verminderte mRNA-Mengen des transkribierten DBC1-Gens nachgewiesen. [79]

Für DBC1 konnten Beetz et al. [80] bei der Analyse von Gliomen – speziell bei Astrozytomen – eine reduzierte mRNA-Expression der meisten Tumoren und eine signifikante Korrelation mit höherem WHO-Grad zeigen. In der RT-PCR fiel hier weiterhin bei 21% der Proben ein Verlust von DBC1 auf, was von den Autoren als Zeichen für eine allgemeine Rolle des DBC1 in der Tumorsuppression interpretiert wurde. Während der Tumorgenese könnte somit nach Beetz et al. das DBC1 je nach Tumortyp auf unterschiedlichen Wegen inaktiviert werden.

Wir fanden in der immunhistochemischen Untersuchung des DBC1 mit $p = 0,057$ einen Trend zu besserem Überleben bei Negativität für DBC1. Außerdem gelang es uns nachzuweisen, dass die Positivität für DBC1 ein vom Resektionsstatus unabhängiger Prädiktor für kürzere Überlebenszeit der Patienten ist.

Ein weiteres Ergebnis unserer Arbeit war die statistisch signifikante Korrelation von Positivität für DBC1 in Ependymomen mit hohen WHO-Graden ($p = 0,009$) sowie mit erhöhten Ki67-Scores ($p = 0,013$).

Durch den verwendeten Ki67-Score wurde die Proliferationsrate der Ependymome abgestuft dargestellt. Da die Proliferationsrate aus mehreren Studien [89-92] als prognostischer Marker bekannt ist, wird eine Korrelation der immunhistochemischen Expression von DBC1 zum Ki67-Score zum wichtigen Befund, der einen indirekten Zusammenhang mit der Prognose der Ependymome nahelegt.

Ein weiterer Zusammenhang ergab sich zu der infratentoriellen Lokalisation, wobei hier auch häufiger anaplastische Ependymome mit somit höherem Proliferationsindex vorkommen. Spinale Ependymome, die meist WHO Grad I als myxopapillär oder selten WHO Grad II entsprechen, waren häufiger negativ für DBC1.

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu der von Beetz et al. publizierten Korrelation zwischen erniedrigter DBC1-mRNA und steigendem WHO-Grad. Vor diesem Hintergrund erscheint eine Rolle von DBCCR1 in der Tumorsuppression fraglich. Auch konnte keine Korrelation zwischen der immunhistochemischen Reaktivität und dem Aberrationsstatus der Tumoren für das DBC1-Gen nachgewiesen werden. Dies kann an der mit 16 nachgewiesenen Aberrationen zu geringen Fallzahl liegen.

4.4 Rezidive

Es wurden wie bereits beschrieben drei Tumoren mit ihren Rezidiven untersucht. Bei der gesonderten Betrachtung dieser Proben fiel auf, dass in zwei Fällen der Ki67-Score als Indikator des Proliferationsindex bei den Rezidiven gestiegen war. In einem Fall konnte eine Regredienz des Ki67-Scores - möglicherweise durch die adjuvante Radiochemotherapie bewirkt - festgestellt werden.

Zwei von drei Tumoren wiesen primär eine Positivität für DBC1 auf. Ein wie oben beschriebener Trend zu schlechterer Überlebenszeit und signifikant höherem WHO-Grad und Ki67-Score bei Positivität für DBC1 steht im Einklang mit einer bei allen drei Primärtumoren nachweisbaren Reaktivität und nachfolgendem Rezidiv. Die bei zwei von drei Rezidivtumoren fehlende Reaktivität für DBC1 könnte durch unter adjuvanter Therapie vermehrt auftretenden Mutationen und daraufhin veränderter Proteinexpression bedingt sein.

Unter den Primärtumoren waren zwei von drei schwach positiv bezüglich der punktförmigen Positivität von HCK. Bei einem von drei Fällen trat bei vorheriger Positivität im Rezidiv eine Konversion zu fehlender Reaktivität auf. Auch hier wäre ein Zusammenhang mit veränderter Proteinexpression im Tumorrezidiv denkbar.

Da beim Vergleich der Reaktivität von MTAP in Primärtumor und Rezidiven in einem Fall keine Änderung, im zweiten Fall eine positive und im dritten Fall eine negative Konversion festzustellen war, lässt dies keine weiteren Rückschlüsse zu.

Die Reaktivität des CDKN2b veränderte sich von den Primärtumoren zu den Rezidiven nicht und ergab somit auch keine weiteren Informationen.

4.5 Lokalisation, Alter und WHO-Grad

Bei der Betrachtung der Altersverteilung in einzelnen Gruppen (vgl. Abbildung 5) zeigten sich zwei Altersgipfel der Erkrankung: Der erste in der Altersgruppe unter drei Jahren und der zweite im Kontrast zu Schiffer et al. [1], die den Gipfel der Verteilung im Erwachsenenalter bei 30 bis 40 Jahren feststellten, bei den 50– bis 70-jährige Patienten.

Bezüglich der Lokalisation ist bereits eine typische Abhängigkeit von der Altersgruppe, dem WHO-Grad und dem histologischen Subtyp bekannt: Die meist spinal lokalisierten myxopapillären Ependymome (WHO Grad I) finden sich besonders bei jungen Erwachsenen. Mit steigendem Alter sinkt die Inzidenz dieser Lokalisation. Subependymome (WHO Grad I) finden sich meist infratentoriell, selten im Alter unter 19 Jahren, später in jeder Altersgruppe [2]. Ependymome (WHO Grad II) treten bei Erwachsenen meist spinal [2], bei Kindern meist infratentoriell auf [19]. Die supratentorielle Lokalisation zeigt keine Alterspräferenz. Anaplastische Ependymome finden sich meist bei Kindern besonders in infratentorieller Lage.

Im vorliegenden Kollektiv überwog in der Altersgruppe unter drei Jahren die infratentorielle Lokalisation mit davon 88,2% anaplastischen Ependymomen WHO Grad III, bei den 50 bis 70-jährigen die spinale Lokalisation mit davon 66,6% Ependymomen WHO Grad I.

Die spinalen Ependymome traten zu 91,3% bei Erwachsenen, die supratentoriellen Ependymome mit 55,6% geringfügig häufiger bei Kindern und die infratentoriellen Ependymome in 72% der Fälle bei Kindern auf.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Zur Identifizierung geeigneter Routinemarker für die Prognose von Ependyompatienten führten wir immunhistochemische Untersuchungen und statistische Auswertungen an Ependyomen und Daten von 32 Erwachsenen und 23 pädiatrischen Patienten durch. Davon wurden bei drei Tumoren auch Rezidive untersucht, so dass insgesamt 59 Ependyome in die Untersuchung eingeschlossen wurden. Im Einzelnen handelte es sich um 11 myxopapilläre Ependyome, 6 Subependyome, 19 Ependyome und 23 anaplastische Ependyome.

Die größten Fallgruppen bildeten pädiatrische Patienten unter drei Jahren und Erwachsene zwischen 50 und 70 Jahren. Bei Kindern war mit 45,8% die infratentorielle, bei Erwachsenen mit 65% die spinale Tumorlokalisierung am häufigsten.

Die untersuchten spinalen Ependyome entsprachen zu gleichen Teilen myxopapillären Ependyomen WHO Grad I und Ependyomen WHO Grad II. In supratentorieller Lage fanden sich mit 67% überwiegend anaplastische Ependyome WHO Grad III. Auch bei den infratentoriell gelegenen Ependyomen waren mit 63% die Mehrzahl anaplastische Ependyome, daneben fanden sich 29,6% Ependyome WHO Grad II.

Beim Vergleich des von uns definierten und bestimmten Ki67-Scores als Zeichen für die Ependyomproliferation und der immunhistochemischen Positivität für HCK fiel nach Anwendung des Chi-Quadrat-Tests mit $p=0,067$ ein deutlicher Trend zu schwächerer punktförmiger Positivität bei höherem Ki67-Score auf. Dieser Trend setzte sich in der Erwachsenenengruppe separat fort, während er in der Kindergruppe allein nicht nachweisbar war. In der Erwachsenenengruppe war mit 28% ein deutlicher Anteil myxopapillärer Ependyome vorhanden, welche bei den Kindern nur 8% ausmachten.

Möglicherweise spielt die veränderte HCK-Expression in der Subgruppe der myxopapillären Ependymome eine Rolle.

Unsere Untersuchungen zeigten außerdem mit $p=0,057$ einen deutlichen Trend zu längerem Überleben bei immunohistochemischer DBC1-Negativität. Die Multivarianzanalyse mittels Cox-Regression wies eine Positivität für DBC1 als unabhängigen Risikofaktor für eine kürzere Überlebenszeit nach.

Des Weiteren konnte eine mit $p=0,013$ signifikante Korrelation zwischen immunhistochemischer Positivität für DBC1 und höherem Ki67-Score gezeigt werden. Auch mit höherem WHO-Grad korrelierte die DBC1-Positivität mit $p=0,009$. Besonders infratentoriell gelegene Ependymome zeigten DBC1-Reaktivität. Hier treten bekannterweise häufiger anaplastische Ependymome mit höherem Proliferationsindex auf.

Unsere Ergebnisse legen somit die Eignung des Markers DBC1 als immunhistochemische Routineuntersuchung für die Beurteilung der vom Resektionsstatus unabhängigen Prognose und Überlebenszeit von Ependyompatienten nahe.

6 ANHANG

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AbStat DBC1 bzw. CDKN2b/MTAP	Aberrationsstatus DBC1 bzw. CDKN2b/MTAP
AEC	Aminoethylcarbazol
ALL	Akute lymphatische Leukämie
BCR/ABL	Breakpoint Cluster Region/Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1
Bidest.	Zweifach destilliert
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CDK4/6	Cyclin-dependent Kinase
CDKN2b	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2b
cDNA	Complementary DNA
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CTCL	Cutaneous T-Cell-Lymphoma
Da	Dalton
DBC1	Deleted in Bladder Cancer 1
DDT	Dampfdrucktopf
Dest.	destilliert
E II	Ependymom

6 ANHANG

E III	Anaplastisches Ependymom
HCK	Hematopoietic Cell Kinase
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIV 1	Humanes Immundefizienzvirus 1
HRP	Horseradish Peroxidase
IEP	Isoelektrischer Punkt
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilodalton
L	Links
LOH	Loss of Heterozygosity
mE I	Myxopapilläres Ependymom
MG	Molekulargewicht
M.L.	Mitte links
M.R.	Mitte rechts
mRNA	Messenger-RNA
MTAP	S-Methyl-5'-Thioadenosine Phosphorylase
n.b.	Nicht bekannt
n.d.	Nicht durchgeführt
NF2	Neurofibromatose Typ 2
O.L.	Oben links
O.R.	Oben rechts
PAP	Peroxidase Anti Peroxidase
PBS	Phosphate-buffered Saline
PI	Proliferationsindex
R	Rechts

6 ANHANG

Rb-Protein	Retinoblastomprotein
SE	Subependymom
s.o.	Siehe oben
Src	Sarcoma
s.u.	Siehe unten
TBS	Tris-buffered Saline
TGFbeta	Transforming Growth Factor beta
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
u.a.	Unter Anderem
U.L.	Untern links
U.R.	Untern rechts
vs	versus
WHO	World Health Organization
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
100- bzw 200FACH	100fache Vergrößerung

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Seite
Abbildung 1: WHO-Grad-Einteilung der Ependymome	2
Abbildung 2: Verteilung der untersuchten Proben nach Alter und WHO-Grad	16
Abbildung 3: Die LAB-Methode	20
Abbildung 4: Altersverteilung bei Diagnosestellung	36
Abbildung 5: Tumorlokalisation in den Gruppen ‚Erwachsene‘ und ‚Kinder‘	37

Abbildung 6: Lokalisation vs WHO-Grad	37
Abbildung 7: Lokalisation vs WHO Grad der Gruppe 'Kinder'	38
Abbildung 8: Lokalisation vs WHO Grad der Gruppe 'Erwachsene'	39
Abbildung 9: HCK Immunhistochemie.	40
Abbildung 10: HCK punktförmig vs Ki67 Score	41
Abbildung 11: Aberration von CDKN2B vs Reaktivität CDKN2b	42
Abbildung 12: CDKN2b und MTAP Immunhistochemie	43
Abbildung 13: DBC1 Immunhistochemie	44
Abbildung 14: Kaplan-Meier-Analyse Negativität für DBC1 und Überlebenszeit	44
Abbildung 15: DBC1 vs Ki67-Score	45
Abbildung 16: DBC1 vs WHO Grad	46
Abbildung 17: DBC1 vs Lokalisation	46

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle	Seite
Tabelle 1: Auswertungsscore für CDKN2b	30
Tabelle 2: Auswertungsscore für MTAP	31
Tabelle 3: Ergebnisse	34-35
Tabelle 4: Gegenüberstellung der Tumorlokalisation in den Gruppen ‚Erwachsene‘ und ‚Kinder‘	36

6.4 Literaturverzeichnis

1. Schiffer, D., et al., Histologic prognostic factors in ependymoma. *Childs Nerv Syst*, 1991. 7(4): p. 177-82.
2. Louis, D.N., et al., The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, 2007. 114(2): p. 97-109.
3. Deutsche Krebsgesellschaft:
http://www.krebsgesellschaft.de/pat_ka_hirntumor_ependymom,108176.html.
4. Morantz, R.A., et al., Extraspinal ependymomas. Report of three cases. *J Neurosurg*, 1979. 51(3): p. 383-91.
5. Garcia-Barriola, V., et al., Ovarian ependymoma. A case report. *Pathol Res Pract*, 2000. 196(8): p. 595-9.
6. Tzerakis, N., et al., Intraparenchymal myxopapillary ependymoma: case report. *Neurosurgery*, 2004. 55(4): p. 981.
7. Kurt, E., et al., Identification of relevant prognostic histopathologic features in 69 intracranial ependymomas, excluding myxopapillary ependymomas and subependymomas. *Cancer*, 2006. 106(2): p. 388-95.
8. Warnick, R.E., et al., Intracranial myxopapillary ependymoma: case report. *J Neurooncol*, 1993. 15(3): p. 251-6.
9. Liu, H.M., J. Boogs, and J. Kidd, Ependymomas of childhood. I. Histological survey and clinicopathological correlation. *Childs Brain*, 1976. 2(2): p. 92-110.
10. Chow, C.W. and J. Brittingham, Perivascular pseudorosettes in childhood brain tumours: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Pathology*, 1987. 19(1): p. 12-6.
11. Ilhan, I., et al., Subcutaneous sacrococcygeal myxopapillary ependymoma. *Med Pediatr Oncol*, 1998. 30(2): p. 81-4.
12. Celli, P., L. Cervoni, and G. Cantore, Ependymoma of the filum terminale: treatment and prognostic factors in a series of 28 cases. *Acta Neurochir (Wien)*, 1993. 124(2-4): p. 99-103.
13. Ross, D.A., et al., Myxopapillary ependymoma. Results of nucleolar organizing region staining. *Cancer*, 1993. 71(10): p. 3114-8.
14. Sonneland, P.R., B.W. Scheithauer, and B.M. Onofrio, Myxopapillary ependymoma. A clinicopathologic and immunocytochemical study of 77 cases. *Cancer*, 1985. 56(4): p. 883-93.
15. Akyurek, S., et al., Spinal myxopapillary ependymoma outcomes in patients treated with surgery and radiotherapy at M.D. Anderson Cancer Center. *J Neurooncol*, 2006. 80(2): p. 177-83.
16. Fassett, D.R., J. Pingree, and J.R. Kestle, The high incidence of tumor dissemination in myxopapillary ependymoma in pediatric patients. Report of five cases and review of the literature. *J Neurosurg*, 2005. 102(1 Suppl): p. 59-64.
17. Woesler, B., et al., Intracranial metastasis of a spinal myxopapillary ependymoma. A case report. *Neurosurg Rev*, 1998. 21(1): p. 62-5.
18. Jallo, G.I., D. Zagzag, and F. Epstein, Intramedullary subependymoma of the spinal cord. *Neurosurgery*, 1996. 38(2): p. 251-7.
19. Waldron, J.S. and T. Tihan, Epidemiology and pathology of intraventricular tumors. *Neurosurg Clin N Am*, 2003. 14(4): p. 469-82.
20. Ryken, T.C., R.A. Robinson, and J.C. VanGilder, Familial occurrence of subependymoma. Report of two cases. *J Neurosurg*, 1994. 80(6): p. 1108-11.
21. Taylor, M.D., et al., Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma. *Cancer Cell*, 2005. 8(4): p. 323-35.
22. Moss, T.H., Observations on the nature of subependymoma: an electron microscopic study. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1984. 10(1): p. 63-75.
23. Russell, D.S., *Pathology of Tumours of the Nervous System*. 1989.
24. Scheithauer, B.W., Symptomatic subependymoma. Report of 21 cases with review of the literature. *J Neurosurg*, 1978. 49(5): p. 689-96.
25. Duncan, J.H.H., *Intracranial Ependymomas*. *Brain Tumors*, 1995: p. 493-504.

26. Schiffer, D., *Brain Tumors. Biology, Pathology, and Clinical References.* . 2 ed. 1997: Springer. Berlin. .
27. Yates, A.J., L.E. Becker, and L.A. Sachs, Brain tumors in childhood. *Childs Brain*, 1979. 5(1): p. 31-9.
28. Kudo, H., et al., Ependymoma diagnosed in the first year of life in Japan in collaboration with the International Society for Pediatric Neurosurgery. *Childs Nerv Syst*, 1990. 6(7): p. 375-8.
29. Gomez, D.R., et al., High failure rate in spinal ependymomas with long-term follow-up. *Neuro Oncol*, 2005. 7(3): p. 254-9.
30. Bhattacharjee, M.B., et al., Cytogenetic analysis of 120 primary pediatric brain tumors and literature review. *Cancer Genet Cytogenet*, 1997. 97(1): p. 39-53.
31. Hamilton, R.L. and I.F. Pollack, The molecular biology of ependymomas. *Brain Pathol*, 1997. 7(2): p. 807-22.
32. Hamilton, S.R., et al., The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med*, 1995. 332(13): p. 839-47.
33. Carter, M., et al., Genetic abnormalities detected in ependymomas by comparative genomic hybridisation. *Br J Cancer*, 2002. 86(6): p. 929-39.
34. Grill, J., et al., Comparative genomic hybridization detects specific cytogenetic abnormalities in pediatric ependymomas and choroid plexus papillomas. *Cancer Genet Cytogenet*, 2002. 136(2): p. 121-5.
35. Jeuken, J.W., et al., Correlation between localization, age, and chromosomal imbalances in ependymal tumours as detected by CGH. *J Pathol*, 2002. 197(2): p. 238-44.
36. Zheng, P.P., et al., Comparative genomic hybridization detects losses of chromosomes 22 and 16 as the most common recurrent genetic alterations in primary ependymomas. *Cancer Genet Cytogenet*, 2000. 122(1): p. 18-25.
37. Hirose, Y., et al., Chromosomal abnormalities subdivide ependymal tumors into clinically relevant groups. *Am J Pathol*, 2001. 158(3): p. 1137-43.
38. Scheil, S., et al., Low frequency of chromosomal imbalances in anaplastic ependymomas as detected by comparative genomic hybridization. *Brain Pathol*, 2001. 11(2): p. 133-43.
39. Tong, C.Y., et al., Identification of novel regions of allelic loss in ependymomas by high-resolution allelotyping with 384 microsatellite markers. *J Neurosurg*, 2001. 95(1): p. 9-14.
40. Rickert, C.H. and W. Paulus, Comparative genomic hybridization in central and peripheral nervous system tumors of childhood and adolescence. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004. 63(5): p. 399-417.
41. Hirose, Y. and K. Yoshida, Chromosomal abnormalities subdivide neuroepithelial tumors into clinically relevant groups. *Keio J Med*, 2006. 55(2): p. 52-8.
42. Huang, B., et al., Loss of heterozygosity on chromosome 22 in human ependymomas. *Acta Neuropathol*, 2002. 103(4): p. 415-20.
43. Huang, B., et al., Human ependymomas reveal frequent deletions on chromosomes 6 and 9. *Acta Neuropathol*, 2003. 106(4): p. 357-62.
44. Schneider, D., et al., Pediatric supratentorial ependymomas show more frequent deletions on chromosome 9 than infratentorial ependymomas: a microsatellite analysis. *Cancer Genet Cytogenet*, 2009. 191(2): p. 90-6.
45. Horn, B., et al., A multi-institutional retrospective study of intracranial ependymoma in children: identification of risk factors. *J Pediatr Hematol Oncol*, 1999. 21(3): p. 203-11.
46. Pierre-Kahn, A., et al., Intracranial ependymomas in childhood. Survival and functional results of 47 cases. *Childs Brain*, 1983. 10(3): p. 145-56.
47. Korshunov, A., et al., The histologic grade is a main prognostic factor for patients with intracranial ependymomas treated in the microneurosurgical era: an analysis of 258 patients. *Cancer*, 2004. 100(6): p. 1230-7.
48. Dyer, S., et al., Genomic imbalances in pediatric intracranial ependymomas define clinically relevant groups. *Am J Pathol*, 2002. 161(6): p. 2133-41.
49. Reardon, D.A., et al., Chromosome arm 6q loss is the most common recurrent autosomal alteration detected in primary pediatric ependymoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 1999. 24(3): p. 230-7.

50. Ernestus, R.I., et al., Prognostic relevance of localization and grading in intracranial ependymomas of childhood. *Childs Nerv Syst*, 1996. 12(9): p. 522-6.
51. Lukashova-v Zangen, I., et al., Ependymoma gene expression profiles associated with histological subtype, proliferation, and patient survival. *Acta Neuropathol*, 2007. 113(3): p. 325-37.
52. Quintrell, N., et al., Identification of a human gene (HCK) that encodes a protein-tyrosine kinase and is expressed in hemopoietic cells. *Mol Cell Biol*, 1987. 7(6): p. 2267-75.
53. Robbins, S.M., N.A. Quintrell, and J.M. Bishop, Myristoylation and differential palmitoylation of the HCK protein-tyrosine kinases govern their attachment to membranes and association with caveolae. *Mol Cell Biol*, 1995. 15(7): p. 3507-15.
54. Ziegler, S.F., et al., Novel protein-tyrosine kinase gene (*hck*) preferentially expressed in cells of hematopoietic origin. *Mol Cell Biol*, 1987. 7(6): p. 2276-85.
55. Welch, H. and I. Maridonneau-Parini, Hck is activated by opsonized zymosan and A23187 in distinct subcellular fractions of human granulocytes. *J Biol Chem*, 1997. 272(1): p. 102-9.
56. Willman, C.L., et al., Expression of the *c-fgr* and *hck* protein-tyrosine kinases in acute myeloid leukemic blasts is associated with early commitment and differentiation events in the monocytic and granulocytic lineages. *Blood*, 1991. 77(4): p. 726-34.
57. Mohn, H., et al., The *src*-family protein-tyrosine kinase *p59hck* is located on the secretory granules in human neutrophils and translocates towards the phagosome during cell activation. *Biochem J*, 1995. 309 (Pt 2): p. 657-65.
58. Lock, P., et al., Two isoforms of murine *hck*, generated by utilization of alternative translational initiation codons, exhibit different patterns of subcellular localization. *Mol Cell Biol*, 1991. 11(9): p. 4363-70.
59. Rudd, C.E., et al., *src*-related protein tyrosine kinases and their surface receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1993. 1155(2): p. 239-66.
60. Alland, L., et al., Dual myristylation and palmitylation of *Src* family member *p59fyn* affects subcellular localization. *J Biol Chem*, 1994. 269(24): p. 16701-5.
61. Kennah, E., et al., Identification of tyrosine kinase, HCK, and tumor suppressor, BIN1, as potential mediators of AHI-1 oncogene in primary and transformed CTCL cells. *Blood*, 2009. 113(19): p. 4646-55.
62. Stanglmaier, M., et al., The interaction of the Bcr-Abl tyrosine kinase with the *Src* kinase Hck is mediated by multiple binding domains. *Leukemia*, 2003. 17(2): p. 283-9.
63. Klejman, A., et al., The *Src* family kinase Hck couples BCR/ABL to STAT5 activation in myeloid leukemia cells. *EMBO J*, 2002. 21(21): p. 5766-74.
64. Poincloux, R., et al., The oncogenic activity of the *Src* family kinase Hck requires the cooperative action of the plasma membrane- and lysosome-associated isoforms. *Eur J Cancer*, 2009. 45(3): p. 321-7.
65. Loukopoulos, P., et al., Genome-wide array-based comparative genomic hybridization analysis of pancreatic adenocarcinoma: identification of genetic indicators that predict patient outcome. *Cancer Sci*, 2007. 98(3): p. 392-400.
66. Podar, K., et al., Critical role for hematopoietic cell kinase (Hck)-mediated phosphorylation of Gab1 and Gab2 docking proteins in interleukin 6-induced proliferation and survival of multiple myeloma cells. *J Biol Chem*, 2004. 279(20): p. 21658-65.
67. Krady, J.K., et al., Differential expression of protein tyrosine kinase genes during microglial activation. *Glia*, 2002. 40(1): p. 11-24.
68. Komuro, I., et al., CSF-induced and HIV-1-mediated distinct regulation of Hck and C/EBPbeta represent a heterogeneous susceptibility of monocyte-derived macrophages to M-tropic HIV-1 infection. *J Exp Med*, 2003. 198(3): p. 443-53.
69. Nam, S., et al., Dasatinib (BMS-354825) inhibits Stat5 signaling associated with apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells. *Mol Cancer Ther*, 2007. 6(4): p. 1400-5.
70. Okuda, T., et al., Frequent deletion of p16INK4a/MTS1 and p15INK4b/MTS2 in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1995. 85(9): p. 2321-30.
71. Hannon, G.J. and D. Beach, p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*, 1994. 371(6494): p. 257-61.

72. Saab, R., et al., Pharmacologic inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 activity arrests proliferation in myoblasts and rhabdomyosarcoma-derived cells. *Mol Cancer Ther*, 2006. 5(5): p. 1299-308.
73. Nobori, T., et al., Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*, 1994. 368(6473): p. 753-6.
74. Stone, S., et al., Genomic structure, expression and mutational analysis of the P15 (MTS2) gene. *Oncogene*, 1995. 11(5): p. 987-91.
75. Fernandez-Irigoyen, J., et al., Redox regulation of methylthioadenosine phosphorylase in liver cells: molecular mechanism and functional implications. *Biochem J*, 2008. 411(2): p. 457-65.
76. Avila, M.A., et al., Methylthioadenosine. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. 36(11): p. 2125-30.
77. Nobori, T., et al., Genomic cloning of methylthioadenosine phosphorylase: a purine metabolic enzyme deficient in multiple different cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(12): p. 6203-8.
78. Habuchi, T., O. Yoshida, and M.A. Knowles, A novel candidate tumour suppressor locus at 9q32-33 in bladder cancer: localization of the candidate region within a single 840 kb YAC. *Hum Mol Genet*, 1997. 6(6): p. 913-9.
79. Habuchi, T., et al., Structure and methylation-based silencing of a gene (DBCCR1) within a candidate bladder cancer tumor suppressor region at 9q32-q33. *Genomics*, 1998. 48(3): p. 277-88.
80. Beetz, C., et al., Low expression but infrequent genomic loss of the putative tumour suppressor DBCCR1 in astrocytoma. *Oncol Rep*, 2005. 13(2): p. 335-40.
81. Timmermann, B., et al., Combined postoperative irradiation and chemotherapy for anaplastic ependymomas in childhood: results of the German prospective trials HIT 88/89 and HIT 91. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2000. 46(2): p. 287-95.
82. Timmermann, B., et al., 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*, 2005. 77(3): p. 278-85.
83. Boenisch, T., *Handbuch II immunchemischer Färbemethoden*. 3 ed. 1989, Carpinteria, CA: Naish, S.J. DAKO Corporation.
84. Boenisch, T., *Handbuch I immunhistochemischer Färbemethoden*. 1989, Carpinteria, CA: Naish, S.J.
85. Nadji, M., Immunoperoxidase techniques. II. Application to cutaneous neoplasms. *Am J Dermatopathol*, 1986. 8(2): p. 124-9.
86. Nadji, M., Immunoperoxidase techniques. I. Facts and artifacts. *Am J Dermatopathol*, 1986. 8(1): p. 32-6.
87. Peters, J.H., Baumgarten, H., Schulze, M. , *Monoklonale Antikörper - Herstellung und Charakterisierung*. 1985: Springer-Verlag.
88. Giorno, R., A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction. *Diagn Immunol*, 1984. 2(3): p. 161-6.
89. Schroder, R., C. Ploner, and R.I. Ernestus, The growth potential of ependymomas with varying grades of malignancy measured by the Ki-67 labelling index and mitotic index. *Neurosurg Rev*, 1993. 16(2): p. 145-50.
90. Preusser, M., et al., Ki67 index in intracranial ependymoma: a promising histopathological candidate biomarker. *Histopathology*, 2008. 53(1): p. 39-47.
91. Suri, V.S., et al., Histological spectrum of ependymomas and correlation of p53 and Ki-67 expression with ependymoma grade and subtype. *Indian J Cancer*, 2004. 41(2): p. 66-71.
92. Ferraraccio, F., M. Accardo, and L. Cuccurullo, [Proliferative activity of ependymomas. (Quantitative analysis of the expression of Ki67 and AgNOR)]. *Pathologica*, 1995. 87(2): p. 112-20.